



**NARA EDREIRA ALENCAR**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE  
ISOLADOS DO *Squash mosaic virus* (SqMV) E  
ANÁLISE DE IMAGENS PARA AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES  
PRODUZIDAS POR PLANTAS DE ABÓBORA  
INFECTADAS**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**NARA EDREIRA ALENCAR**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DO *Squash mosaic virus* (SqMV) E ANÁLISE DE IMAGENS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES PRODUZIDAS POR PLANTAS DE ABÓBORA INFECTADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora

Dra. Antônia dos Reis Figueira

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Alencar, Nara Edreira.

Caracterização genética de isolados do *Squash mosaic virus* (SqMV) e análise de imagens para avaliação da qualidade fisiológica de sementes produzidas por plantas de abóbora infectadas / Nara Edreira Alencar. – Lavras: UFLA, 2015.

97 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Squash mosaic virus*.
2. Sequenciamento.
3. Sementes infectadas.
4. Análise de imagem. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**NARA EDREIRA ALENCAR**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DO *Squash mosaic virus* (SqMV) E USO DA ANÁLISE DE IMAGENS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES PRODUZIDAS EM PLANTAS DE ABÓBORA INFECTADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dr. Hugo Adelande de Mesquita	EPAMIG
Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dr. Vicente Paulo Campos	UFLA

Dra. Antônia dos Reis Figueira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**  
**2015**

A Deus *et al.*, por proporcionarem saúde, paz e sabedoria para a condução dos trabalhos.

Aos meus pais, Mário e Carmélia; meu irmão, Alexandre e a todos os meus parentes que, de uma forma ou de outra, me impulsionaram para seguir nessa vida.

### **OFEREÇO**

A minha família, pois sem vocês não sou ninguém.

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade em realizar o doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos na Wageningen University (Holanda).

A minha orientadora, professora Dra. Antônia dos Reis Figueira, pelos ensinamentos, experiência transmitida e pela oportunidade de trabalho.

Ao meu orientador em Wageningen, Jan van Lent, por ser the best ever!

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e experiências, elementos importantes na minha formação profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, que contribuíram para a realização deste trabalho, e a Dilurdes, por me deixar sempre tomar café!

Aos amigos, prefiro não citar nomes para não correr o risco de me esquecer de alguém, mas que foram muito importantes na minha vida “LAVROIDE”. À Gisele Louzada, pelo apoio desde o início da minha caminhada acadêmica (a culpa é sua!) e à Denise Balani, pelo apoio incondicional desde SEMPRE. Vocês são AS PESSOAS. À professora Dra. Heloisa Oliveira, por sempre atender meus telefonemas e chamados extraordinários. À Priscilla, pela paciência e pelos ensinamentos de laboratório e de vida também.

À minha nova turma EDF 2015/1. Sem vocês, pessoal, essa reta final seria muito mais difícil! Acredite em seus sonhos!

Aos colegas da virologia e afins: Mauricio, João, José Romário, Douglas Cubano, Roberto, Daniele, Suellen, Sílvia, Carzim, Mirelli, Luciana Cassetari, Jacy, Elisângela (Glória), Vlad, Luciana Godinho, Anderson e Claudinha Labory (solos/microscopia), MUITO OBRIGADA A TODOS.

Aos meus pais, Mario Edreira e Carmélia Alencar e meu irmão, Alexandre Edreira, por todo apoio emocional e financeiro, de forma incondicional.

#MINHAFAMILIAMEACEITA

"Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar de que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão".

Peter Marshall

## RESUMO

O *Squash mosaic virus* (SqMV) infecta plantas da família das cucurbitáceas, estando associado a perdas consideráveis na qualidade e na quantidade da produção das mesmas. Pouco ainda é conhecido sobre a população desse vírus nas principais regiões produtoras de cucurbitáceas do país, bem como o efeito da presença dele em sementes oriundas de plantas infectadas. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de, além de sequenciar e analisar a diversidade genética de isolados de SqMV coletados nos estados de Tocantins e São Paulo, verificar a possibilidade de utilização de análise de imagens para a avaliação dos danos internos e a utilização das técnicas DAS-ELISA e IC-PCR para detecção do SqMV em sementes produzidas por plantas de abobrinha de moita infectadas. Para o estudo da diversidade genética foram utilizados *primers* desenhados com base nas sequências de SqMV disponíveis no banco de dados, para amplificar um fragmento genômico com 2.599 nucleotídeos (nt) de cada isolado contendo parte do gene da proteína de movimento (MP), as duas subunidades da proteína do capsídeo (LCP e SCP) e a região 3' UTR. Quando as sequências dos 2.490 nt (região codificável dos genomas) foram analisadas, observou-se que houve variação de 89% a 98%, quando os isolados brasileiros foram comparados entre si e de 82% a 88%, quando comparados com isolados do GenBank. Quando os genes foram comparados separadamente, as identidades de nucleotídeos foram semelhantes, entretanto, as substituições nem sempre resultaram na mudança de aminoácidos, de modo que as identidades entre os aminoácidos foram acima de 90%, com exceção do gene MP do GR2, que variou entre 82 e 83%. Na análise da região 3' UTR, o isolado MOC apresentou a menor identidade, entre 39% e 42%, e os demais isolados brasileiros se agruparam separadamente dos isolados do GenBank. Na maioria das árvores filogenéticas os isolados brasileiros se agruparam separadamente dos isolados empregados para comparação, tendo ocorrido maior proximidade entre os isolados LC2 e MOC, e maior distância dos isolados entre esses LC3 e FA. Nos isolados empregados para comparação, houve maior proximidade entre o isolado EU421060 da China com o isolado dos Estados Unidos AF059532, em todas as árvores, e do isolado dos Estados Unidos AF059533 com o NC 003800 do Japão; nas árvores construídas para os nucleotídeos e aminoácidos da MP, nucleotídeos da subunidade maior e menor da CP e deste com o isolado KP223324 da Espanha. Quando foram comparados os aminoácidos do fragmento total e as árvores construídas para a CP1 e CP2, notou-se maior proximidade entre os isolados dos Estados Unidos (AF059533) e o da Espanha KP223324. Neste estudo apresentam-se os primeiros relatos sobre a caracterização genômica de isolados do SqMV no Brasil. A análise de imagens para a avaliação dos danos internos em sementes possibilitou a classificação das

sementes em três categorias: vazias, cheias e danificadas. No teste de germinação, sementes infectadas e classificadas como cheias produziram mais plântulas anormais quando comparadas às sadias de mesma categoria. Observou-se, ainda, redução no vigor dessas sementes infectadas pelo SqMV. A análise radiográfica revelou-se como uma ferramenta útil na avaliação da qualidade das sementes produzidas por plantas infectadas com o SqMV. Os métodos DAS-ELISA e IC-RT-PCR foram eficientes na detecção do SqMV em sementes. Teste de transmissibilidade ou outros estudos envolvendo vírus que infectam sementes de abóbora podem, então, ser otimizados com a utilização dessas técnicas.

Palavras-chave: Vírus. Abóbora. Sequenciamento. Análise de imagem. DAS-ELISA. IC-RT-PCR.

## ABSTRACT

The *Squash mosaic virus* (SqMV) infects plants of Cucurbitaceae family and can cause frequent yield losses. Little is known about the virus population in the main Brazilian cucurbit-producing regions as well as the effect of this virus on seeds coming from infected plants. Thus, the objective of this study was to sequence and analyze the genetic diversity of SqMV isolates collected in Tocantins and São Paulo, check the possibility of using image analysis for the evaluation of internal damage and use of DAS-ELISA techniques and IC-PCR for the detection of SqMV seeds produced by infected squash plants. In order to study the genetic diversity were designed primers based on SqMV sequences available in the GenBank, to amplify a genomic fragment with 2599 nucleotides (nt) of each isolate containing part of the movement protein gene (MP), the two subunits of the capsid protein (LCP and SCP) and the 3' UTR. The sequence analysis of 2490nt (genome coding region) showed an identity ranging from 89% to 98%, when the Brazilian isolates were compared, and 82% to 88% when they were compared with GenBank isolates. Comparing the genes, separately, the nucleotide identities were similar. However, substitutions not always resulted in amino acids changing so that identities between amino acids was over 90%, excluding GR2 MP gene, which showed an identity between 82% and 83%. In the analysis of the 3' UTR, the MOC isolate showed the lowest identity, between 39 and 42%, and the remaining Brazilian isolates clustered separately from GenBank isolates. In most phylogenetic trees, Brazilian isolates clustered separately from the isolates used for comparison, and there was a closer relationship between the LC2 and MOC isolates, and greater distance between these isolates LC3 and FA. Among the GenBank isolates, there was a closer relationship between the EU421060 isolate from China and the AF059532 American isolate in all the trees. Closer relationship was also seen between the AF059533 American isolate and NC003 800 Japanese isolate in the trees based on nucleotides and amino acids sequences of the MP and CP1 nucleotides. In the trees based on the amino acid of the 2490 nt fragment, NC003800 Japanese isolate were closer to KP223324 Spanish isolate and the trees built for CP1 and CP2 noticed a greater proximity between the isolated American isolate (AF059533 ) and Spanish isolate KP223324. This study presents the first reports on the genomic characterization of SqMV isolates in Brazil. The image analysis for the evaluation of possible internal damage seed sorting of the seeds in three categories: empty, full and damaged. In the germination test, infected seeds classified as full seeds produced more abnormal seedlings compared to the healthy seeds of the same category. There was also a reduction in seed vigor of when they were infected with SqMV. Radiographic analysis has proved to be a useful tool in assessing the quality of seed produced by SqMV infected plants.

DAS-ELISA and IC-RT-PCR methods were efficient in detecting SqMV seed. Tests involving virus transmissibility or even other investigations related to virus infected seeds can be greatly improved by using these techniques.

**Keywords:** Virus. Zucchini. Sequencing. Image analysis. DAS-ELISA. IC-RT-PCR.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV) .....	15
<b>2.2</b>	Transmissão de vírus por sementes .....	18
<b>2.3</b>	Técnicas e métodos utilizados para detecção de vírus em sementes .....	21
<b>2.3</b>	Caracterização molecular de isolados virais .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	33
	<b>ARTIGO 1</b> Diversidade genética entre isolados de <i>Squash mosaic virus</i> (SqMV) do Brasil .....	33
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	36
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
	<b>ARTIGO 2</b> Análise de imagens para avaliação da qualidade fisiológica das sementes produzidas por plantas de abóbora infectadas com <i>Squash mosaic virus</i> (SqMV) .....	74
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	77
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	80
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Entre as plantas utilizadas para a produção de alimentos, as cucurbitáceas se destacam por sua importância econômica e social. Sua cultura tem papel de destaque na geração de empregos diretos e indiretos, pois necessita de grande número de mão de obra, desde o cultivo até a comercialização. O cultivo de cucurbitáceas é praticado tanto em pequenas áreas, em regime de agricultura familiar, quanto em grandes propriedades (LOPES, 1991).

A família *Cucurbitaceae* tem, aproximadamente, 118 gêneros e cerca de 825 espécies, das quais as mais expressivas economicamente, no Brasil, são as pertencentes aos gêneros *Cucurbita* (moranga, abóbora e abobrinha), *Citrullus* (melancia), *Cucumis* (pepino, maxixe e melão), *Lagenaria* (cabaça-caxi) e *Sechium* (chuchu).

As cucurbitáceas podem ser afetadas por diversos tipos de doenças, dentre as quais as viróticas são consideradas importantes, por serem de difícil controle, podendo causar perdas de até 100% da produção. Plantas infectadas por vírus podem apresentar mosaico, redução do limbo foliar e deformação nas folhas e frutos, podendo a sintomatologia variar tanto com o hospedeiro infectado, quanto com a ocorrência de infecções mistas (RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003).

A incidência e a severidade de viroses nos campos de produção dependem de inúmeros fatores ligados à planta, como a idade e a cultivar; ao patógeno como espécie e estirpe de vírus e a fatores outros, como local de plantio, época do ano, presença e preferência de vetores, além de outros fatores ambientais. Sendo assim, a diagnose precoce, bem como o estudo dos vírus que

ocorrem em uma dada região, é de grande importância para o estabelecimento de medidas efetivas de controle.

Os vírus mais comuns que, geralmente, são encontrados nessa cultura, no Brasil, são o *Papaya ringspot virus*, estirpe W (PRSV-W), o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), o *Watermelon mosaic virus* (WMV) e o *Cucumber mosaic virus* (LIMA; ALVES, 2011; RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003; SILVEIRA et al., 2009). O *Squash mosaic virus* (SqMV) tem sido considerado um vírus sem importância, pela sua baixa incidência, e alguns levantamentos já feitos no Brasil nem empregaram testes específicos para a sua diagnose (HAFELD-VIEIRA et al., 2004; LIMA; ALVES, 2011; MOURA et al., 2001; SILVEIRA et al., 2009;). Entretanto, Alencar et al. (2012), analisando 15 amostras de abóbora e 10 de melancia provenientes do estado do Tocantins com sintomas de mosaico, pelo método de RT-PCR, descobriram que sete amostras de melancia e sete de abóbora, representando 56% das amostras analisadas, estavam infectadas pelo SqMV. As amostras restantes estavam infectadas pelo ZYMV.

Esses resultados demonstram que a incidência desse vírus pode estar passando despercebida, pelo fato de não ser muito comum nos campos de produção até recentemente. Como esse vírus é transmitido pelas sementes, a sua alta incidência no campo poderia ser um reflexo da sua introdução na lavoura via material propagativo infectado. Considerando-se que o estado de Tocantins tem as condições ideais para multiplicação e disseminação desse vírus, ele é um patógeno que deve ser mais bem estudado, com a finalidade de estabelecer medidas efetivas de controle.

Neste trabalho, foram sequenciados isolados de SqMV provenientes de plantas de abóbora e de melancia e foi também estudada a qualidade fisiológica de sementes produzidas por plantas infectadas através da análise de imagens por raios X.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Squash mosaic virus* (SqMV)

O primeiro relato de mosaico em abóbora causado por *Squash mosaic virus* (SqMV) foi feito em 1934, no estado norte-americano da Califórnia. Este vírus tem sido relatado em países da América do Norte (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; KNUHTSEN, NELSON, 1968; NELSON, KNUHTSEN, 1973), da América do Sul (ALENCAR et al., 2012; SANTOS; FREIRE, 1999; VIANA et al., 2001) e da Europa, além de Austrália (SHERF; MACNAB, 1986), Japão e China. Na China, o vírus tem sido, frequentemente, associado a problemas na produção de cucurbitáceas (HU et al., 2009).

Moura et al. (2001), inspecionando campos de produção de cucurbitáceas no estado do Maranhão, observaram que, das 118 amostras analisadas, apenas 3,4% apresentaram-se positivas para o SqMV. Halfeld-Vieira (2004) coletou amostras foliares de plantas de melancia exibindo diferentes sintomas de vírus, em 21 campos representativos de cultivo de cucurbitáceas no estado de Roraima, e nenhuma das amostras apresentou-se positiva para SqMV. Silveira (2009), por um período de três anos, coletou, em campos de produção do submédio do rio São Francisco, 967 amostras de cucurbitáceas, das quais 608 apresentaram infecção viral, porém, nenhuma apresentou infecção com SqMV, sugerindo que os programas de melhoramento genético na região não deveriam considerar fontes de resistência para este vírus.

Alencar et al. (2012) identificaram 14 isolados de SqMV em campos de produção de melancia e de abóbora em Tocantins e, a partir disso, demonstraram que ou o SqMV pode ter encontrado as condições ideais na região daquele estado para se disseminar e infectar as hospedeiras locais, ou tem sido

introduzido por meio de sementes contaminadas, uma vez que esse vírus é facilmente transmitido pelas sementes.

Membro do gênero *Comovirus*, da família *Secoviridae*, o SqMV, descrito por Freitag (1941, 1956), Lindberg, Hall e Walker (1956), pode ser transmitido pelas sementes, por besouros crisomélídeos (*Diabrotica* spp. e *Acalymma* spp.) (FREITAG, 1956; LASTRA, 1968; STONER, 1963; SITTERLY, 1960), por um besouro coccinelídeo (*Epilachna cacica*) (COHEN; NITZANY, 1963) e por cigarrinha (STONER, 1963), sendo capaz de infectar a maioria das plantas dos gêneros *Cucurbita*, *Cucumis* e *Citrullus* (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; NELSON, KNUHTSEN, 1973).

