

## Caracterização biológica e sorológica de um isolado de *Squash mosaic virus* e efeitos da infecção mista com vírus do gênero *Potyvirus* (22)<sup>1</sup>

### Biological and serological of an isolate of squash mosaic virus and effects of mixed infection with a virus of the genus *Potyvirus*

Fabiana Rodrigues da Silva<sup>2\*</sup>, José Albersio de Araújo Lima<sup>2</sup>, Aline Kelly Queiroz do Nascimento<sup>3</sup> e Graziela Silva Barbosa<sup>3</sup>

**RESUMO** - O Nordeste brasileiro possui condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo do meloeiro (*Cucumis melo*). No entanto, diferentes problemas fitossanitários afetam sua produtividade, destacando-se as doenças ocasionadas por vírus. A presente pesquisa objetivou efetuar a caracterização biológica e sorológica de um isolado de *Squash mosaic virus* (SqMV) obtido no Ceará. Em estudos de gama de hospedeiros o vírus infetou sistemicamente somente cinco espécies da família Cucurbitaceae e ocasionou lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*. Estudos da infecção mista do SqMV com vírus do gênero *Potyvirus* demonstraram efeito sinérgico entre os mesmos. A purificação química do SqMV foi possível a partir de plantas de meloeiro e a imunização em coelho com a preparação purificada possibilitou a produção de antissoro policlonal específico. O antissoro produzido apresentou títulos de 1:10.000 quando avaliado por plate trapped antigen enzyme linked immune absorbent assay (PTA-ELISA), de 1:160.000 em immune-precipitation ELISA (IP-PTA-ELISA) e de 1:1.024 em Dupla Difusão em Ágar. Estudos do relacionamento sorológico entre SqMV e *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) do gênero *Comovirus* contra seus antissoros homólogos e heterólogos em Dupla Difusão em Ágar demonstraram relacionamento unilateral entre os mesmos.

**Palavras-chave:** *Comovirus*. Infecção mista. IP-PTA-ELISA. Relacionamento sorológico.

**ABSTRACT** - The conditions of soil and climate in the northeast of Brazil are favorable to cultivation of melon (*Cucumis melo*). However, there are various sanitary problems that affect productivity, especially diseases caused by viruses. This research had the objective of carrying out the biological and serological characterisation of an isolate of the *Squash mosaic virus* (SqMV), obtained in the State of Ceará, Brazil. In studies into host range, the virus infected systemically only five species of *Cucurbitaceae* family, and caused local lesions in *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*. Mixed-infection studies of SqMV with a virus specie from the genus *Potyvirus* demonstrated a synergistic effect between the viruses. Chemical purification of SqMV was possible using melon plants, and immunisation of rabbits with the purified preparation enabled the production of a specific polyclonal antiserum. The antiserum produced presented titers of 1:10,000 when evaluated by plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA), 1:160,000 by immunoprecipitation ELISA (IP-PTA-ELISA) and 1:1,024 by agar double diffusion. Studies by agar double diffusion of the serological relationship between SqMV and the *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), of the genus *Comovirus*, demonstrated a unilateral relationship against their homologous and heterologous antisera.

**Key words:** *Comovirus*. Mixed infection. IP-PTA-ELISA. Serological relationship.

DOI: 10.5935/1806-6690.20160023

\*Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 24/07/2013; aprovado em 22/04/2015

Parte da Monografia do primeiro autor apresentada na Universidade Federal do Ceará; pesquisa financiada pela FUNCAP

<sup>2</sup>Departamento de Fitossanidade, CCA/UFC, Campus do Pici, Blocos 806, Fortaleza-CE, Brasil, 60.356-000, agro.fabiorodrigues@gmail.com, albersio@ufc.br

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, CCA/UFC, Campus do Pici, Blocos 805 e 806, Fortaleza-CE, Brasil, 60.356-000, alynekelly@yahoo.com.br, grazzy26@bol.com.br

