

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ

OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCURBITAL VIRUSES IN THE STATE OF PARÁ

Nara Helena Tavares da Ponte¹, Alessandra de Jesus Boari² Kenny Bonfim³

¹Universidade do Estado do Amapá, Av. Pres. Vargas, 650 - Central, Macapá - AP, 68900-070. nara.ponte@ueap.edu.br

²Embrapa Amazônia Oriental, Dr. Enéas Pinheiro, CEP, Belém, PA, alessandra.boari@embrapa.br

Resumo

Palavras-chave: Víruses, RT-PCR, ELISA, Filogenia

As cucurbitáceas estão entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil por ser importante fonte de minerais e vitaminas, especialmente vitaminas A e C, encontrados na polpa dos frutos na forma de carotenóides e ácido ascórbico. As espécies de cucurbitáceas são frequentemente acometidas por doenças de origem viral. No Brasil já foram relatados dez vírus infectando cucurbitáceas. Entretanto, sete se destacam como os principais, devido à frequência de detecção em plantios comerciais de cucurbitáceas e às perdas que podem causar na produção e na produtividade. Dentre esses, o vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type watermelon – PRSV-w), o vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) e o vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* – WMV) do gênero *Potyvirus*, são os mais importantes. No estado do Pará não há estudos sobre as viroses importantes na cultura, tendo apenas relatos de ocorrência dos vírus ZYMV e PRSV-w. Deste modo, este trabalho propôs registrar a ocorrência e a caracterização molecular das espécies virais prevalentes em alguns municípios produtores de cucurbitáceas no estado do Pará. Amostras de folhas de cucurbitáceas com suspeitas de viroses foram coletadas em 14 municípios do estado do Pará. A detecção das espécies virais foi feita pelo teste sorológico PTA-ELISA. A caracterização molecular foi feita por meio da análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no *GenBank* utilizando os programas BLAST, ClustalW e MEGA 5.0. Os resultados obtidos mostraram a abrangência dos *Potyvirus* no estado, pois todas as espécies investigadas foram detectadas nas análises. O PRSV-w, como já relatado em outros estados, é o vírus mais frequente na cultura das cucurbitáceas, seguido dos vírus ZYMV e do WMV.

ABSTRACT

Keywords: Viruses, RT-PCR, ELISA, Phylogeny.

Cucurbits are among the main vegetables grown in Brazil because they are an important source of minerals and vitamins, especially vitamins A and C, found in fruit pulp in the form of carotenoids and ascorbic acid. Cucurbit species are frequently affected by diseases of viral origin. In Brazil, ten viruses infecting cucurbits have already been reported. However, seven stand out as the main ones, due to the frequency of detection in commercial cucurbit plantations and the losses they can cause in production and productivity. Among these, papaya ring spot virus, watermelon strain (*Papaya ringspot virus* – type watermelon – PRSV-w), zucchini yellow mosaic virus – ZYMV and watermelon mosaic virus (*Watermelon mosaic virus* – WMV) of the genus *Potyvirus*, are the most important. In State of Pará, so far, there were only occurrence reports of the virus ZYMV and PRSV-w in the watermelon culture. Thus, this paper proposes to record the occurrence and molecular characterization of predominant viral species in some municipalities that produce cucurbits in the state of Pará. Samples of cucurbitaceae leaves under viruses suspicion were collected in 14 municipalities of the state of Pará. The detection of viral species was taken by serological test PTA-ELISA. The molecular characterization was done by analyzing the nucleotide sequences from the isolated ones. The nucleotide sequences were compared with the entries in *GenBank* using the softwares BLAST, ClustalW and MEGA 5.0. The results obtained showed the range of Potyviruses in the state, as all investigated species were detected in the analyses. PRSV-w, as already reported in other states, is the most frequent virus in cucurbits, followed by the ZYMV and WMV viruses.

INTRODUÇÃO

As cucurbitáceas estão entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil por ser importante fonte de minerais e vitaminas, especialmente vitaminas A e C, encontrados na polpa dos frutos na forma de carotenóides e ácido ascórbico (ROMANO *et al.*, 2008).