Assim como outros *Comovirus*, o SqMV tem um genoma de RNA bipartido senso positivo com RNA-1 e RNA-2 (Figura 1), os quais estão separadamente encapsidados em partículas isométricas de 28 nm de diâmetro e expressos como poliproteínas. A poliproteína codificada pelo RNA-1 contém a polimerase viral (POL), uma helicase (Hel) e uma protease (Pro), assim como um cofator de protease (32K) e a proteína viral ligada ao genoma (VPg). Já o RNA-2 codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em proteína de movimento (MP), subunidade maior da proteína do capsídeo (CPL) e subunidade menor da proteína do capsídeo (CPS) (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998).

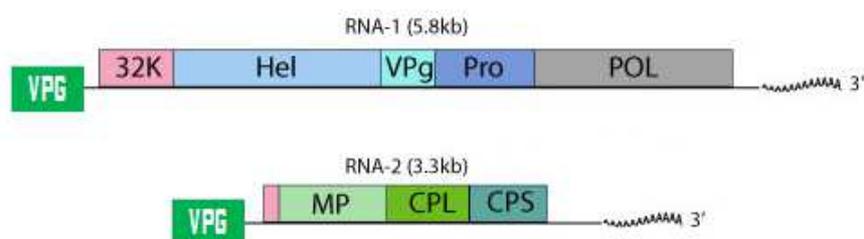


Figura 1 Estrutura do genoma do *Squash mosaic virus* (SqMV). Adaptado de [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/298.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/298.html)

Os sintomas induzidos pelo SqMV são variáveis e dependem da combinação da virulência do isolado/estirpe, cultivar/espécie, da idade em que a planta foi infectada e de condições ambientais, como a temperatura, mas são caracterizados, principalmente, por mosaico, que pode variar de médio a severo, deformações nas folhas e nos frutos, lesões locais necróticas, amarelecimento das nervuras e formação de bandas amarelas ao longo das nervuras (CAMPBELL, 1971). Plantas infectadas precocemente podem não produzir frutos ou frutos muito deformados, inviáveis para a comercialização.

Os isolados de SqMV podem ser separados em dois grupos com base na sorologia. O grupo I infecta melancia, causa sintomas severos em melão ‘Cantaloupe’ e sintomas moderados em abóboras; o grupo II não infecta melancia, causa sintomas moderados em melão ‘Cantaloupe’ e sintomas severos em abóbora. Em pepino-africano (*Cucumis metuliferus*), a infecção com SqMV resulta em lesões locais e este resultado pode ser utilizado para a identificação biológica deste vírus (SHERF, MACNAB, 1986).

O vírus do mosaico da abóbora pode ser transmitido por meio de sementes comerciais, num percentual que varia entre 10% e 15% (BLANCARD; LECOQ; PITRAT, 1996; ALMEIDA, 2013), apesar de incidências maiores já terem sido reportadas (CAMPBELL, 1971). Nolan e Campbell (1984), avaliando sementes de abóbora, verificaram a presença do SqMV no tegumento, porém, a

maioria delas apresentava o embrião livre de vírus, o que, por algumas vezes, não descartou o fato de produzir plantas infectadas. Almeida (2013) verificou que, no patossistema abóbora e SqMV, os mecanismos de infecção que podem ocorrer são os da forma indireta (infecção dos óvulos) e direta (infecção do embrião já formado), ou seja, plantas inoculadas, antes ou depois do florescimento, produziram sementes infectadas.

As medidas de controle devem ser aquelas que visam impedir ou retardar o máximo possível a entrada do vírus na lavoura. Assim sendo, uma das mais importantes medidas consiste em utilizar cultivares resistentes ou sementes livres do vírus, eliminar possíveis fontes de inóculo nos arredores da lavoura e empregar inseticidas para o controle do vetor.

## **2.2 Transmissão de vírus por sementes**

A transmissão de vírus por sementes ocorre em cerca de 18% das espécies de vírus descritas, por uma ou mais hospedeiras naturais e um terço dos vírus pode ser transmitido por pelo menos uma de suas hospedeiras (HULL, 2002). A transmissão do vírus da planta para semente é dependente de alguns fatores que se relacionam, principalmente, à espécie viral e à planta hospedeira (ALBRECHTSEN, 2006)

Segundo Sastry (2013), geralmente, apenas as espécies capazes de infectar o embrião da semente são transmissíveis para a próxima geração, porém, existem diversos fitovírus que são capazes de infectar, além do embrião, os outros tecidos que compõem a semente. Segundo Johansen, Edwards e Hampton (1994), a infecção do embrião pode ocorrer por meio de dois mecanismos. No primeiro, denominado de infecção direta, o vírus se movimenta dos tecidos vegetativos da planta para o embrião formado, logo após a fertilização. No segundo, denominado infecção indireta, a transmissibilidade

ocorre antes da fertilização e, dessa forma, o vírus é capaz de infectar os gametas masculinos e femininos.

Um dos exemplos de infecção direta ocorre com o *Pea seedborn mosaic virus* (PSbMV) que, além disso, é capaz de infectar todos os tecidos da semente de ervilha (*Pisum sativum*). Porém, apenas as sementes com as folhas primárias do eixo embrionário infectados é que darão origem a uma planta infectada. Johansen, Edwards e Hampton (1994) demonstraram que, no genoma, as regiões dos genes HC-Pro e da capa proteica (CP) são determinantes na transmissão do vírus da planta para a semente. Além disso, a proteína HC-Pro relaciona-se com o movimento do vírus a longa distância e está envolvida com o mecanismo de transmissão do vírus pelo pulgão.

No caso do SqMV, a infecção do embrião ocorre de forma indireta. As partículas virais se encontram presentes nas camadas externas do grão de pólen como contaminantes e não aparecendo, porém, nas células do grão de pólen (ALVAREZ; CAMPBELL, 1978; NOLAN; CAMPBELL, 1984). Os mesmos autores testaram a polinização cruzada entre plantas doadoras e receptoras tanto com pólen infectado e sadio. As plantas sadias, quando polinizadas com grão de pólen infectado, não produziram sementes infectadas. Semente com embrião infectado somente foi obtida quando as plantas receptoras do grão de pólen apresentavam-se infectadas.

Além disso, Nolan e Campbell (1984), para a investigação da interação e a detecção do SqMV em sementes de abóbora, empregaram a técnica sorológica ELISA. Nesse sentido, para investigar a relação entre a sua transmissibilidade e a presença do vírus no embrião, ele foi segmentado em duas partes, uma para o plantio e a obtenção de plântula e a outra que foi utilizada como antígeno. Observou-se variação de 0,4% a 12,1% quanto à transmissão do vírus pelas sementes, de acordo com a cultivar de abóbora utilizada e, além disso, o vírus estava presente nos diversos tecidos das sementes. No entanto, mesmo quando o

vírus se encontrava nos tecidos do embrião de algumas sementes, sua respectiva plântula nem sempre se apresentava também infectada. Porém, quando não havia vírus presente nos embriões, a plântula correspondente também não se apresentou positiva para o vírus. De acordo com os autores, a hipótese que é levantada relata que, mesmo com o conhecimento que o nível de transmissão embriônica de um lote de sementes diminui com o tempo, o antígeno detectado por ELISA permanece e que o SqMV não se translocaria de modo sistêmico nos tecidos do embrião e, sim, se concentraria em algumas partes localizadas do mesmo.

Diante das evidências de que os vírus, para serem transmitidos, devem contaminar os tecidos internos das sementes, de forma preferencial o embrião, há uma exceção com as espécies do gênero *Tobamovirus*, os quais não têm capacidade de infectar o embrião ou, mesmo, o endosperma das sementes e, dessa forma, permanecem apenas aderidos ao tegumento (CEZAR et al., 2009). As partículas virais desse grupo de vírus, em semente de tomate, ficam imensas no líquido placentário, que recebe a denominação de sarcotesta. A severidade da doença no fruto afeta a variação da porcentagem de sementes contaminadas, porém, relatou-se que já foram encontradas até 94% de sementes com vírus (BROADBENT, 1965). Entretanto, há uma exceção dentro do grupo dos *Tobamovirus*, que é o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), que também pode infectar o embrião das sementes, além de aparecer como contaminante.

Mink (1993) descreveu dois mecanismos de infecção via grão de pólen. No primeiro, denominado de “transmissão horizontal”, o grão de pólen infectado na fertilização tem capacidade de infectar a semente e a planta-mãe receptora. Este tipo de mecanismo já foi relatado em um pequeno número de espécies virais, porém, também já foi demonstrado que o viroide *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), em sua transmissão via semente, atua dessa forma. No segundo

tipo, denominado de “transmissão vertical”, apenas a semente é infectada pelo grão de pólen também infectado, permanecendo a planta-mãe receptora sadia.

Em se tratando do processo de infecção do tecido reprodutor feminino, as partículas virais podem encontrar-se no saco embrionário, no nucelo e também no óvulo, em alguns casos. Schippers (1963), trabalhando com *Bean common mosaic virus* (BCMV), coletou óvulos antes da polinização e verificou que 80% deles estavam infectados com o vírus, porém, após a maturação do embrião, apenas 15% dessas sementes apresentaram infecção pelo BCMV.

### **2.3 Técnicas e métodos utilizados para detecção de vírus em sementes**

Para a obtenção de sucesso na diagnose de vírus em semente, algumas variáveis devem ser observadas, como a escolha da técnica a ser utilizada, assim como a escolha do melhor método de preparo da amostra, levando em consideração o vírus que se busca detectar, bem como a localização deste na semente.

Por vários anos, esses métodos de diagnose viral em sementes foram baseados em testes biológicos em que se realizava a inoculação mecânica dos extratos dos tecidos das sementes em plantas indicadoras e a posterior observação dos sintomas induzidos por estas. Por caracterizar-se como uma técnica laboriosa, em que grandes quantidades de plantas seriam necessárias, bem como espaço físico maior para a sua realização, a mesma é considerada pouco eficiente. Além disso, a concentração viral nos tecidos das sementes, geralmente, é baixa, ocasionando o não aparecimento de sintomas em algumas plantas. Dessa forma, aliado ao fato de que os sintomas poderiam aparecer entre 15 e 30 dias, dependendo da espécie viral, esse longo período de tempo faz com que essa técnica não seja muito indicada (SASTRY, 2013).

Algumas técnicas sorológicas também podem ser utilizadas para a detecção de vírus em sementes. A difusão dupla em ágar apresenta baixa sensibilidade para a detecção de vírus em sementes, além de pouco prática para esse tipo de diagnose, principalmente para a condução de um grande número de amostras. Já o teste sorológico descrito por Clark e Adams (1977), conhecido como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), é amplamente utilizado e aplicado para a detecção de vírus de plantas, pois, aliado à simplicidade da técnica, apresenta, ainda, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, sendo utilizado em grande escala para um grande número de amostra ao mesmo tempo (FIGUEIRA, 2002; SASTRY, 2013).

O teste *Double antibody sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent assay* (DAS-ELISA) utiliza a IgG (imunoglobulina G) simples e a IgG conjugada, ambas para o antígeno viral. Quando há a conjugação do anticorpo com a enzima, torna-se possível a visualização de uma coloração quando as reações são positivas, resultante da reação enzima-substrato, cuja intensidade é medida em espectrofotômetro, com utilização de filtros e comprimento de onda adequado (CLARK, ADAMS; 1977). Várias enzimas podem ser utilizadas na conjugação com o anticorpo, porém, as mais utilizadas são a fosfatase alcalina e a peroxidase (CLARK; BAR-JOSEPH, 1984).

Existem algumas limitações quanto ao teste sorológico, dentre elas a padronização quanto à concentração adequada dos reagentes e do extrato vegetal que contém o vírus, o suporte físico a ser utilizado e a disponibilidade de antissoros produzidos contra um antígeno específico. Além disso, o extrato vegetal pode conter algumas substâncias que podem interferir nos resultados obtidos, podendo originar, assim, falsos positivos em tecidos sadios. Em vírus que ocorrem em baixas concentrações nas plantas o teste de ELISA não é suficientemente sensível para diagnose.

Geralmente, as técnicas moleculares apresentam-se mais sensíveis do que as técnicas sorológicas. As técnicas mais comumente utilizadas, em virologia molecular, para a detecção de vírus, são as de hibridização dos ácidos nucleicos e *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). A rapidez e a especificidade, aliadas à alta sensibilidade da técnica de RT-PCR, fazem com que a mesma seja utilizada por pesquisadores e estudantes em trabalhos que envolvem diagnose de vírus em plantas.

Embora as técnicas clássicas de PCR e RT-PCR para a detecção de vírus também apresentem algumas limitações, quando comparadas a técnicas mais modernas e sofisticadas (ENGEL et al., 2010), de forma geral, estas vêm se mostrando promissoras para diagnose, visto que são bastante seguras e eficientes para a realização dos testes em tecidos vegetais (BOONHAM et al., 2002; FIGUEIRA; DOMIER; D'ARCY, 1997; LORENZEN et al., 2008).

Para a diagnose de vírus, alguns autores têm relatado que a técnica da PCR tem se revelado altamente eficiente e sensível, detectando quantidades mínimas de vírus (BRIOSO et al., 1996; FIGUEIRA; DOMIER; D'ARCY, 1997; HADIDI et al., 1993; KROTH; DANIELS; PIEROBOM, 2005). Teoricamente, pequenas concentrações do patógeno são suficientes para o início da reação, conferindo ao teste uma sensibilidade muito grande, que chega a atingir índices superiores aos do teste de ELISA (DANIELS, 1999). Sua utilização é válida não apenas para a detecção de espécies de vírus, mas também tem sido eficiente na detecção de estirpes viróticas proximamente relacionadas (BOONHAM et al., 2002; BORJA; PONZ, 1992; FIGUEIRA; DOMIER; D'ARCY, 1997; LORENZEN et al., 2006, 2008; SING; NIE, 2001; SINGH; SINGH, 1998).

Outra técnica também utilizada é a da imunocaptura seguida da RT-PCR, conhecida como IC-RT-PCR. Esta técnica baseia-se na amplificação de um cDNA sintetizado a partir de um RNA de partículas virais adsorvidas em

suporte sólido de polipropileno. Os anticorpos contra um determinado vírus são adsorvidos ao material plástico. Sobre estes anticorpos adiciona-se a amostra que contém, hipoteticamente, os antígenos.. Depois da formação do complexo anticorpo-vírus são necessárias várias lavagens do mesmo, de forma a remover os constituintes presentes na amostra que possam interferir na reação de RT-PCR. Após estas lavagens, a temperatura é aumentada para que ocorra a desnaturação da cápsula viral e seja libertado para o meio o ácido nucleico do vírus (KOENIG; LESEMANN, 2001).

Em plantas, a técnica da IC-RT-PCR foi utilizada pela primeira vez em 1992, para diagnose de *Plum pox virus* em ameixeira (KHAN et al., 2012; WETZEL et al., 1992). Essa técnica demonstrou alta sensibilidade em detectar baixas concentrações do *Plum pox virus*, quando comparada com o teste ELISA (WETZEL et al., 1992).

Alguns protocolos já se encontram recomendados e disponibilizados pela International Seed Federation (ISF) e pela International Seed Testing Association (ISTA) para a detecção de vírus em algumas sementes, como as de *Lettuce mosaic virus* em alface; *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* e *Pepper mild mosaic virus* em diferentes espécies de pimentão, tomate e pimenta; *Pea seedborn mosaic virus* em ervilha; *Pepino mosaic virus* em sementes de tomate e *Squash mosaic virus*, *Melon necrotic spot virus* e *Cucumber green mottle mosaic virus* em cucurbitáceas.

Em cucurbitáceas é frequente a ocorrência de sementes vazias e danificadas morfológicamente, sendo estas últimas de difícil separação e identificação, devido ao tipo de beneficiamento que sofrem, também, pela presença de tegumento duro, o qual impede a visualização do embrião sem danificar as sementes.

