

Efeito de Diferentes Variáveis na Infetividade de Estirpes Fracas do *Papaya ringspot virus* em Plantas de Melancia*

José Segundo Giampan^{1**} & Jorge Alberto M. Rezende^{1***}

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Cx. Postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, fax (019) 3434-4839, e-mail: jamrezen@esalq.usp.br.

(Aceito para publicação em 16/09/2004)

Autor para correspondência: Jorge Alberto Marques Rezende

GIAMPAN, J.S. & REZENDE, J.A.M. Efeito de diferentes variáveis na infetividade de estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia. *Fitopatologia Brasileira* 30:39-45. 2005.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo inicial selecionar uma estirpe fraca do *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) de bolhas de folhas de melancia (*Citrullus lanatus*) com mosaico. A infetividade dessa estirpe, PRSV-W-3, em plantas de melancia foi comparada com a das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2, previamente selecionadas de bolhas de folhas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) cv. Caserta com mosaico. Além do efeito da origem da estirpe fraca na infetividade de plantas de melancia, avaliaram-se, ainda, os efeitos da concentração do inóculo, da espécie da planta fonte do inóculo e da idade da planta de melancia inoculada. Como controle, foi utilizada uma estirpe severa do vírus obtida de abobrinha de moita (PRSV-W-C). A avaliação do efeito da concentração e da espécie da planta fonte do inóculo foi feita com extratos de quatro, oito, 12 e 16 discos de folhas de abobrinha de moita e de melancia, infetadas separadamente com as estirpes fracas e severa, e diluídos em 2 ml de tampão fosfato. O efeito da idade da planta-teste de melancia foi estudado comparando-se plantas inoculadas em três estádios de desenvolvimento, com inóculos das estirpes do PRSV-W extraídos de 12 discos foliares/2 ml de tampão. Em todos os testes de infetividade, independente da concentração do inóculo, da planta fonte do inóculo e do estádio de desenvolvimento da planta-teste, a estirpe fraca PRSV-W-3 apresentou taxas de infetividade semelhantes as das estirpes PRSV-W-1 e PRSV-W-2, chegando a 100% em alguns casos. A infetividade da estirpe severa PRSV-W-C foi de 100%. A infetividade das três estirpes fracas está mais diretamente associada à intensidade de fricção das folhas no momento da inoculação do que às outras variáveis estudadas.

Palavras-chave adicionais: *Citrullus lanatus*, Cucurbitaceae, imunização.

ABSTRACT

The effect of different variables on the infectivity of mild strains of *Papaya ringspot virus* in watermelon plants

The initial purpose of this work was to select a mild strain of *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) from blisters on watermelon (*Citrullus lanatus*) infected with severe strains of the virus. The infectivity of this mild strain, PRSV-W-3, on watermelon plants was compared with that of mild strains PRSV-W-1 and PRSV-W-2, which were previously obtained from blisters formed on mosaic leaves of zucchini squash (*Cucurbita pepo*) cv. Caserta. The infectivity of these mild strains was also evaluated based on the concentration of inoculum, the species source of the inoculum and the age of the watermelon plant inoculated. A severe strain isolated from zucchini squash (PRSV-W-C) was used as control. The effect of the concentration and the species source of inoculum of the mild strains on the infectivity of watermelon plants were studied with inocula extracted from four, eight, 12 and 16 leaf discs of zucchini squash and watermelon plants, separately infected with the mild and severe strains, diluted in 2 ml of phosphate buffer. Three stages of development of watermelon plants were tested for the infectivity with the mild strains. Inoculum was prepared with extracts of 12 leaf discs diluted in 2 ml of buffer. The rate of infection of mild strain PRSV-W-3 was similar to that of mild strains PRSV-W-1 and PRSV-W-2 in all infectivity tests, irregardless of the concentration of inoculum, species source of inoculum or stage of development of the test-plant, which reached 100% in some cases. The infectivity of the mild strains on watermelon was more directly related to the intensity of the abrasion produced by mechanical inoculation than with the above studied variables.

Additional keywords: *Citrullus lanatus*, Cucurbitaceae, pre-immunization.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de viroses tem-se constituído num problema de grande relevância no cultivo da melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai], assim como da

maioria das cucurbitáceas. Dentre as viroses constatadas em melancia, o mosaico comum causado pelo *Papaya ringspot virus* - type Watermelon (PRSV-W) família *Potyviridae* gênero *Potyvirus* é considerado um dos mais importantes, devido à predominância do vírus em áreas importantes de produção de cucurbitáceas no país (Ávila *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 1997; Stangarlin *et al.*, 2000; Yuki *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003).

