

CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DE VÍRUS DE MELANCIA ISOLADOS DO ESTADO DO TOCANTINS

Marcio Akio Ootani¹, Gabriela Priscila de Sousa Maciel², Deyvid Rocha Brito³, Raimundo Wagner de Souza Aguiar⁴, Alessandra Maria de Lima Naoe¹ e Larissa Alves Lopes⁶

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o da caracterização dos sintomas dos principais vírus isolados nos campos produtivos de melancia do estado do Tocantins. As amostras foram coletadas em quatro áreas produtoras de melancia: Formoso do Araguaia (F.A.), Lagoa da Confusão (L.C.), Porto Nacional (P.N.) e Gurupi (G.U.). A identificação foi realizada por teste imunoenzimático (dot-ELISA). Em seguida, os isolados foram inoculados em casa de vegetação em plantas de abóbora cv. Caserta e melancia cv. Crimson sweet. As inoculações foram realizadas com os vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV, ZLCV e infecção mista providas das regiões citadas acima. O sucesso das inoculações foi reconfirmado pelo teste dot-ELISA, realizado 30 dias depois a inoculação. Os resultados mostraram que os vírus mais severos em plantas de abóbora e melancia foram: CMV de P.N. e L.C.; ZYMV de G.U. e P.N.; PRSV-W de G.U. e P.N. e WMV de L.C. Os vírus causaram os sintomas mais severos em infecções simples em plantas de abóbora Caserta em ordem decrescente de importância foram os isolados de CMV de P.N. e L.C.; ZYMV de G.U. e P.N.; PRSV-W de G.U. e P.N. e WMV de L.C. Já para as plantas de melancia cv. Crimson sweet foram os isolados de CMV da L.C., P.N. e G.U.; ZYMV de F.A., L.C. e P.N.; PRSV-W da L.C. e G.U. e WMV de F.A. e G.U. O CMV foi o mais agressivo mesmo em associação com outras estirpes seguidas da estirpes PRSV-W e ZYMV tiveram sintomas severo e menor tempo de apresentação dos primeiros sintomas nas quatro regiões.

PALAVRAS-CHAVE: *Citrullus lanatus*, dot-ELISA, Infecção mista, Infecção simples, Severidade.

SYMPTOMATOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATED WATERMELON VIRUS FROM THE STATE OF TOCANTINS

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the symptoms of major virus cucurbit isolated from the watermelon-producing fields of the State of Tocantins. The samples were collected in four watermelon-producing areas (Formoso do Araguaia - F.A.; Lagoa da Confusão - L.C.; Porto Nacional - P.N. and Gurupi - G.U.). Identification was performed by enzyme immune assay (dot-ELISA). Then the isolates were inoculated in a greenhouse in the pumpkin plants cultivate caserta and watermelon crimson sweet. The inoculations were carried out with inoculants of the viruses *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* Watermelon strain (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and mixed infections. The success of inoculations was reconfirmed by dot-ELISA assay performed 30 days after the last inoculation. The results showed that the most severe viruses in pumpkin and watermelon plants were: CMV of P.N. and L.C.; ZYMV of G.U. and P.N.; PRSV-W of G.U. and P.N. and WMV of L.C. The viruses caused the most severe symptoms in simple infections in cultivate caserta pumpkin plants in descending order of importance were the CMV isolates of P.N. and L.C.; ZYMV of G.U. and P.N.; PRSV-W of G.U. and P.N. and WMV of L.C.. Already for the cultivate. Crimson sweet were the CMV isolates from L.C., P.N. and G.U.; ZYMV of F.A., L.C. and P.N.; PRSV-W of L.C. and G.U.; WMV of F.A. and G.U. CMV was the most aggressive even in association with other strains followed by the PRSV-W and ZYMV strains had severe symptoms and shorter time of presentation of the first symptoms in four regions.

Keywords: *Citrullus lanatus*, dot-ELISA, joint infection, simple infection, Severity.

1 Engenheiro Agrônomo, Mestre em Produção vegetal, Doutor em Fitotecnia, Universidade Estadual do Ceara – Av. Humberto Monte s/n, Campus do Pici, CEP 60455-760, Fortaleza (CE), Brasil. (Corresponding author); ootani667@uft.edu.br*.

2 Engenheira Agrônoma, Graduada em agronomia, Universidade Federal do Ceara, Av. Humberto Monte s/n, Campus do Pici, CEP 60455-760, Fortaleza (CE), Brasil. macielpriscilagabi20@hotmail.com.

3 Engenheiro Agrônomo, Mestre em Produção vegetal, Universidade Federal do Tocantins – Chácara 69-72 - Rua Badejos, Lote 7, s/n - Jardim Servilha, CEP: 77404-970, Gurupi - TO, Brasil. dvbrito06@hotmail.com.

4 Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biotecnologia, Professores do Curso de Engenharia em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins – Chácara 69-72 - Rua Badejos, Lote 7, s/n - Jardim Servilha, CEP: 77404-970, Gurupi - TO, Brasil. rwsa@uft.edu.br.

5 Engenheira ambiental, Mestre em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins – Avenida NS 15, Norte, 109 - Plano Diretor Norte, CEP: 77001-090. Palmas - TO, Brasil. alima@uft.edu.br.

6 Engenheiro em Biotecnologia. Mestranda em Bioquímica, Av. Humberto Monte s/n, Campus do Pici, CEP 60455-760, Fortaleza (CE), Brasil. larissalveslopes@gmail.com.