As espécies de cucurbitáceas são frequentemente acometidas por doenças de origem viral. No Brasil já foram relatados dez vírus infectando cucurbitáceas. Entretanto, sete se destacam como os principais, devido à frequência

de detecção em plantios comerciais de cucurbitáceas e às perdas que podem causar na produção e na produtividade (LIMA, 2011). Dentre esses, o vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type watermelon – PRSV-w), o vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) e o vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* – WMV) do gênero *Potyvirus*, são os mais importante (LIMA, 2011). No estado do Pará não há estudos sobre as viroses importantes na cultura, tendo apenas relatos de

ocorrência dos vírus ZYMV e PRSV-w (POLTRONIERI, 2000; HAYASHI *et al.*, 2013).

Deste modo, este trabalho propõe realizar a ocorrência das espécies virais prevalentes nas principais regiões produtoras de cucurbitáceas no estado do Pará. Os resultados deste estudo darão subsídios para estabelecimento de estratégias de manejo das viroses.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para realização dos testes sorológicos e moleculares foram coletadas de 101 amostras de folhas de cucurbitáceas com sintomas característicos de viroses como: mosaico, deformação foliar, amarelecimento e necrose, em 14 municípios do Pará, sendo as localidades visitadas de: Ananindeua, Baião, Belém, Benevides, Curuçá, Moju, São Miguel do Guamá, São João da Ponta, Santo Antônio do Tauá, Santa Izabel do Pará, Santa Maria do Pará, Santarém, Paragominas e Tomé-açu. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos dentro da caixa de isopor e levadas o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

Parte das amostras foliares foi dessecada, em dessecador contendo sílica gel a 4 °C e armazenada em frascos em freezer -20 °C, e a outra utilizada nos testes de diagnose PTA-ELISA e RT-PCR.

Teste PTA-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para execução do teste de diagnose foi utilizado o teste sorológico PTA-ELISA. Os vírus testados foram: CMV, PRSV-w, ZYMV, SqMV, WMV e ZLCV de acordo com o protocolo (MOWAT e DAWSON, 1987) utilizando antissoros específicos para cada vírus e anticorpo anti-coelho. As avaliações de absorvância a 405 nm foram feitas após a adição de substrato (p-nitrofenil fosfato), utilizando uma leitora de microplaca de UV.

Foi pesado 1g de folhas e macerado com 10 ml de tampão de carbonato de sódio (1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; 1,00L H₂O; pH 9,6). Em seguida, foram pipetados 100 µL das amostras na placa de ELISA, e posta para incubação à 37 °C durante 60 min, logo após a incubação, as placas foram lavadas manualmente com o tampão de lavagem PBS-Tween 8 g NaCl; 0,20 g NaH₂PO₄; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,20 g KCl; 1,00 L H₂O; 0,50 mL de Tween 20; pH 7,4). Após a lavagem foi pipetado na placa de ELISA o anticorpo específico para cada vírus a ser testado, diluído em Tris-HCl (0,20 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2), e incubação por 60 min a 37 °C. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com o tampão PBS-Tween. Após adição do conjugado anticorpo anti-coelho conjugado com (fosfatase alcalina) fez-se a incubação de 60 min a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada com o tampão PBS-Tween e, posteriormente adicionou-se p- nitrofenil fosfato diluído (0,5 mg/mL) em dietanolamina (97 mL dietanolamina; 1,0 L H₂O;). As placas foram colocadas para incubar a temperatura ambiente por 15 a 30 min e levadas ao leitor de ELISA para medição da absorvância.

Os resultados foram analisados comparando amostras infectadas e sadias (I/S). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram o dobro do valor de absorvância do controle sadio. Extratos de folhas de abóbora foram usados como controles negativos. Foram utilizados extratos de folhas infectadas com cada vírus como controle positivo. O controle positivo de ZLCV foi cedido gentilmente pela Doutora Mirtes Freitas Lima da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

RT-PCR E SEQUENCIAMENTO

Para avaliar a diversidade genética dos isolados a serem selecionados de cada espécie encontrada foi realizado o teste de RT-PCR, sequenciamento de DNA e estudo filogenético.

