

# **AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE CINCO VÍRUS EM GENÓTIPOS DE ABÓBORAS E MORANGAS (*Cucurbita spp.*), EM EXPERIMENTO A CAMPO**

**Tadeu Souza<sup>1</sup>; Mirtes Freitas Lima<sup>2</sup>; Giovani Bernardo Amaro<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bolsista- ITI/CNPq, e-mail: souza.tadeu@hotmail.com; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Cx. Postal 218, 70359-970, Brasília-DF, e-mail: mirtes.lima@embrapa.br; giovani.amaro@embrapa.br

## **RESUMO**

As viroses que afetam abóboras e morangas situam-se entre as doenças mais importantes dessas culturas podendo causar severas perdas. Dessa forma, a identificação de fontes de resistência a serem utilizadas em programas de melhoramento é altamente desejável. Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de *Papaya ringspot virus* (PRSV-W), *Watermelon ringspot virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and, *Cucumber mosaic virus* (CMV) em 52 genótipos de abóboras e morangas em 2012 (30) e 2013 (22). O experimento foi instalado no campo, em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições e cinco plantas por parcela. A avaliação das plantas foi realizada de 45-50 dias após o plantio, pela análise de folhas em NCM-ELISA, utilizando-se antissoros policlonais. ZYMV, ZLCV e CMV foram detectados nos genótipos nos dois anos considerados, entretanto, PRSV-W (6,77%) e WMV (13,94%) ocorreram apenas em 2012. O ZYMV foi o mais frequente nas plantas avaliadas em 2012 (15,13%) e 2013 (9,01%). A incidência do ZLCV foi 5,57% (2012) e 6,01% (2013). Na avaliação de 2012, três genótipos de moranga (CNPH 972088; CNPH 972183; CNPH 972044) e um de abóbora (CNPH 961400) mantiveram-se livres de infecção por esses vírus. Na avaliação realizada em 2013, não foram detectados vírus em nove genótipos de abóbora (CNPH 10671; CNPH 1987; CNPH 2063; CNPH2528; CNPH 2124; CNPH 3001; CNPH 2530; cv. Itapuã; cv. Maranhão) e um de moranga (CNPH 2528). Testes adicionais de inoculação mecânica com cada um dos vírus devem ser realizados em condições controladas, em casa de vegetação para confirmação da resistência.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Papaya ringspot virus* (PRSV-W), *Watermelon ringspot virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and, *Cucumber mosaic virus* (CMV)

## **ABSTRACT**

## **Evaluation of the incidence of five viruses in squash and pumpkin genotypes (*Cucurbita* spp.), in field-grown plants**

Viral diseases are considered one of the main problems in the production of squashes and pumpkins (*Cucurbita* spp.) leading to severe yield losses. Therefore, the identification of genotypes to be used as sources of resistance to viruses is highly desirable. The objective of this work was to evaluate the incidence of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W), *Watermelon ringspot virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and, *Cucumber mosaic virus* (CMV) in field-grown plants of 52 squash and pumpkin genotypes in 2012 (30) and 2013 (22). The field assays were carried out in a randomized block design, with three replicates and 5 plants per plot. Plant evaluation was performed at 45 to 50 days after planting into the field. Extracts of leaf samples were submitted to NCM-ELISA test using polyclonal antibodies. ZYMV, ZLCV and CMV were detected in both years, 2012 and 2013; however, PRSV-W (6,77%) and WMV (13,94%) were found only in 2012. ZYMV was the most frequent in 2012 (15,13%) and 2013 (9,01%). ZLCV incidence was 5,57% (2012) and 6,01% (2013). Three pumpkin genotypes (CNPB 972088; CNPB 972183; CNPB 972044) and one squash genotype (CNPB 961400) were free of virus infection in 2012 evaluation. In 2013 evaluation, for nine squash genotypes (CNPB 10671; CNPB 1987; CNPB 2063; CNPB2528; CNPB 2124; CNPB 3001; CNPB 2530; cv. Itapuã; cv. Maranhão) and one pumpkin genotype (CNPB 2528) those viruses were not detected. Additional tests consisting of mechanical inoculation, under controlled conditions in greenhouse, with each one of those viruses must be performed for those selected genotypes to confirm virus resistance.

**Keywords:** *Papaya ringspot virus*- type watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and, *Cucumber mosaic virus* (CMV)

## **INTRODUÇÃO**

Entre os problemas fitossanitários que afetam abóboras e morangas, as doenças de origem viral destacam-se pela complexidade, devido à dificuldade de controle, e pelos danos causados, podendo tornar-se limitante à produção e resultar em baixa produção e baixa qualidade dos frutos. A incidência assim como também a severidade dessas doenças pode variar segundo a interação patógeno, hospedeiro, vetor e meio ambiente

(Provvidenti, 1996). Os vírus mais importantes infectando abóboras e morangas no Brasil pertencem aos gêneros *Potyvirus* (*Papaya ringspot virus*- type watermelon - PRSV-W; *Watermelon mosaic virus* - WMV-2; *Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus* - CMV), transmitidos por pulgões, e *Tospovirus* (*Zucchini lethal chlorosis virus* - ZLCV) transmitidos por tripses. Esses vírus são encontrados infectando diversas espécies de cucurbitáceas no Brasil (Lima & Alves, 2011).