INTRODUÇÃO

A família *Cucurbitaceae* é constituída por aproximadamente 825 espécies, a qual tem grande importância na dieta alimentar e na economia do agronegócio brasileiro por influenciar na geração de empregos diretos e indiretos. O cultivo de cucurbitáceas é praticado em todas as regiões em pequenas e grandes propriedades (Nascimento et al., 2012). No Brasil, o estado do Tocantins tem se destacado na produção de melancia, uma de suas principais fontes da economia. Contudo, a produção está sendo limitada pelo aparecimento de inúmeras doenças. Dentre elas, as de vírus que causam a diminuição da produtividade. Para este artigo, foram identificadas mais de quatro famílias em diferentes cucurbitáceas no Brasil, a saber: família *Potyviridae* do gênero *Potyvirus*, família *Comoviridae* do gênero *Comovirus* e família *Bromoviridae* do gênero *Cucumovirus* e família *Bunyaviridae* do gênero *Tospovirus* (Aguiar et al., 2015).

A utilização de método de controle preventivo tem sido eficaz, contudo muitos produtores não o adotam devido ao aumento dos custos; pois o controle curativo é ineficaz. Diversas viroses têm sido relatadas em cucurbitáceas induzindo diferentes tipos de sintomas que variam desde mosaicos foliares, nanismo a deformações das folhas e frutos. Assim, a severidade e os sintomas se diversificam de acordo com o hospedeiro e a região onde foi coletada (Giampan et al., 2009).

Os vírus depois de infectar a planta age de forma sistêmica e a severidade dos sintomas apresentados é ocasionada principalmente por várias alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, através da ativação e/ou bloqueio de determinadas atividades celulares nas plantas infectadas, como por exemplo, sintomas de clorose que refletem na biossíntese de clorofila (Fauquet et al., 2005).

A diversidade de sintomas e a severidade podem ser observadas, geralmente, quando associada às alterações citológicas na estrutura e na função dos cloroplastos (Domiciano et al., 2009; Desbiez et al., 2009). De modo geral, as infecções virais são capazes de induzir desordens na célula vegetal, que incluem alterações na fotossíntese, na respiração, nas atividades enzimáticas, no transporte de fotoassimilados e no balanço hormonal (Sampol et al., 2003). Em decorrência disto, este processo infeccioso resultará em queda de produtividade e da qualidade da produção (Creazzo et al., 2010).

Infecções virais causam sintomas de mosaico nas folhas e podem levar ao acúmulo de carboidratos, alterar a capaci-

dade fotossintética, afetar o movimento de fotoassimilados e alterar o transporte de elétrons em várias vias metabólicas. Em geral, os vírus causam uma série de perturbações fisiológicas, devido suas infecções, que podem variar com as condições ambientais, tipos de vetores, estirpes dos vírus e tipo de transmissão (Tatineni et al., 2014). Por isso, a correta identificação dos vírus e seus sintomas é um passo importante para definir estratégias para o seu controle. Pensando nisso, sabe-se que os estudos da sintomatologia dos vírus podem servir de base para identificar e indicar as estirpes mais severas e traçar uma estratégia de controles mais adequado (Aguiar et al., 2015).

Em se tratando de vírus de cucurbitáceas, a diagnose no nível de espécies e estirpes é bastante difícil de ser feita com a sintomatologia de plantas no campo, pois a maioria dos vírus induz sintomas muito semelhantes entre si, além de ocorrerem infecções mistas (Lima e Alves, 2011). Os sintomas de vírus podem ser facilmente confundidos, por exemplo, com deficiência nutricional ou diversos fatores abióticos. Por isso, a diagnose correta de cada espécie de vírus exige a realização de análises laboratoriais, principalmente, a sorologia, RT-PCR e o estudo da reação fenotípica (sintomas) em diferentes espécies (López-Fabuel et al., 2013). Contudo, trabalhos de Aguiar et al. (2015) demonstram que a sintomatologia e espécies diferentes é um fator importante para a identificação a nível de campo, pois trabalhos com resultados parecidos têm sido relatado por (Aguiar et al., 2015, Nascimento et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sintomatologia de infecções simples e mistas mostrando que os sintomas é um fator importante na identificação das espécies de vírus no campo e o tempo de infecção nos primeiros dias após a inoculação (DAI) em melancia e abóbora de estirpes isoladas em diferentes municípios do estado do Tocantins.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas nos municípios de Formoso do Araguaia (F. A.), Lagoa da Confusão (L. C.), Porto Nacional (P. N.) e Gurupi (G. U.) de plantas de melancia que apresentavam sintomas suspeitos de viroses como: mosaico (M), deformação (D) e estreitamento do limbo foliar (EF), mosqueados (MQ) e subdesenvolvimento (SD). As folhas com sintomas foram colhidas e envoltas em papel alumínio, identificadas e armazenadas em caixas térmicas com gelo, em seguida foram conduzidas para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, onde foi realizado o teste sorológico dot-ELISA (*Enzyme Linked Immuno sorbent Assay*) com anticorpos específicos para os vírus *Cucumber mosaic vi-*

rus (CMV), *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV), *Papaya ring spot virus strain Watermelon* (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV). As amostras positivas desses vírus foram separadas em função do tipo de infecção simples e mista, identificadas e conduzidas para inoculação em casa de vegetação.

As cultivares utilizadas para inoculação e avaliação dos sintomas foram: abóbora cultivar Caserta e melancia cultivar Crimson sweet, ambas provenientes da empresa Sakata Seed Sudamerica. As plântulas foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 2 litros, onde foram mantidas três plantas por vaso. Os vasos foram preenchidos com substrato de terra e esterco na proporção de 2:1 respectivamente, mais adubação química 250 g de 5-25-15 NPK para 0,5 m³ de substrato.