## INTRODUÇÃO

Entre as principais culturas utilizadas para produção de alimentos as espécies cultivadas da família Cucurbitaceae ocupam lugar de destaque, pela sua importância econômica e social, sendo o meloeiro (*Cucumis melo* L.) uma das culturas de maior importância do Nordeste brasileiro, por constituir um dos principais produtos do agronegócio nos estados do Rio Grande do Norte e do Ceará. As condições climáticas da região Nordeste, caracterizadas por elevadas temperaturas e níveis de luz solar, têm propiciado a obtenção da alta produtividade, com frutos de excelente qualidade (ARAÚJO; VILELA, 2003). Dentre os problemas fitossanitários causados por diferentes agentes biológicos, os de natureza viral ocasionam danos severos na produção do meloeiro, sendo os mais problemáticos devido à inexistência de medidas tradicionais de controle por defensivos agrícolas, com o agravante de resultarem em infecções sistêmicas e os vírus serem disseminados por vetores biológicos eficientes (LIMA *et al.*, 2012a; 2012b; LIMA; SITTOLIN; LIMA, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Entre os vírus de plantas que infetam as cucurbitáceas, já foram relatadas no Nordeste brasileiro as espécies pertencentes aos seguintes gêneros: *Potyvirus*: *Papaya ringspot virus*, tipo Watermelon (PRSV-W); *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); Gênero *Cucumovirus*: *Cucumber mosaic virus* (CMV); Gênero *Comovirus*: *Squash mosaic virus* (SqMV) (LIMA *et al.*, 2012a, 2012b; LIMA; VIEIRA, 1992; MOURA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2000; RABELO FILHO *et al.*, 2005) e um vírus responsável pelo amarelão do meloeiro ainda não caracterizado a nível de espécie e gênero (LIMA *et al.*, 2012a; 2012b; MOURA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Ocorrência natural de dois ou mais vírus numa mesma planta é muito comum e infecções mistas de PRSV-W, WMV e ZYMV com efeitos mais severos na sintomatologia podem ser observadas em diferentes genótipos de meloeiro ou de melancia (OLIVEIRA *et al.*, 2000; RAMOS; LIMA; GONÇALVES *et al.*, 2003). A intensidade dos sintomas observada em infecções mistas tem revelado interação sinérgica entre PRSV-W, WMV e ZYMV em meloeiro e em melancia e, algumas vezes, envolvendo infecções triplas com espécies de vírus do gênero *Potyvirus* resultando em sintomas mais severos (RAMOS; LIMA; GONÇALVES *et al.*, 2003). Em razão da frequência de infecções mistas no campo (OLIVEIRA *et al.*, 2000; RAMOS; LIMA; GONÇALVES *et al.*, 2003), a produção de cultivares com resistência dupla ou tripla constitui eficiente forma de controle de vírus em meloeiro. Embora a infecção mista de dois ou mais vírus

do gênero *Potyvirus* seja muito comum em condições de campo e bastante estudada (RAMOS; LIMA; GONÇALVES *et al.*, 2003), existe pouca ou nenhuma informação dos efeitos da infecção mista de SqMV com outras espécies de vírus (LIMA *et al.*, 2012b).

O SqMV do gênero *Comovirus* pode ser disseminado por sementes e por coleópteros especialmente, *Diabrotica* spp e *Acalymma* spp (ASTIER, 2007; FREITAG, 1956; LIMA *et al.*, 2012a; 2012b). Os sintomas induzidos pelo SqMV são variáveis e os graus de severidade são bastante diferenciados, em função da estirpe do vírus, da espécie e/ou da variedade vegetal cultivada, da proximidade da fonte de inóculo e da população dos vetores (MOURA *et al.*, 2001).

O SqMV tem sido constatado nos estados do Ceará, Maranhão, Piauí e Rio Grande do Norte. Possui gama de hospedeiros restrita a espécies de cucurbitáceas, sendo mais importante em melão var. Cantaloupe (CAMPBELL, 1971; FREITAG, 1956; MOURA *et al.*, 2001).

O gênero *Comovirus* pertence à subfamília *Comovirinae* da família *Secoviridae* inclui espécies de vírus responsáveis por importantes doenças de plantas no Nordeste Brasileiro, incluindo o SqMV em meloeiro (LIMA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012b) e o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) em feijoeiro caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*], ocorrendo também em várias partes do mundo tropical (HAMPTON; THOTTAPPILLY; ROSSEL *et al.*, 1997; LIMA; NELSON, 1975; LIMA; SITTOLIN; LIMA *et al.*, 2005). O feijoeiro caupi faz parte da agricultura tradicional do semiárido Nordeste e as doenças ocasionadas por vírus incluindo o CPSMV são fatores limitantes à sua produção (LIMA; NELSON, 1975; LIMA; SITTOLIN; LIMA *et al.*, 2005).

Embora o SqMV tenha sido constatado em baixos índices nos estados do Nordeste brasileiro em razão da sua gama restrita de hospedeiros confinada em espécies de cucurbitáceas e em razão do intensivo controle químico de insetos vetores de vírus em campos de produção de meloeiro (LIMA *et al.*, 2011), o vírus pode ser facilmente transmitido por sementes de meloeiro e de jerimum (*Cucurbita* spp.), indicando a necessidade de estudos e caracterização dos seus isolados e desenvolvimento de métodos eficientes de identificação (ASTIER *et al.*, 2007; CAMPBELL, 1971; LIMA *et al.*, 2011; ZITTER; HOPKINS; THOMAS *et al.*, 2004). Diversidades biológicas, sorológicas e moleculares entre isolados de SqMV têm sido usadas para classificação de isolados nos subgrupos I e II (LIMA *et al.*, 2011; LING *et al.*, 2011; NELSON; KNUHTSEN, 1973).