O teste de raios X não é um teste de viabilidade, porém, gera informações que auxiliam na avaliação da viabilidade do lote de sementes,

revelando deficiências morfológicas que indicam o seu potencial. Esse teste tem sido bastante utilizado para fazer a avaliação das estruturas internas das sementes florestais e hortícolas, de forma rápida, precisa e não destrutiva, permitindo determinar o seu estágio de maturação, bem como a ocorrência de sementes vazias, pouco desenvolvidas e com danos mecânicos ou causados por insetos (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS, 1983; SIMAK; BERGSTEN; HENRIKSSON, 1989). Sendo um teste não destrutivo, as sementes submetidas à análise podem ser posteriormente colocadas para germinar, permitindo o estabelecimento de uma correlação entre os danos mecânicos ou alterações observadas na parte interna das sementes e os prejuízos causados na germinação (CÍCERO et al., 1998).

Como a radiação usada em sementes de abóbora não interfere na sua qualidade e ainda auxilia na identificação de sementes danificadas, que prejudicam a qualidade fisiológica do lote, o teste de raios X pode ser utilizado como auxiliar na avaliação da qualidade das sementes, possibilitando a obtenção de lotes de qualidade superior (CARVALHO et al., 2009). Apesar de este teste ser bastante utilizado para avaliar a viabilidade das sementes, não tem sido empregado para analisar sementes produzidas por plantas infectadas.

#### **2.4 Caracterização molecular de isolados virais**

Os vírus são capazes de cruzar as barreiras entre as espécies, permitindo a infecção de novos hospedeiros. A replicação contínua possibilita a produção rápida de diversidade genética, incluindo as mutações que facilitem a adaptação ao hospedeiro. Portanto, estudos de caracterização de isolados e análise genômica permitem acompanhar esta evolução viral, bem como compreender alguns aspectos da interação vírus-planta. O surgimento de novas espécies virais é resultante dessa interação, sem a qual o sucesso da infecção viral e da

translocação de partículas virais para todas as partes da planta não seria possível. Por exemplo, uma infecção bem sucedida exige um transporte de partículas virais célula-a-célula eficiente (SCHOELZ; HARRIES; NELSON, 2011).

O uso de plantas resistentes aos fitovírus tem sido o método mais desejável, principalmente nesse momento em que a produção sustentável tem sido uma exigência universal (STEINLAGE; HILL; NUTTER JUNIOR, 2002). Além de diminuir o custo de produção, dispensando o uso adicional de medidas de controle, como gastos com defensivos agrícolas, evita a poluição do meio ambiente. Entretanto, a variabilidade genética e a capacidade que esses patógenos têm de superar a resistência da planta hospedeira têm constituído um grande desafio para os melhoristas de plantas. Assim, a caracterização molecular e a correta classificação dos vírus em gêneros e estirpes são indispensáveis para garantir uma solução que, ainda que não seja definitiva, seja a mais duradoura possível (GONG et al., 2011; MOREIRA; KITAJIMA; REZENDE, 2010).

Não existe, até o momento, estudo da diversidade genética e de caracterização e análise do genoma de isolados de *Squash mosaic virus* no Brasil. Dessa forma, os programas de melhoramento de espécies de cucurbitáceas, visando resistência a esta doença, não tiveram grandes avanços. Este tipo de estudo é de fundamental importância e garante subsídios para os programas de melhoramento de plantas. Até o momento não há, disponível para estudo, nenhum isolado brasileiro no banco de dados (GenBank), o qual é utilizado como base para comparação da diversidade de isolados.

No GenBank, apenas cinco sequências de SqMV com o genoma completo estão disponíveis, e nenhuma é do Brasil. Portanto, este tipo de estudo e caracterização com isolados brasileiros de SqMV torna-se extremamente necessário para o desenvolvimento de programas de melhoramento ligados ao SqMV.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHTSEN, S. E. **Testing methods for seed transmitted viruses: principles and protocols.** Oxford: CABL Publishing, 2006. 259 p.
- ALENCAR, N. E. et al. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 1, p. 32-37, Feb. 2012.
- ALMEIDA, J. E. M. de. **Detecção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora, pimentão e tomate.** 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- ALVAREZ, M.; CAMPBELL, R. N. Transmission and distribution of squash mosaic virus in seeds of cantaloupe. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 257-263, 1978.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigor testing handbook.** Washington: AOSA, 1983. 88 p. (Contribution, 32).
- BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar y luchar.** Madri: Mundi-Prensa, 1996. 301 p.
- BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>, and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 103-112, Apr. 2002.
- BORJA, M. J.; PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of walnut strain of Cherry leafroll virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 73-83, Jan. 1992.
- BRIOSO, P. S. T. et al. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de “Polymerase Chain Reaction” e de DOT-BLOT”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 328-335, 1996.
- BROADBENT, L. The epidemiology of tomato mosaic XI. Seed transmission of TMV. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 56, n. 2, p. 177-205, Oct. 1965.
- CAMPBELL, R. N. **CMI/AAB descr. Pl. viruses.** [S.l.: s.n.], 1971. 4 p.

CARVALHO, M. L. M. et al. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 221-227, 2009.

CEZAR, M. A. et al. Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2009.

CÍCERO, S. M. et al. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 26, n. 3, p. 603-612, 1998.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

CLARK, M. F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. **Methods in Virology**, Orlando, v. 7, p. 51-85, 1984.

COHEN, S.; NITZANY, F. E. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 193-196, 1963.

DANIELS, J. **Utilização de técnicas sorológicas para detecção de vírus em batata-doce**. Brasília: EMBRAPA/CPACT, 1999. 3 p. (Comunicado Técnico, 46).

ENGEL, E. A. et al. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163, n. 2, p. 445-451, Feb. 2010.

FIGUEIRA, A. R.; DOMIER, L. L.; D'ARCY, C. J. Comparison of the techniques for detection of Barley Yellow Dwarf Virus- PAV-IL. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 11, p. 1236-1240, Nov. 1997.

FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: Editora da UFLA, 2002. 99 p.

FLORINDO, M. I.; LIMA, J. A. A. Detecção sorológica do vírus do mosaico da abóbora em sementes comercializadas de *Cucurbita pepo* L. "Caserta". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 278, 1993.

FREITAG, J. H. Beetle transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 73-81, 1956.

FREITAG, J. H. Insect transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, p.8, 1941. Abstract.

FREITAG, S. E. **Testing methods for seed transmitted viruses: principles and protocols**. Oxford: CABL Publishing, 2006. 259 p.

GONG, D. et al. Genomic sequencing and analysis of *Chilli ringspot virus*, a novel potyvirus. **Virus Genes**, Norwell, v. 43, n. 3, p. 439-444, Mar. 2011.

HADIDI, A. et al. Detection of potato leaf roll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 595-601, 1993.

HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. Identificação sorológica de espécies de potyvírus em melancia, no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 687-689, nov./dez. 2004.

HAUDENSHIELD, J. S.; PALUKAITIS. P. Diversity among isolates of squash mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 10, p. 2331–2341, Oct. 1998.

HU, J. et al. The genomic sequence of a Chinese isolate of Squash mosaic virus with novel 5' conserved ends. **Virus Genes**, Norwell, v. 38, n. 3, p. 475-477, June 2009.

HULL, R. **Matthews plant virology**. Great Britain: Academic Press, 2002. 1001 p.

JOHANSEN, E.; EDWARDS, M. C.; HAMPTON, R. O. Seed transmission of viruses—current perspectives. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 363–386, 1994.

KHAN, S. et al. Immunodiagnosics of cucumber mosaic virus using antisera developed against recombinant coat protein. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Oxon, v. 45, n. 5, p. 561-569, Mar. 2012.

KOENIG, R.; LESEMANN, D. Plant virus identification. **Encyclopedia of Life Sciences**, New York, 2001.

KROTH, L. L.; DANIELS, J.; PIEROBOM, C. R. Utilização de um método simplificados de RT-PCR para detecção do *Sweetpotatofeatherymottle virus I*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 1, p. 109-111, jan./mar. 2005.

LASTRA, T. Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. **Plant Disease Reporter**, Washington, n. 53, p. 171-174, 1968.

LIMA, M. F.; ALVES, C. A. Levantamento de vírus em Cucurbitáceas no Brasil, no período 2008-2010. **Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento**, Brasília, n. 76, p. 1-26, dez. 2011.

LINDBERG, G. D.; HALL, D. H.; WALKER, J. C. A study of melon and squash mosaic viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 489-495, 1956.

LOPES, J. F. I Simpósio Brasileiro de cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, n. 2, v. 9, 1991.

LORENZEN, J. H. et al. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 935-940, July 2006.

LORENZEN, J. H. et al. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, n. 3, p. 517-525, Jan. 2008.

MINK, G. J. Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 375-402, 1993.

MOURA, M. C. C. L. et al. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 90-92, 2001.

MOREIRA, A.; KITAJIMA, E.; REZENDE, J. Identification and partial characterization of a *Carica papaya* -infecting isolate of *Alfalfa mosaic virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, London, v. 76, n. 2, p. 172-175, Feb. 2010.

NELSON, M. R.; KNUHTSEN, H. K. Squash mosaic virus variability: review and serological comparisons of six biotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 920-926, 1973.

NOLAN, P. A.; CAMPBELL, R. N. Squash mosaic virus detection in individual seeds and seed lots of cucurbits by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 971-975, Nov. 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**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2003.

SANTOS, A.A; FREIRE, F.C.O. **Importância da transmissibilidade de vírus através de sementes comerciais de melão**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1999. 2 p. (Comunicado Técnico, 35).

SASTRY, K. S. Mechanism of seed transmission. In: \_\_\_\_\_. **Seed-borne plant virus diseases**. New Delhi: Springer India, 2013. p. 85-100.

SCHIPPERS, B. Transmission of *Bean common mosaicvirus* by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 12, p. 433-497, 1963.

SCHOELZ, J. E.; HARRIES, P. A.; NELSON, R. S. Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 4, n. 5, p. 813-831, May 2011.

SHERF, A. F.; MACNAB, A. A. **Vegetable diseases and their control**. New York. John Wiley & Sons, 1986. 736 p.

SILVEIRA, L. M. da et al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2009.

SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end germination test by radiography. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 17, n. 2, p. 361-369, 1989.

SING, R. P.; NIE, X. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 37-49, Jan. 2001.

SINGH, R. P.; SINGH, M. Specific detection of Potato Virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 2, p. 230-234, Feb. 1998.

SITTERLY, W. R. A new vector of *Squash mosaic virus*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, p. 134-135, 1960.

STEINLAGE, T. A.; HILL, J. H.; NUTTER JUNIOR, F. W. Temporal and spatial spread of *Soybean mosaic virus* (SMV) in soybeans transformed with the coat protein gene of SMV. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 478-486, May 2002.

STONER, W. N. A mosaic virus transmitted by beetles and a grasshopper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 890, 1963.

VIANA, F. M. P. et al. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na Região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 22 p. (Circular Técnica, 12).

WETZEL, T. et al. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 23-37, Sept. 1992.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**Diversidade genética entre isolados de *Squash mosaic virus* (SqMV) do  
Brasil**

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *Squash mosaic virus*  
(SQMV) DO BRASIL**

Nara Edreira Alencar<sup>1</sup>, Antônia dos Reis Figueira<sup>1</sup>, Priscilla de Sousa Geraldino  
Duarte<sup>1</sup>, Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras,  
Minas Gerais, Brazil, Cep. 37200-000 (autor para correspondência: Alencar,  
N.E. narexxx@gmail.com)

## RESUMO

Diversos vírus podem afetar cucurbitáceas, causando perdas consideráveis na qualidade e na quantidade da produção. Dentre eles, o mosaico causado pelo *Squash mosaic virus* (SqMV) tem sido detectado com alta incidência no campo, como, por exemplo, no estado do Tocantins. Sua ocorrência depende de inúmeros fatores, como a época do ano, o local de plantio, a presença e a preferência de vetores. Neste estudo, foram analisados cinco isolados brasileiros do *Squash mosaic virus* (SqMV), sendo quatro do estado de Tocantins (FA, GR2, LC2, LC3) e um de São Paulo (MOC). Utilizando *primers* desenhados com base nas sequências de SqMV disponíveis no banco de dados, foram amplificados por RT-PCR e sequenciados 2.599 nucleotídeos (nt) do RNA-2, dos quais 813 nt correspondem à região 3' do gene da proteína de movimento, 1122 nt à subunidade maior e 555 nt à menor da proteína do capsídeo e 109 nt da 3'UTR. Comparando-se a sequência dos 2.490 nt, que corresponde à região codificável dos genomas analisados, observaram-se identidades que variaram de 91% a 98%, quando os isolados brasileiros foram comparados entre si e de 82% a 88%, quando comparados com isolados do GenBank. Variação similar foi observada quando a sequência de aminoácidos foi analisada. Comparando-se as proteínas separadamente, constatou-se que a maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos foi observada na região da subunidade menor da proteína do capsídeo, tanto entre os isolados brasileiros quanto quando os mesmos foram comparados com isolados do banco de dados. Nas árvores de nucleotídeos e aminoácidos das sequências analisadas, os isolados brasileiros sempre se agruparam em clados diferentes dos isolados do GenBank, mostrando que os mesmos são diferentes dos demais já sequenciados, evidenciando a importância deste estudo, uma vez que estes são os primeiros isolados brasileiros de SqMV que têm o seu genoma analisado.

Palavras-chave: Vírus. Cucurbitáceas. Sequenciamento. RNA2.

**GENETIC DIVERSITY AMONG SQUASH MOSAIC VIRUS (SqMV)  
ISOLATES FROM BRAZIL**

**ABSTRACT**

Several viruses can affect cucurbits causing considerable losses in quality and quantity of production. Among them the mosaic caused by *Squash mosaic virus* (SqMV) has been detected with high incidence in the field in Tocantins state, and its occurrence depends on numerous factors such as time of year, the planting site, the presence and preference vectors. In this study, we analyzed five Brazilian isolates of *Squash mosaic virus* (SqMV) four of the state of Tocantins (FA, GR2, LC2, LC3) and one of São Paulo state (MOC). The using primers was designed based on SqMV sequences available in database. The 2599 nucleotides (nt) of RNA-2 was amplified by RT-PCR and sequenced; 813 nt corresponding to the 3' region of the movement protein gene, 1122nt the largest subunit of the capsid and 555nt the small subunit of the capsid and 109nt the 3'UTR. Comparing the sequence of 2490nt, which corresponds to the codable region of the genomes analyzed, it was observed identities ranging from 91% to 98% when the Brazilian isolates were compared and 82% to 88% compared with GenBank isolates. Similar variation was observed when the amino acid sequence was analyzed. Comparing the proteins separately a higher identity of nucleotide and amino acids was observed in the region of the small subunit of the capsid protein isolated both from Brazilian as when they were compared with single database. In the trees of nucleotides and amino acids of the analyzed sequences, Brazilian isolates always grouped in different clades of isolates from GenBank, showing that they are different from others already sequenced, highlighting the importance of this study once these are the first Brazilian isolates SqMV genome analyzed.

Keywords: Viruses. Cucurbits. Sequencing. RNA2.

## 1 INTRODUÇÃO

O *Squash mosaic virus* ( SqMV ) é um membro do gênero *Comovirus*, família *Secoviridae* (WELLINK et al., 2000). SqMV é transmitido por meio de sementes (Nelson; Knuhtsen, 1973) e por diferentes espécies de besouros (FREITAG, 1956) e cigarrinhas (STONER, 1963), e infecta uma variedade de plantas dos gêneros *Cucumis* (pepino, maxixe e melão), *Cucurbita* (moranga, abóbora e abobrinha) e *Citrullus* (melancia) (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; NELSON; KNUHTSEN, 1973). Plantas pertencentes a esses gêneros destacam-se, no Brasil, pela importância econômica e também social, gerando empregos diretos e indiretos ligados à necessidade de grande número de mão de obra, do cultivo até a comercialização (PINTO, 2003).

Assim como outros *Comovirus*, o SqMV tem um genoma de RNA bipartido senso positivo com RNA-1 e RNA-2 poliadenilados na extremidade 3' que são separadamente encapsidados em partículas isométricas de 28 nm de diâmetro e expressos como poliproteínas. A poliproteína codificada pelo RNA-1 contém a polimerase viral, uma helicase e uma protease, assim como um cofator de protease e a proteína viral ligada ao genoma (VPg), enquanto o RNA-2 codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em proteína de movimento (MP), subunidade maior da proteína do capsídeo (LCP) e subunidade menor da proteína do capsídeo (SCP) (GOLDBACH; WELLINK, 1996). Três tipos de partículas virais podem ser separados por centrifugação em gradiente de densidade, sendo designadas Top (T; capas proteicas vazias), Middle (M; contendo RNA-2) e Botton (B; contendo RNA-1) (BRUENING, 1978).