A extração RNA total foi realizada para todas as amostras coletadas de acordo com Gibbs e Mackenzie (1997). 100 mg de folhas com sintomas, foram maceradas em almofariz gelado, utilizando 1600 µL do tampão de lavagem *Wash buffer* (10 mM de tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05% BSA) e 10 µL de β- mercaptoetanol. Em seguida o material foi transferido para microtubos de 2 mL, e levados para agitação, em agitador de tubos, depois foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 800 µL de tampão CTAB (2% de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio); 1,4 M de NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5% mercaptoethanol) e homogeneizado por 2 min. A suspensão foi incubada a 55 °C por 30 min. Logo após, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi homogeneizada por 2 min. E depois centrifugada a 13.200 rpm por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2 mL. Esta última fase foi repetida e posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Acrescentou-se 600 µL de isopropanol gelado e 60 µL de acetato de amônio. Após a agitação da solução, o material foi posto para incubar a -20 °C por 20 min. Depois de submetido a centrifugação a 13.200 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de álcool etílico a 70% e centrifugação 13.200 rpm por 2 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco e ressuspenso com 50 µL de água ultrapura e armazenado a -20 °C. Foram utilizadas amostras foliares como controles negativos (sadios) e positivos (infectados) para os vírus testados.

Para a síntese do cDNA, a transcrição reversa foi realizada em um microtubo empregando-se 0,25 µL do *primer reverse*, 3,0 µL do RNA extraído e 5,0 µL de água ultrapura. O microtubo foi incubado à 70 °C por 10 min, foi imediatamente transferido para o gelo por 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 2,0 µL de tampão da transcriptase reversa (M-MLV), 0,5 µL de dNTP(10mM), 0,15 µL da enzima RT e 1,8 µL de água ultrapura. Posteriormente, fez-se a incubação da reação por 50 min a 37 °C, e em seguida por 15 min a 70 °C.

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando de cDNA (DNA complementar), 5 µL de tampão 5X, 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL de primers (10mM), 0,15 L de Taq Polimerase, 0,5 µL de dNTP (10mM), 12,85 µL de água ultra-pura.

Para as espécies do gênero *Potyvirus* foi utilizado o par de *primer* universal PV1 e WCIEN para detecção do ZYMV. O ciclo consistiu em 94 °C/30 segundos, 60 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 57 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, e polimerização final de 68 °C durante 7 minutos. Por não ocorrer a amplificação dos vírus PRSV-w e WMV com o par de *primer* citado, foi utilizado o par de *primer* (MJ1 e MJ2).

A amplificação consistiu de 35 ciclos de amplificação; desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento e 50 °C por 1 min; e extensão de por 1 min a 72 °C. Posteriormente, fez-se uma extensão final a 72 °C por 3 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e analisado em fotodocumentador.

Os fragmentos de DNA produzidos por PCR foram limpos utilizando o kit Wizard PCR (Promega) e quantificados. O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa Helixxa DNA for Life (Campinas-SP), utilizando o sequenciador Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser da Next Generation Sequencing. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram comparadas com os acessos depositados no GenBank utilizando os programas o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), Clustal W (THOMSON *et al.*, 1994) e MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste PTA-ELISA

Os resultados sorológicos indicaram que PRSV-w, ZYMV, foram os vírus mais frequentes nos municípios visitados, seguidos do CMV e WMV. O ZLCV não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Amostras de cucurbitáceas provenientes de regiões produtoras do Estado do Pará, submetidas ao teste PTA-ELISA, para os seguintes vírus: CMV, PRSV-W, ZYMV, WMV, ZLCV.

Local de coleta	n° de amostras coletadas	n° de amostras negativas	n° de amostras c/infecção mista	Amostras/Positivas					
				C M V	P R S V w	Z Y M V	S q M V	W M V	Z L C
Ananindeua	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Baião	3	2	0	0	0	1	0	0	0
Benevides	11	4	6	1	2	4	0	0	0
Belém	7	6	1	1	1	0	0	0	0
Curuçá	23	13	0	0	5	0	5	0	0
Moju	2	0	0	0	0	2	0	0	0
Paragominas	13	0	10	3	7	3	0	0	0
Santo Antônio do Tauá	5	0	0	0	0	5	0	0	0
Santa Izabel do Pará	9	0	9	0	9	9	0	0	0
São João da Ponta	5	3	0	1	1	0	0	0	0
Santa Maria do Pará	16	4	0	0	3	0	8	1	0
São Miguel do Guamá	3	1	0	0	0	2	0	0	0
Santarém	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Tomé-açu	2	0	0	0	2	0	0	0	0
Total	101	33	26	6	30	26	15	1	0

Os resultados sorológicos indicaram que PRSV-w, ZYMV, foram os vírus mais frequentes nos municípios visitados, seguidos do CMV e WMV. O ZLCV não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas (**Tabela 1**).