A presente pesquisa teve por objetivo a caracterização biológica e sorológica de um isolado de SqMV através do estudo de gama de hospedeiros, infecção mista com vírus do gênero *Potyvirus*, purificação química, produção de antissoro e estudo do relacionamento sorológico com outro vírus do gênero *Comovirus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estudo de gama de hospedeiros do isolado de *Squash mosaic virus*

Foram realizadas inoculações mecânica com extratos de plantas de meloeiro infectadas sistemicamente pelo isolado de SqMV em solução tampão 0,05 M de KPO<sub>4</sub>, pH 7,5, obtidos pela maceração de tecido foliar infetado, na proporção de 1 g de tecido para 8 mL de solução. Foram inoculadas 12 plantas de cada espécie/cultivar, com aproximadamente oito dias após a emergência, deixando-se quatro plantas de cada espécie ou cultivar sem inoculação para funcionarem como testemunhas. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Virologia Vegetal, da Universidade Federal do Ceará (LabVV/UFC). Uma segunda inoculação foi efetuada nas poucas plantas que não apresentaram sintomas dez dias após a primeira inoculação. Todas as plantas inoculadas e não inoculadas foram observadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas e testadas por Dupla Difusão em Ágar contra antissoro específico para SqMV, 25 dias após a primeira inoculação.

Foram estudadas as espécies das famílias Cucurbitaceae: melancia (*Citrullus lanatus* Thunb Matsum. & Nakai); bucha (*Luffa aegyptica* Mill); pepino (*Cucumis sativus* L.), var. 'Conserva Wiscorson', var. 'Verde Comprido'; maxixe (*C. anguria* L.); abóbora (*Cucurbita moschata* L.) var. 'Menina Rajada'; abobrinha (*C. pepo* L.) var. 'Caserta'; Fabaceae: feijoeiro caupi [*Vigna unguiculata* (L.) subsp. *unguiculata* Walp.] var. 'Pitiuba', var. 'Macaibo'; Solonaceae: pimenta de cheiro (*Capsicum adoniferum* Vell.); pimentão (*Capsicum annum* L.); berinjela (*Solanum melongena* L.); fumo (*Nicotiana tabacum* L.) var. 'Sansum', var. 'TNN', var. 'Xanth', var. 'Sansum White burley'; *N. glutinosa* L.; Apiaceae: cenoura (*Dacus carota* L.); Caricaceae: jaracatia [*Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC.], mamoeiro (*Carica papaya* L.) tipo 'Formosa'; Amaranthaceae: *Chenopodium amaranticolor* Costa e Reyn e *C. quinoa* Willd.

### Efeitos da infecção mista do *Squash mosaic virus* com vírus do gênero *Potyvirus*

Em casa de vegetação, plantas de meloeiro var. 'Imperial' foram obtidas por sementeiras em bandejas contendo

substrato comercial a base de vermiculita e transplantadas para vasos de 5 L, contendo uma mistura de terra e esterco previamente autoclavadas. Foram utilizados dois vasos por tratamento, com quatro plantas por vaso, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Cinco dias após o transplantio, o isolado de SqMV foi inoculado em uma das folhas cotiledonares e um dos vírus do gênero *Potyvirus* (PRSV-W, WMV e ZYMV) foi inoculado na outra folha. O experimento foi composto de oito tratamentos assim representados: A- plantas inoculadas somente com SqMV; B- plantas inoculadas somente com WMV; C- plantas inoculadas somente com ZYMV; D- plantas inoculadas somente com PRSV-W; E- plantas inoculadas com SqMV e com WMV; F- plantas inoculadas com SqMV e com PRSV-W; G- plantas inoculadas com SqMV e com ZYMV e H- testemunha, plantas sem inoculação.

As plantas de cada tratamento foram diariamente observadas quanto ao surgimento de sintomas e início da floração. Decorridos 50 dias das inoculações, as plantas foram avaliadas quanto ao tamanho, ao número total de folhas e às concentrações dos vírus do gênero *Potyvirus* estimadas pela técnica de "plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay" (PTA-ELISA) e às concentrações do SqMV estimadas por imunoprecipitação seguida de ELISA (IP-PTA-ELISA), metodologia desenvolvida por Lima *et al.* (2011). As amostras para as análises por PTA-ELISA e por IP-PTA-ELISA foram preparadas nas mesmas condições, usando-se iguais quantidades (1,0 g) de tecidos das plantas, diluídas nas mesmas proporções com o tampão das amostras (1:2), a fim de possibilitar avaliações qualitativas e quantitativas quanto à presença dos vírus nas plantas inoculadas (LIMA *et al.*, 2012a).

No final do experimento, todas as plantas foram removidas para avaliação das massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade, pelo programa GENES (CRUZ, 2006).

### PTA-ELISA para avaliação da concentração de vírus do gênero *Potyvirus*

Amostras de 1,0 g de folhas de cada planta dos tratamentos com vírus do gênero *Potyvirus* (PRSV-W, WMV e ZYMV) isoladamente ou em combinação com SqMV foram coletadas e testadas por PTA-ELISA contra os antissoros para cada vírus correspondente. Cada amostra de 1,0 g foi diluída em 2,0 mL de tampão de extração. Os valores das absorbâncias dos extratos das plantas infectadas foram avaliados através da análise das razões das suas médias pela média dos valores de absorbância dos extratos de plantas sadias,

considerando positivas as amostras com razão igual ou superior a dois. Referidos valores foram considerados como referência para estimar as concentrações dos vírus.