Embora existam fontes de resistência ao PRSV-W em

*Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor. ESALQ/USP (2003);

**Bolsista FAPESP;

***Bolsa de produtividade do CNPq.

melancia (Oliveira *et al.*, 2002), o controle do mosaico é muito difícil devido ao baixo nível de resistência das cultivares disponíveis, à ineficiência do controle químico dos afídeos vetores e à dificuldade da utilização prática de métodos culturais que minimizem a disseminação do vírus nos plantios (Costa & Costa, 1971; Chalfant *et al.*, 1977; Wyman *et al.*, 1979 e Yuki, 1990). O uso da premunização com estirpes fracas protetoras tem demonstrado grande eficiência no controle dessa virose em abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) cv. Caserta (Rezende & Pacheco, 1998), abóbora rasteira [*C. moschata* (Duch. ex Lam) Duch ex Poir] cv. Menina Brasileira (Rezende *et al.*, 1999) e em abóbora híbrida (*C. maxima* Duch. ex Lam x *C. moschata*) do tipo ‘Tetsukabuto’ (Dias & Rezende, 2000). Entretanto, a premunização de melancia com as estirpes fracas selecionadas a partir de bolhas de folhas de abobrinha de moita com mosaico (Rezende *et al.*, 1994) não mostraram efeitos tão satisfatórios como nas espécies anteriormente mencionadas. Dias & Rezende (2001) notaram, inicialmente, que essas estirpes fracas apresentaram baixa infetividade em plantas de melancia, sendo necessárias duas inoculações sucessivas para permitir a infecção de aproximadamente 80% das mudas. Além disso, em três testes em campo, os autores verificaram reduções variando de 10,8 a 50% na produção das plantas premunizadas em relação às sadias, apesar do eficiente efeito protetor das estirpes fracas contra a infecção e/ou manifestação de sintomas das estirpes severas do vírus. A baixa infetividade das estirpes fracas em melancia, conforme propuseram Dias & Rezende (2001), pode estar associada à especificidade das estirpes, uma vez que foram obtidas de plantas de abobrinha de moita.

Diante desses fatos e objetivando viabilizar o uso da premunização para o controle do mosaico em melancia, este trabalho teve por objetivos selecionar estirpes fracas a partir de plantas de melancia infetadas naturalmente com o PRSV-W e comparar a sua infetividade com a das estirpes fracas selecionadas em plantas de abobrinha de moita. Adicionalmente, estudou-se o efeito da espécie fonte de inóculo, diluição do inóculo, pressão de inoculação e idade das mudas na infetividade das estirpes fracas em melancia.

MATERIALE MÉTODOS

Plantas-teste

Foram utilizadas plantas de melancia cv. Crimson Sweet e de abobrinha de moita cv. Caserta. As plantas foram cultivadas em vasos de alumínio contendo uma mistura de solo e esterco, colocando-se três sementes por vaso e, por ocasião do desbaste, foram deixadas duas plantas em cada vaso.

Estirpes do PRSV-W e inoculação mecânica

Foram utilizadas as duas estirpes fracas, PRSV-W-1 e PRSV-W-2, selecionadas por Rezende *et al.* (1994), e uma estirpe severa do PRSV-W, oriunda de Campinas/SP (PRSV-W-C). As estirpes foram mantidas em abobrinha de moita e em melancia, sob condições de casa de vegetação.

Para a inoculação mecânica das plantas-teste,

inicialmente obtiveram-se os inóculos macerando folhas das plantas fonte das estirpes do vírus em almofariz contendo tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfato de sódio 0,02 M. Os extratos foram inoculados em folhas cotiledonares das plantas-teste, polvilhadas com carborundum, por meio de fricção com o dedo indicador ou o pistilo, passando-os duas vezes sobre cada cotilédone. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação dos sintomas.