RT-PCR E SEQUENCIAMENTO

Para o teste de diagnose utilizando o teste molecular RT-PCR foram selecionadas as amostras positivas para *potyvirus* no teste PTA-ELISA.

O ZYMV foi detectado pelo par de *primer* PV1 e WCIEN na concentração de 800 pb (**Figura 1**). Obtendo a concentração necessária de DNA para realização do sequenciamento nucleotídico desse vírus. As seqüências de

nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no GenBank utilizando os programas o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Clustal W e MEGA 5.0 (Tabela 2). O PRSV-w e WMV não amplificaram para o par de *primer* PV1 e WCIEN, devido este motivo, foi utilizado o par de *primer* MJ1 e MJ2 na concentração de 321 pb (Figura 2) para o sequenciamento.

As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no GenBank utilizando os programas o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Clustal W e MEGA 5.0. A árvore filogenética gerada a partir de 21 seqüências de nucleotídeos para PRSV-w agrupou os isolados paraenses em 3 grupos distintos. No grupo 1 o isolado BR_PA11 agrupa-se com isolados de São Paulo e Distrito Federal. No grupo 2 os isolados BR_PA 8 e BR_9 juntam-se ao acesso oriundo da Paraíba. No entanto o grupo 3 é composto pelos isolados BR_PA5, BR_PA7, BR_10 e BR_PA12 juntamente com um isolado do Distrito Federal e um de Cuba, evidenciando a proximidade genética entre os isolados paraenses com os acessos brasileiros (Figura 3). No entanto árvore filogenética que relaciona os aminoácidos, os isolados do Pará de PRSV-w agruparam-se em um mesmo ramo, mostrando um alto grau de identidade genética entre os isolados, mesmo que estes sejam de municípios diferentes (Figura 4).

Figura 1. Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para os *primer* PV1 e WCIEN, para identificação de ZYMV. M- marcador 1kb; 1- pepino de Santa Maria do Pará; 2- abóbora de Baião; 3- pepino de Santo

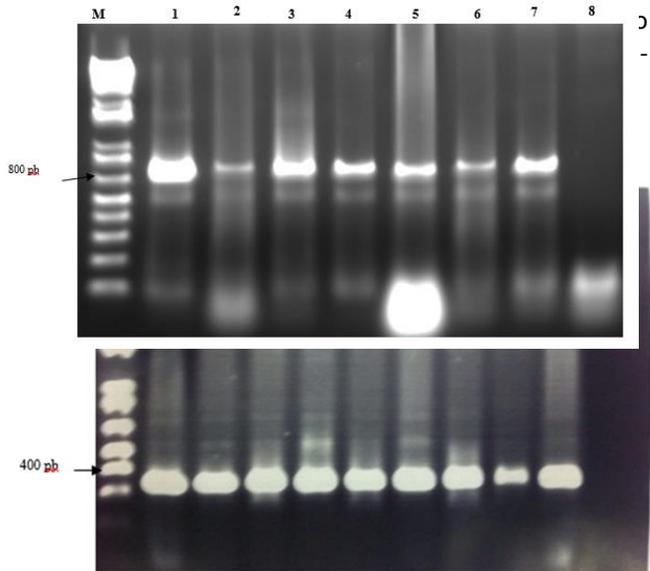


Figura 2. Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para o par de *primer* MJ1 e MJ2. Amostras positivas para os vírus PRSV-w e WMV. M- marcador 1kb; 1- controle positivo; 2- abóbora de São João da Ponta; 3- abóbora de Santa Izabel do Pará; 4- maxixe de Santarém; 5- abobrinha de Tomé-açu; 6- abóbora de Tomé-açu; 7- melancia de Santa Maria do Pará; 8- maxixe de Santa Maria do Pará; 9- maxixe de Curuçá, 10- controle negativo.