Os cinco vírus em infecções simples e mistas foram inoculados duas vezes, sendo que a primeira inoculação foi realizada na fase cotiledonar e a segunda inoculação foi feita três dias após a primeira. As inoculações foram efetuadas com as estirpes obtidas, ambos preparados através da maceração de tecidos vegetais infectados, com a adição de tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄; 0,01 M; pH 7.0) e 0,1% de sulfito de sódio (Na₂SO₃) na proporção 1g de tecido para 2 ml de solução. Em seguida, a suspensão viral foi friccionada nas folhas cotiledonares das mudas previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh) (Lima e Alves, 2011). Após isso, as evoluções dos sintomas nas plantas inoculadas nos diferentes tratamentos foram acompanhadas diariamente até 30 dias após a última inoculação, fazendo comparações e anotações fotografadas das características sintomatológicas.

O experimento de inoculação foi realizado em vasos de acordo com os vírus encontrados nas amostras de cada município. Levando em consideração as infecções simples e mistas, a disposição dos vasos foram 12 vasos com abóboras e 12 com melancia contendo três plantas por vaso, e por região (Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão, Porto Nacional e Gurupi). As infecções mistas entre as regiões foram variáveis como; CMV+ZYMV; PRSV-W+CMV e PRSV+ZLCV em Formoso do Araguaia; CMV+ZYMV e WMV+CMV em Lagoa da Confusão; CMV+ZYMV, PRSV-W+CMV e ZYMV+PRSV-W em Porto Nacional e CMV+ZYMV, ZYMV+PRSV-W e ZLCV+CMV em Gurupi. A testemunha foi composta de plantas de abóbora e melancia sem inoculação com os vírus.

A presença dos vírus nas plantas com infecção simples ou mista foram reconfirmadas pelo teste dot-ELISA descritos por Aguiar et al. (2015). Após 30 dias depois da última inoculação das plantas sintomáticas foram realizados os testes de dot-ELISA. Conforme os procedimentos que consiste na deposição do extrato da planta diluído (1:100) em tampão PBS (NaH₂PO₄H₂O 0,08 M; K₂HPO₄0,02 M; NaCl1,40 M; KCl0,02 M e pH 7,4), foi colocado 100 µL equivalente a uma gota do extrato com o tampão sobre membranas de nitrocelulose.

As demais etapas do procedimento foram conduzidas sob agitação em mesa agitadora, à temperatura ambiente, com imersão das membranas em solução PBS contendo 3% de leite em pó desnatado, por 3 horas, para bloquear os sítios das membranas não ocupados pelo antígeno e, em seguida, imersão em antissoro específico produzido contra a capa proteica dos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W e WMV, diluídos (1:1000) em PBS, *overnight*. A lavagem das membranas foi realizada três vezes em PBS, permanecendo nesta solução por cerca de três minutos.

A incubação das membranas no conjugado universal (anti-imunoglobulina produzido em coelho e conjugado à enzima fosfatase alcalina) foi realizada na diluição 1:1000 em PBS, por 3 horas e, em seguida, procedeu-se ao enxágue em PBS. Na revelação utilizou-se água destilada e autoclavada, contendo BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) e NBT (Nitro blue tetrazolium). As membranas ficaram imersas na solução, na ausência de luz até o surgimento dos resultados. Na avaliação dos resultados, as amostras positivas apresentaram coloração arroxeada como resultado da formação de precipitado pela ação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato BCIP e NBT.

Os dados foram analisados pela sua sintomatologia e incidência das plantas inoculadas através do teste t de student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os vírus estudados na presente pesquisa, quando inoculados isoladamente e em infecções simples e mistas em plantas de abóbora cv. Caserta e melancia e cv. Crimson sweet, causaram danos desde mosaico (M) leve a mosaico (M) severo, com deformações foliares (Df), mosqueados (MQ), subdesenvolvimento e florescimento precoce (Figura 1), sendo que estes genótipos utilizados são considerados suscetíveis aos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV e ZLCV.

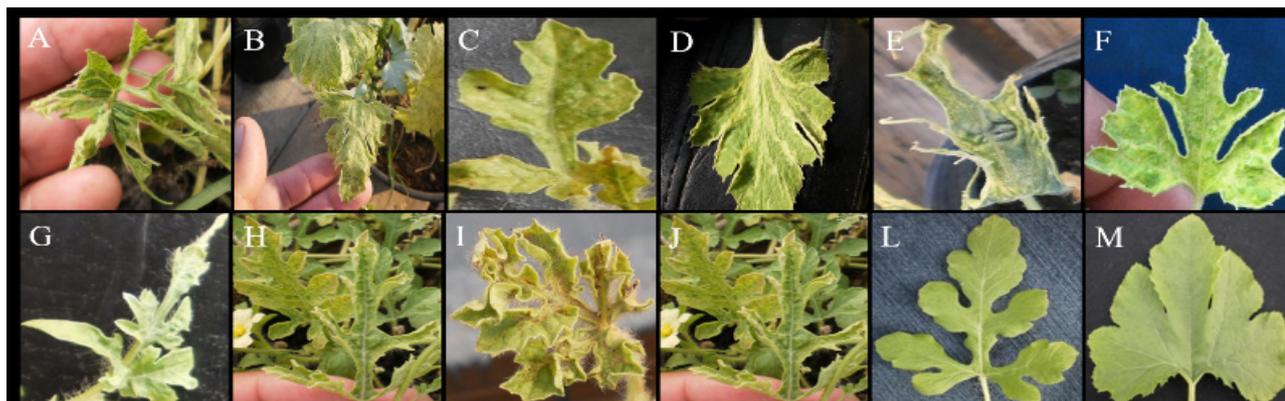


Figura 1. Folhas de abóbora cv. Caserta e melancia cv. Crimson sweet com sintomas de vírus após inoculação mecânica dos isolados de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão, Porto Nacional e Gurupi. Sendo: A= PRSV-W+ZYMV em abóbora; B= CMV+ZYMV em abóbora; C= CMV em Abóbora; D= ZYMV; em abóbora E= PRSV-W; em abóbora; F= WMV em abóbora; G= CMV em melancia; H= ZYMV em melancia; I= PRSV-W em melancia; J= WMV em melancia; L= Testemunha melancia e M= Testemunha em abóbora.