O *Squash mosaic virus* tem sido relatado em países da América do Norte (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; KNUHTSEN; NELSON, 1968, NELSON; KNUHTSEN, 1973), da América do Sul (SANTOS; FREIRE, 1999),

no Japão e na China (HU et al., 2009). Os sintomas produzidos pelo SqMV variam de mosaico severo e deformações foliares em abobrinha (*Cucurbita pepo*) e, em *Cucumis sativus*, clorose sistêmica nas nervuras e manchas amareladas (RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003).

Em alguns trabalhos anteriores utilizaram-se gama de hospedeiras, sintomatologia e, principalmente, sorologia para identificar o SqMV e classificá-los em dois grupos (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; KNUHTSEN; NELSON, 1968; NELSON; KNUHTSEN, 1973). O grupo I infecta melancia, causa sintomas severos em melão ‘Cantaloupe’ e sintomas moderados em abóboras; já o grupo II não infecta melancia, mas causa sintomas moderados em melão ‘Cantaloupe’ e sintomas severos em abóbora. Em pepino-africano (*Cucumis metuliferus*), a infecção com SqMV resulta em lesões locais, sintoma que pode ser utilizado para a identificação biológica deste vírus (SHERF, MACNAB, 1986). As variações de sintomas e sorologia observadas levam à hipótese de que podem existir, entre as estirpes de SqMV, um ou mais subgrupos geneticamente definidos

Existem poucos trabalhos relacionados ao SqMV no Brasil e, até o momento, não foram realizados estudos moleculares visando estudar a filogenia do patógeno e pouco se sabe sobre a variabilidade genética do SqMV. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a variabilidade genética, por meio da análise do segmento genômico referente ao RNA-2, do *Squash mosaic virus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Vegetal, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA). Os cinco isolados empregados neste trabalho foram coletados no estado do Tocantins e se encontram discriminados na Tabela 1.

Tabela 1 Origem dos isolados e hospedeiras que foram encontradas infectadas naturalmente no campo.

Código dos isolados	Local de coleta	Hospedeiro
FA	Formoso do Araguaia	<i>Citrullus lanatus</i>
GR2	Gurupi	<i>Citrullus lanatus</i>
LC2	Lagoa da Confusão	<i>Citrullus lanatus</i>
LC3	Lagoa da Confusão	<i>Citrullus lanatus</i>
MOC	Mococa	<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta

Esses isolados se encontram dessecados e/ou armazenados em ultracongelador, a -80 °C. Para a multiplicação dos isolados, os tecidos infectados foram macerados em nitrogênio líquido e o pó obtido foi diluído em tampão fosfato 0,01M, pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1:10 (p/v). Esse extrato foi inoculado, por fricção, em plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta previamente polvilhadas com carborundum (carbureto de silício - CSi) e, em seguida, as folhas foram lavadas com água e as plantas deixadas em casa de vegetação até o aparecimento do sintomas para coleta dos tecidos infectados e extração do RNA total.

### **Extração do RNA total**

A extração do RNA total foi feita pelo método do Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2002), a partir das folhas das plantas infectadas com SqMV. Primeiramente, as folhas foram maceradas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido e ao pó obtido adicionaram-se a solução de Trizol (solução aquosa contendo 38% de fenol saturado, 0,8M de guanidina tiocianato, 0,4M de amônio tiocianato e 0,1M de acetato de sódio, pH5 e 5% de glicerol), na proporção de 1 g/10 mL. Posteriormente, os microtubos (2 mL) foram incubados em temperatura ambiente, por 5 minutos e centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi descartado e ao sobrenadante adicionaram-se 300 µL de clorofórmio a cada microtubo que foi agitado no vórtex e deixado à temperatura ambiente por 3 minutos. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados novamente, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante obtido foi transferido para outro microtubo, adicionando-se a metade do seu volume de isopropanol e 0,8M de citrato de sódio/1,2M de NaCl. Os tubos foram cuidadosamente misturados por inversão e deixados à temperatura ambiente, por 10 minutos, para que houvesse a precipitação do RNA. Após esse período, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol gelado a 75% e centrifugado, a 12.000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e, após a secagem do pellet a vácuo, o RNA foi ressuscitado em 25 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A qualidade do RNA total obtido foi analisada por eletroforese gel de agarose a 0,7%, contrastado com Gel Red (*Biotium*<sup>®</sup>).

## RT-PCR

### Síntese do cDNA

A transcrição reversa foi realizada empregando-se 0,5  $\mu\text{L}$  (10 pMol) do *primer reverse*, 1,0  $\mu\text{L}$  do RNA extraído e 4,0  $\mu\text{L}$  de água ultrapura tratada com DEPC em um microtubo que foi inicialmente incubado, por 5 minutos, a 75 °C e, após este tempo, foi imediatamente transferido para o gelo. Em seguida, acrescentaram-se 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão da transcriptase reversa (RT M-MLV buffer da USB), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 mM, 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima RT (USB) e 1,8  $\mu\text{L}$  de água ultrapura tratada com DEPC. Os tubos foram incubados, a 42 °C, por 30 minutos, depois a 95 °C, por 5 minutos e transferidos para o gelo para utilização posterior.

### PCR

A amplificação por meio de PCR foi feita empregando-se os *primers* desenhados com base nas sequências obtidas no banco de dados (GenBank) (Tabela 2). Para a reação de PCR, utilizaram-se 1  $\mu\text{L}$  do cDNA, 5  $\mu\text{L}$  de buffer 2x GoTaq; 0,75  $\mu\text{L}$  de cada um dos *primers* senso e antissenso; 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM; 1  $\mu\text{L}$  de dNTP; 0,125  $\mu\text{L}$  da enzima e 14,875  $\mu\text{L}$  de água (reação total de 25  $\mu\text{L}$ ). Para amplificação empregaram-se desnaturação inicial a 95 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: 72 °C, 30 segundos; temperatura de anelamento variando conforme o par de *primer* utilizado (Tabela 2) por um minuto e extensão, a 72 °C, por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed (*Biotium*<sup>®</sup>).

Tabela 2 Relação de *primers* utilizados para o sequenciamento do RNA-2

Primer	Ident.	Temp. (°C)	Sequência
1	2SqMV 741F	51,2	5' GGA ACT CTC ACA CCT GGT 3'
	2SqMV 1395R		5' CCA CCA ATC TTG TAA ACA AA 3'
2	2SqMV 1284F	50,0	5' CAG ATG ACA AAG GAA GAG AT 3'
	2SqMV 1929R		5' CAA GCA GGA TTC CAC AC 3'
3	2SqMV 1868F	50,5	5' AGT GGC ATA ACA GGA GC 3'
	2SqMV 2699R		5' GTA CTC TGC CCA GAA ATT 3'
4	2SqMV 2501F	49,7	5' TTT GAC GGC ATG GTC 3'
	2SqMV 3360R		5' GCA TCA AAG AAA ACA AGC TC 3'

### Sequenciamento e análise do fragmento genômico viral amplificado

Os cDNAs obtidos foram purificados diretamente do produto da reação com o Kit Norgen (Biotek Corporation®), de acordo com as recomendações do fabricante, e enviados para a empresa MYLEUS Biotechnology, onde foi realizado o sequenciamento genômico. As sequências foram analisadas e comparadas entre si e com outras disponíveis no GenBank, sendo cinco sequências de SqMV e uma sequência de *Cowpea mosaic virus* (CPMV) empregada como isolado externo (*outgroup*) (Tabela 3). Para isso, empregou-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponível no website do National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Os alinhamentos múltiplos, das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, foram realizados utilizando-se o programa CLUSTAL Ômega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)). Distâncias genéticas e árvores filogenéticas foram geradas utilizando-se o programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2011), com bootstrap, considerando valores superiores a 10.000 repetições.

Tabela 3 Número de acesso no GenBank (NCBI) e origem dos isolados utilizados para comparação com as sequências dos isolados brasileiros

Vírus	Número de acesso	Origem	Autor
SqMV	EU 421060	China	Hu et al., 2009
SqMV	KP 223324	Espanha	Li et al, 2015
SqMV	AF 059532	Estados Unidos	Haudenshield & Palukaitis, 1998
SqMV	AF 059533	Estados Unidos	Haudenshield & Palukaitis, 1998
SqMV	NC 003800	Japão	Han et al., 2002
CPMV	NC 003550	Holanda	Wezenbeek, P. et al., 1983

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Análises filogenéticas**

Foi amplificado e analisado um fragmento com um total de 2.599 nucleotídeos (nt) pertencentes ao RNA 2, com 813 nt (de um total de 1.353) da parte 3' terminal do gene da proteína de movimento, ambas as subunidades do capsídeo: a maior com 1.122 nt e a menor com 555 nt e 109 nt da região 3'UTR.

As sequências de SqMV obtidas foram comparadas com as sequências dos únicos cinco isolados que se encontram disponíveis no GenBank (Tabela 3). A comparação entre as sequências dos 2.490 nucleotídeos (excluindo-se a região 3'UTR) dos isolados brasileiros de SqMV mostrou identidades que variaram de 91% a 98% (Tabela 4). A menor identidade (91%) foi verificada quando se comparou o isolado FA com o isolado GR2 e LC3 com MOC, indicando uma maior diferença entre esses dois isolados do Tocantins e o isolado de Mococa. A maior identidade (98%) foi verificada entre os isolados LC2 e MOC que, ao contrário do que se espera, são de regiões bastante distantes.

Comparando-se os isolados brasileiros com os isolados do GenBank, as identidades variaram entre 82% e 88%, sendo a menor identidade entre o isolado KP223324, da Espanha e o isolado GR2. As maiores identidades ocorreram entre os isolados NC 003800 (do Japão) e os isolados LC2 e LC3, e entre o AF059533 (dos Estados Unidos) e o LC3. As identidades entre os isolados do GenBank variaram de 84% (entre os isolados EU421060 da China e o KP223324 da Espanha) a 99% (entre os isolados AF059532 dos Estados Unidos e o EU421060 da China).

As identidades entre os aminoácidos (Tabela 5) dos isolados brasileiros variaram de 91%, entre o isolado GR2 e o isolado FA, a 98% entre os isolados LC2, LC3, e MOC. Quando as sequências de aminoácidos dos isolados brasileiros foram comparadas com os isolados do GenBank, as identidades

variaram de 90% (entre os isolados GR2, EU421060 e AF059532) a 97% entre os isolados LC2 e NC003800; entre os isolados LC3, NC003800 e AF05933.

Entre os isolados disponíveis no GenBank a identidade variou de 96% (entre os isolados AF059532, KP223324, NC003800 e AF05933; entre os isolados EU421060, NC003800 e AF05933; entre o isolado KP223324 e o EU421060) a 99% (entre o isolado EU421060 e AF059532 e entre o isolado NC003800 e o AF05933).

Tabela 4 Porcentagem de identidade entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank, considerando-se os 2.490 nucleotídeos amplificados

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	91	94	92	93	84	85	87	87	86
2 GR2	-	-	96	89	96	82	83	85	85	84
3 LC2	-	-	-	92	98	85	86	87	88	86
4 LC3	-	-	-	-	91	85	86	88	88	87
5 MOC	-	-	-	-	-	86	86	87	87	86
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	84	85	86	84
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	88	88	99
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	93	88
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5 Porcentagem de identidade dos aminoácidos entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank, considerando-se os 2.490 nucleotídeos amplificados

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	91	96	96	95	94	93	95	95	93
2 GR2	-	-	93	93	93	91	90	92	92	90
3 LC2	-	-	-	98	98	96	95	97	96	95
4 LC3	-	-	-	-	97	96	95	97	97	95
5 MOC	-	-	-	-	-	95	94	96	96	94
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	96	98	98	96
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	96	96	99
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	99	96
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros e dos isolados do GenBank (Figura 1) observou-se a formação de dois clados com dois subclados. Em um deles se agruparam os isolados brasileiros e, no outro, os isolados do GenBank, conforme o esperado para isolados de diferentes regiões geográficas. O isolado NC 003550, utilizado como *outgroup*, ficou separado desses, como o esperado.

No subclado em que se agruparam os isolados brasileiros, os isolados LC2 e GR2, do Tocantins, agruparam-se juntamente com o MOC de São Paulo, indicando que, apesar da distância entre as regiões geográficas, eles devem ter tido a mesma origem. Isso pode ser explicado pelo fato de esse vírus ser transmitido pelas sementes e do grande trânsito dessas sementes dentro do país. O isolado LC3 foi o que mais se distanciou dos demais. No subclado dos isolados do GenBank, um dos isolados americanos (AF059532) se agrupou com o isolado da China (EU421060) e o outro (AF059533) com o do Japão (NC003800). O isolado KP 223324 da Espanha ficou separado no segundo subclado.

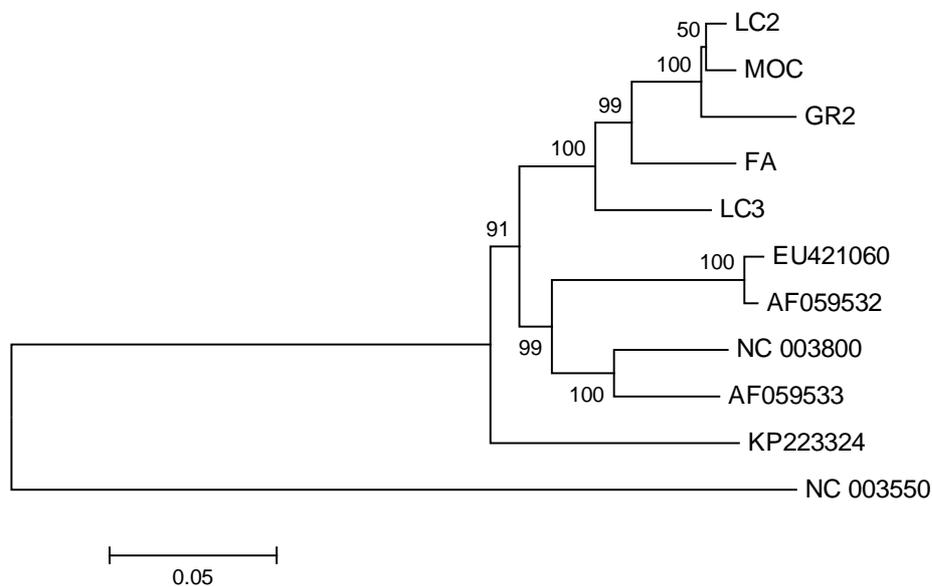


Figura 1 Árvore filogenética construída com base na sequência de 2599 nucleotídeos dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

Já na árvore construída com base na sequência de aminoácidos também foram formados dois clados, com o primeiro apresentando dois subclados, um com os cinco isolados do GenBank e outro com quatro dos isolados brasileiros (Figura 2). Nos isolados do GenBank, os isolados KP 223324, AF 059533 e NC003800 se agruparam em um ramo do primeiro subclado e os EU421060 e AF 059532 no outro. O isolado FA ficou mais próximo do LC3, enquanto o LC2 ficou mais perto do MOC. Nesse caso, o isolado que ficou separado do segundo subclado foi o isolado brasileiro GR2, do município de Gurupi, TO.

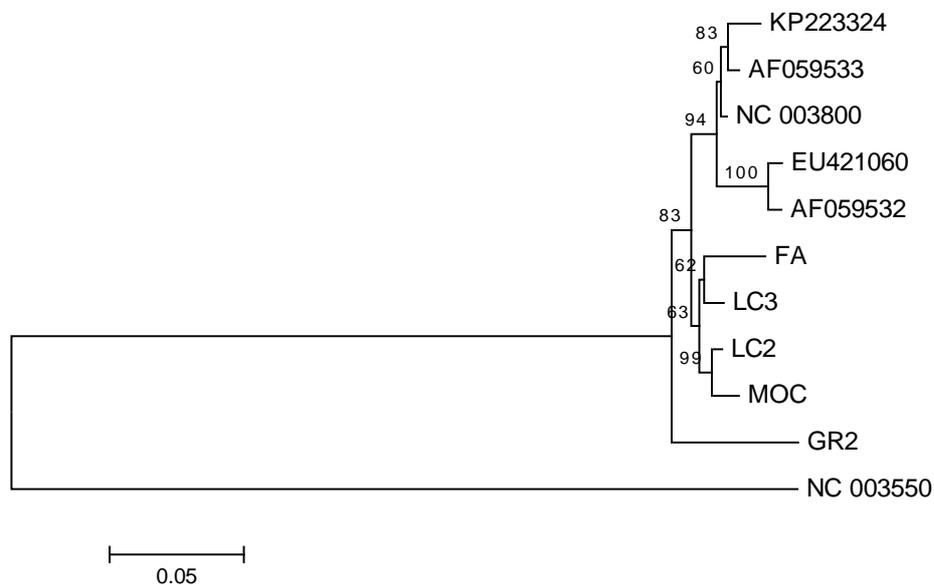


Figura 2 Árvore filogenética construída com base na sequência dos aminoácidos dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

Fazendo-se a comparação, separadamente, entre os 813 nucleotídeos da proteína de movimento os isolados brasileiros de SqMV mostraram identidades que variaram de 85% (entre LC3 e MOC) a 99% (entre GR2 e LC2) (Tabela 6) .