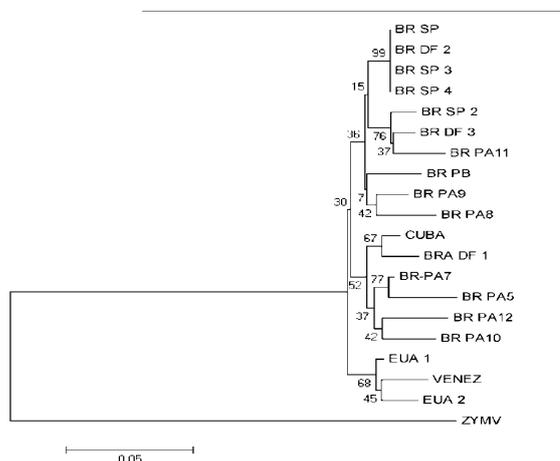


Tabela 2. Número de amostras coletadas/ espécies em cada localidade.

Espécies	Nº de amostras/ espécies	Amostras positivas				
		CMV	PR SV w	ZY M V	SqM V	ZLCV
<i>Cucubita sp.</i>	40	6	10	8	10	0
<i>Citrulus lanatus</i>	21	0	10	5	5	0
<i>Cucumis sativas L.</i>	25	0	6	5	0	0
<i>Cucumis anguria L.</i>	15	0	4	8	0	0

Figura 3. Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.

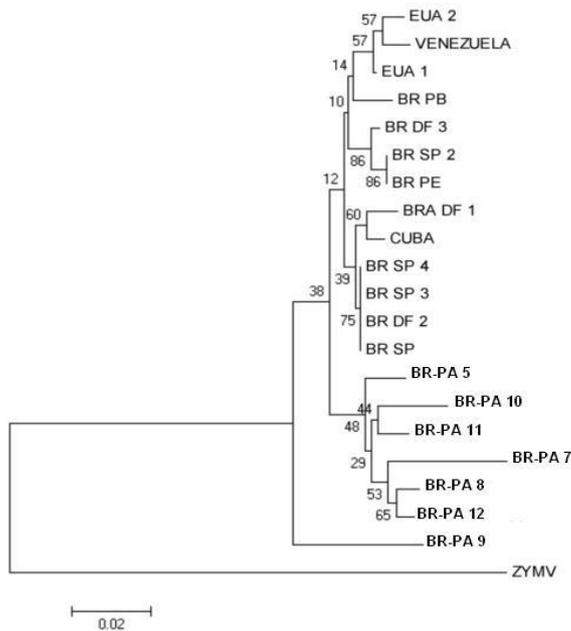
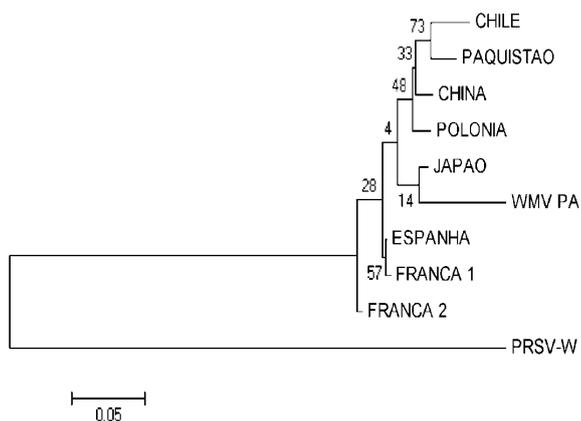


Figura 4. Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das sequências aminoácidos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.



As sequências de nucleotídeos de ZYMV do estado do Pará mostraram diferenças nucleotídicas entre si, evidenciando variabilidade genética entre isolados de ZYMV oriundas do mesmo estado (Figura 5). No entanto a árvore filogenética dos aminoácidos agrupou os isolados paraenses em um mesmo ramo, juntamente com acessos brasileiros oriundos do Paraná, Pará, Distrito Federal, Mato Grosso,

Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Rio grande do Norte e também com acessos estrangeiros provenientes dos Estados Unidos, Sérvia, Índia e Iraque. Porém se diferenciaram de outro acesso vindo do Distrito Federal e dos isolados oriundos do estado de São Paulo (Figura 6).