Os resultados concordam com os encontrados na presente pesquisa, conforme demonstrados na Tabela 1. Desta forma foi possível observar também alta severidade das infecções mistas PRSV-W+ZYMV (Figura 1A) e CMV+ZYMV (Figura 1B). Foi observado que o CMV apareceu em infecção mista com todos os Potyvirus aqui estudados (ZYMV, PRSV-W e WMV). Isso é explicado pelo fato do CMV ter um sinergismo comprovado com os Potyvirus (Aguiar et al., 2015). Segundo Lima (2011), apesar dos sintomas destes vírus serem semelhantes nas cucurbitáceas, ainda assim é possível caracterizá-los fenotipicamente, observando atentamente o conjunto de sintomas descritos para cada uma de suas espécies.

A planta infectada com CMV pode apresentar mosaico, mosqueado em folhas, amarelecimento e redução no desenvolvimento da planta, além de distorção em frutos e folhas (Gil et al., 2011). Para o ZYMV os sintomas descritos são: descoloração internerval. Com o avanço da doença surge sintomas de mosaico, caracterizado por áreas verdes e áreas amareladas, bolhosidade, necrose, redução e deformação do limbo foliar, porém não há severa redução no desenvolvimento da planta e na produção de frutos (Fletcher et al., 2000; Desbiez et al., 2003).

O PRSV-W pode apresentar, na maioria das vezes, nas folhas mais novas da planta, amarelecimento entre as nervuras. Posteriormente, surgem sintomas de mosaico verde escuro e verde mais claro, bolhosidade e deformação foliar. No caso de deformação, pode ocorrer estreitamento do limbo foliar e a folha pode ficar reduzida às nervuras. Plan-

tas com severa infecção ficam com o subdesenvolvimento (Azevedo et al., 2012). Os sintomas induzidos por WMV em plantas infectadas são bastante semelhantes aos causados pelo PRSV-W como mosqueado, mosaico, rugosidade e deformação foliar (Herrington et al., 2001). Plantas afetadas pela doença apresentam ainda redução na produtividade e na qualidade dos frutos. Com relação aos sintomas do ZLCV, dependendo da espécie de cucurbitácea afetada, as plantas podem exibir tonalidade verde mais claro nas folhas, mosaico amarelo, clorose e encurvamento dos bordos das folhas mais novas e necrose nas mais velhas, rugosidade, internódios curtos, epinastia, deformação foliar e necrose da haste. Plantas doentes apresentam redução no desenvolvimento e queda na produtividade (Lima, 2011).

A maioria desses sintomas descritos foi observada inicialmente nas plantas inoculadas com esses vírus em infecções simples e mista nos genótipos de abóbora e melancia utilizados na presente pesquisa, com uma variação dos genótipos e vírus de cada município, conforme representado na Tabela 1. As estirpes de vírus da região de Formoso do Araguaia (F.A.) inoculadas em abóbora caserta apresentaram sintomatologia severa para infecção mista (PRSV-W+ZYMV) e para CMV, onde os sintomas iniciais começaram a aparecer aos 6 DAI para ambos genótipos, onde a inoculações foram as que tiveram maior porcentagem de plantas infectadas 91,66 e 83,33% respectivamente, observando que o CMV foi severo com sintomas na melancia, contudo não causou subdesenvolvimento (SD) das plantas.

Tabela 1. Caracterização fenotípica dos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV e ZLCV coletados no município de Formoso de Araguaia (F.A.) em infecções simples e mistas inoculados mecanicamente em genótipos de abóbora Caserta (*Cucurbita pepo* L.) e melancia Crimsom sweet (*Citrullus lanatus*).

Região	Genótipo	Vírus	Plantas inoculadas x3	Plantas com Sintomas médias	Primeiros sintomas (DAI)	Sintomas 30 (DAI)
F. A.	Caserta	PRSV-W+-ZYMV	12	11 (91,66)±0,02**	6	EF; M; BF; DF; CS; SD
F. A.	Caserta	CMV+ZYMV	12	8 (66,66)±0,03**	13	M; BF; DF; SD
F. A.	Caserta	PRSV-W+ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
F. A.	Caserta	CMV	12	10 (83,33)±0,01**	6	EF; M; BF; BL; DF; FP
F. A.	Caserta	ZYMV	12	9 (75,00)±0,04**	8	M; DF; FP; SD
F. A.	Caserta	PRSV-W	12	9 (75,00)±0,06**	11	EF; M; BF; DF; SD;
F. A.	Caserta	WMV	12	7 (58,33)±0,03**	16	EF; M; BF; DF
F. A.	Caserta	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
F. A.	Caserta	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			108	54 (50,00%)		
F. A.	Melancia	CMV	12	8 (66,66)±0,04**	6	M; BL; DF; FP
F. A.	Melancia	ZYMV	12	6 (50,00)±0,02**	7	EF; M; BF; BL; DF; FP; SD
F. A.	Melancia	PRSV-W	12	7 (53,33)±0,01**	10	EF; M; DF; SD
F. A.	Melancia	WMV	12	10 (83,33)±0,03**	13	M; DF; FP; SD; MQ
F. A.	Melancia	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
F. A.	Melancia	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			72	31 (43,05%)		

DAI= Dias Após Inoculação. Sintomas: SS= Sem Sintomas; EF= Estreitamento Foliar; M= Mosaico; BF= Bordas Franzinas; BL= Formação de Bolha; DF= Deformação Foliar; FP= Florescimento Precoce; SD= Subdesenvolvimento; MQ= Mosqueado; CS= Cordão de Sapato; BE= Bordo Encurvado.