A técnica de IP-PTA-ELISA (LIMA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012a) foi utilizada para estimar a concentração do SqMV. Amostras de 1,0 g de folhas de cada planta dos tratamentos com plantas inoculadas com SqMV isoladamente ou em combinação com vírus do gênero *Potyvirus* foram coletadas e testadas por IP-PTA-ELISA de acordo com Lima *et al.* (2011) e Lima *et al.* (2012a).

#### **Purificação química de *Squash mosaic virus* e determinação da massa molecular das proteínas capsidiais**

O isolado de SqMV foi multiplicado em 100 plantas de meloeiro 'Imperial' em condições de casa de vegetação do LabVV/UFC. Após 30 dias da inoculação, as folhas que apresentavam sintomas característicos do vírus foram coletadas para purificação por meio da clarificação com *n*-Butanol e precipitação das partículas virais com polietilenoglicol (PEG) 6.000, segundo protocolo usado por Lima e Amaral (1985).

A preparação viral foi biologicamente avaliada por inoculação em plantas sadias de meloeiro. Alíquotas da preparação purificada do vírus foi diluída 1:20 e analisada no espectrofotômetro de luz ultravioleta, CIRRUS 80ST, na faixa de comprimento de onda de 220 a 340 nm para obtenção de espectro de adsorção e concentração do vírus. A concentração de vírus na preparação purificada foi avaliada com base na  $A_{260}$ , na diluição de 1:20, usando o coeficiente de extinção igual a 7, segundo Lima e Amaral (1985).

A massa molecular das suas proteínas capsidiais foi determinada por eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo protocolo de Nascimento *et al.* (2010) com modificações.

#### **Caracterização sorológica do isolado de *Squash mosaic virus***

O produto final da purificação química do SqMV foi usado para imunização de coelho da Raça Nova Zelândia Branca, com seis meses de idade, através de injeções na pata traseira do animal. Para imunização foi utilizada uma alíquota de 500 µL da preparação purificada emulsificada com igual volume de adjuvante incompleto de Freud. Foram feitas três injeções com igual quantidade da preparação viral com o adjuvante em intervalos de sete dias. Após 21 dias da primeira imunização, procedeu-se a primeira sangria e a partir daí, o animal foi sangrado semanalmente. A coleta de sangue foi realizada através de pequenos cortes nas veias marginais das orelhas do coelho, retirando-se aproximadamente 10 mL de sangue

por sangria. O sangue coletado foi incubado em banho-maria a 37 °C por 1 h e centrifugado a 3.000 g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 10.000 g por 10 min e o soro obtido foi armazenado a -20 °C.

Os títulos do antissoro foram determinados por IP-PTA-ELISA e PTA-ELISA, utilizando diluições de 1:1.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000, 1:160.000, com antissoro bruto e absorvido com proteína purificada de meloeiro sadio, visando remover possíveis anticorpos reativos com proteínas de plantas. A purificação da proteína foi efetuada seguindo o mesmo protocolo de purificação viral de Lima e Amaral (1985) e para a absorção do antissoro foi utilizada uma proporção de 1:2 (antissoro/proteína purificada). Em seguida, a mistura foi incubada a 37 °C por 3 h e centrifugada a 5.000 g por 10 min, sendo o sobrenadante recuperado para constituir o antissoro absorvido.

A reatividade e a especificidade do antissoro absorvido foram avaliadas por IP-PTA-ELISA através de diluições do extrato de planta infectada e sadia (1:10; 1:100; 1:1.000, 1:10.000) e o antissoro na diluição de 1:100. A reatividade e especificidade foram também avaliadas nas diluições do antissoro (1:100, 1:1.000 e 1:2.000), mantendo o extrato da planta infectada e sadia na diluição de 1:10. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições na avaliação dos resultados. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade, pelo do programa GENES (CRUZ, 2006).

A titulação foi também avaliada pela técnica de Dupla Difusão em Ágar utilizando extrato de planta infectada e sadia na proporção de 1:2 e 1:10 (p/v) obtidos a partir da maceração em presença de água destilada. Em seguida, alíquotas de 25 a 35 µL dos extratos foram distribuídas nos orifícios periféricos do gel (0,8 % de Ágar Noble 1,0 % de  $\text{NaN}_3$ ) e testadas contra o antissoro para SqMV nas diluições de 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 e 1:1.024 em solução salina a 0,85%.