PTA-ELISA

A detecção de infecção com estirpes do PRSV-W em plantas de melancia e de abobrinha de moita foi feita por meio do teste sorológico de “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) do tipo “Plate Trapped Antigen” (PTA) (Mowat & Dawson, 1987), com as seguintes modificações: a) o anti-soro foi diluído em Tris-HCl, pH 7,2; b) foi usado “goat anti-rabbit IgG” conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A-8025), diluído 1:34.000 em Tris-HCl e c) em todas as etapas o tempo de incubação foi de 1,5 h. Extratos de plantas infetadas com a estirpe severa do PRSV-W e de plantas sadias, respectivamente, foram utilizados como controles. A absorbância foi medida no leitor de ELISA, da marca Metertech Σ 960, utilizando-se filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedeu em três vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

Seleção de estirpes fracas do PRSV-W

Na tentativa de encontrar estirpes fracas a partir de bolhas de folhas de melancia com mosaico, foi utilizado o procedimento descrito por Rezende *et al.* (1994). Folhas de plantas de melancia infetadas foram coletadas em uma propriedade no município de Tupã-SP. Do centro de cada bolha foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro. Estes foram macerados na superfície de etiquetas plásticas na presença de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfato de sódio 0,02 M. O extrato foi inoculado mecanicamente em folhas cotiledonares de uma planta de abobrinha de moita. As plantas inoculadas foram avaliadas com base na manifestação e intensidade dos sintomas, utilizando uma escala de notas de 1 a 5, proposta por Rezende *et al.* (1994). Plantas sem sintomas e que foram positivas no PTA-ELISA, com o anti-soro contra o PRSV-W, foram selecionadas como portadoras de possíveis estirpes fracas do vírus.

Teste de proteção da estirpe fraca em casa de vegetação

Plantas de melancia, mantidas em casa de vegetação, foram mecanicamente inoculadas com a estirpe fraca selecionada de bolhas de folhas de melancia. Foram feitas duas inoculações em dias consecutivos no estádio de folha cotiledonar. Dez dias após a inoculação, as plantas foram indexadas por PTA-ELISA para confirmar a infecção com a estirpe fraca. O desafio (superinoculação) com a estirpe severa foi feito 15 dias após a inoculação de premunização, inoculando-se mecanicamente duas folhas expandidas do ponteiro das plantas. Planta sadia, da mesma idade, foi inoculada com a

estirpe PRSV-W-C como controle do inóculo do desafio. O segundo desafio foi realizado dez dias após o primeiro, em metade das plantas já desafiadas, novamente inoculando uma planta sadia como controle do inóculo. As avaliações foram feitas com base na manifestação de sintomas e no teste de recuperação das estirpes do vírus para plantas de abobrinha de moita. Para isso, folhas expandidas das extremidades dos ramos de plantas de melancia, premunizadas com as estirpes fracas e superinoculadas, foram coletadas, após 20 a 25 dias da segunda superinoculação. Essas folhas foram maceradas e os extratos resultantes foram inoculados mecanicamente em folhas cotiledonares de plantas de abobrinha de moita 'Caserta'. As avaliações do teste de recuperação foram feitas através de leituras de sintomas e PTA-ELISA.

Teste de infetividade das estirpes fracas

A infetividade das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 foi comparada com a da estirpe fraca selecionada de bolhas de folhas de melancia com mosaico, quando inoculadas mecanicamente em plantas-teste de melancia. Além da origem das estirpes fracas (abobrinha de moita/melancia), também foram avaliados os efeitos da espécie fonte dos inóculos das estirpes fracas (abobrinha de moita/melancia); da concentração dos inóculos e do estágio de desenvolvimento das plantas de melancia no momento da inoculação na infetividade dessas estirpes. O inóculo foi coletado das plantas fontes das estirpes fracas no período de dez a 14 e 14 a 20 dias após a inoculação, no verão e no inverno respectivamente, que correspondem à época de maior concentração das estirpes fracas em abobrinha de moita e em melancia (Pacheco *et al.*, 2003). Como controle, em todos os testes, foi usada a estirpe severa PRSV-W-C.

Os testes de infetividade foram realizados retirando-se discos foliares de plantas de abobrinha de moita ou de melancia infetadas com as três estirpes fracas e com a estirpe severa de Campinas, separadamente. Esses discos, agrupados em número de quatro, oito, 12 e 16 foram macerados em almofariz, juntamente com 2 ml de tampão fosfato de potássio. Os extratos obtidos foram inoculados, separadamente, em plantas de melancia no estágio cotiledonar. A inoculação mecânica foi realizada utilizando o pistilo de maceração, friccionando-o duas vezes nas folhas cotiledonares polvilhadas com carborundum. A infecção das plantas de melancia foi avaliada com base em sintomas e PTA-ELISA.