A árvore filogenética que relaciona a sequência de WMV paraense com acessos estrangeiros mostrou que essa sequência tem alto grau de identidade genética com o acesso proveniente do Japão (Figura 7). Essa similaridade genética foi confirmada quando ocorreu a comparação entre os aminoácidos de WMV do Pará com o isolado japonês e também com os outros acessos estrangeiros.

Figura 5. Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento de nucleotídeos da parte do gene de proteína capsidial dos isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.

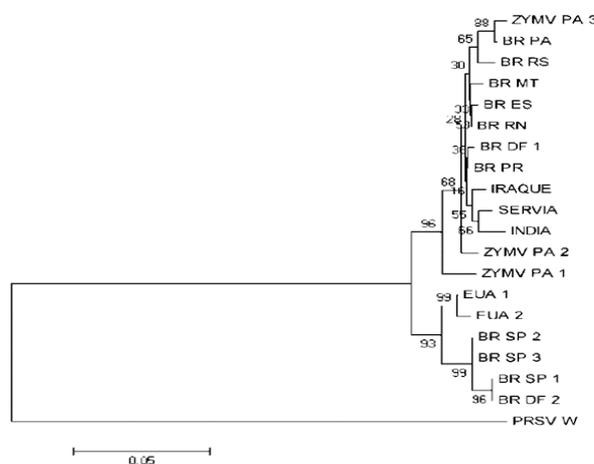
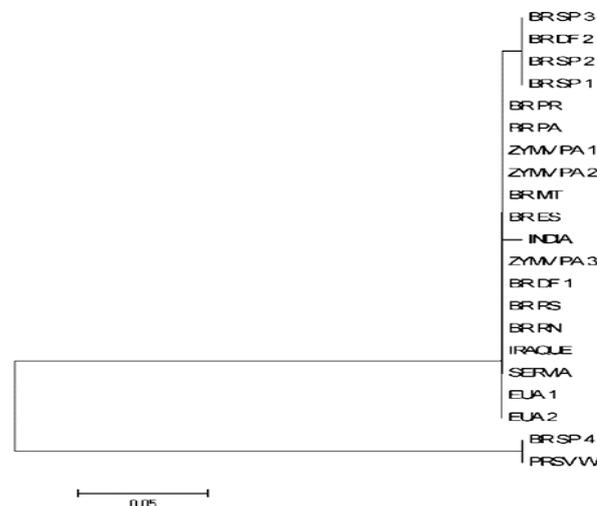


Figura 6. Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de parte do gene da capa protéica de isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.



Das 40 amostras de *Cucurbitas* sp. coletadas, 6 estavam infectadas como o CMV, 10 com PRSV-w, 8 com ZYMV e 10 com SqMV. No entanto das 21 amostras de *C. lanatus* coletadas 10 foram positivas para PRSV-w, 5 para ZYMV e 5 para SqMV. Já as 25 amostras de *C. sativus*, 6 foram positivas para PRSV-w e 5 para ZYMV. Todavia as 15 amostras de *C. anguria* coletadas, 4 foram positivas para o PRSV-w e 8 para ZYMV.

O PRSV-w foi um dos vírus de maior incidência nas amostras coletada estando presente em dez amostras de abóbora, dez de melancia, seis de pepino e quatro de maxixe. Essas amostras foram provenientes das localidades de Belém, Curuçá, Santa Maria do Pará, Santa Izabel do Pará, São João da ponta, Santarém e Tomé-açu, em infecção simples. Em Benevides, Paragominas e Santa Izabel do Pará esse vírus foi constatado em infecção mista com o ZYMV. O PRSV-W encontra-se distribuído em escala mundial e é de grande importância econômica onde estão presentes as lavouras de cucurbitáceas (PURCIFULL *et al.*, 1984). Perdas na produção e a incidência já foram estimadas por outras regiões do País, inclusive no Nordeste brasileiro (NELSON *et al.*, 1962; OLIVEIRA *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2003).