Comparando-se os isolados brasileiros com os isolados do GenBank, constata-se que as identidades variaram entre 73% (entre os isolados GR2 e KP223324) e 88% (entre o isolado LC2 e o AF 059533; entre LC3, EU421060 e AF 059532). Entre os isolados do GenBank, essa identidade ficou entre 83% (entre KP223324, EU421060 e AF 059533) a 99% (entre EU421060 e AF 059532).

As identidades entre os aminoácidos (Tabela 7) dos isolados brasileiros variaram de 81%, entre o isolado GR2 e o isolado FA e entre o GR2 e o LC3, a

98%, entre os isolados LC2 e MOC. Quando comparados aos isolados do GenBank, as identidades variaram de 80% (entre o isolado GR2, EU421060 e AF 059532) a 97%, entre o isolado LC2, NC003800 e AF059533 e entre os isolados LC3, NC003800 e AF059533. Entre os isolados do GenBank a identidade variou entre 96% (entre KP223324 e AF059532) a 100% (entre NC003800 e AF059533). Nota-se, portanto, que a variabilidade dessa parte da proteína de movimento é maior entre os isolados brasileiros do que entre os isolados do GenBank.

Na Figura 3 pode-se observar a árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros de SqMV e do GenBank. Novamente houve a formação de dois clados, só que, dessa vez, o isolado LC3 ficou agrupado no clado dos isolados do GenBank, mais próximos aos isolados dos Estados Unidos (AF059532) e da China (EU421060).

Na árvore com base na sequência de aminoácidos (Figura 4) desse fragmento genômico, novamente houve a formação de dois clados, mas o isolado GR2 ficou sozinho em um deles e os demais no outro. Os isolados FA, LC2 e MOC se agruparam em um subclado e o LC3 novamente se agrupou com os isolados do GenBank. Pode-se perceber que muitas substituições de nucleotídeos resultaram em mudanças de aminoácidos, caracterizando substituições do tipo sinônima (NEI; GOJOBORI, 1986).

Tabela 6 Porcentagem de identidade dos 813 nucleotídeos da proteína de movimento entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	86	95	87	95	82	85	86	87	85
2 GR2	-	-	99	77	88	73	76	79	80	76
3 LC3	-	-	-	86	98	83	85	87	88	85
4 LC2	-	-	-	-	85	86	88	87	86	88
5 MOC	-	-	-	-	-	82	85	86	87	85
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	83	86	84	83
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	89	87	99
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	92	89
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 7 Porcentagem de identidade dos aminoácidos da proteína de movimento entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	81	96	96	95	94	94	95	95	93
2 GR2	-	-	83	81	82	81	80	82	82	80
3 LC3	-	-	-	96	98	95	95	97	97	94
4 LC2	-	-	-	-	95	96	96	97	97	96
5 MOC	-	-	-	-	-	95	94	96	96	94
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	97	98	98	96
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	97	97	99
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	100	97
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

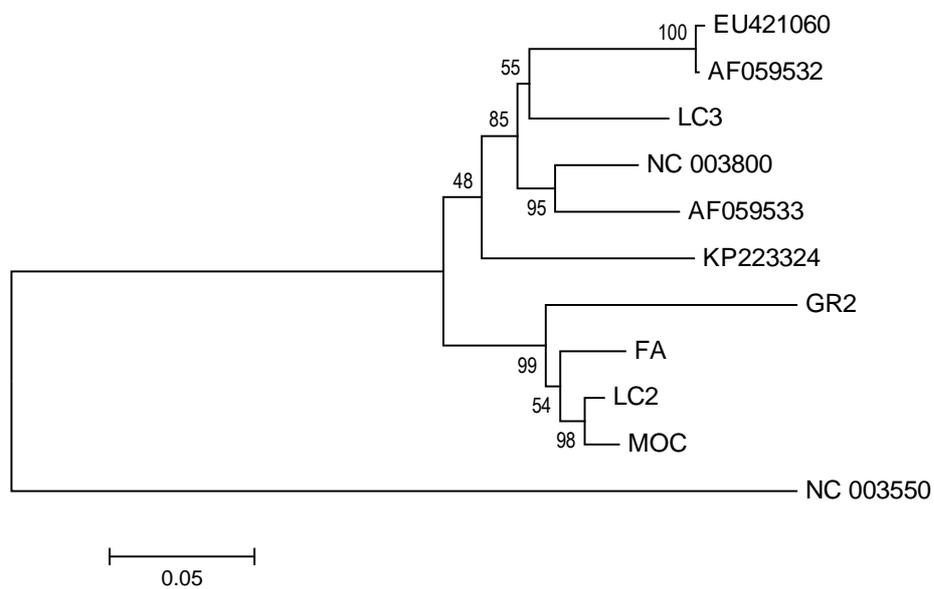


Figura 3 Árvore filogenética construída com base na sequência de 813 nucleotídeos da proteína de movimento dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

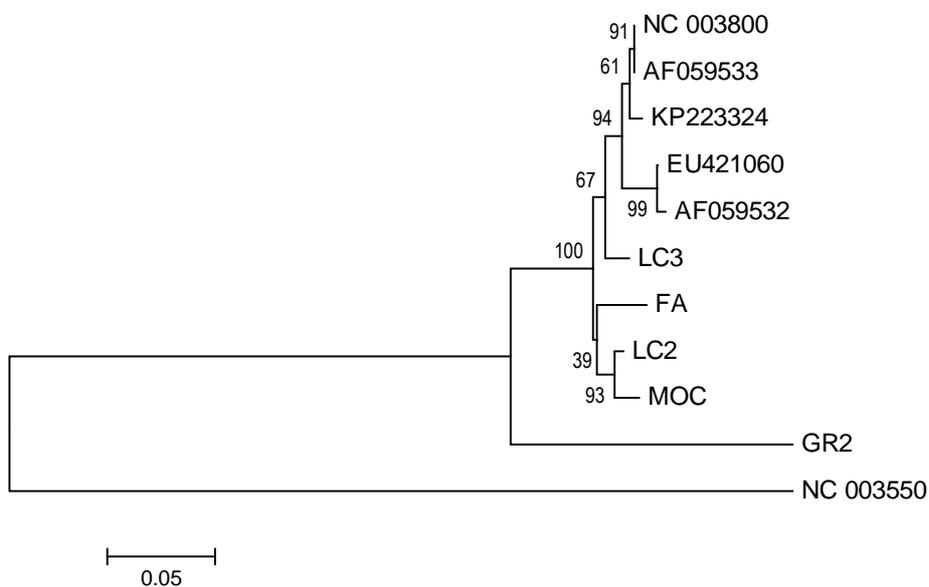


Figura 4 Árvore filogenética construída com base na sequência dos aminoácidos da proteína de movimento dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

Na comparação entre as sequências dos 1.122 nucleotídeos da subunidade maior da proteína do capsídeo, a identidade entre os isolados brasileiros variou de 94% (entre LC2 e LC3; entre LC3 e MOC) a 99% (GR2, LC2 e MOC; LC2 e MOC) (Tabela 8). Comparando-se os isolados brasileiros com os isolados do GenBank, as identidades variaram entre 82% (entre os isolados FA e KP223324) a 88% (entre o isolado LC3 e AF059533). A identidade entre os isolados do GenBank variou de 83% (entre os isolados KP223324, EU421060, NC003800 e o AF059532) e 98% (entre EU421060 e AF059532).

As identidades entre os aminoácidos dos isolados brasileiros variaram de 95% (entre os isolados FA, GR2 e LC2) a 99% (entre o isolado MOC e

LC2/LC3) (Tabela 9). Comparando-se os isolados brasileiros com os isolados do Genbank, as identidades variaram entre 92% (entre o isolado FA e EU421060) e 98% (entre o isolado NC003800 e LC3/MOC). Entre os isolados do GenBank, a identidade variou de 95% (entre o isolado KP223324 e EU421060/ AF059532) e 98% (entre os isolados EU421060 e AF059532 e entre NC003800 e AF05953). Nesse caso, a variabilidade entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos isolados brasileiros foi menor do que a observada entre os isolados do GenBank.

Na Figura 5 pode-se observar a árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da subunidade maior da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros e do GenBank. Houve a formação de dois clados, tendo o primeiro apresentado dois subclados: no primeiro ficaram agrupados os isolados brasileiros e, no outro, quatro isolados do GenBank. O quinto isolado, KP223324, ficou separado no segundo clado. Entretanto, na árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos, foram novamente formados dois clados, mas, no primeiro clado se agruparam todos os isolados brasileiros, juntamente com um isolado do GenBank, o NC003800, e, no outro, os quatro isolados restantes.

Tabela 8 Porcentagem de identidade dos 1.122 nucleotídeos da subunidade maior da proteína do capsídeo entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	96	96	95	96	82	83	86	87	84
2 GR2	-	-	99	95	99	83	84	86	87	84
3 LC2	-	-	-	94	99	84	84	86	87	84
4 LC3	-	-	-	-	94	83	83	86	88	84
5 MOC	-	-	-	-	-	84	84	86	87	84
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	83	83	85	83
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	87	87	98
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	92	87
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 9 Porcentagem de identidade dos aminoácidos da subunidade maior da proteína do capsídeo entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	95	95	96	96	93	92	95	94	92
2 GR2	-	-	98	98	98	95	94	97	96	94
3 LC2	-	-	-	98	99	95	94	97	96	95
4 LC3	-	-	-	-	99	96	95	98	97	95
5 MOC	-	-	-	-	-	95	95	98	97	95
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	95	97	97	95
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	96	96	98
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	98	97
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

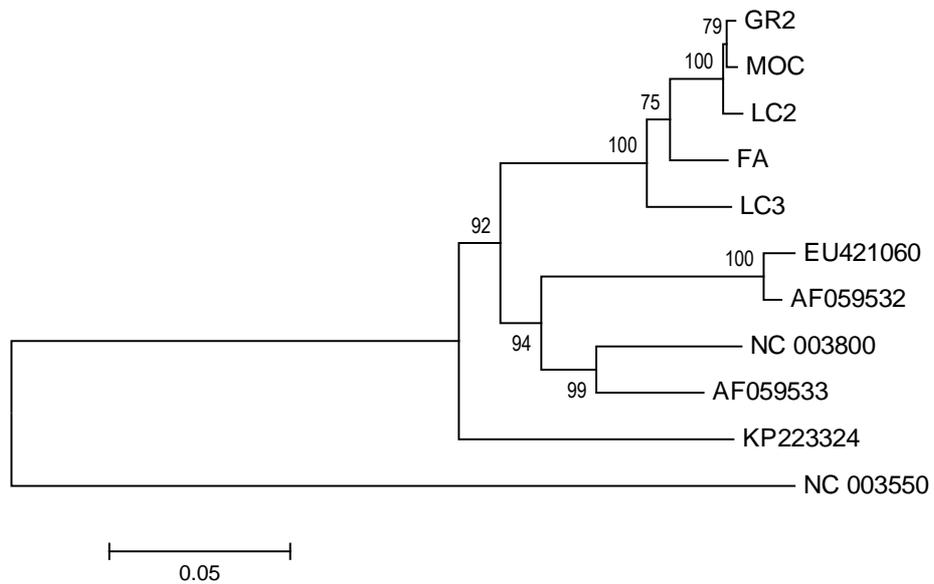


Figura 5 Árvore filogenética construída com base na sequência de 1.122 nucleotídeos da subunidade maior da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

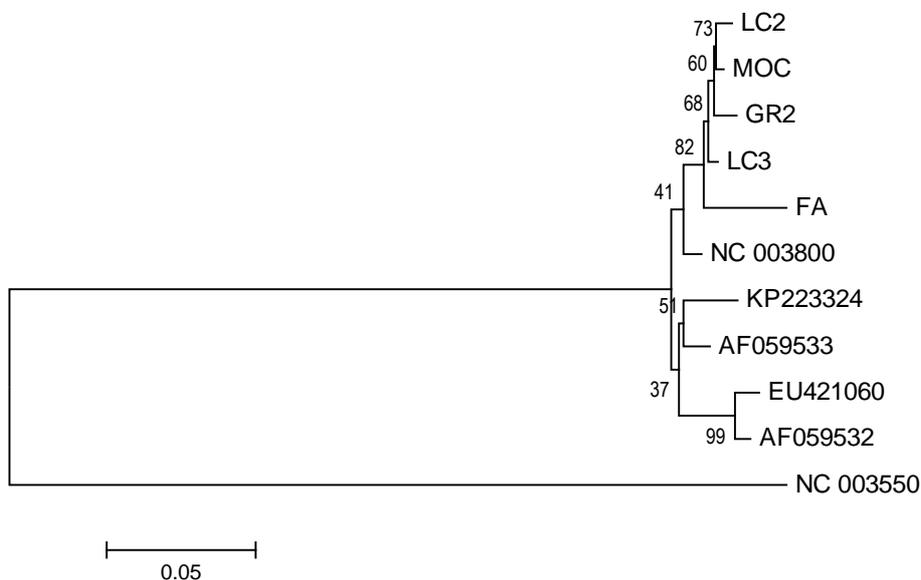


Figura 6 Árvore filogenética construída com base na sequência dos aminoácidos da subunidade maior da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

A comparação entre as sequências dos 555 nucleotídeos da subunidade menor da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de SqMV mostrou identidades que variaram de 85%, entre o isolado FA e o isolado MOC, a 100% entre os isolados GR2 e LC2 (Tabela 10). Quando comparados com os isolados do GenBank, as identidades variaram de 85%, entre o isolado MOC e o isolado KP223324, a 88%, entre o isolado japonês NC 003800 com os isolados FA e LC3. A identidade entre os isolados do GenBank variou de 87% a 99%.

As identidades entre os aminoácidos (Tabela 11) dos isolados brasileiros variaram de 93%, entre o isolado FA e o isolado MOC, a 100% entre os isolados GR2 e LC2. Quando comparados com os isolados do GenBank, as identidades variaram de 93% (entre o isolado chinês EU 421060 com isolados FA e MOC e

o isolado norte-americano AF 059532 também com os isolados FA e MOC) a 97%, entre o isolado japonês NC 003800 com os isolados GR2, LC2 e LC3 e o isolado AF 059533 com os isolados GR2 e LC2. Entre os isolados do GenBank a variação foi entre 96% e 99%.

Tabela 10 Porcentagem de identidade dos 555 nucleotídeos da subunidade menor da proteína do capsídeo entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	86	86	91	85	86	86	88	87	87
2 GR2	-	-	100	94	97	86	86	86	87	86
3 LC2	-	-	-	94	97	86	86	86	87	86
4 LC3	-	-	-	-	92	86	86	88	87	87
5 MOC	-	-	-	-	-	85	86	86	86	86
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	87	87	87	87
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	87	89	99
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	94	87
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 11 Porcentagem de identidade dos aminoácidos da subunidade menor da proteína do capsídeo entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	96	96	97	93	95	93	95	95	93
2 GR2	-	-	100	98	97	96	96	97	97	96
3 LC2	-	-	-	98	97	96	96	97	97	96
4 LC3	-	-	-	-	95	96	94	97	96	94
5 MOC	-	-	-	-	-	94	93	95	94	93
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	96	98	99	96
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	96	96	98
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	99	96
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na Figura 7 pode-se observar a árvore filogenética construída com base na sequência de 555 nucleotídeos da subunidade menor da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de SqMV e dos isolados do banco de dados. Observou-se a formação de dois clados distintos, sendo o primeiro com dois subclados contendo todos os isolados do GenBank e o segundo com o isolado brasileiro FA (Figura 8). No segundo clado, também com dois subclados, o LC3 ficou sozinho em um deles e os três restantes, MOC, GR2 e LC2, no segundo. O isolado FA agrupou-se com os demais isolados do banco de dados, porém, em um ramo distinto da árvore. Já na árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos foram novamente formados dois clados, mas no primeiro clado encontra-se somente o isolado FA e, no outro, os isolados ficaram separados em subclados, porém, os isolados do GenBank agrupados em conjunto.