A resistência genética a esses patógenos, em cultivares comerciais, tem sido considerada a forma mais eficiente de controle. Dessa forma, a identificação de genótipos resistentes que possam ser utilizados em programas de melhoramento de *Cucurbita* spp., é altamente desejável.

O Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Hortaliças possui cerca de três mil acessos de abóboras (*Cucurbita moschata*) e morangas (*Cucurbita maxima*) provenientes de diferentes localidades do Brasil ou mesmo de outros países e que representam a diversidade genética das variedades locais de abóboras e morangas das diferentes regiões do País (Silva *et. al.*, 2011). O estudo criterioso desses materiais em programas de melhoramento genético visa explorar essa variabilidade visando a seleção de genótipos superiores e estáveis e que possam ser incorporadas em cultivares comerciais.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de vírus em 52 genótipos de abóboras e morangas (*Cucurbita* spp.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, cultivados a campo visando à identificação de materiais com resistência a esses patógenos a serem utilizados no programa de melhoramento da Embrapa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Genótipos de abóbora (*Cucurbita moschata* L.) e moranga (*Cucurbita máxima* L.) pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliados quanto à incidência de cinco vírus em experimentos a campo, no segundo semestre de 2012 (16 morangas; 14 abóboras) e no primeiro semestre de 2013 (15 abóboras; 7 morangas (Tabela 1).

O experimento foi instalado em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições e cinco plantas por parcela (Tabela 1). Para avaliação, foram coletadas amostras individuais constituídas por folhas novas, coletadas da ponta da rama de nove plantas de

cada genótipo, tendo sido amostradas três plantas por repetição. A coleta das amostras foi realizada no período de 45-50 dias após o plantio em campo.

A avaliação foi realizada em NCM-ELISA (Clark & Adams, 1977) utilizando-se antissoros policlonais específicos produzidos contra a capa protéica de *Papaya ringspot virus-type watermelon* (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV).

A análise do material foi realizada no Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças. Os extratos foliares das amostras, diluídos em tampão ½PBS, foram aplicados em membrana de nitrocelulose. Na detecção viral utilizaram-se antissoros na diluição 1:1000 e conjugado geral (Sigma; anticorpo conjugado à enzima fosfatase alcalina) na diluição 1:30000. O bloqueio da membrana foi realizado em solução ½PBS contendo 2% de leite em pó desnatado, por 2 horas. Na revelação utilizou-se solução reveladora (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O; pH 9,5) contendo BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) e NBT (Nitro blue tetrazolium). A membrana ficou imersa na solução de revelação, à temperatura ambiente, sob agitação, na ausência de luz até o surgimento dos resultados. Como controle positivo e negativo, utilizaram-se extrato de folhas de abobrinha (*C. pepo* cv. Caserta) inoculadas, com extrato de plantas infectadas com cada um dos vírus e extrato de folhas saudáveis, respectivamente. As amostras positivas apresentaram-se como manchas arroxeadas, como resultado da ação da enzima fosfatase alcalina sobre os substratos BCIP e NBT.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na avaliação realizada no ano de 2012, a incidência de vírus foi maior que na avaliação realizada no ano de 2013. A detecção do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) foi verificada nos genótipos nos dois anos de avaliação (Tabela 1). Os resultados das análises sorológicas indicaram a presença do ZYMV em 15,13% das plantas avaliadas, tendo sido o mais frequente e reafirmando a sua importância para a cultura. A taxa de infecção por ZYMV variou de 11,11% (CNPH 2525-1) a 55,6% (CNPH 2526-1). *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W) e *Watermelon mosaic virus* (WMV-2) ocorreram apenas na avaliação de 2012, com taxa de infecção das plantas de 13,94% e 6,77%, respectivamente. A incidência do ZLCV foi de 5,57% (2012) e 6,01% (2013), tendo se

tornado um patógeno frequentemente detectado na cultura em diversas áreas produtoras. O CMV ocorreu em 1,59% e 1,011%, em 2012 e 2013.

De forma geral, a incidência de vírus foi maior em morangas que nas abóboras. Em 2012, quatro genótipos, sendo três de moranga (CNPH 972088; CNPH 972183; CNPH 972044) e um de abóbora (CNPH 961400) mantiveram-se livres de infecção por esses vírus. Na avaliação realizada em 2013, não foram detectados vírus em nove genótipos de abóbora (CNPH 10671; CNPH 1987; CNPH 2063; CNPH2528; CNPH 2124; CNPH 3001; CNPH 2530; cv. Itapuã; cv. Maranhão) e um de moranga (CNPH 2528).