No Brasil, grande atenção tem sido dada ao PRSV-W, por ser o vírus de maior abrangência geográfica detectado em cucurbitáceas. O mesmo já foi identificado em vários estados, causando grandes prejuízos à produção de diversas espécies de cucurbitáceas (LIMA *et al.*, 1980; PAVAN *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2000). O PRSV-w também é de ocorrência predominante em regiões produtoras de melão de Belém (ALBUQUERQUE *et al.*, 1972) e em abóbora e melancia em Igarapé-açu (POLTRONIERI *et al.*, 2000), em várias cucurbitáceas no Maranhão (MOURA *et al.*, 2001) na cultura da melancia em Roraima (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004) no Tocantins (NASCIMENTO *et al.*, 2011) e em acessos de abóboras de Brasília-DF (LIMA e COSTA, 2011).

O ZYMV foi o segundo vírus de maior frequência, sendo detectado em oito amostras de abóboras, cinco de melancia, cinco de pepino e oito de maxixe (**Tabela 2**). Essas amostras são provenientes dos municípios de Benevides, Paragominas e Santa Izabel do Pará, Baião, São Miguel do Guamá, Santo Antônio do Tauá, Moju, Santa Maria do Pará. Este vírus já foi relatado por Poltronieri *et al.*, (2000) no estado do Pará no município de Igarapé-açu, e na bucha (HAYASHI *et al.*, 2013). Foi registrado infectando melancia e abóboras nos estados do Tocantins (NASCIMENTO *et al.*, 2011; ALENCAR *et al.*, 2012), Ceará e em Brasília (LIMA *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2014) e em diferentes cucurbitáceas no estado de São Paulo (CÓRDOVA, 2010; SANTOS, 2011).

As amostras abóbora de Baião, abobrinha de Tomé-açu e maxixe de Curuçá foram positivas para os vírus ZYMV e PRSV-w respectivamente, ao serem inoculadas em abóbora cv. Caserta mostrando sintomas de mosaico e deformação foliar (Figura 1).

CONCLUSÕES

Os estudos sorológico, molecular e o sequenciamento comprovaram a presença das principais viroses que acometem as cucurbitáceas no estado do Pará. Os resultados obtidos mostraram a abrangência dos *Potyvirus* no estado, pois todas as espécies investigadas foram detectadas nas análises. O PRSV-w, como já relatado em outros estados, é o vírus mais frequente na cultura das cucurbitáceas, seguido dos vírus ZYMV e do WMV.

Outro vírus encontrado foi o CMV que tem grande importância por possuir uma ampla gama de plantas hospedeiras.

O SqMV tem sido avaliado como um vírus de baixa importância no território nacional. Entretanto, os resultados obtidos mostram que essa não é a mesma realidade no estado do Pará, onde grande parte das amostras coletadas se apresentavam infectadas com o SqMV. Isso mostra que o vírus encontrou na região condições ideais para se disseminar e infectar hospedeiras locais. Esses relatos serão de grande importância para estudos de melhoramento genético e elaboração de uma estratégia de manejo adequada para as espécies de cucurbitáceas infectadas por esse vírus. Justificando, assim os estudos acerca desses vírus no estado.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H. & COSTA, A. S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad.) em plantações de melão (*Cucumis melo* L.) na região de Belém-PA. Revista de Olericultura v.12, p.94, 1972 (Resumo).
- ALENCAR, N. E.; FIGUEIRA, A. R.; ALMEIDA, J. E. M.; LUCAS, M. A., SANTOS, L. B., NASCIMENTO, I. R. Journal of Biotechnology and Biodiversity. v. 3, N.1: pp. 32-37, Fev. 2012.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. v. 215, p. 403-410, 1997.
- BARBOSA, G.S.; NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA, F. R.; LIMA J. A. A.; DIAS R. C. S. Reação de acessos de Cucurbita spp. a vírus do gênero Potyvirus. Horticultura Brasileira, v. 30: S2161-S2168, 2012.
- CÓRDOVA, P. J. M. Infecção natural e experimental de cucurbitáceas com o vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe mamoeiro e implicações epidemiológicas. Dissertação de mestrado-Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 2010.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods, Amsterdam, v. 63, p.9-16, 1997.
- HAYASHI, E. A. I.; BOARI, A. J.; CARVALHO, T. P. Detecção de *Potyvirus* em bucha (*Luffa cylindrica* (L.) roem.) no estado do Pará. In: 17º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 1º seminário de pós-graduação da EMBRAPA Amazônia Oriental. 21 A 23 DE AGOSTO DE 2013, BELÉM-PA. 2013, Belém. Resumo. Belém: Pará, 2013,5p.