Com a finalidade de avaliar o efeito da pressão de fricção na infetividade, foram realizados testes usando as mesmas estirpes nas concentrações descritas acima, efetuando-se a inoculação mecânica com o dedo indicador, procurando aumentar a força de fricção em relação à rotineiramente empregada nas inoculações, onde se friccionam com pressão suave as folhas para evitar danos físicos. Além disso, realizaram-se três ou quatro fricções nas folhas cotiledonares. As avaliações foram feitas como descritas anteriormente.

Para avaliar o efeito da idade das mudas de melancia na infetividade das estirpes fracas, foram comparadas inoculações nos seguintes estágios de desenvolvimento: I) estágio de folha cotiledonar; II) estágio de duas folhas verdadeiras, estando a

segunda parcialmente expandida e III) estágio de cinco a sete folhas verdadeiras. A inoculação com as estirpes fracas foi efetuada mecanicamente, com o dedo indicador, utilizando inóculos extraídos de 12 discos foliares, de 1 cm de diâmetro, macerados em 2 ml de tampão fosfato. As plantas foram avaliadas através da leitura de sintomas e de PTA-ELISA.

Análise estatística

A análise estatística da infetividade das três estirpes fracas e da estirpe severa do PRSV-W em plantas de melancia, inoculadas em quatro concentrações com o auxílio do pistilo de maceração, considerando o delineamento em blocos ao acaso no esquema fatorial 4 x 4, foi realizada com o auxílio do programa "General Linear Model" (GLM) do sistema estatístico "Statistical Analysis System" (SAS). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Estirpe fraca do PRSV-W

Foram obtidos inóculos de 30 discos de bolhas retiradas de folhas de plantas de melancia naturalmente infetadas com o PRSV-W em campo. Desses, 28 causaram sintomas severos quando inoculados em abobrinha de moita. Dois induziram sintomas fracos e imperceptíveis em abobrinha de moita. Extratos dessas plantas reagiram com o anti-soro contra o PRSV-W em PTA-ELISA. Uma estirpe mostrou-se estável e foi denominada PRSV-W-3, sendo mantida em plantas de abobrinha de moita e em melancia. A outra estirpe, depois de algum tempo, intensificou os sintomas nas plantas-teste e foi descartada.

Efeito protetor da estirpe fraca PRSV-W-3 em casa de vegetação

Foram realizados dois testes independentes para avaliar o efeito protetor da estirpe fraca PRSV-W-3 em plantas de melancia. Todas as 20 plantas premunizadas com essa estirpe ficaram protegidas contra a infecção e/ou manifestação da estirpe severa do vírus, PRSV-W-C. A proteção foi eficiente mesmo quando outras 20 plantas premunizadas foram desafiadas duas vezes com a estirpe severa. Quatro plantas sadias de melancia, inoculadas com a estirpe severa usada no desafio (controle) mostraram sintomas severos característicos da doença. A recuperação da estirpe do vírus das plantas de melancia premunizadas e desafiadas, para plantas de abobrinha de moita, feita aos 45 dias após a premunização, confirmou o efeito protetor da estirpe PRSV-W-3. Em nenhuma das plantas de abobrinha de moita observou-se sintomas severos de mosaico, constituindo um indicativo de que a estirpe severa do PRSV-W não se estabeleceu durante as superinoculações. A confirmação da infecção dessas plantas de abobrinha de moita com a estirpe fraca usada na premunização foi feita por PTA-ELISA.

Infetividade das estirpes fracas

Em testes preliminares de infetividade das estirpes fracas em melancia, realizando as inoculações de forma

tradicional, friccionando o dedo indicador com pressão suave sobre as folhas, a fim de não causar danos excessivos nos cotilédones, observou-se uma tendência de aumento da infetividade das estirpes fracas com o aumento da concentração do inóculo. A infetividade média das três estirpes fracas aumentou de 19,4% para 55,5% quando a concentração do inóculo passou de dois para oito discos foliares. Mesmo assim, verificou-se que a infetividade foi bastante variável, tanto entre as estirpes fracas, como entre as concentrações dos inóculos (dados não apresentados).

