



NARA EDREIRA ALENCAR

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E
MOLECULAR DE VÍRUS EM ESPÉCIES DE
CUCURBITÁCEAS EM ÁREAS PRODUTORAS
DO TOCANTINS E SEUS EFEITOS EM
DIFERENTES HOSPEDEIRAS**

LAVRAS - MG

2011

NARA EDREIRA ALENCAR

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE VÍRUS EM
ESPÉCIES DE CUCURBITÁCEAS EM ÁREAS PRODUTORAS DO
TOCANTINS E SEUS EFEITOS EM DIFERENTES HOSPEDEIRAS**

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora

Dra. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Alencar, Nara Edreira.

Identificação sorológica e molecular de vírus em espécies de Cucurbitáceas em áreas produtoras do Tocantins e seus efeitos em diferentes hospedeiros / Nara Edreira Alencar. – Lavras: UFLA, 2011.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Squash mosaic vírus*. 2. *Zucchini yellow mosaic vírus*. 3. DAS-ELISA. 4. RT-PCR. 5. Sequenciamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6398

NARA EDREIRA ALENCAR

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE VÍRUS EM
ESPÉCIES DE CUCURBITÁCEAS EM ÁREAS PRODUTORAS DO
TOCANTINS E SEUS EFEITOS EM DIFERENTES HOSPEDEIRAS**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dra. Antônia dos Reis Figueira

Orientadora

LAVRAS - MG

2011

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.

Ao Rodolfo, pelos momentos difíceis que passamos juntos.

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 mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

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

Ao professor Dr. Ildon Rodrigues do Nascimento, da Universidade Federal do Tocantins, pela disponibilização dos isolados estudados.

À professora Dra. Neusa de Lima Nogueira e à bióloga Mônica Lanzoni Rossi (CENA/USP- Piracicaba, SP), pela disponibilidade e atenção nas análises envolvendo microscopia eletrônica de transmissão.

Aos professores Elliot Watanabe Kitajima e Francisco A. Ossami Tanaka (NAP/MEPA – ESALQ/USP-Piracicaba, SP), pela disponibilização do microscópio eletrônico de transmissão.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos, que prefiro não citar nomes para não correr o risco de me esquecer de alguém, mas que foram muito importantes na minha vida lavrense. A Gisele Louzada, pelo apoio desde o início da minha caminhada acadêmica e à Denise Balani, pelo apoio incondicional nas últimas semanas. Vocês são AS PESSOAS.

Aos colegas da virologia e afins, Mauricio, João, José Romário, Douglas Cubano, Suellen, Priscilla, Sílvia, Carzim, Luciana Cassetari, Jacy, Elisângela

(Glória), Vlad, Luciana Godinho, Wellington e Anderson, 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.

Ao meu namorado, Rodolfo, pelo amor, pela paciência nas horas difíceis e pelo incentivo de cada dia.

"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

As cucurbitáceas podem ser afetadas por várias doenças, dentre elas as viróticas, as quais podem provocar perdas de até 100% da produção. As plantas infectadas por vírus apresentam 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. Devido às suas condições climáticas, favoráveis ao aparecimento das viroses, o estado do Tocantins tem apresentado grande incidência dessas doenças no campo. Contudo, não existem estudos direcionados à sua caracterização e identificação, dificultando, assim, o desenvolvimento de programas de melhoramento visando à resistência a doenças em abóboras. Nesse contexto, este trabalho foi realizado com a finalidade de identificar sorologicamente e molecularmente isolados de abóbora e melancia, coletados naquele estado, em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal do Tocantins (UFT). A identificação desses isolados será de fundamental importância para fornecer subsídios aos programas de melhoramento da UFT, bem como estabelecer medidas de controle para as viroses de cucurbitáceas no campo. Foram coletadas 25 amostras de plantas de cucurbitáceas que apresentavam sintomas característicos de viroses, em diversos municípios de Tocantins. Estes isolados foram inoculados em diferentes espécies, como abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta'), abóbora-rasteira (*C. moschata* 'Menina Rajada'), melancia (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet'), melão (*Cucumis melo*), mamão (*Carica papaya*), pepino (*Cucumis sativus*), *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa*, para a identificação biológica. Além disso, foi realizado teste de diagnose DAS-ELISA com antíseros específicos, diagnose por meio de RT-PCR e sequenciamento genômico de fragmentos da região do gene do capsídeo. Quatorze dos 25 isolados estudados, ou seja, 56%, foram identificados como *Squash mosaic virus* (SqMV), tendo sete deles sido provenientes de abóbora 'Caserta' e sete de melancia. Os demais isolados foram identificados como *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Ao contrário do que ocorre em outras regiões brasileiras, o SqMV foi o vírus com maior incidência nas amostras. Os isolados de SqMV, ao infectarem plantas de melancia, causaram mosaico e distorção foliar, diferentemente do que tem sido descrito por diversos autores, em outras partes do Brasil. A análise da capa protéica dos 14 isolados de SqMV mostraram uma identidade de nucleotídeos entre eles que variou de 86 a 100% e, entre eles e os seis isolados disponíveis no GenBank de 86 a 88%. A análise de aminoácidos dessa região, mostrou identidade de 95 a 100% entre eles e 91 a 97% entre eles e os isolados estrangeiros. O isolado que apresentou maior variabilidade foi o de Porto Nacional, denominado de PN2. O segmento da capa protéica do ZYMV, analisada, apresentou uma