- HALFELD-VIEIRA, B. A.; RAMOS, N. F.; RABELO FILHO, F. A. C.; GONÇALVES, M. F. B.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; LIMA, J. A. A. Identificação sorológica de espécies de *potyvirus* em melancia, no estado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p.687-689, 2004.
- LIMA, J. A. A., FERNANDES, E. R. & MENDES, M. L. Identificação sorológica de *Watermelon mosaic virus* em cucurbitáceas cultivadas e nativas do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira*, v. 5, p.414. 1980. (Resumo).
- LIMA, M. F.; ALVES, R. C. Levantamento de vírus em cucurbitáceas no Brasil, no período 2008-2010. *Boletim de pesquisa técnica e desenvolvimento* 76. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2011.
- LIMA, M. F.; COSTA, J. R.; AMARO, G. Reação de 55 genótipos de abóboras e morangas à infecção natural com *Papaya rings potvirus* – type watermelon (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZyMV) em campo. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, (Suplemento) 36, 2011, Bento Gonçalves, RS. *Tropical Plant Pathology*, Bento Gonçalves, RS: 2011.
- MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virology Methods*, v. 15, p. 233-247. 1987.
- MOURA, M. C.C.; LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, V. B.; GONÇALVES, M. F. B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26:90-92, 2001.
- NASCIMENTO, I. R. dos.; SANTOS, L. B. dos.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, G. R. dos.; AGUIAR, R. W.S.; MALUF, W. R. GILBERTO IRIS SOUZA DE OLIVEIRA, G. I. S. DE. 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. 2, n. 1: p. 22-29, 2011.
- NELSON, M.R.; ALLEN, R. M.; TUTTLE, D.M. Distribution, prevalence and importance of some cantaloup virus disease in Southwestern Arizona. *Plant Disease Reporter*, v. 46, p. 667-672, 1962.
- OLIVEIRA, V.B., LIMA, J.A.A., VALE, C.C. ; PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 628-636, 2000.
- PAVAN, M. A., CARVALHO, M. G. & FERNANDES, J. J. Distribuição do vírus do mosaico da melancia (*Papaya ringspot virus-w*), nas principais regiões produtoras de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) e Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 14, p.84-85. 1989.
- POLTRONIERI, L.S.; NOVAES, Q. S.; DIAS, P. R.; REZENDE, J. A. M.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; KITAJIMA, E. W. Constatação do *Zucchini yellow mosaico virus* em cucurbitáceas no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* (Impresso) (Cessou em 2007. Cont. ISSN 1982-5676 *Tropical Plant Pathology* (Impresso)), Brasília, v. 25, n.4, p. 667, 2000.
- PURCIFULL, D. E.; EDWARDSON, J. R.; HIEBERT, E.; GONÇALVES, D. *Papaya ringspot virus* (revised) N° 292 In: *Descriptions of plant viruses*. CMI/AAB, Kew, Surrey, England. 1984.
- 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, p.1999-203, 2003.
- ROMANO, C. M.; STUMPF, R.T; BARBIERI, R. L; BEVILAQUA, G. A.P; RODRIGUES, W.F. *Polinização Manual e Abóboras*. Documentos, 225, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.
- SANTOS, V. C. dos. Caracterização de resistência da moranga (*Cucurbita maxima*) “Exposição” ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirusna resistência das plantas. 2011. 57f. Dissertação de mestrado-Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2011.
- SOUZA, T.; LIMA, M. F.; AMARO, G. B. Avaliação da incidência de cinco vírus em genótipos de abóboras e morangas (*cucurbita* spp.), em experimento a campo. III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças, DF, 2013.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.L. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, p.2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121, 2007.
- TAVARES, A. T.; CHAVES, P. P. N.; AGUIAR, R. W. S.; SANTOS, M. F.; SARMENTO, R. A.; NASCIMENTO, I. R. Phenotypic response of pumpkin and melon plants to infection by simple isolates of ZYMV and mixed ZYMV+SQMV. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, Vol. 5, n.1: p. 79-87, February, 2014.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.

Submissão: XX/XX/202X

Aprovado para publicação: XX/XX/XXXX