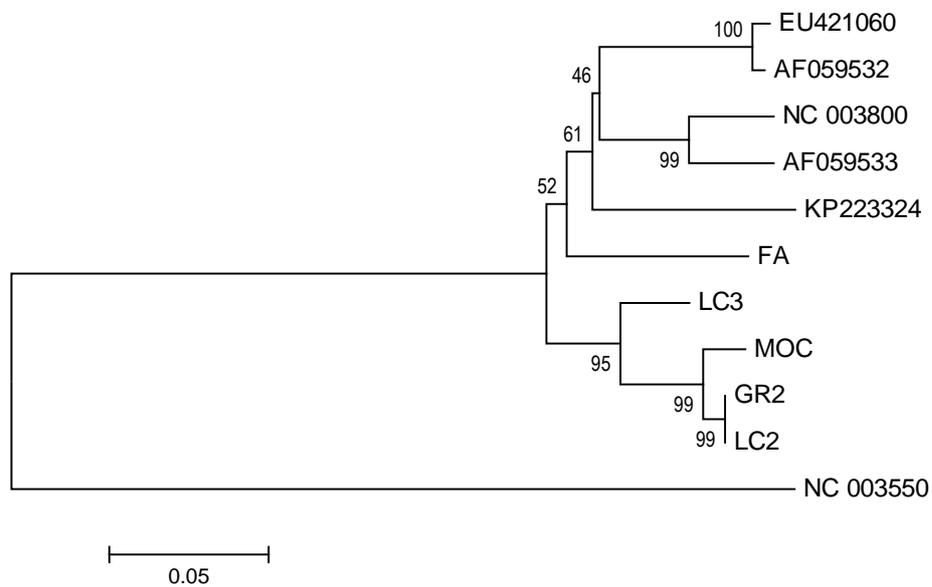


Figura 7 Árvore filogenética construída com base na sequência de 555 nucleotídeos da subunidade menor da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

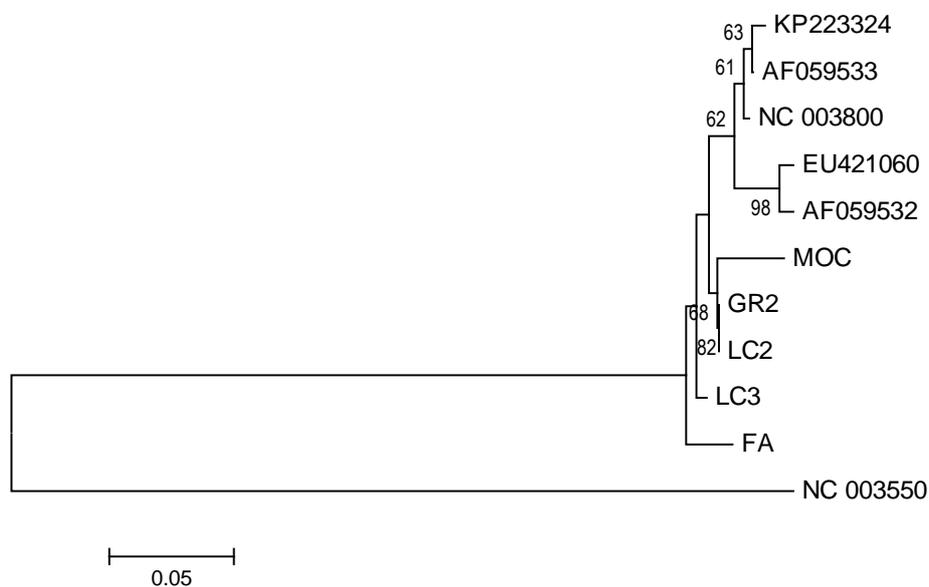


Figura 8 Árvore filogenética construída com base na sequência dos aminoácidos da subunidade menor da proteína do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

A região da 3' UTR foi a mais variável, pois a comparação entre os 109 nt sequenciados dos isolados brasileiros de SqMV mostrou identidades que variaram de 37%, entre o isolado LC2 e o isolado MOC, a 92%, entre os isolados FA e LC3 e GR2 e LC3 (Tabela 12). Quando comparados com os isolados do GenBank, as identidades variaram de 39%, entre o isolado MOC e os isolados AF059533 e NC 003800, a 98%, entre o isolado japonês NC 003800 e o isolado FA. A identidade entre os isolados do GenBank variou de 85% a 100%.

Tabela 12 Porcentagem de identidade dos 109 nucleotídeos da 3'UTR entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 FA	-	90	83	92	41	83	85	98	92	85
2 GR2	-	-	91	92	39	81	81	88	88	81
3 LC2	-	-	-	85	37	73	76	80	81	76
4 LC3	-	-	-	-	41	85	83	91	92	83
5 MOC	-	-	-	-	-	42	42	39	39	42
6 KP223324	-	-	-	-	-	-	85	85	86	85
7 EU421060	-	-	-	-	-	-	-	86	88	100
8 NC 003800	-	-	-	-	-	-	-	-	97	86
9 AF059533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88
10 AF059532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Observa-se, na árvore filogenética (Figura 9) construída com base na sequência de nucleotídeos da 3'UTR dos isolados brasileiros de SqMV e dos isolados do banco de dados, novamente, a formação de dois cladogramas distintos sendo o primeiro com dois subclados, um contendo os isolados brasileiros GR2, LC2, FA e LC3 e o outro com os isolados NC003800 e AF059533. O segundo clado contém um subclado dos isolados EU421060 e AF059532 e, em um ramo separado, o isolado KP223324. O isolado paulista MOC ficou separado dos demais em um ramo distinto.

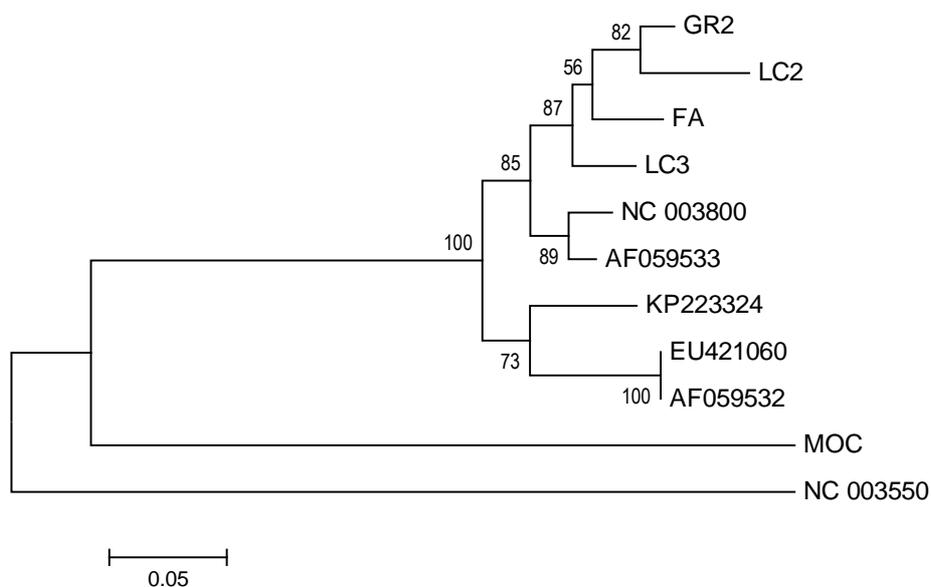


Figura 9 Árvore filogenética construída com base na sequência nucleotídeos da 3'UTR dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e dos isolados do banco de dados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com 10.000 repetições

De modo geral, as substituições de nucleotídeos observadas no fragmento genômico estudado não resultaram em mudança nos aminoácidos,

constituindo-se numa mutação não sinônima (NEI; GOJOBORI, 1986). Tanto entre os isolados brasileiros como entre esses e os disponíveis no GenBank, as identidades do fragmento total estudado, ou de cada gene separadamente, ficaram acima de 90%, com exceção do gene da proteína de movimento do isolado GR2, que variou entre 82% e 83% (Tabela 7).

Nas árvores filogenéticas, houve uma tendência de separação entre isolados brasileiros e os do GenBank, com poucas exceções: na árvore filogenética construída com base no gene parcial da proteína de movimento, em que o isolado brasileiro LC3 se agrupou com os isolados do GenBank (Figuras 4 e 5) na árvore baseada na sequência de nucleotídeos da unidade menor da proteína do capsídeo do SqMV, em que o isolado brasileiro FA se alocou, sozinho, em um dos dois subclados formados pelos isolados estrangeiros (Figura 7). Entretanto, na árvore construída com base na sequência de nucleotídeos desse gene, o isolado FA não se agrupou com nenhum dos subclados formados pelos isolados brasileiros e estrangeiros, ficando sozinho em um dos dois clados que foram formados, indicando certa distância de todos os demais isolados.

Notou-se, ainda, maior proximidade entre os isolados LC2 e MOC e uma maior distância dos isolados LC3 e FA, que ficaram separados em subclados distintos na maioria das árvores construídas. Entre os isolados estrangeiros houve uma maior proximidade entre o isolado EU421060 da China com o isolado dos Estados Unidos AF059532, em todas as árvores e do isolado dos Estados Unidos AF059533 com o NC 003800 do Japão, nas árvores construídas para os nucleotídeos e os aminoácidos da MP, nucleotídeos da subunidade maior e menor da proteína do capsídeo e deste com o isolado KP223324 da Espanha, quando foram comparados os aminoácidos do fragmento total, e das duas subunidades da proteína do capsídeo.

Esses dados indicam que os isolados que apresentaram maior consistência no grau de proximidade foram os isolados dos Estados Unidos

(AF059532) e da China (EU421060) que, provavelmente, devem ter a mesma origem geográfica. Porém, em fitovirologia, o usual é basear a filogeografia de isolados virais no gene da proteína do capsídeo (CHOI; PARK; RYU, 2012; DOLJA et al., 1991; MELO et al., 2015). Assim sendo, apenas com base nas subunidades da CP, fica confirmada a proximidade entre os isolados dos Estados Unidos (AF059533) e o da Espanha (KP223324), e entre os isolados EU421060 da China e o dos Estados Unidos AF059532 e também a proximidade entre os isolados MOC e LC2, e a maior distância dos isolados LC3 e FA.

#### **4 CONCLUSÕES**

Os isolados brasileiros apresentaram pouca variabilidade genética entre si, mas houve um maior distanciamento dos isolados LC3 e MOC.

Os isolados brasileiros se agruparam separadamente dos isolados do GenBank, na maioria das árvores filogenéticas.

## REFERÊNCIAS

- AFGC PROTOCOLS. 2002. Disponível em: <<http://www.arabdopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- ALENCAR, N. E. et al. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 1, p. 32-37, Feb. 2012.
- ALMEIDA, J. E. M. de. **Detecção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora, pimentão e tomate**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BRUENING, G. **Comovirus group**. Califórnia: CMI, 1978. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=199>>. Acesso em: 14 mar. 2014.
- CHOI, S. H.; PARK, M. H.; RYU, K. H. Phylogeny, coat protein genetic variability, and transmission via seeds of Hosta virus X. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 63, n. 1, p. 151-161, Mar. 2012.
- CLUSTAL Ômega. Disponível em: <[www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)>. Acesso em: 05 jul. 2015.
- DOLJA, V. V. et al. Phylogeny of capsid proteins of Rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. **Virology**, New York, v. 184, n. 1, p. 79-86, Sept. 1991.
- FREITAG, J. H. Bettle transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 73-81, 1956.
- FREITAG, J. H. Insect transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, p. 8, 1941. Abstract.
- GOLDBACH, R. W.; WELLINK, J. Comoviruses: molecular biology and replication. In: HARRISON, B. D.; MURANT, A. F. **The plant viruses: polyhedral virions and bipartite RNA genomes**. New York: Plenum, 1996. p. 35-76.

HAN, S. S. et al. Nucleotide sequence of a Japanese isolate of Squash mosaic virus. Brief report. **Archive of Virology**, Wien, v. 147, n. 2, p. 437-443, 2002.

HAUDENSHIELD, J. S.; PALUKAITIS, P. Diversity among isolates of squash mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 10, p. 2331–2341, Oct. 1998.

HU, J. et al. The genomic sequence of a Chinese isolate of Squash mosaic virus with novel 5' conserved ends. **Virus Genes**, Norwell, v. 38, n. 3, p. 475-477, June 2009.

HU, J. S. et al. The coat protein genes of squash mosaic virus: cloning, sequence analysis, and expression in tobacco protoplasts. **Archive of Virology**, Wien, v. 130, n. 1-2, p. 17-31, 1993.

KNUHTSEN, H. K.; NELSON, M. R. Identification of two serotypes in squash mosaic virus strains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 345–347, 1968.

LI, R. et al. Complete genome sequence of a novel genotype of squash mosaic virus infecting squash in Spain. **Genome Announcements**, Oxford, v. 3, n. 1, p. e1583, Jan./Feb. 2015.

LINDBERG, G. D.; HALL, D. H.; WALKER, J. C. A study of melon and squash mosaic viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 489-495, 1956.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, n. 5, p. 418-426, Sept. 1986.

MELO, J. R. F. et al. Recent characterization of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, [s.n.], v. 14 n. 9, p. 735-744, Mar. 2015.

NELSON, M. R.; KNUHTSEN, H. K. Squash mosaic virus variability: review and serological comparisons of six biotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 920-926, 1973.

PINTO, Z. V. **Efeito da origem dos isolados do Cucumber mosaic vírus (CMV) e da presença de dois potyvirus na transmissão do CMV para abobrinha de moita por meio de duas espécies de afídeos**. 2003. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2003.

SANTOS, A. A.; FREIRE, F. C. O. **Importância da transmissibilidade de vírus através de sementes comerciais de melão**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1999. 2 p. (Comunicado Técnico, 35).

SHERF, A. F.; MACNAB, A. A. **Vegetable diseases and their control**. New York. John Wiley & Sons, 1986. 736 p.

SILVEIRA, L. M. da et al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2009.

SITTERLY, W. R. A new vector of *Squash mosaic virus*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, p. 134-135, 1960.

STONER, W. N. A mosaic virus transmitted by beetles and a grasshopper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 890, 1963.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

WELLINK, J. et al. Family comoviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 691-701.

WEZENBEEK, P. et al. Primary structure and gene organization of the middle component RNA of cowpea mosaic virus. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 941-946, 1983.

**ARTIGO 2**

**Análise de imagens para avaliação da qualidade fisiológica das sementes produzidas por plantas de abóbora infectadas com *Squash mosaic virus* (SqMV)**

**ANÁLISE DE IMAGENS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES PRODUZIDAS POR PLANTAS DE ABÓBORA INFECTADAS COM *Squash mosaic virus* (SqMV).**

Nara Edreira Alencar<sup>(1)</sup>, Antônia dos Reis Figueira<sup>(1)</sup>, Heloisa Oliveira dos Santos<sup>(2)</sup>, Priscilla Sousa Geraldino Duarte<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Departamento de Fitopatologia, <sup>(2)</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. Email: narexx@gmail.com

## RESUMO

Algumas espécies olerícolas, como a abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv Caserta), comumente apresentam sementes com estruturas vazias e danificadas devido a problemas relacionados não só com a malformação da semente, mas também com a ocorrência de infecções por fitopatógenos. Estes danos, nesse tipo de semente, não são comumente detectados, devido à presença de tegumento espesso que impede a visualização das estruturas internas das mesmas. O objetivo, neste trabalho, foi verificar a possibilidade de utilização de análise de imagens para a avaliação dos danos internos em sementes produzidas por abobrinha de moita infectada com *Squash mosaic virus*, como medida auxiliar para seleção das sementes para posterior avaliação da taxa de transmissibilidade desse vírus por sementes avaliadas pelo método sorológico DAS-ELISA e molecular através da IC-RT-PCR. Para todos os testes avaliaram-se dois lotes de sementes produzidas em casa de vegetação (sadia e infectada). As análises das imagens radiográficas permitiram a divisão das sementes em três categorias: sementes vazias, cheias e danificadas. No teste de germinação, sementes infectadas e classificadas como cheias produziram mais plântulas anormais quando comparadas às sadias de mesma categoria. Quando da contaminação por vírus, observou-se redução no vigor das sementes. Os métodos DAS-ELISA e IC-RT-PCR foram eficientes na detecção do SqMV em sementes. A análise radiográfica e os outros testes utilizados revelaram-se como ferramentas úteis na avaliação da qualidade das sementes produzidas por plantas infectadas com o SqMV. A utilização dessas técnicas pode auxiliar na elaboração e na otimização de testes de transmissibilidade ou outros estudos envolvendo vírus que infectam sementes de abóbora.