Após a padronização das concentrações dos inóculos, os testes definitivos foram realizados de maneira semelhante aos anteriores, porém as inoculações foram feitas com o auxílio do pistilo de maceração. Este, com o próprio peso, já promove uma fricção mais acentuada do que o dedo indicador, a ponto de causar algum dano físico visível no tecido foliar. Nesses testes, a infetividade média das estirpes fracas foi superior a dos testes preliminares, variando de 59,3% a 91,7%, tendo atingido 100% em vários casos (Tabela 1). Verificou-se, ainda, que a taxa de infetividade foi mais estável e representativa, não apresentando oscilações em relação à concentração do inóculo. Também não houve interação significativa das estirpes do PRSV-W com as concentrações do inóculo. A utilização de inóculos das estirpes fracas extraídos de abobrinha de moita ou de melancia não parece ter efeito na infetividade em plantas de melancia. Também não se verificou o efeito da origem das

estirpes fracas, visto que a infetividade da estirpe PRSV-W-3, originária de melancia, não diferiu significativamente daquela das estirpes PRSV-W-1 e PRSV-W-2, originárias de abobrinha de moita. A infetividade da estirpe severa foi de 100% em todos os testes, independente da concentração do inóculo.

Nos três testes posteriores de infetividade para avaliar o efeito da pressão de fricção na infetividade das estirpes fracas do PRSV-W, inoculadas com o dedo indicador e aumentando a pressão de fricção, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações e nem interação significativa das estirpes do PRSV-W com as diferentes concentrações (Tabela 2). No entanto, neste caso, notou-se que as três estirpes fracas apresentaram alta infetividade, não diferindo significativamente da infetividade da estirpe severa. A infetividade média das estirpes fracas variou de 72,2% a 100%, atingindo o valor máximo em diversos casos em todas as concentrações usadas, sendo que na concentração de 12 discos foliares, todas as estirpes fracas apresentaram valores de infetividade máximos. A estirpe severa mais uma vez infetou todas as plantas testadas.

Os resultados das inoculações de mudas de melancia em diferentes estádios de desenvolvimento mostraram que estes não afetaram significativamente a infetividade das estirpes fracas, a qual variou de 54,2% a 100%, em quatro testes independentes (Tabela 3). A estirpe fraca PRSV-W-3 apresentou uma infetividade significativamente maior que a estirpe fraca

TABELA 1 - Infetividade das estirpes fracas e severa do *Papaya ringspot virus*, tipo W (PRSV-W) em plantas de melancia (*Citrus lanatus*) 'Crimson Sweet', inoculadas mecanicamente com o auxílio do pistilo de maceração, com extratos de quatro, oito, 12 e 16 discos foliares de plantas fonte de inóculo

Estirpe	Fonte de inóculo: abobrinha de moita				Total
	Número de discos foliares				
	4	8	12	16	
PRSV-W-1	20/24 (83,3) ¹	16/19 (84,2)	18/23 (78,3)	18/22 (81,8)	72/88 (81,8) a ³
PRSV-W-2	19/23 (82,6)	22/24 (91,7)	17/23 (73,9)	22/24 (91,7)	80/94 (85,1) a
PRSV-W-3	21/24 (87,5)	20/24 (83,3)	20/24 (83,3)	19/24 (79,2)	80/96 (83,3) a
PRSV-W-C	20/20 (100)	23/23 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	91/91 (100) b
Média	80/91 (87,9) A ⁴	81/90 (90) A	79/94 (84) A	83/94 (88,3) A	
Estirpe	Fonte de inóculo: melancia				Total
	Número de discos foliares				
	4	8	12	16	
PRSV-W-1	19/30 (63,3) ²	22/29 (75,9)	22/29 (75,9)	27/30 (90,0)	90/118 (76,2) a ³
PRSV-W-2	16/27 (59,3)	24/29 (82,8)	22/29 (75,9)	23/28 (82,1)	85/113 (75,2) a
PRSV-W-3	24/30 (80,0)	27/30 (90,0)	26/30 (86,7)	23/27 (85,2)	100/117 (85,5) a
PRSV-W-C	29/29 (100)	29/29 (100)	29/29 (100)	27/27 (100)	114/114 (100) a
Média	88/116 (75,9) A ⁴	102/117 (87,2) A	99/117 (84,6) A	100/112 (89,3) A	

¹ Soma de quatro testes independentes, apresentando número de plantas infetadas/número de plantas inoculadas, com porcentagem total de plantas infetadas entre parênteses.

² Soma de cinco testes independentes, idem.

³ Letras minúsculas iguais na coluna não diferem ao nível de 5% de significância.

⁴ Letras maiúsculas iguais na linha não diferem ao nível de 5% de significância.

PRSV-W-1, não tendo diferido da estirpe severa PRSV-W-C e nem da PRSV-W-2. Já as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 apresentaram infetividade significativamente menor que a da estirpe severa. Também não houve interação significativa das estirpes do PRSV-W com os diferentes estádios de desenvolvimento na inoculação. A estirpe severa novamente infetou todas as plantas, independente do estádio de desenvolvimento.