identidade de 100% de aminoácidos entre os isolados brasileiros e entre esses e os estrangeiros empregados para comparação, mostrando que essa região é altamente conservada e inadequada para análise de variabilidade e filogenia.

Palavras-chave: *Squash mosaic vírus*. *Zucchini yellow mosaic virus*. DAS-ELISA. RT-PCR. Sequenciamento.

ABSTRACT

Cucurbit crops may be affected by several virus diseases, which might cause up to 100% of yield losses. Plants infected with viruses show mosaic, leaf reduction and deformation in leaves and fruits, and the symptoms depend on the infected hosts, becoming more severe with the occurrence of mixed infections. Due to its environmental conditions, favorable to the emergence of viruses, the state of Tocantins has shown a high incidence of virus diseases in the field. However, no studies aimed at identifying and characterizing those diseases have been carried out, making it difficult to develop breeding programs approaching disease resistance in pumpkins. Therefore, the main objective of this study was to identify and characterize, serological and molecularly, the pumpkin and watermelon virus isolates collected in the state of Tocantins, in collaboration with researchers from the University of Tocantins (UFT). The identification of those isolates will be relevant to support and improve UFT breeding programs, and establish control measures for virus diseases of cucurbit crops in the field. Twenty five samples were collected from cucurbit plants showing characteristic symptoms of viruses in different regions of Tocantins. Those isolates were inoculated in different species: zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta'), trailing pumpkin (*C. moschata* 'Menina Rajada'), watermelon (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet'), melon (*Cucumis melo*), papaya (*Carica papaya*), cucumber (*Cucumis sativus*), *Chenopodium amaranticolor* and *Chenopodium quinoa* for biological identification. In addition, DAS-ELISA, using specific antisera and RT-PCR were carried out for virus diagnosis. Genomic fragments, from coat protein region, were amplified, sequenced and analyzed. Fourteen, or 56%, of the 25 isolates studied, were identified as *Squash mosaic virus* (SqMV). Seven of them were detected in Caserta squash and another seven in watermelon. The remaining isolates were identified as *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Contrary to what occurs in other Brazilian regions, SqMV presented the higher incidence in the analyzed samples. When SqMV isolates infected watermelon plants, they caused mosaic and leaf distortion, unlike what has been described by several authors in other parts of Brazil. The coat protein nucleotide analysis of the 14 SqMV isolates showed an identity among them that varied from 86% to 100%, and the identity between them and the isolates of the GenBank was from 86% to 88%. The aminoacid analysis of the same region showed an identity from 95% to 100%. The identity between them and the isolates of the GenBank varied from 91% to 97%. The virus isolate that presented the higher variability was the one from Porto Nacional, named PN2. The coat protein

fragment of ZYMV analyzed, showed an aminoacid identity of 100% among the Brazilian isolates and also among the virus isolates from the GenBank. It showed that this region is highly conserved, therefore inappropriate for variability and phylogeny analysis.

Keywords: *Squash mosaic virus*. *Zucchini yellow mosaic virus*. DAS-ELISA. RT-PCR. Sequencing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	A cultura da melancia	15
2.2	A cultura das abóboras	17
2.3	Viroses que afetam as cucurbitáceas	19
2.3.1	<i>Squash mosaic virus</i>	19
2.3.2	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	21
2.4	Técnicas de diagnose	23
2.5	Métodos de controle	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Identificação dos isolados.....	28
3.1.1	Coleta e preservação das amostras	28
3.1.2	Diagnose e estudo dos vírus.....	30
3.1.3	Testes sorológicos	31
3.1.4	RT-PCR.....	32
3.1.5	Extração de RNA total	32
3.1.6	Síntese do cDNA	33
3.1.7	Reação de amplificação (PCR).....	34
3.1.8	Sequenciamento do fragmento genômico viral amplificado	34
3.1.9	Microscopia eletrônica de transmissão.....	35
3.2	Efeito do <i>squash mosaic virus</i> em diferentes hospedeiras.....	35
3.2.1	Plantas teste.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Diagnose dos vírus.....	36
4.1.1	Testes sorológicos	36
4.1.2	Microscopia eletrônica	37
4.1.3	RT-PCR.....	38
4.2	Sintomas induzidos pelos isolados	40
4.2.1	Avaliação da severidade dos sintomas induzidos em abóbora cv. Caserta.....	40
4.2.2	Efeito do <i>Squash mosaic virus</i> em diferentes hospedeiras.....	42
4.2.3	Efeito do <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> em diversas hospedeiras	45
4.3	Análise dos fragmentos genômicos amplificados.....	47
4.3.1	SqMV.....	47
4.3.2	ZYMV.....	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Entre as famílias botânicas utilizadas para a produção de alimentos, as cucurbitáceas destacam-se pela importância econômica e social, desde a geração de empregos diretos e indiretos, ligados à necessidade de grande número de mão de obra do cultivo, até a comercialização. O cultivo de cucurbitáceas é praticado tanto em pequenas propriedades, em regime de agricultura familiar, quanto em grandes propriedades.