Palavras-chave: *Curcubita pepo* cv Caserta. Análise de imagens. Viabilidade.

**IMAGES ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT OF SEEDS PRODUCED IN INFECTED PUMPKIN PLANTS WITH *Squash mosaic virus* (SqMV).**

**ABSTRACT**

Oleraceous species such as zucchini (*Cucurbita pepo* cv Caserta) usually present seeds with empty and damage structures due to problems correlated with the seed malformation in addition to the occurrence of infection by pathogens. These damages in this type of seeds aren't commonly detected due to its tissue density, which prevents the visualization of internal structures. The objective of this study was investigate the possibility of using the X-ray test, germination, tetrazolium, emergency and emergency speed the evaluation of internal damage in seeds produced by infected zucchini with *Squash mosaic virus*, as a measure to assist selection of seeds for further transmissibility seed evaluation rate of this virus by serological method DAS-ELISA and molecular IC-RT-PCR. For all tests, two lots of seeds produced in the greenhouse (healthy and infected) were evaluated. The analysis of the radiographic images allowed the separation of the seeds into three categories: filled, empty and damaged seeds. In the germination test, infected seeds classified as filled produced more abnormal seedlings compared to healthy seeds of the same category. Reduction in seed vigor was observed when seeds were infected. DAS-ELISA methods and IC-RT-PCR were efficient detecting SqMV in seeds. The difference between the percentage of seedlings that were positive for DAS-ELISA and IC-RT-PCR, was not significant. The radiographic analysis and other tests used have proved to be useful tools in assessing the quality of seed produced by plants infected with SqMV showing that the quality of infected seeds was always lower than healthy seeds. Thus, the use of these techniques can assist the design and optimization of transmission tests or other studies involving viruses that infect zucchini seeds.

**Keywords:** *Curcubita pepo* cv Caserta. Image analysis. Infected seeds. Viability.

## 1 INTRODUÇÃO

As cucurbitáceas, com cerca de 90 gêneros e mais de 800 espécies, constituem uma das mais importantes famílias de plantas cultivadas pelo homem. Dentre as espécies de maior expressão econômica merecem destaque a abóbora (*Cucurbita moschata*), a abobrinha (*Cucurbita pepo*), o melão (*Cucumis melo* L.), a melancia (*Citrullus vulgaris*) e o pepino (*Cucumis sativus* L.).

Para a produção comercial de frutos de abóbora, a utilização de sementes de alta qualidade é fator fundamental. A produção mundial de abóboras, em 2014, foi de 23,4 milhões de toneladas, cultivadas em 1,83 milhão de hectares, proporcionando produtividade média de 13,4 t/ha (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2015). Baixas produtividades, geralmente, estão associadas, dentre outros fatores, à utilização de lotes de sementes com baixa germinação, reduzido vigor e alta contaminação por patógenos, como, por exemplo, os vírus.

O primeiro relato de mosaico em abóbora causado por *Squash mosaic virus* (SqMV) foi feito em 1934, no estado norte-americano da Califórnia. Desde então, este vírus também foi relatado nas Américas do Norte e do Sul, na Europa e na Austrália (SHERF; MACNAB, 1986). No Brasil, em diversos levantamentos de viroses que infectam cucurbitáceas, não há incidência do SqMV ou esta apresenta-se muito baixa (MOURA et al., 2001; SILVEIRA, 2009). Entretanto, Alencar (2012), em um levantamento de viroses que infectam cucurbitáceas no estado do Tocantins, detectou que 56% das amostras analisadas estavam infectadas pelo SqMV.

O SqMV, descrito por Freitag (1941, 1956), Lindberg, Hall e Walker (1956), é membro do gênero *Comovirus*, da família *Secoviridae* e pode ser transmitido pelas sementes, por besouros crisomelídeos (*Diabrotica* spp. e *Acalymma* spp.) (FREITAG, 1956; LASTRA, 1968; SITTERLY, 1960;

STONER, 1963), por um besouro coccinelídeo (COHEN; NITZANY, 1963) e por cigarrinha (STONER, 1963), sendo capaz de infectar a maioria das plantas dos gêneros *Cucurbita* e *Cucumis* (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; NELSON; KNUHTSEN, 1973).

A transmissão de vírus por sementes ocorre em cerca de 18% das espécies de vírus descritas, por uma ou mais hospedeiras naturais e um terço dos vírus pode ser transmitido por pelo menos uma de suas hospedeiras (HULL, 2002). A transmissão do vírus da planta para semente é dependente de alguns fatores que se relacionam, principalmente, à espécie viral e à planta hospedeira (ALBRECHTSEN, 2006). O vírus do mosaico da abóbora pode ser transmitido por meio de sementes comerciais num percentual de até 10%, tornando o monitoramento da ocorrência de vírus em cucurbitáceas necessário, não só nos campos de produção, mas como forma de se evitar que as mesmas constituam hospedeiras alternativas de viroses, que também afetam economicamente culturas vizinhas (BLANCARD; LECOQ; PITRAT, 1996).

Na cultura da abóbora é frequente a ocorrência de sementes vazias e danificadas morfológicamente, sendo as últimas de difícil separação e identificação devido ao tipo de beneficiamento que sofrem, além da presença de tegumento duro, o qual impede a visualização do embrião sem danificar as sementes.

O teste de raios X não é um teste de viabilidade, porém, gera informações que auxiliam a avaliação da viabilidade do lote de sementes, revelando deficiências morfológicas que indicam o seu potencial. Esse teste tem sido bastante utilizado para fazer a avaliação das estruturas internas das sementes florestais e hortícolas, de forma rápida, precisa e não destrutiva, permitindo determinar o seu estágio de maturação, bem como a ocorrência de sementes vazias, pouco desenvolvidas e com danos mecânicos ou causados por insetos (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS, 1983; SIMAK;

BERGSTEN; HENRIKSSON, 1989). Sendo um teste não destrutivo, as sementes submetidas à análise podem ser posteriormente colocadas para germinar, permitindo o estabelecimento de uma correlação entre os danos mecânicos ou alterações observadas na parte interna das sementes e os prejuízos causados na germinação (CARVALHO et al., 2009; CÍCERO et al., 1998).

Apesar de esse teste ser bastante utilizado para avaliar a viabilidade das sementes, ele não tem sido empregado para analisar sementes produzidas por plantas infectadas pelo SqMV, com vistas a detectar os danos físicos e a sua capacidade de germinação e produção de plantas viáveis. Assim sendo, neste trabalho, as sementes produzidas por plantas de abóbora cv. Caserta, infectadas com SqMV, foram analisadas por raios X, para avaliar o potencial dessa técnica para indicar danos internos em sementes infectadas. Posteriormente, essas sementes foram plantadas e a taxa de germinação e as plantas obtidas foram avaliadas para estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos na análise por raios X e a viabilidade das mesmas na produção de plantas sadias.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG) e no Laboratório de Virologia do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) utilizando-se sementes de abóbora produzidas em plantas infectadas com *Squash mosaic virus* e plantas sadias.

O isolado utilizado no experimento foi o SqMV-LC2 proveniente de planta de melancia infectada naturalmente em campo de produção do município de Lagoa da Confusão, no estado do Tocantins e que faz parte da coleção de vírus do laboratório de virologia do DFP/UFLA.

A obtenção das plantas para a manutenção dos isolados e a produção de sementes se deu por meio de sementeiras em bandejas de polietileno, empregando-se o substrato comercial (Plantmax<sup>®</sup>), com posterior transplante para vasos, com capacidade de 2 kg (plantas para manutenção do isolado) e de 8 kg (para produção de sementes), contendo terra, areia e esterco, na proporção 2:2:1. A inoculação mecânica foi feita quando a planta apresentou o primeiro par de folhas definitivas, no estágio de dois terços de sua expansão.

Esta inoculação foi realizada com o extrato de folhas jovens, das plantas infectadas, obtido por maceração em almofariz de porcelana na presença de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1:10 (peso/volume). O extrato foi friccionado nas folhas das plantas previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício (CSi - Carborundum) e, em seguida, as plantas foram lavadas com água corrente. Plantas sadias inoculadas somente com a solução extratora serviram como controle.

Para a obtenção das sementes em casa de vegetação, polinizações diárias foram realizadas no período da manhã entre as 8 e 10 horas, coincidindo com o

período no qual se encontravam as flores abertas e os grãos de pólen viáveis. As flores masculinas foram destacadas das plantas e as anteras friccionadas nos estigmas das flores femininas, deixando aderida a maior quantidade de pólen possível sobre as mesmas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o término de seu ciclo (aproximadamente 40 dias), quando os frutos foram colhidos e as sementes obtidas foram lavadas, secadas e armazenadas em câmara fria até a realização dos testes.

As sementes dos dois lotes (sadio e infectado) foram submetidas ao teste de raios X, utilizando-se o aparelho Faxitron x-ray, modelo MX20, option DC-12, com intensidade de 18 kV, por 20 segundos. Foram analisadas 3.000 sementes de plantas sadias e a mesma quantidade de plantas infectadas, distribuídas em parcelas contendo cem sementes, arranjadas em lâminas transparentes, com cinco repetições.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x2), sendo três classes de sementes (cheia, danificada e vazia) e dois lotes de sementes (sadias e infectadas pelo SqMV).

Os dados previamente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011).

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa, a 105 °C, por 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se duas repetições de 50 sementes de cada lote/classe. Após esse período, as sementes foram levadas para dessecadores até o resfriamento das amostras e, em seguida, foi efetuado o peso seco das mesmas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O teste de germinação foi conduzido com 200 sementes de cada classe, sendo 10 repetições de 20 sementes. Juntamente com este teste foram também calculados o T50 e o índice de velocidade de emergência.

A semeadura foi feita entre papel tipo Germitest umedecido com água destilada, na proporção de  $2,5 \text{ mL.g}^{-1}$  de papel e em cada um as sementes foram dispostas de acordo com as imagens dos raios X. Logo depois, os rolos foram mantidos em câmara de germinação a temperatura constante de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e as avaliações foram efetuadas em duas contagens, sendo a primeira no quarto e a última no oitavo dia após a semeadura, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais e anormais.

As sementes não germinadas de cada tratamento do teste de germinação foram cortadas longitudinalmente, com uso de um bisturi. Elas foram colocadas em recipiente de plástico escuro, imerso em solução de sal de tetrazólio a 0,075%, durante 3,5 horas, em temperatura constante de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a coloração, a avaliação foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico comum, para a determinação da viabilidade (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011).

Para o teste de emergência, a semeadura foi realizada em bandejas de plástico de  $1.200 \text{ cm}^3$  contendo substrato para hortaliças (Plantmax<sup>®</sup>). As sementes foram dispostas na sequência das imagens dos raios X e em cada recipiente foram colocadas quatro repetições de 50 sementes, aleatoriamente.

Foram realizadas avaliações diárias a partir do início da emergência, computando-se o número de plântulas emersas. Foi considerada a porcentagem de plântulas normais aos 21 dias.

A velocidade de emergência foi realizada junto com o teste de emergência, anotando-se, diariamente e no mesmo horário, o número de plântulas emergidas até a completa estabilização do estande. O índice de

velocidade de emergência foi determinado de acordo com a expressão de Edmond e Drapala (1958):

$$VE = \frac{(N_1 E_1) + (N_2 E_2) + \dots + (N_n E_n)}{E_1 + E_2 + \dots + E_n}$$

em que:

VE = velocidade de emergência (em dias);

E1, E2, En = número de plantas normais emergidas na primeira, segunda e última contagem;

N1, N2, Nn = número de dias da primeira, segunda e última contagem, em relação à semeadura.

Após a germinação, as plântulas e toda a porção remanescente da casca e dos cotilédones foram maceradas e o extrato obtido foi submetido ao teste de diagnose DAS-ELISA (CLARK; ADAMS, 1977) com antissoros específicos disponíveis contra o SqMV produzidos pela empresa Bioreba e IC-RT-PCR (*Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction*). O protocolo do teste DAS-ELISA foi o recomendado pelo fabricante.

No teste de IC-RT-PCR, 50 µL de antissoro policlonal anti SqMV, da empresa Bioreba, na diluição de 1:1000, foram adicionados a microtubos de polipropileno com capacidade de 200 µL, da marca *Axygen*, e incubados, por 2 horas, a 35 °C. Em seguida, os microtubos foram lavados com PBS, por três vezes, após o que foram adicionados 50 µL do extrato das plântulas e de toda a porção remanescente da casca e dos cotilédones, fazendo-se nova incubação de um dia para o outro, a 4 °C (aproximadamente 12 horas). Após esta incubação, os microtubos foram lavados com tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered*

*saline* (PBS), por sete vezes, e empregados para montar a reação para a obtenção cDNA viral. Inicialmente, foram adicionados a esses microtubos 10,0 µL de água ultrapura tratada com DEPC e 1,0 µL do *primer reverse* SqMV- 2465 R: 5'GGAAAGAAGCCACAAC3', na concentração de 10 pM, e incubou-se, por 5 minutos, a 75 °C, transferindo-os imediatamente para o gelo. Em seguida, foram adicionados 0,4 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV), 4,0 µL do tampão da enzima, 1,0 µL de dNTP a 10 mM e água ultrapura tratada com DEPC, para completar o volume final de 20 µL. Os tubos foram incubados, a 42 °C, por 30 minutos, depois a 95 °C, por 5 minutos e transferidos para o gelo.

A reação de PCR foi montada para um volume de 25 µL, composto por 8,5 µL de água ultrapura previamente tratada com DEPC, 2,5 µL do tampão da enzima (5x), 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,25 µL de dNTP 10 mM; 0,75 µL de cada um dos *primers forward* (SqMV-1648 F:5'TTTGACGGCATGGTC3') e *reverse* a 10 pM; 0,125 µL GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 0,25 µL do cDNA. Para a amplificação do DNA foi feita uma desnaturação inicial, a 95 °C, por 2 minutos, seguida por 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 49 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 1 minuto, com alongação final, a 72 °C, por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,7%, contrastados com Gel Red (Invitrogen).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados do teste de raios X, as sementes foram classificadas em três classes: cheia, para sementes aparentemente normais (Figura 1A); danificadas, para sementes que apresentaram qualquer tipo de alteração, como, por exemplo, as observadas nas Figuras 1B e 1C, e vazias, para sementes sem conteúdo aparente (Figura 1D).

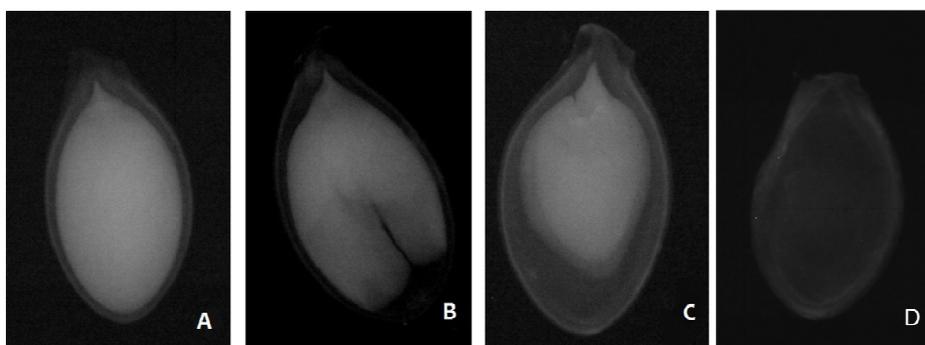


Figura 1 Imagens radiográficas de sementes de abóboras. (A) semente cheia, (B) semente danificada, (C) semente danificada, (D) semente vazia. UFLA, Lavras, MG, 2015

A porcentagem média de sementes em cada uma das categorias está discriminada na Tabela 1. A análise de variância indicou diferenças significativas entre as sementes classificadas em cada categoria, nos lotes de sementes produzidas por plantas infectadas e sadias, assim como para a interação das classes avaliadas ( $p < 0,05$ ) nos testes de germinação, emergência, velocidade de emergência, sorológico e molecular.