DISCUSSÃO

De acordo com a proposta do trabalho, foi selecionada uma estirpe fraca a partir de bolhas de folhas de plantas de melancia com mosaico, denominada PRSV-W-3. A obtenção de estirpes fracas através desse método já havia sido realizada com sucesso por Rezende (1985) para o vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* – type P), em bolhas de folhas dessa frutífera naturalmente infetada em campo. Mais tarde, Rezende *et al.* (1994) também obtiveram duas estirpes fracas do PRSV-W (PRSV-W-1 e PRSV-W-2) a partir de bolhas de folhas de abobrinha de moita infetadas com estirpes severas desse vírus.

Testes do efeito protetor da estirpe fraca PRSV-W-3 em casa de vegetação mostraram alto grau de proteção em plantas de melancia. O efeito protetor das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 em plantas de melancia já havia sido verificado por Dias & Rezende (2001). O efeito protetor dessas duas estirpes fracas também foi relatado em outras espécies de cucurbitáceas: abobrinha de moita ‘Caserta’ (Rezende *et al.*, 1994); abóbora rasteira ‘Menina Brasileira’ (Rezende *et al.*, 1999) e abóbora híbrida do tipo Tetsukabuto (Dias & Rezende, 2000).

A infetividade das estirpes fracas não foi afetada pelas diversas variáveis estudadas, como a origem da estirpe, a planta fonte do inóculo e a concentração deste e a idade da planta-teste inoculada. A ausência de interferência da espécie doadora do inóculo na infetividade já era esperada, pois seria pouco provável que extratos de abobrinha de moita atuassem como inibidores de infecção em plantas de melancia, de maneira semelhante ao que ocorre, por exemplo, com extratos de *Phytolacca* sp e outras espécies vegetais (Gibbs & Harrison, 1976).

As avaliações da infetividade das estirpes fracas corroboram os dados obtidos por Dias e Rezende (2001) que

TABELA 2 - Infetividade das estirpes fracas e severa do *Papaya ringspot virus*, tipo W (PRSV-W) em plantas de melancia (*Citrus lanatus*) ‘Crimson Sweet’, inoculadas mecanicamente com o auxílio do dedo indicador, com extratos de quatro, oito, 12 e 16 discos foliares de plantas fonte de inóculo

Estirpe	Número de discos foliares				Total
	4	8	12	16	
PRSV-W-1	13/18 (72,2) ¹	15/17 (88,2)	17/17 (100)	17/17 (100)	62/69 (89,9) a ²
PRSV-W-2	15/18 (83,3)	16/16 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	67/70 (95,7) a
PRSV-W-3	17/17 (100)	17/17 (100)	18/18 (100)	13/14 (92,8)	65/66 (98,5) a
PRSV-W-C	17/17 (100)	16/16 (100)	17/17 (100)	16/16 (100)	66/66 (100) a
Média	62/70 (88,6) A ³	64/66 (97) A	70/70 (100) A	64/65 (98,5) A	

¹ Soma de três testes independentes, apresentando número de plantas infetadas/número de plantas inoculadas, com porcentagem total de plantas infetadas entre parênteses.

² Letras minúsculas iguais na coluna não diferem ao nível de 5% de significância.

³ Letras maiúsculas iguais na linha não diferem ao nível de 5% de significância.

TABELA 3 - Infetividade das estirpes fracas e severa do *Papaya ringspot virus*, tipo W (PRSV-W) em plantas de melancia (*Citrus lanatus*) ‘Crimson Sweet’, em três estádios de desenvolvimento

Estirpe	Estádio de desenvolvimento			Total
	I ¹	II	III	
PRSV-W-1	13/24 (54,2) ²	18/24 (75,0)	21/24 (87,5)	52/72 (72,2) a ³
PRSV-W-2	17/23 (73,9)	19/24 (79,2)	19/24 (79,2)	55/71 (77,5) ab
PRSV-W-3	20/23 (87,0)	19/23 (82,6)	21/23 (91,3)	60/69 (87,0) bc
PRSV-W-C	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	72/72 (100) c
Média	74/94 (78,7) A ⁴	80/95 (84,2) A	85/95 (89,5) A	

¹ Estádios de desenvolvimento: I) folha cotiledonar, II) duas folhas verdadeiras e III) cinco a sete folhas verdadeiras.