A família *Cucurbitaceae* é constituída por aproximadamente 118 gêneros e cerca de 825 espécies. As espécies com maior expressão econômica no Brasil são as pertencentes aos gêneros *Citrullus* (melancia), *Cucumis* (pepino, maxixe e melão), *Cucurbita* (moranga, abóbora e abobrinha), *Lagenaria* (cabaça-caxi) e *Sechium* (chuchu).

As cucurbitáceas podem ser afetadas por várias doenças, dentre elas as viróticas, que podem levar a perdas de até 100% da sua produção. As 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 et al., 2003). Sabe-se que a ocorrência de viroses depende de inúmeros fatores, como a época do ano, o local de plantio, a presença e a preferência de vetores, dentre outros. Dessa forma, o monitoramento da ocorrência de vírus em cucurbitáceas torna-se necessário, não só em campos de produção, mas como forma de se evitar que as mesmas constituam hospedeiras alternativas de viroses, que também afetam economicamente culturas vizinhas.

Devido às suas condições climáticas, favoráveis às viroses, o estado do Tocantins tem apresentado uma grande incidência dessas doenças no campo. Contudo, não existem estudos direcionados à sua caracterização e identificação, dificultando, assim, o desenvolvimento de programas de melhoramento visando

à resistência a doenças em cucurbitáceas. Assim sendo, este trabalho teve como finalidade identificar sorológica e molecularmente isolados de abóbora e melancia coletados nesse estado, em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Essa é a primeira identificação e caracterização de viroses que ocorrem em cucurbitáceas, em Tocantins, e deverá se constituir em um importante subsídio para os programas de melhoramento desenvolvidos na UFT, bem como embasar medidas de controle para as viroses de cucurbitáceas no campo naquela região.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da melancia

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) pertence à família das Cucurbitáceas, com origem no continente africano. É uma planta anual, de crescimento rasteiro, com várias ramificações que podem alcançar até cinco metros de comprimento. Cultivada em praticamente todo o mundo, a produção total é de, aproximadamente, 23 milhões de toneladas de frutos. De acordo com a Diretoria de Fruticultura, da Secretaria da Agricultura da Pecuária e do Desenvolvimento Agrário (SEAGRO, 2011), a melancia tocaninense está conquistando outros estados e também países do Mercosul. Na safra retrasada, foram produzidas mais de 50 mil toneladas de melancia. Em 2010, essa produção quase dobrou para cerca de 100 mil toneladas (CENTRO ESTADUAL DE ABASTECIMENTO S/A-CEASA-TO, 2011).

Os frutos da melancia são utilizados tanto na alimentação humana como animal (MIRANDA et al., 1997). Em algumas regiões, as sementes são consumidas tostadas e dessas pode-se extrair um óleo de boa qualidade, cujo conteúdo varia de 20% a 45%. A casca do fruto pode ser utilizada na fabricação de doce, bem como na alimentação de alguns animais (MIRANDA et al., 1997).

Em janeiro de 2011, a produção de melancia no Tocantins chegou a atingir a marca de 90 toneladas (CENTRO ESTADUAL DE ABASTECIMENTO S/A-CEASA -TO, 2011).

Cerca de 89% das melancias produzidas no estado de Tocantins são provenientes do município de Lagoa da Confusão e do Projeto Rio Formoso, no município de Formoso do Araguaia, cujo sistema de irrigação possui quase 28 mil hectares de várzea. Este é o maior projeto de irrigação contínua do mundo.

O balanço anual do Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2007) mostrou que, no ano de 2007, uma área equivalente a pouco mais de 90 mil hectares foi dedicada ao cultivo da melancia, resultando na produção de um volume de quase 2,1 milhões de toneladas da fruta. Deste montante, 33 mil toneladas foram exportadas. Já no ano seguinte, esse valor subiu para 43 mil toneladas.