Tabela 1 Porcentagem média de sementes em cada uma das três classes, de acordo com a análise no teste de raios X

Classes	Porcentagem de sementes em cada classe	
	Sementes de plantas	Sementes de plantas
	sadias	infectadas
Cheia	93Aa	15B c
Danificada	5B b	49A a
Vazia	2B b	36A b
CV (%)	1,16	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas e minúsculas nas colunas, para cada tratamento e lote, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%

As sementes de abóbora, assim como a grande maioria de sementes de espécies cultivadas, são classificadas como ortodoxas e, dessa forma, apresentam diferentes níveis de tolerância à dessecação (BARBEDO; MARCOS-FILHO, 1998). O teor de água médio das sementes no momento dos testes foi de 8,3%, com variação máxima de 0,5%, de acordo com Carvalho et al. (2009). É válido ressaltar que essa baixa variação no teor de água é importante, uma vez que, quando ocorrem altos valores nessa variação, o processo de deterioração é acelerado, ocorrendo a formação de produtos que acarretam danos imediatos (MARCOS FILHO, 2005). Além disso, favorece a visualização das estruturas das sementes durante a análise radiográfica, pois, de acordo com Simak (1991), a umidade das sementes influencia a densidade ótica, ou seja, quanto menor a umidade das sementes, maior a densidade ótica, o que possibilita uma maior diferenciação das estruturas das sementes visualizadas nas radiografias (CARVALHO et al., 2009).

Os resultados dos testes de germinação, porcentagem de plântulas anormais, emergência, velocidade média de emergência, viabilidade (tetrazólio), T50 e índice de velocidade de emergência estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados dos testes de germinação, porcentagem de plântulas anormais, emergência, velocidade média de emergência, viabilidade, T50 e índice de velocidade de emergência

Classes	Tipos de sementes	
	Sadias	Danificadas
Germinação (%)		
Cheia	98aA	46aB
Danificada	74bA	12bB
Vazia	1cA	1cA
CV(%)	7,34	
Plântulas anormais (%)		
Cheia	1bB	34bA
Danificada	12aB	49aA
Vazia	1cA	0cA
CV(%)	6,38	
Emergência (%)		
Cheia	100aA	63aB
Danificada	69bA	25bB
Vazia	2cA	1cA
CV(%)	8,14	
Velocidade média de emergência (dias)		
Cheia	12aA	14aA
Danificada	14aA	16bB
Vazia	19bA	20cA
CV(%)	12,28	

Tabela 2, conclusão

Classes	Tipos de sementes	
	Sadias	Danificadas
Viabilidade – Tetrazólio (%)		
Cheia	1aA	98aB
Danificada	6bA	99aB
Vazia	--	--
CV(%)	11,75	
T50 (dias)		
Cheia	3aA	5aA
Danificada	5aB	8bB
Vazia	12bC	16cC
CV(%)	9,68	
Índice de velocidade de emergência		
Cheia	1,66aA	3,01aA
Danificada	2,53aB	4,32bB
Vazia	4,59bC	6,41cC
CV(%)	6,93	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, para cada tratamento e lote, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%

As porcentagens de plântulas normais provenientes das três classes de sementes, no teste de germinação (Tabela 2), foram significativamente menores nas sementes produzidas por plantas infectadas com o SqMV, quando foram comparadas com as produzidas por plantas sadias, indicando uma redução substancial na qualidade dessas sementes. As sementes da classe cheia provenientes das plantas sadias produziram mais que o dobro (98%) de plantas normais que as sementes da mesma classe produzidas por plantas infectadas (46%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Pupim et al. (2008), em sementes de embaúba. Carvalho et al. (2009), analisando sementes de abóbora,

também observaram que os lotes que tinham maior número de sementes cheias originaram maior número de plântulas normais.

Na classe danificada, a produção de plântulas normais nas sementes de plantas infectadas foi seis vezes menor e, na classe vazia, ambas produziram apenas uma planta normal. A produção de plântula normal em sementes classificadas como vazias pode ser explicada pelo fato de que, mesmo parecendo vazias, no teste de raios X a diferença de densidade pode não mostrar o cotilédone e o embrião que podem estar presentes, ficando estes mascarados na foto.

Esses resultados confirmam que a morfologia interna (Figura 1) pode ser um indicativo do potencial de viabilidade das sementes (COPELAND, 1976; MARCOS FILHO, 1994; SIMAK; BERGSTEN; HENRIKSSON, 1989). Resultados semelhantes, indicativos de que sementes danificadas prejudicam o desempenho de lotes de sementes, foram obtidos em trabalhos realizados com outras espécies olerícolas, como *Cucurbita moschata* cv. Brasileirinha (SILVA et al., 2014), *Cucurbita moschata* cv. Piramoita (CARVALHO et al., 2009) e pimentão (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011).

Considerando-se que o SqMV exerce efeito negativo em sementes infectadas, afetando a qualidade de lotes de sementes de abóbora, esse teste poderá auxiliar no descarte das sementes de má qualidade, proporcionando, portanto, uma melhoria na qualidade fisiológica dos lotes destinados ao plantio e multiplicação. Além disso, poderia também contribuir para a diminuição da introdução e disseminação do SqMV nos campos de produção de abóbora.

A porcentagem média de plântulas anormais no teste de germinação pode ser observada na Tabela 2. De modo geral, as sementes danificadas geraram uma quantidade maior de plântulas anormais que as sementes cheias, em todos os lotes analisados. As sementes provenientes de plantas que foram infectadas com o SqMV produziram um maior número de plântulas defeituosas,

quando comparadas com as produzidas por plantas sadias, indicando o efeito deletério do vírus, mesmo nas sementes da classe cheia. Apenas 12% das plântulas produzidas por sementes danificadas provenientes de plantas sadias apresentaram alguma deformação, enquanto 49% das plantas provenientes de sementes de plantas infectadas se mostraram anormais.

Sabe-se que plântulas anormais podem ser consequência de fatores genéticos, mas também de ambientes e práticas de manejo que acarretam a ausência, a atrofia ou as deformidades em seus órgãos vitais, como a radícula, o hipocótilo e a plúmula, que são difíceis ou impossíveis de serem superadas (MARTINS; CARVALHO, 1994).

No teste de emergência, os resultados obtidos foram semelhantes aos observados no teste de germinação, ou seja, as porcentagens de plântulas normais foram maiores na categoria cheia, e menores na categoria vazia. As sementes das classes cheia e danificada apresentaram um número ligeiramente maior do que os observados nos testes de germinação. Isso pode ter ocorrido devido às variações fisiológicas normais entre os diferentes lotes de sementes produzidas por plantas infectadas utilizadas nos diferentes testes. As porcentagens de plântulas normais produzidas pelas diferentes classes de sementes provenientes de plantas infectadas foram semelhantes às obtidas no teste de germinação.

Entretanto, nem sempre os resultados obtidos nos testes de germinação e emergência são semelhantes. Nascimento (1994), trabalhando com sementes de beterraba, tomate, cenoura e ervilha, notou que o teste de germinação não traduziu totalmente o potencial de desempenho de sementes.

A velocidade média de emergência das plântulas provenientes de sementes produzidas por plantas sadias foi semelhante para as sementes das classes cheia e danificada, em torno de 12 a 14 dias e maior para as da classe vazia, que demoraram 19 dias para emergir (Tabela 2). No caso das plântulas

provenientes das sementes de plantas infectadas com SqMV, houve uma diferença significativa entre as velocidades de emergência das três categorias, variando de 14 a 20 dias. A emergência das classes cheia e vazia foi semelhante em ambos os lotes de sementes avaliados.

Lakshmanan e Berke (1998) observaram que existem diferenças na velocidade de emergência de genótipos distintos, principalmente na ocorrência e intensidade de danos internos. Entretanto, neste trabalho, constatou-se que, mesmo tendo sido utilizadas sementes de um único genótipo de abóbora, houve uma variação na velocidade de emergência dos dois lotes, evidenciando, mais uma vez, o efeito de infecção virótica na qualidade das sementes. Durante o processo de produção, as informações sobre o potencial fisiológico das sementes são de importância fundamental para as decisões a serem tomadas.

Conjuntamente com o teste de germinação, muitas vezes utilizado como único parâmetro para determinação da qualidade de sementes, devem ser utilizados testes de vigor, compreendidos pelos testes de porcentagem e velocidade emergência, os quais refletem o comportamento das sementes em situações desfavoráveis ou, ainda, o grau de deterioração delas. Por esse motivo, normalmente apresentam melhor relação com a emergência de plântulas (NASCIMENTO, 1994).

O teste de tetrazólio, realizado para estimar a ocorrência de sementes mortas entre aquelas que não germinaram no respectivo teste, mostrou que praticamente todas as sementes (98%) não germinadas produzidas pelas plantas infectadas com SqMV estavam mortas. O mesmo não ocorreu com as sementes produzidas pelas plantas sadias (Tabela 2), mostrando que, mais uma vez, o SqMV influencia a viabilidade das sementes produzidas.

O tetrazólio é considerado um teste promissor, cuja principal vantagem é possibilitar a avaliação da viabilidade das sementes em período relativamente curto, podendo ser empregado para o estabelecimento de bases para a

comercialização, a determinação do ponto de colheita e a avaliação da viabilidade das sementes, durante o processamento e o período de armazenamento (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987).

Tanto o teste DAS-ELISA como o IC-RT-PCR, quando aplicados nas sementes germinadas, detectaram o SqMV em praticamente a totalidade das amostras. Ambos os testes foram bastante eficientes nessa detecção, tendo o IC-RT-PCR se mostrado ligeiramente mais sensível, detectando o vírus em 100% das amostras contra os 96% detectados pelo DAS-ELISA. Sabe-se, porém, que nem todas as plantas provenientes dessas sementes se tornam infectadas. Almeida (2013) observou que, apesar de todas as sementes provenientes de plantas infectadas testarem positivas para o SqMV, apenas 15% das plântulas geradas por elas se mostram infectadas.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam as afirmações de que a morfologia interna das sementes é um indicativo do seu potencial de viabilidade, além de apresentar correlação direta com a sanidade destas sementes. Dessa forma, a identificação e a posterior eliminação de sementes que apresentam malformação durante a produção e/ou problemas durante o processo de extração e beneficiamento, passíveis de serem visualizados nas radiografias, poderiam promover a melhoria da qualidade física, fisiológica e sanitária de lotes de sementes. A utilização da técnica de raios X mostrou-se eficiente na detecção de sementes malformadas e de sementes vazias de abóbora que afetam negativamente sua germinação. Dessa forma, pode ser empregada na otimização dos protocolos já utilizados em laboratórios de diagnose de vírus em semente, facilitando o processo de obtenção de resultados.

Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que a infecção do SqMV em plantas de abóbora induz à formação de sementes danificadas, interferindo na sua qualidade fisiológica, bem como no percentual de plântulas anormais, além de ser a principal causa de mortalidade das sementes.

#### **4 CONCLUSÕES**

A análise de imagens por raios X se revelou uma técnica bastante útil para avaliar a qualidade das sementes produzidas por plantas de abóbora infectadas por SqMV.

As sementes de abóbora provenientes de plantas infectadas com SqMV apresentam maior número de sementes danificadas e vazias que resultaram num menor vigor e num maior número e plântulas anormais.

Tanto a técnica DAS-ELISA como a IC-RT-PCR foram eficientes para a detecção do SqMV nas sementes.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHTSEN, S. E. **Testing methods for seed transmitted viruses: principles and protocols**. Oxford: CABL Publishing, 2006. 259 p.
- ALENCAR, N. E. et al. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 1, p. 32-37, Feb. 2012.
- ALMEIDA, J. E. M. de. **Deteção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora, pimentão e tomate**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigor testing handbook**. Washington: AOSA, 1983. 88 p. (Contribution, 32).
- BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.
- BARROS, R. G.; BARRIGOSI, J. A. F.; COSTA, J. L. S. Efeito do armazenamento na compatibilidade de fungicidas e inseticidas, associados ou não a um polímero no tratamento de sementes de feijão. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 459-465, 2005.
- BARRY, K. et al. Sequence analysis and detection using immuno capture-PCR of *Cymbidiummosaicvirus* and *Odontoglossum ringspot virus* in Hawaiian orchids. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 144, p. 179-186, 1996.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar y luchar**. Madri: Mundi-Prensa, 1996. 301 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agraria. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA, 2009. 365 p.
- CARVALHO, M. L. M. et al. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 221-227, 2009.
- CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M. Raios X na avaliação da qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, Brasília, v. 16, n. 1-3, p. 116-120, 2006.

CÍCERO, S. M. et al. Evaluation of mechanical damage in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 26, n. 3, p. 603-612, 1998.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COHEN, S.; NITZANY, F. E. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 193-196, 1963.

COPELAND, L. O. **Principles of seed science and technology**. Minneapolis: Burges Publishing Company, 1976. 369 p.

DELOUCHE, J. C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand soil and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 71, p. 428-434, 1958.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Productions Indices/Value of agricultural production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

FREITAG, J. H. Bettle transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 73-81, 1956.

FREITAG, J. H. Insect transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, p. 8, 1941. Abstract.

GAGLIARDI, B.; MARCOS FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 411-416, 2011.

GOLDBACH, R. W.; WELLINK, J. Comoviruses: molecular biology and replication. In: HARRISON, B. D.; MURANT, A. F. **The plant viruses: polyhedral virions and bipartite RNA genomes**. New York: Plenum, 1996. p. 35-76.

HAUDENSHIELD, J. S.; PALUKAITIS, P. Diversity among isolates of squash mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 10, p. 2331-2341, Oct. 1998.

HULL, R. **Matthews plant virology**. Great Britain: Academic Press, 2002. 1001 p.

LAKSHMANAN, V.; BERKE, T. G. Lack of primary seed dormancy in pepper (*Capsicum* spp.). **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Elmsford, v. 17, p. 72-75, 1998.

LASTRA, T. Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. **Plant Disease Reporter**, Washington, n. 53, p. 171-174, 1968.

LINDBERG, G. D.; HALL, D. H.; WALKER, J. C. A study of melon and squash mosaic viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 46, p. 489-495, 1956.

MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Editora da FEALQ, 2005. 495 p.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 3-35, 1994.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: Editora da FEALQ, 1987. 230 p.

MARTINS, C. C.; CARVALHO, N. M. Fontes de deterioração na produção de sementes de soja e respectivas anormalidades nas plântulas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 168-182, 1994.

MOURA, M. C. C. L. et al. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 90-92, 2001.

NASCIMENTO, W. M. A importância da qualidade de sementes olerícolas. **A lavoura**, Rio de Janeiro, p. 38-39, 1994.

NELSON, M. R.; KNUHTSEN, H. K. Squash mosaic virus variability: review and serological comparisons of six biotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 920-926, 1973.

PUPIM, T. L. et al. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropiapachystachyatréc*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 28-32, 2008.

SHERF, A. F.; MACNAB, A. A. **Vegetable diseases and their control**. New York: John Wiley & Sons, 1986. 736 p.

SILVA, P. P. et al. Image analysis to associate morphological and physiological characteristics in pumpkin seeds. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, v. 32, n. 2, p. 210-214, abr./jun. 2014.

SILVEIRA, L. M. da et al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2009.

SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end germination test by radiography. **Seed Science and Tecnology**, Zürich, v. 17, n. 2, p. 361-369, 1989.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A.G.; GOSLING, P.; WANG, B. S. P. **Tree and shrub seed handbook**. Zürich: ISTA, 1991. p. 1-28.

SITTERLY, W. R. A new vector of *Squash mosaic virus*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, p. 134-135, 1960.

STONER, W. N. A mosaic virus transmitted by beetles and a grasshopper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 890, 1963.

VIANA, F. M. P. et al. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na Região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 22 p. (Circular Técnica, 12).

WELLINK, J. et al. Family comoviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 691-701.