² Soma de quatro testes independentes, apresentando número de plantas infetadas/número de plantas inoculadas, com porcentagem de plantas infetadas entre parênteses.

³ Letras minúsculas iguais na coluna não diferem ao nível de 5% de significância.

⁴ Letras maiúsculas iguais na linha não diferem ao nível de 5% de significância.

apontaram dificuldades de infecção de plantas de melancia das cultivares Charleston Gray, Crimson Sweet e Crimson Tide com as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2. Além disso, mostraram que a estirpe fraca originária de bolhas de folhas de melancia com mosaico (PRSV-W-3) teve a mesma taxa de infetividade das duas primeiras, obtidas de bolhas de folhas de abobrinha de moita com mosaico, não confirmando, portanto, a hipótese formulada por aqueles autores de que a menor infetividade das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 em melancia poderia estar associada com a origem e especificidade da estirpe fraca do vírus. Na verdade, os resultados indicaram que a menor taxa de infetividade das estirpes fracas do PRSV-W em plantas de melancia é uma característica intrínseca dessas estirpes em relação a espécie de cucurbitácea, visto que a estirpe severa PRSV-W-C infetou 100% das plantas em qualquer situação. Mostraram, ainda, que o aumento da infetividade das estirpes fracas está diretamente associado com a severidade do processo de inoculação mecânica.

Estudos anteriores de premunização de plantas de abobrinha de moita 'Caserta', de abóbora rasteira 'Menina Brasileira' e de abóbora híbrida do tipo Tetsukabuto, com as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2, nunca se referiram a dificuldades de promover infecção em plantas dessas espécies (Rezende *et al.*, 1994; Rezende *et al.*, 1999; Dias & Rezende, 2000). Em todos esses estudos, as plantas foram inoculadas mecanicamente com o dedo indicador, da maneira convencional e sempre lograram 100% de plantas infetadas com apenas uma inoculação. Acrescente-se que no decorrer do presente trabalho, nas sucessivas transmissões mecânicas para a manutenção das fontes de inóculos das estirpes fracas PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3, em plantas de abobrinha de moita e de melancia, sempre se alcançou 100% de plantas infetadas da primeira espécie, sem qualquer dificuldade. No entanto, nas inoculações das plantas de melancia, freqüentemente constatavam-se falhas na infecção de algumas plantas. Deve-se mencionar também que não há relatos de problemas de infetividade das estirpes fracas do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus*, *Cucumber mosaic virus* (CMV) família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus* e *Watermelon mosaic virus* (WMV) família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus* utilizadas em trabalhos de premunização de cucurbitáceas em outros países (Lecoq *et al.*, 1991; Perring *et al.*, 1995; Kosaka & Fukunishi, 1997; Montasser *et al.*, 1998; Yarden *et al.*, 2000).

Embora não tenha sido objetivo deste trabalho avaliar a estabilidade da estirpe fraca PRSV-W-3, a sua constante transferência de plantas de abobrinha de moita e melancia para novas plantas dessas espécies permite afirmar que trata-se de uma estirpe estável. Em nenhuma planta infetada com essa estirpe foi observada intensificação de sintomas ao longo desse período de transferências (26 meses). Rezende & Pacheco (1997) estudando a estabilidade das estirpes PRSV-W-1 e PRSV-W-2, constataram que a primeira induziu sintomas fracos durante 28 meses de observações, após 18 transferências sucessivas para abobrinha de moita, enquanto a estirpe fraca PRSV-W-2 permaneceu estável por 22 meses, tendo intensificado os