Houve uma grande variação no surgimento dos primeiros sintomas até no máximo 16 dias após a inoculação. Segundo Aguiar et al. (2015), isto é considerado comum em experimentos realizados nessas condições controladas de casa de vegetação. Nascimento et al. (2012) ainda relatam que alguns isolados de vírus que afetam as cucurbitáceas após inoculação, podem se apresentar de forma latente em muitos genótipos. Nesse caso, muitas plantas quando infectadas não mostram os sintomas característicos da doença, porém quase sempre ocorre redução do crescimento normal da planta e o genótipo é caracterizado como

tolerante.

Na estirpe da Lagoa da Confusão os vírus CMV e PRSV-W foram os mais severos, apresentando sintomas aos 4 DAI para abóbora Caserta e aos 5 DAI para melancia. Na avaliação dos isolados coletados na Lagoa da Confusão, foi possível observar que a infecção mista mais severa para as plantas de abóbora cv. Caserta foi CMV+-ZYMV e em infecção simples ZYMV com 83%. Já para infecção simples, o CMV (100%) se mostrou o mais severo para as plantas de abóbora quando comparado às outras

plantas inoculadas com os demais vírus, sendo que apresentou número de sintomas e severidade semelhante a infecção mista CMV+ZYMV. O segundo vírus mais severo para as plantas de abóbora foi o CMV. Ainda com relação

aos isolados da Lagoa da Confusão, observou-se que o PRSV-W foi o vírus mais severo, seguido pelo CMV, apresentando diversos sintomas, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização fenotípica dos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV e ZLCV coletados no município de Lagoa da Confusão (L.C.) em infecções simples e mistas inoculados mecanicamente em genótipos de abóbora Caserta (*Cucurbita pepo* L.) e melancia Crimsom sweet (*Citrullus lanatus*).

L. C.	Abóbora	CMV+ZYMV	12	10 (83,33)±0,03**	5	EF; M; BF; BL; DF; SD
L. C.	Abóbora	WMV+CMV	12	8 (66,66)±0,02**	7	M; DF; FP; SD; MQ
L. C.	Abóbora	CMV	12	12 (100,0)±0,00**	5	M; BL; DF; FP; SD; MQ
L. C.	Abóbora	ZYMV	12	10 (83,33)±0,01**	7	M; BL; DF
L. C.	Abóbora	PRSV-W	12	9 (75,00)±0,04**	5	EF; BF; DF; FP; SD
L. C.	Abóbora	WMV	12	8 (66,66)±0,03**	9	EF; M; BL; DF; SD; MQ
L. C.	Abóbora	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
L. C.	Abóbora	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			108	57 (52,77%)		
L. C.	Melancia	CMV	12	10 (83,33)±0,01**	4	M; DF; FP; SD; MQ
L. C.	Melancia	ZYMV	12	8 (66,66)±0,04**	5	M; BF; BL; DF; SD
L. C.	Melancia	PRSV-W	12	8 (66,66)±0,02**	4	EF; M; BF; BL; DF; SD
L. C.	Melancia	WMV	12	6 (50,00)±0,03**	14	M; DF; MQ
L. C.	Melancia	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
L. C.	Melancia	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			72	32 (44,44%)		

DAI= Dias Após Inoculação. Sintomas: SS= Sem Sintomas; EF= Estreitamento Foliar; M= Mosaico; BF= Bordas Franzinas; BL= Formação de Bolha; DF= Deformação Foliar; FP= Florescimento Precoce; SD= Subdesenvolvimento; MQ= Mosqueado; CS= Cordão de Sapato; BE= Bordo Encurvado.

Nos isolados de Porto Nacional, foi possível observar que a infecção mista foi mais severa em plantas de abóbora inoculadas com CMV+PRSV-W, comprometendo totalmente o desenvolvimento das plantas. Com relação às infecções simples, o CMV se mostrou mais severo dentre os demais vírus, onde os sintomas apresentados foram severos e semelhantes quando comparados à infecção mista CM-

V+PRSV-W. Em seguida, a infecção simples mais severa para as plantas de abóbora foi a causada pelo PRSV-W. Com relação às plantas de melancia inoculadas com os mesmos isolados de Porto Nacional, foi possível perceber que o ZYMV foi o mais severo, seguido pelo CMV, apresentando diversos sintomas severos para as plantas, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização fenotípica dos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV e ZLCV coletados no município de e Porto Nacional (P.N.) em infecções simples e mistas inoculados mecanicamente em genótipos de abóbora Caserta (*Cucurbita pepo* L.) e melancia Crimson sweet (*Citrullus lanatus*).