O possível relacionamento sorológico entre SqMV e CPSMV, também pertencente ao gênero *Comovirus*, foi realizado em teste de reciprocidade em Dupla Difusão em Ágar, com antissoros específicos para SqMV e CPSMV. Extratos foliares de plantas de meloeiro infectados com SqMV e extratos da planta de feijoeiro caupi infectados com CPSMV na diluição 1:2 (p/v) foram testados contra seus antissoros homólogos e heterólogos nas diluições de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64. Em todos os testes foram usados como testemunhas extratos de plantas sadias de meloeiro e feijoeiro caupi.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos de gama de hospedeiros, com exceção da melancia e da bucha, o isolado de SqMV infectou sistemicamente todas as espécies da família Cucurbitaceae, mas não infectou nenhuma das espécies das famílias Apiaceae, Caricaceae, Fabaceae e Solonaceae. Como era esperado, o vírus ocasionou lesões necróticas locais em *C. amaranticolor* e *C. quinoa*. Em estudos semelhantes, Freitag (1956) constatou que algumas espécies da família Amaranthaceae, Chenopodiaceae e Leguminosae (atual Fabaceae) foram infectadas experimentalmente com SqMV. Embora com gama de hospedeiras sistêmicas restrita a espécies da família Cucurbitaceae, os resultados obtidos demonstraram que o isolado de SqMV estudado deve ser diferente dos isolados obtidos no Nordeste por Lima e Amaral (1985) e por Lima e Vieira (1992). O isolado estudado por Lima e Amaral (1985) foi obtido a partir de plantas de melancia exibindo sintomas de mosaico severo, redução do desenvolvimento e necrose sistêmica, em campos de cultura irrigada no estado do Piauí e o isolado de SqMV estudado por Lima e Vieira (1992) foi obtido a partir de pequenas áreas de produção de abóbora (*Cucurbita moschata* L.) no estado do Ceará, o qual também infectou melancia em experimentos de casa de vegetação. Tal característica biológica indica que referidos isolados devem pertencer ao grupo SqMV-I caracterizado por Nelson e Knuhtsen (1973). De acordo com Nelson e Knuhtsen (1973), nenhum isolado pertencente ao grupo SqMV-II infecta melancia, no entanto os isolados do grupo SqMV-I são capazes de infectar melancia, indicando que o isolado de SqMV em estudo deve pertencer ao grupo SqMV-II, diferindo dos isolados estudados por Lima e Amaral (1985) e Lima e Vieira (1992). Estudos desenvolvidos por Ling *et al.* (2011) confirmaram a existência dos dois grupos do SqMV e desenvolveram metodologia capaz de detectar isolados de SqMV pertencentes a ambos os grupos através da técnica de Real-time RT-PCR (qRT-PCR).

No estudo da infecção mista as análises sintomatológicas diárias demonstraram que todas as plantas com infecção de SqMV manifestaram seus sintomas típicos, mesmo quando em combinação com vírus do gênero *Potyvirus*. Nos tratamentos com infecção mista todas as plantas iniciaram a apresentação dos sintomas sete dias após a inoculação enquanto que o aparecimento de sintomas nas plantas com infecção simples teve início somente três dias depois (Figura 1). Mesmo nas plantas simultaneamente inoculadas com SqMV e com qualquer um dos vírus do gênero *Potyvirus* (WMV, ZYMV e PRSV-W) os primeiros sintomas surgidos sete dias após as inoculações foram típicos do SqMV, indicando a possibilidade de uma maior rapidez no processo de infecção, replicação e movimentação do SqMV em comparação às espécies de vírus do gênero *Potyvirus*. Somente 10 dias após as inoculações se deu a

modificação dos sintomas, os quais se apresentaram mais severos, indicando uma interação sinérgica entre os vírus. Todas as plantas com infecção viral simples ou mista retardaram os períodos de floração quando comparados com as plantas não inoculadas usadas como testemunhas. No entanto, não houve diferença no início da floração entre as plantas com infecção simples ou múltipla. Diferenças significativas foram verificadas com todas as características avaliadas, exceto número de folhas (Tabela 1). As plantas com infecção mista apresentaram acentuadas reduções, sobretudo no tamanho, massa fresca e seca das plantas, sendo que a interação entre SqMV e PRSV-W foi a que mais afetou todos os parâmetros de desenvolvimento das plantas avaliadas, inclusive o número total de flores até o final do experimento. Os resultados mostraram que as plantas de meloeiro com infecção mista, desde o início da infecção, exibiram sintomas mais severos que os das plantas com infecções isoladas, evidenciando interação sinérgica entre os vírus.

As concentrações dos vírus do gênero *Potyvirus* avaliadas por PTA-ELISA, em infecção simples e em combinação com SqMV foram sempre elevadas, sendo que a maior concentração encontrada foi para PRSV-W em plantas com infecção simples. Quando em infecção simples o ZYMV, também, apresentou maior concentração do que em infecção mista com SqMV. Por outro lado, o WMV apresentou maior concentração quando em combinação com SqMV. Na avaliação da concentração do SqMV em infecção simples e em combinação com os vírus do gênero *Potyvirus*, sua maior concentração estimada por IP-PTA-ELISA foi quando em infecção mista com PRSV-W, sendo que nas outras situações, inclusive em infecção simples suas concentrações foram semelhantes.