Esses resultados preliminares reafirmam a importância do ZYMV para abóboras e morangas, considerando a significativa incidência nas plantas avaliadas quando comparado à incidência dos demais vírus e também indicam a importância do ZLCV para espécies do gênero *Cucurbita*. A frequência de detecção do ZLCV tem aumentado em diversas áreas produtoras (Lima & Costa, 2011). Também, esses resultados sugerem a existência de níveis diferenciados de resistência nos genótipos avaliados. Entretanto, testes adicionais de avaliação desses materiais em condições controladas, em casa de vegetação, devem ser realizados para confirmação da resistência desses genótipos selecionados a esses vírus e, assim assegurar a sua utilização como fonte de resistência em programas de melhoramento.

## REFERÊNCIAS

- CLARK, MF; ADAMS, A, N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483, 1977.
- HALFELD-VIEIRA, BA; RAMOS, NF; RABELO FILHO, FAC; GONÇALVES, MFB; NECHET, KL; PEREIRA, PRVS; LIMA, JAA. Identificação sorológica de espécies de potyvírus em melancia, no estado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.687-689. 2004.
- LIMA, MF; ALVES, CA. Levantamento de vírus em Cucurbitáceas no Brasil, no período 2008-2010. *Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF*. 2011.
- LIMA, MF; COSTA, JR. Incidence of *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) on field-grown cucurbits in six brazilian states. In: 45 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA., Manaus-AM. CD\_ROM. 19-23/2012. PROVVIDENTI, R. Cucumber mosaic. In: ZITTER, A; HOPKINS, DL & THOMAS, CE. *Compendium of cucurbit diseases*. APS PRESS: St. Paul. 1996a. p.438-39.
- SILVA, KMP; LOPES, JF; AMARO, GB; PERMIGIANI, L. O. Geografia da coleta de germoplasma do gênero *Cucurbita* no Brasil pela Embrapa Hortaliças. Resumos...

CD ROM do Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. 1 a 4 de agosto de 2011. Búzios-RJ.

**Tabela 1.** Avaliação sorológica de acessos de abóboras e morangas (*Cucurbita* spp.) quanto à incidência de *Papaya ringspot virus* –type watermelon (PRSV-W=), *Watermelon mosaic vírus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic vírus* (ZYMV), *Cucumber mosaic vírus* (CMV), *Zucchini lethal chlorosis vírus* (ZLCV), utilizando-se antissoros policlonais, em NCM-ELISA. Brasília, DF. 2012-2013.

Genótipo	Espécie	Vírus <sup>1/</sup>				
		PPRSV-W	WMV-2	ZYMV	CMV	ZLCV
<b>Ano 2012</b>						
CNPH982057	<i>C. maxima</i>	1/8(12,5%)	2/8(25%)	1/8(12,5%)	1/8(12,5%)	0/8(0%)
CNPH971918	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	3/9(33,3%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972063	<i>C. moschata</i>	2/9(22,2%)	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972092	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	3/9(33,3%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972016	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	2/9(22,2%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)
CNPH88489	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	3/9(33,3%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH880644	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	2/9(22,2%)	4/9(44,4%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)
CNPH880543	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	3/6(50%)	3/6(50%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH880639	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	3/9(33,3%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	3/9(33,3%)
Moranga	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	3/9(33,3%)	3/9(33,3%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH880514	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972125	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	3/9(33,3%)	2/9(22,2%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH972010	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	3/9(33,3%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH880612	<i>C. moschata</i>	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972088	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
Sergipana	<i>C. moschata</i>	2/9(22,2%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH972121	<i>C. maxima</i>	3/9(33,3%)	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH880446	<i>C. maxima</i>	3/9(33,3%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)
CNPH 972027	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 880525	<i>C. moschata</i>	1/9(11,1%)	2/9(22,2%)	0/9(0%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)
CNPH972183	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH880513	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH880544	<i>C. moschata</i>	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)
CNPH972044	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972009	<i>C. moschata</i>	2/9(22,2%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 880348	<i>C. moschata</i>	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 880053	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	2/9(22,2%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH972027	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH961400	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH982543	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	1/9(11,1%)	1/9(11,1%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
<b>Ano 2013</b>						
CNPH 1067-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%) <sup>2</sup>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH 2516-2	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 1987-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)

CNPH 2063-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2116-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH 2124-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2143-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
CNPH 3001-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2501-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)
CNPH 2523-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	3/9(33,3%)
CNPH 2530-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 0526-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)	1/9(11,1%)
CNPH 0543-1	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9(11,1%)
Itapuã	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
Maranhão	<i>C. moschata</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 1985-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2525-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	1/9 (11,1%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2526-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	5/9(55,6%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2527-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	2/9(22,2%)
CNPH 2528-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2531-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	0/9(0%)
CNPH 2531-1	<i>C. maxima</i>	0/9(0%)	0/9(0%)	4/9(44,4%)	0/9(0%)	0/9(0%)

<sup>1</sup>PRSV-W= *Papaya ringspot virus* –type watermelon; WMV=*Watermelon mosaic virus*; ZYMV=*Zucchini yellow mosaic virus*; CMV=*Cucumber mosaic virus*; ZLCV=*Zucchini lethal chlorosis virus*.

<sup>2</sup>Número de plantas positivas para determinado vírus/ número total de plantas avaliadas.