Região	Genótipo	Vírus	Plantas inoculadas x 3	Plantas com Sintomas medias	Primeiros sintomas (DAI)	Sintomas 30 (DAI)
P. N.	Abóbora	CMV+ZYMV	12	11 (91,66)±0,01**	6	EF; M; BF; BL; DF; SD
P. N.	Abóbora	PRSV-W+CMV	12	8 (66,66)±0,02**	5	EF; BF; BL; DF; SD; MQ
P. N.	Abóbora	CMV	12	12 (100,00)±0,00**	4	EF; M; BL; DF; FP; SD; MQ
P. N.	Abóbora	ZYMV	12	8 (66,66)±0,02**	6	M; BL; DF; FP; SD
P. N.	Abóbora	PRSV-W	12	10 (83,33)±0,03**	5	EF; M; BF; BL; DF; SD
P. N.	Abóbora	WMV	12	8 (66,66)±0,01**	7	M; DF; FP; SD; MQ
P. N.	Abóbora	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
P. N.	Abóbora	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			108	65 (56,48%)		
P. N.	Melancia	CMV	12	10 (83,33)±0,01**	7	EF; M; BF; DF; SD
P. N.	Melancia	ZYMV	12	11 (91,66)±0,02**	6	M; BL; DF; SD; MQ
P. N.	Melancia	PRSV-W	12	8 (66,66)±0,03**	9	EF; BF; DF; FP; SD
P. N.	Melancia	WMV	12	8 (66,66)±0,01**	12	M; DF; SD; MQ
P. N.	Melancia	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
P. N.	Melancia	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			72	37 (48,61%)		

DAI= Dias Após Inoculação. Sintomas: SS= Sem Sintomas; EF= Estreitamento Foliar; M= Mosaico; BF= Bordas Franzinas; BL= Formação de Bolha; DF= Deformação Foliar; FP= Florescimento Precoce; SD= Subdesenvolvimento; MQ= Mosqueado; CS= Cordão de Sapato; BE= Bordo Encurvado.

Os vírus que apresentaram uma maior taxa de transmissão por inoculação mecânica foram ZYMV e CMV, sendo que esse último foi transmitido para todas as plantas inoculadas de abóbora Caserta com os isolados de todas as quatro regiões. Porém, os inóculos dos demais municípios também apresentaram altos valores de eficiência nas inoculações mecânicas.

As estirpes CMV e a infecção dupla CMV+ZYMV de

Gurupi os sintomas em abóbora caserta tiveram maior severidade e apresentou sintomas aos 4 e 5 DAI. Contudo, na melancia Crimson sweet as estirpes CMV, PRSV-W e ZYMV foram os mais severos Tabela 4. Segundo Gil et al. (2011), a fácil transmissão de CMV para plantas cucurbitáceas pode ser explicada devido o CMV ser um vírus de fácil transmissibilidade e possuir uma característica que lhe torna altamente virulento, pois apenas a sua capa proteica no interior da célula vegetal já é capaz de causar sintomas na planta.

Tabela 4. Caracterização fenotípica dos vírus CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV e ZLCV coletados no município de Gurupi (G.U.) em infecções simples e mistas inoculados mecanicamente em genótipos de abóbora Caserta (*Cucurbita pepo* L.) e melancia Crimsom sweet (*Citrullus lanatus*).

Região	Genótipo	Vírus	Plantas inoculadas x 3	Plantas com Sintomas	Primeiros sintomas (DAI)	Sintomas (30 DAI)
G.U.	Abóbora	CMV+ZYMV	12	12 (100,00)±0,00**	5	EF; M; BF; BL; DF; SD
G.U.	Abóbora	ZYMV+PRSV-W	12	9 (75,00)±0,03**	10	EF; M; BF; BL; DF; SD
G.U.	Abóbora	ZLCV+CMV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
G.U.	Abóbora	CMV	12	10 (83,33)±0,01**	4	M; BL; DF; SD
G.U.	Abóbora	ZYMV	12	11 (91,66)±0,02**	5	EF; M; BF; DF; FP; SD
G.U.	Abóbora	PRSV-W	12	9 (75,00)±0,04**	5	EF; M; BF; BL; DF; SD; CS
G.U.	Abóbora	WMV	12	11 (91,66)±0,003**	7	M; BL; DF; SD; MQ
G.U.	Abóbora	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
G.U.	Abóbora	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			108	42 (38,88%)		
G.U.	Melancia	CMV	12	11 (91,66)±0,02**	5	EF; M; BL; DF; SD
G.U.	Melancia	ZYMV	12	9 (75,00)±0,01**	5	M; BL; DF; SD
G.U.	Melancia	PRSV-W	12	7 (53,33)±0,03**	7	EF; M; BF; DF; FP; SD
G.U.	Melancia	WMV	12	6 (50,00)±0,04**	10	M; DF; FP; SD; MQ
G.U.	Melancia	ZLCV	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
G.U.	Melancia	Testemunha	12	0 (0,00)±0,00	-----	SS
Total			72	33 (45,83%)		

DAI= Dias Após Inoculação. Sintomas: SS= Sem Sintomas; EF= Estreitamento Foliar; M= Mosaico; BF= Bordas Franzinas; BL= Formação de Bolha; DF= Deformação Foliar; FP= Florescimento Precoce; SD= Subdesenvolvimento; MQ= Mosqueado; CS= Cordão de Sapato; BE= Bordo Encurvado.

Segundo Mandakombo et al. (2013), na maioria das vezes, os sintomas causados pela interação de dois vírus em infecção mista são bem mais severos e diferentes dos encontrados em infecções simples, o que indica sinergismo entre esses vírus e o aumento da capacidade de replicação viral e disseminação sistêmica na planta infectada. Aguiar et al. (2015), estudando infecções mistas de ZYMV+PRSV inoculados em plantas de melancia cv. Charleston Gray e

plantas de abóbora cv. Caserta, constataram aumento de severidade de sintomas relacionados ao subdesenvolvimento de planta e de folhas, mosaico, bolhosidade, deformação foliar e cordão de sapato.

Na variedade Crimson Sweet, os sintomas apresentados pelas plantas com infecção dupla foram bem mais severos do que os apresentados pelo PRSV inoculado isoladamente e com maior intensidade do que os apresentados

por ZYMV.