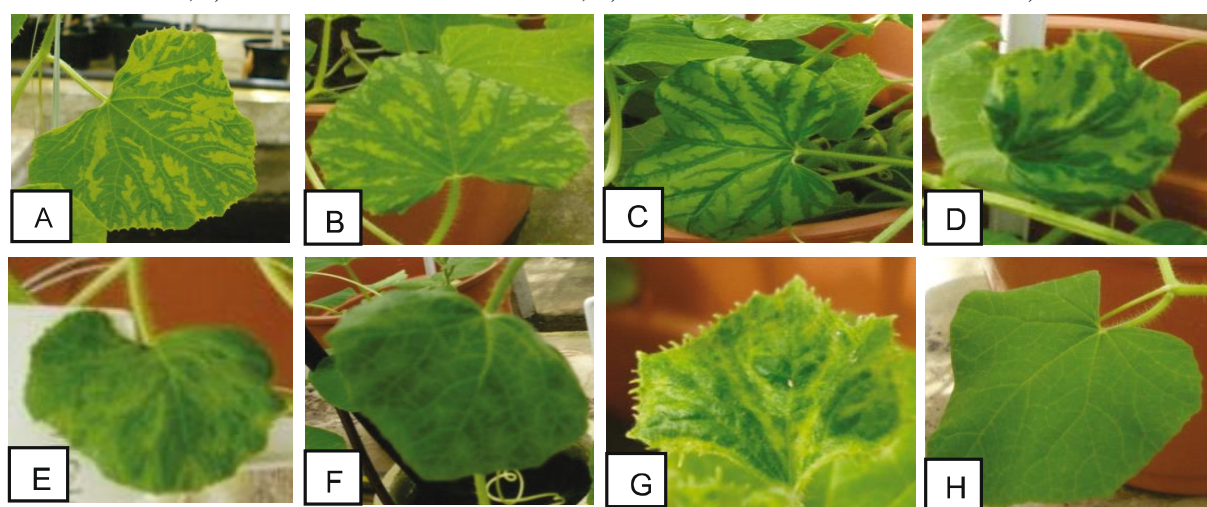
Em condições de campo, Lima e Vieira (1992) também constataram sintomas de mosaico severo e necrose sistêmica em plantas de melancia resultantes de infecção simultânea de SqMV e PRSV-W, em cultivo irrigado no estado do Piauí. Nascimento *et al.* (2011), objetivando selecionar espécies de melancia resistente ao PRSV-W, diagnosticaram a presença de infecção mista de PRSV-W e SqMV. A ocorrência e as consequências do sinergismo entre vírus, resultantes de infecções mistas, podem acarretar alterações nos sintomas das doenças em meloeiro, com sintomas mais severos e, conseqüente aumento da severidade da doença (RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003).

Em razão dos efeitos negativos no desenvolvimento das plantas resultantes de infecções simultâneas de dois ou mais vírus e a frequência com que elas ocorrem naturalmente no campo, as estratégias para convivência e controle das viroses em espécies de cucurbitáceas não devem considerar somente as doenças ocasionadas por cada vírus isoladamente (OLIVEIRA *et al.*, 2000; RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A preparação purificada do SqMV apresentou razão de absorção nos comprimentos de onda de  $A_{260}$  e  $A_{280}$  nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) de 1,54, valor típico de vírus poliédricos que possuem percentuais elevados de ácido nucléico e semelhante ao encontrado por Lima e Amaral (1985) para outro isolado de SqMV. A concentração viral foi estimada em 85,01 mg de vírus/kg de tecido vegetal infectado. A preparação purificada do vírus foi infectiva em todas as diluições de 1:10, 1:20 e 1:50, quando inoculadas em plantas saudáveis de meloeiro, demonstrando a integridade

biológica do vírus purificado e confirmando a eficiência do processo de purificação utilizado por Lima e Amaral (1985). O grau de pureza da preparação purificada e a elevada concentração de vírus ratificam que o protocolo de purificação adotado é um processo simples, mas eficiente para purificação de vírus do gênero *Comovirus* e aqueles com características semelhantes. Estes resultados constituem indicativos da eficiência do método utilizado, conforme adaptações de Lima e Amaral (1985) para a purificação do SqMV.

**Figura 1** - Plantas de meloeiro (*Cucumis melo*) com infecção simples e mista de vírus: A) Planta infectada somente com *Squash mosaic virus* (SQMV); B) Planta infectada com SqMV e *Watermelon mosaic virus* (WMV); C) Planta infectada com SqMV e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); D) Planta infectada com SqMV e *Papaya ringspot virus*, tipo Watermelon (PRSV-W); E) Planta infectada somente com PRSV-W; F) Planta infectada somente com WMV; G) Planta infectada somente com ZYMV e H) Planta não inoculada



**Tabela 1** - Efeito da infecção simples e mista de *Squash mosaic virus* (SQMV) com *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) ou *Papaya ringspot virus*, tipo Watermelon (PRSV-W) no tamanho das plantas, número total de folhas, massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular de meloeiro (*Cucumis melo*)

Tipo de infecção	Tamanho	Nº de folhas	Massa fresca folha	Massa fresca raiz	Massa seca folha	Massa seca raiz
SqMV	2,21 ab <sup>1</sup>	27,00 a	61,99 a	13,21 b	6,10 ab	0,86 ab
PRSV-W	1,50 abc	26,93 a	32,03 ab	7,09 bc	6,08 ab	0,79 ab
WMV	2,23 ab	25,67 a	60,43 a	7,09 bc	6,08 ab	0,86 ab
ZYMV	1,81 abc	24,66 a	32,03 ab	6,21 bc	5,46 ab	0,78 ab
SqMV+WMV	1,40 abc	22,33 a	22,70 ab	3,42 c	3,29 ab	0,54 ab
SqMV+ZYMV	1,81 abc	23,00 a	53,80 a	6,21 bc	3,29 ab	0,54 ab
SqMV+PRSV-W	1,39 abc	20,00 a	53,06 b	1,52 c	2,06 b	0,21 b
Sadia	2,31 ab	27,67 a	61,99 a	53,06 a	6,83 a	1,21 a
Média	1,72	24,29	35,72	11,30	4,29	0,64
CV (%)	20,84	16,23	42,01	30,46	35,14	39,63
F	5,44*	2,06*	5,61*	75,45*	5,36*	4,87*