sintomas após esse período. No entanto, após a recuperação da estirpe PRSV-W-2 de tecido desidratado, nenhum outro caso de intensificação de sintomas foi notado durante as sucessivas transferências dessa estirpe até os dias atuais (J.A.M. Rezende, informação pessoal). O caso mais evidente de estabilidade parece ser o das estirpes fracas do *Citrus tristeza virus* (CTV) família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus*, visto que em 33 anos de utilização na premunização de plantas cítricas, nenhuma menção à intensificação de sintomas foi relatada pelos autores (Müller & Carvalho, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, A.C., DELLA VECCHIA, P.T., LIN, M.T., d'OLIVEIRA, L.O.B. & ARAUJO, J.P. Identificação do vírus do mosaico da melancia em melão (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) na região do Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 9:113-117. 1984.
- CHALFANT, R.B., JAWORSKI, C.A., JOHNSON, A.W. & SUMMER, D.R. Reflective film mulches, millet barriers, and pesticides effects on watermelon mosaic virus, insects, nematodes, soil borne fungi, and yield of yellow summer squash. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102: 11-15. 1977.
- COSTA, C.L. & COSTA, A.S. Redução na disseminação de mosaico em abóbora de moita (*Cucurbita pepo* var. melopepo) com superfícies repelentes aos afídeos vetores. *Revista de Olericultura* 11:24-25. 1971.
- DIAS, P.R.P. & REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida Tetsukabuto para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus - type W*. *Summa Phytopathologica* 26:390-398. 2000.
- DIAS, P.R.P. & REZENDE, J.A.M. Problemas na premunização de melancia para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus*. *Fitopatologia Brasileira* 26:651-654. 2001.
- GIBBS, A. & HARRISON, B. *Plant virology: the principles*. London. Edward Arnold. 1976.
- KOSAKA, Y. & FUKUNISHI, T. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Disease* 81:733-738. 1997.
- LECOQ, H., LEMAIRE, J.M. & WIPF-SCHEIBEL, C. Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. *Plant Disease* 75:208-211. 1991.
- LIMA, M.F., BARBOSA, L.F. & ÁVILA, A.C. Levantamento de víruses na cultura da melancia na região do Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22:337. 1997 (Resumo).
- MONTASSER, M.S., TOUSIGNANT, M.E. & KAPER, J.M. Viral satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Disease* 82:1298-1303. 1998.
- MOWAT, W.P. & DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods* 15:233-247. 1987.
- MÜLLER, G.W. & CARVALHO, S.A. Trinta e três anos de controle da tristeza dos citros por premunização no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 26:241. 2001. (Resumo)
- OLIVEIRA, V.B., QUEIROZ, M.A. & LIMA, J.A.A. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvirus isolados de cucurbitáceas no nordeste Brasileiro. *Horticultura Brasileira* 20:589-592. 2002.

- PACHECO, D.A., REZENDE, J. A. M. & PIEDADE, S M S. Biomass, virus concentration, and symptomatology of cucurbits infected by mild and severe strains of *Papaya ringspot virus*. *Scientia Agricola* 60:691-698. 2003.
- PERRING, T.M., FARRAR, C.A., BLUA, M.J., WANG, H.L. & GONSALVES, D. Cross protection of cantaloupe with a mild strain of zucchini yellow mosaic virus: effectiveness and application. *Crop Protection* 14:601-606. 1995.
- RAMOS, N.F., LIMA, J.A.A. & GONÇALVES, M.F.B. Efeito da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. *Fitopatologia Brasileira* 28:199-203. 2003.
- REZENDE, J.A.M. Tentativas de premunização para o controle do mosaico do mamoeiro. (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1985.
- REZENDE, J.A.M. & PACHECO, D.A. Estabilidade de isolados fracos premunizantes do vírus do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia. *Fitopatologia Brasileira* 22:64-68. 1997.
- REZENDE, J.A.M. & PACHECO, D.A. Control of papaya ringspot virus-type W in zucchini squash by cross protection in Brazil. *Plant Disease* 82:171-175. 1998.
- REZENDE, J.A.M., PACHECO, D.A. & IEMMA, A.F. Efeitos da premunização da abóbora 'Menina Brasileira' com estirpes fracas do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:1481-1489. 1999.
- REZENDE, J.A.M., YUKI, V.A., VEGA, J., SCAGLIUSI, S.M.M., BORBA, L.F. & COSTA, A.S. Isolados fracos do Potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. *Fitopatologia Brasileira* 18:55-61. 1994.
- STANGARLIN, O.S., DIAS, P.R.P. & REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Summa Phytopathologica* 26:132. 2000. (Resumo).
- WYMAN, J.A., TOSCANO, N.C., KIDO, K., JOHNSON, H. & MAYBERRY, K. Effects of mulching on the spread of aphid-transmitted watermelon mosaic virus to summer squash. *Journal of Economic Entomology* 72:139-143. 1979.
- YARDEN, G, HEMO, R., LIVNE, H., MAOZ, E., LEV, E., LECOQ, H. & RACCAH, B. Cross protection of cucurbitaceae from zucchini yellow mosaic potyvirus. *Proceedings, 7th EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETICS AND BREEDING*, Israel. 2000. pp.349-356.
- YUKI, V.A. Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1990.
- YUKI, V.A., REZENDE, J.A.M., KITAJIMA, E. W., BARROSO, P.A.V., KUNIYUKI, H., GROppo, G.A. & PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 84:516-520. 2000.