Métodos de inoculação mecânica têm tornado possível a transmissão de vários vírus não previamente transmitidos mecanicamente, mas a eficácia dos melhores métodos atuais ainda é considerada baixa para alguns vírus, quando comparados com a transmissão pelos vetores, pois a introdução dos vírus pelos insetos é feita diretamente na célula do floema onde se alimentam, o que possibilita o maior sucesso para o início da replicação e movimento viral. Por isso, além de a eficiência da inoculação pelos vetores ser maior, os sintomas nesses casos são apresentados fenotipicamente pelas plantas mais rapidamente, algo que é mais trabalhoso com a inoculação mecânica (Santos et al., 2004).

Entre os progressos na transmissão mecânica de vírus de plantas podem ser citados o uso de abrasivos, adição de tampão de fosfato, sulfito e outros produtos químicos para aumentar a eficiência do inóculo (Mandal et al., 2008), contudo não foi possível observar a transmissão de forma mecânica do vírus ZLCV. A dificuldade de transmissão mecânica artificial em experimentos também foi relatada em vários outros trabalhos (Giampan et al., 2007; Tsompana e Moyer, 2008). Um exemplo disso, foi o relatado por Giampan et al. (2007) que, em testes complementares, observaram que em abóbora Caserta nenhuma planta foi infectada pelo vírus ZLCV. Além de observar que todas as tentativas de transmitir o ZLCV mecanicamente para as plantas em casa de vegetação falharam, observaram também que oito de 35 plantas cultivadas em campo foram naturalmente infectadas pelo vírus através dos vetores (Thysanoptera: Thripidae) (Rotenberg et al., 2015). Os mesmos problemas foram encontrados por Giampam (2007) que não obteve sucesso na inoculação mecânica de ZLCV em plantas de abóbora moranga e abobrinha de moita, onde em várias repetições, do total de oito plantas inoculadas, nenhuma dessas apresentou sintomas, confirmado pelos testes biológicos, PTA-ELISA e RT-PCR. Nagata et al. (2007) estudando um tospovírus encontrado naturalmente infectando *Chrysanthemum grandiflorum*, verificaram que não foi transmitido para as mesmas espécies por meio de inoculações mecânicas. Esses autores atribuíram esse fato à maior eficiência de tripes, vetor que transmite esse vírus, quando comparado ao método usado na transmissão experimental. Esse fato pode ser explicado através da observação feita por Pappu et al. (2009), uma vez que esse vírus se replica no citoplasma, e onde os corpos de inclusão fibrosos podem ser facilmente observados em plantas infectadas. Os vetores (Thysanoptera: Thripidae) são mais eficientes na transmissão desse vírus ZLCV, pois conseguem introduzir as partículas virais o mais próximo possível do citoplasma

da célula das plantas, onde conseguem se replicar e, a partir daí, causar sintomas nas plantas. Isto seria mais difícil de ocorrer com poucas passagens mecânicas. Por isso, acredita-se que esse seja um dos motivos principais da dificuldade de infecção dos hospedeiros da família Cucurbitaceae de forma mecânica principalmente desse vírus (Lima et al., 2009; Yuki et al., 2000).

CONCLUSÃO

O CMV foi o mais agressivo mesmo em associação com outras estirpes seguidas da estirpes PRSR-W e ZYMV tiveram sintomas severo e menor tempo de apresentação dos primeiros sintomas nas quatro regiões da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, R.W.S.; Rodrigues, A.; Portella, A.C.F.; Lopes, M.M.; Lima, M.F.; Ro, R. & Nagata, T. (2015). Serological Identification of Virus in Watermelon Production Fields in the Tocantins State. **Brazilian archives of biology and technology** 58(2): 192-197. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400219>.
- Azevedo, S.M.; Maluf, W.R.; Faria, M.V.; De Resende, J.T.V.; De Menezes, C.B. & Nascimento, I.R. (2012). Inheritance of resistance to the Papaya ringspot virus-watermelon strain (PRSV-W) from watermelon accession 'PI 595201'. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12(1): 67-75. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332012000100009>
- Cretazzo, E.; Padilha, C.; Carambula, C.; Hita, I.; Salmerón, E. & Cifre, J. (2010). Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. **Annals of Applied Biology** 156(1): 1-12. <http://dx.doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00355.x>.
- Desbiez, C.; Gal-On, A.; Girard, M.; Wipf-Scheibel, C. & Lecoq, H. (2003). Increase in Zucchini yellow mosaic virus Symptom Severity in Tolerant Zucchini Cultivars Is Related to a Point Mutation in P3 Protein and Is Associated with a Loss of Relative Fitness on Susceptible Plants. **Phytopathology** 93(12): 1478-1484. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.12.1478>
- Desbiez, C.; Joannon, B.; Wipf-Scheibel, C.; Chandeysson, C. & Lecoq, H. (2009). Emergence of new strains of Watermelon mosaic virus in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. **Virus Research** 141(2): 201-208. <http://dx.doi:10.1016/j.virusres.2008.08.018>
- Domiciano, G.P.; Resende, R.S.; Rodrigues, F.A. & Da Matta, F.M. (2009). Alterações na fotossíntese de plantas