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. \*Significativo em nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

A análise eletroforética das proteínas capsidiais do isolado de SqMV em gel de eletroforese em meio de poli-acrilamida permitiu estimar seus pesos moleculares em aproximadamente 21 e 43 kDa. Segundo Van Regenmortel (2000), os vírus do gênero *Comovirus* possuem duas proteínas na sua capa protéica com massas moleculares estimadas entre 40-45 kDa e 21-27 kDa.

O antissoro obtido apresentou um título de 1:1.024 em Dupla Difusão em Ágar para as diluições do extrato da planta infectada de 1:2 e 1:10. Em IP-PTA-ELISA os títulos do antissoro bruto e absorvido com proteína de planta sadia foram de 1:160.000 e 1:40.000, respectivamente, sendo a melhor reação obtida na diluição de 1:10.000 com antissoro bruto e 1:1.000 para antissoro absorvido. O título do antissoro bruto e absorvido em PTA-ELISA foi de 1:10.000.

Os resultados dos testes sorológicos, em IP-PTA-ELISA e PTA-ELISA, mostraram que tanto para antissoro bruto como para o antissoro absorvido houve reconhecimento do vírus em planta infectada com extrato na diluição de 1:10, apresentando valores de absorbância baixa para os extratos de plantas sadias, evidenciando clara distinção entre o extrato de planta sadia e de planta infectada.

Na avaliação da reatividade e da especificidade do antissoro em teste de IP-PTA-ELISA a melhor diluição do extrato de planta infectada e sadia foi de 1:10. Quando foi mantido o extrato da planta infectada e sadia na diluição de 1:10, o antissoro de precipitação apresentou boa reação em todas as três diluições: 1:100, 1:1.000 e 1:2.000.

A técnica de IP-PTA-ELISA apresentou os melhores resultados para detecção do SqMV, sendo 1:10 a melhor diluição para o antígeno, 1:100, 1:1.000 e 1:2.000 as melhores diluições para antissoro de precipitação e 1:1.000 a melhor diluição para o antissoro de cobertura. Lima *et al.* (2011) avaliando a sensibilidade das técnicas de IP-PTA-ELISA e PTA-ELISA para detecção de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), ZYMV e SqMV em tecidos de plantas infectadas, encontraram melhores resultados com a técnica de IP-PTA-ELISA. Semelhantemente, os resultados da presente pesquisa indicaram alta sensibilidade e especificidade da técnica IP-PTA-ELISA na detecção do isolado de SqMV.

O antissoro obtido confirmou a eficiência do método de imunização de "foot pad", o qual proporciona economia de vírus purificado e produção de elevada concentração de anticorpos no antissoro (LIMA *et al.*, 2012a; LIMA; AMARAL, 1985). A partir das avaliações dos antissoros das diferentes sangrias foi possível observar que a concentração de anticorpos específicos para o SqMV aumentou com o tempo, demonstrando a importância da obtenção de antissoro durante o período máximo de resposta imunológica do coelho.

Os resultados dos estudos de relacionamento sorológico com extratos foliares de plantas infectadas com antissoro para CPSMV não apresentaram nenhuma reação, enquanto que extratos foliares de plantas infectadas com CPSMV apresentaram forte reação com seu antissoro homólogo. De outra parte, extratos de plantas de feijoeiro caupi infectadas com CPSMV reagiram com o antissoro para SqMV, formando esporão com extrato de plantas de meloeiro infectadas com SqMV, depositadas em orifícios vizinhos, evidenciando a existência de relacionamento sorológico unilateral entre SqMV e CPSMV capaz de ser detectado somente com o uso de antissoro para SqMV.

Vários vírus inclusive o SqMV podem ser introduzidos dentro de um país, estado, região ou campo de cultura através de sementes infectadas. Desta forma, a produção de sementes livres de vírus proporcionam um controle efetivo dos vírus transmitidos por sementes, incluindo SqMV. Vários programas de certificação de sementes têm sido desenvolvidos para testar lotes de sementes quanto à presença de vírus, visando a seleção de sementes livres de vírus (LIMA *et al.*, 2012b; LIMA; PURCIFULL, 1980; LING *et al.*, 2011; NELSON KNUHTSEN, 1973). Lima e Purcifull (1980), por exemplo, desenvolveram duas técnicas imunológicas para detecção de vírus em sementes de feijoeiro caupi e sementes de soja (*Glycine max* L.). A simples, eficiente e prática técnica de IP-PTA-ELISA que se mostrou eficiente para detectar SqMV em plantas infectadas, poderia ser usada na indexação de sementes contra referido vírus.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, conclui-se que:

1. Os estudos biológicos indicam que o isolado de SqMV não infecta melancia, devendo, portanto, pertencer ao grupo II;
2. Infecções mistas de SqMV com espécies do gênero *Potyvirus* ocasionam alterações na sintomatologia e redução no desenvolvimento da planta, evidenciando um efeito sinérgico entre os vírus;
3. A metodologia adotada para purificação do isolado de SqMV não afeta a integridade biológica do vírus, podendo constituir um método preliminar para sua caracterização molecular;
4. A técnica de Imunoprecipitação (IP-PTA-ELISA) mostrou-se segura, eficiente e adequada para detecção do SqMV em plantas infectadas, podendo ser usada em programas de indexação de sementes;

5. Existe relacionamento sorológico unilateral entre CPSPMV e SqPMV, espécies virais do gênero *Comovirus*.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. L. P.; VILELA, N. J. Aspectos socioeconômicos. *In: SILVA, H.R. da; COSTA, N.D. (Ed.). Melão, produção aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. cap. 3, p. 15-18.
- ASTIER, S. *et al.* **Principles of plant virology: genome, pathogenicity, virus ecology**. 1. ed. Paris, Francia: Science Pub Inc., 2007. p. 472.
- CAMPBELL, R. N. *Squash mosaic virus*. **Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses**, n. 43, p. 4, 1971.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. 1. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.
- FREITAG, J. H. Beetle transmission, host range, and properties of *Squash mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 46, n. 2, p. 73-81, 1956.
- HAMPTON, R. O; THOTTAPPILLY, G; ROSSEL, H. W. Viral diseases of cowpea and their control by resistance conferring genes. *In: SINGH, B.B.; MOHAN RAJ DR, DASHIELL KE, JACKAILLEN. (Ed.). Advances in cowpea research*. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture; Tsukuba: International Research Center for Agricultural Sciences, 1997. 175 p.
- LIMA, J. A. A. *et al.* An Immune Precipitation Enzyme-Linked Immunosorbent (IP-ELISA) Technique for Identification of Plant Viruses. *In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 22, VIROLOGY MEETING OF MERCOSUL, 6., 2011, São Paulo. Anais...* São Paulo: Virus Reviews and Research, 2011. p. 56-56.
- LIMA, J. A. A. *et al.* serology applied to plant virology. *In: MOSLIH AL-MOSLIH. (Org.). Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases*. Rijeka: InTech, 2012a; p. 71-94.
- LIMA, J. A. A. *et al.* Viruses infecting melon and watermelon in Northeastern Brazil. **Virus: Review and Researches**, v. 1-2, p. 29-35, 2012b.
- LIMA, J. A. A.; AMARAL, M. R. G. Purificação e sorologia de "*Squash mosaic virus*" isolado de melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 605-611, 1985.
- LIMA, J. A. A.; NELSON, M. R. Squash mosaic virus variability: nonreciprocal cross-protection between strains. **Phytopathology**, v. 65, n. 8, p. 837-840, 1975.
- LIMA, J. A. A.; PURCIFULL, D. E. Immunochemical and microscopical techniques for detecting *Blackeye cowpea mosaic virus* and *Soybean mosaic virus* in hypocotyl of germinated seeds. **Phytopathology**, v. 70, n. 1, p. 142-147, 1980.
- LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. *In: FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). Feijão caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p. 404-459.
- LIMA, J. A. A.; VIEIRA, A.C. Distribuição do vírus do mosaico da abóbora em municípios cearenses e gama de hospedeiras de um isolado. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 112-114, 1992.
- LING, K. S. *et al.* Development of a real-time RT-PCR assay for *Squash mosaic virus* useful for broad spectrum detection of various serotypes and its incorporation into a multiplex seed health assay. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 10, p. 649-656, 2011.
- MOURA, M. C. C. L. *et al.* Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 90-92, 2001.
- NASCIMENTO, A. K. Q. *et al.* Biological, physical, and molecular properties of a papaya lethal yellowing virus isolate. **Plant Disease**, v. 94, n. 10, p. 1206-1212, 2010.
- NASCIMENTO, I. R. *et al.* Identificação molecular de espécies de vírus e reação fenotípica de famílias de melancia a um isolado do vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (Papaya ringspot virus strain watermelon - PRSV-W). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 22-29, 2011.
- NELSON, M. R.; KNUHTSEN, H. K. Squash mosaic virus variability: review and serological comparison of six biotypes. **Phytopathology**, v. 63, n. 7, p. 920-926, 1973.
- OLIVEIRA, V. B. *et al.* Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 628-636, 2000.
- RABELO FILHO, F. A. C. *et al.* Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora mediante imunização oral de coelhos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 3, p. 344-347, 2005.
- RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2003.
- SILVEIRA, L. M. *et al.* Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio do São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2009.
- VAN REGENMORTEL, M. H. *et al.* **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 7 ed. San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.
- ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. **Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas**. Madrid, España: Editorial Mundi- Prensa, 2004. 88 p.