- infectadas por patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 17: 305-339.
- Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. & Bali, L.A.A. (2005). **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2nd. San Diego, Ca: Academic Press. 1162p.
- Filho, F.A.C.R.; Carvalho, K. F.; Lima, J.A.A.; Queiroz, M.A.; Paiva, W.O. & Nascimento, A.K.Q. (2010). Fontes de resistência em melancia e meloeiro a vírus do gênero Potyvirus. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 5(2): 187-191. [http://dx.doi: 10.5039/agraria.v5i2a643](http://dx.doi:10.5039/agraria.v5i2a643)
- Fletcher, J.D.; Wallace, A.R. & Rogers, B.T. (2000). Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science** 28(1): 17-26. <http://dx.doi:10.1080/01140671.2000.9514118>
- Giampan, J.S.; Rezende, J.A.M. & Silva, R.F. (2007). Reaction of cucurbits species to infection with Zucchini lethal chlorosis virus. **Scientia Horticulturae** 114(2): 129-132. <http://dx.doi:10.1016/j.scienta.2007.05.015>
- Gil, L.; Yaron, I.; Shalitin, D.; Sauer, N.; Turgeon, R. & Wolf, S. (2011). Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. **The Journal Plant** 66(2): 366-374. <http://dx.doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04498.x>
- Herrington, M.E.; Prytz, S.; Wright, R. M.; Walker, I.O.; Brown, P.; Persley, D.M. & Greber, R.S. (2001). 'Dulong QHI' and 'Redlands Trailblazer', PRSV-W-, ZYMV-, and WMV-resistant winter squash cultivars. **Hortscience** 36(4): 811-812.
- Lima, M.F. & Alves, R.C. (2011). **Levantamento de vírus em cucurbitáceas no Brasil**, no período 2008-2010. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 76: Embrapa Hortaliças, 26p. Disponível em: http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2011/bpd_76.pdf. Acesso em: 06 Dez. 2015.
- Lima, M.F. (2011). **Viroses de cucurbitáceas**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Circular Técnica 95, Brasília, DF, Disponível em: http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2011/ct_95.pdf. Acesso em: 26 Nov. 2015.
- Lima, M.F.; Nagata, T.; Neves, F.M.; Inoue-Nagata, A.K.; Moita, A.W.; Sousa, C.; Della Vecchia, M.; Rangel, M.G.; Dias, R.C.S.; Dutra, L.S. & Ávila, A.C. (2009) Detecção por sorologia do Melon yellowing associated virus (MYaV) em áreas produtoras de melão no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira** 27(4): 478-483.
- Lopez-Fabuel, I.; Wetzel, T.; Bertolini, E.; Bassler, A.; Vidal, E.; Torres, L.B.; Yuste, A. & Olmos, A. (2013). Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. **Journal of Virological Methods** 188(2): 21-24. <http://dx.doi:10.1016/j.jviro-met.2012.11.034>.
- Mandakombo, Y.N.B.; Reynaud, B. & Jean-Michel, L. (2013). Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Central African Republic reveals the importance of mixed viral infection and poor health of plant cuttings. **Crop Protection** 44: 6-12. <http://dx.doi:10.1016/j.cropro.2012.10.010>
- Mandal, B.; Csinos, A.S.; Martinez-Ochoa, N. & Pappu, H.R. (2008). A rapid and efficient inoculation method for Tomato spotted wilt tospovirus. **Journal of Virological Methods** 149(1): 195-198. <http://dx.doi:10.1016/j.cropro.2012.10.010>
- Nagata, T.; Carvalho, K.R.; Sodre, R.D.A.; Dutra, L.S.; Oliveira, P.A.; Noronha, E.F.; Lovato, F.A.; Resende, R.D.O.; De Avila, A.C. & Inoue-Nagata, A.K. (2007). The glycoprotein gene of Chrysanthemum stem necrosis virus and Zucchini lethal chlorosis virus and molecular relationship with other tospoviruses. **Virus Genes** 35(3): 785-793. <http://dx.doi:10.1007/s11262-007-0107-y>
- Nascimento, I.R.; Santos, L.B.; Sarmiento, R.A.; Figueira, A.R.; Oliveira, G.I.S. & Aguiar, R.W.S. (2012). Reação fenotípica de genótipos de abóboras ao vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Pappayaringspotvirus*, strain watermelon - PRSV-W). **Bioscience Journal** 28(2): 191-197.
- Pappu, H.R.; Jones, R.A.C. & Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. **Virus Research** 141(2): 219-236. <http://dx.doi:10.1016/j.virus-res.2009.01.009>
- Ramos, N.F.; Lima, J.A.A. & Goncalves, M.F.B. (2003). Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira** 28(2): 199-204.
- Rotenberg, D.; Jacobson, A.L.; Schneewis, D.J. & Whitfield, A.E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. **Current Opinion in Virology** 15: 80-89. <http://dx.doi:10.1016/j.coviro.2015.08.003>

- Sampol, T.; Bota, J.; Medrano, H. & Flexas, J. (2003). Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. **New Phytologist** 160(2): 403-412. <http://dx.doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00882.x>
- Santos, C.D.G.; Ávila, A.C.D.; Inoue-Nagata, A.K. & Resende, R.O. (2004). Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira** 29(4): 450-455. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400017>
- Tatineni, S.; Kovacs, F. & French, R. (2014). Wheat streak mosaic virus infects systemically despite extensive coat protein deletions: identification of virion assembly and cell-to-cell movement determinants. **Journal Virology** 88(2): 1366-80. <http://dx.doi:10.1128/JVI.02737-13>
- Tsompana, M.T. & Moyer, J.W. (2008). Tospovirus. In: Mahy, B.W.J. & van Regenmortel, M.H.V. **Encyclopedia of Virology**. 3rd ed. San Diego, Ca: Elsevier, p. 157-163.
- Yuki, V.A., Rezende, J.A. M., Kitajima, E.W., Barroso, P.A.V., Kuniyuki, H., Groppo, G.A. & Pavan, M.A. (2000). Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease** 84: 516-520.