Em termos de Brasil, no ano de 2007, estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) posicionaram as macrorregiões sul e nordeste como as principais produtoras de melancia, com, respectivamente, 34,34% e 30,10% do total da produção nacional dessa fruta. No nordeste brasileiro, a melancia é cultivada tanto em agricultura dependente de chuva quanto em cultivos irrigados. Naquela época, a região conhecida como submédio do São Francisco contava com uma área cultivada de 4.500 ha, despontando como o principal pólo de produção. Nesta região, o cultivo da melancia é realizado basicamente por produtores familiares assentados nos perímetros públicos de irrigação ou nas margens do rio São Francisco e seus afluentes. Em sua maioria, são agricultores pouco capitalizados, que cultivam a melancia durante o ano todo e destinam a produção totalmente para o mercado interno.

Na Bahia, o estado da região nordeste que mais produz melancia, a safra do ano de 2007 alcançou 244.895 t, em uma área de 15.220 ha. Dentro do estado, regiões, como o Vale do Rio São Francisco, o oeste baiano e o extremo sul, destacaram-se como principais regiões produtoras. As áreas irrigadas do Vale do Rio São Francisco são responsáveis por cerca de um quarto do total produzido nos estados da Bahia e Pernambuco. Grande parte desta produção é comercializada no Mercado do Produtor de Juazeiro, sendo daí distribuída para várias regiões do Brasil (IBRAF, 2007)

A região sul do país também se destaca na produção da melancia. Segundo a Empresa Brasileira de Extensão Rural (EMATER/RS, 2010), a partir

do mês de agosto de 2010 foram plantados, em Triunfo, cerca de 1.800 hectares da fruta. A colheita teve início em novembro, com produtividade média de 30 toneladas por hectare, o que rendeu à cidade o título de maior produtora do estado. Até o fim do mês de fevereiro, quando está previsto o término da colheita, espera-se que a produtividade se mantenha em alta (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE EXTENSÃO RURAL-ASBRAER, 2010).

2.2 A cultura das abóboras

As abóboras do gênero *Cucurbita* (*C. moschata*), morangas (*C. maxima*) e abobrinhas (*C. pepo*), são nativas das Américas e faziam parte da alimentação da civilização Olmeca, sendo incorporadas depois pelas civilizações Asteca, Inca e Maia. Registros arqueológicos relatam que há a associação dessas espécies ao homem há cerca de 10.000 anos. A diversidade genética de *Cucurbita* existente nas Américas é enorme, sendo encontrados em diversas cores, texturas, formas, tamanhos e sabores. No Brasil, a diversidade dessas espécies pode ser representada pelas inúmeras variedades tradicionais cultivadas pelos indígenas, quilombolas e agricultores de base familiar. Dessa forma, estes dados reforçam a importância dos recursos genéticos do gênero *Cucurbita* para a agricultura e para a segurança alimentar (FERREIRA, 2007).

As abóboras e as morangas são plantas que podem produzir ramos rasteiras, com cerca de 6 m de comprimento. Essas plantas formam estruturas para fixação, denominadas gavinhas, e as ramos, em contato com o solo, emitem raízes que auxiliam em sua fixação. As folhas grandes são de coloração verde-escura, geralmente com manchas prateadas nas abóboras e sem essas manchas em morangas. Outro aspecto a ser considerado é que a abóbora produz flores masculinas e femininas separadas na mesma planta, necessitando, assim, de um agente polinizador. As condições climáticas para seu bom desenvolvimento

vegetativo e frutificação incluem temperatura amena a quente e boa disponibilidade de água durante todo o ciclo (KUROZAWA, 2004).

O Brasil é um grande produtor e consumidor de abóboras, sejam elas verdes ou maduras. As abóboras e as morangas são cultivadas em todas as regiões brasileiras, enquanto os híbridos interespecíficos e a abobrinha-italiana têm a produção mais expressiva na região sudeste do Brasil. A produtividade de abóbora varia de 10 a 13 toneladas por hectare, quando se colhem frutos verdes; já para frutos maduros, de 12 a 20 toneladas por hectare e de 8 a 15 toneladas por hectare de frutos dos híbridos (KUROZAWA, 2004).

O estado de São Paulo é o principal produtor nacional de abóbora, sendo responsável, no último ano, por 37% da safra produzida no país. A cidade de Itapeva costumava se destacar por sua produção, porém, devido a um extenso período de seca na região, a área plantada e, conseqüentemente, a produção, caíram drasticamente. Em 2010, o município colheu pouco mais de 5 mil toneladas, o que representa 80% a menos que na safra passada (CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS-CPTEC, 2010).

Os frutos e as sementes da abóbora têm valor comercial já conhecido e são vendidos em forma de doces e petiscos, em mercados e feiras. Já as folhas têm despertado grande interesse de pesquisadores na caracterização de seus compostos nutricionais e antinutricionais, para averiguação de seu possível consumo, e também como ingrediente inserido em alguns alimentos industrializados e/ou em receitas caseiras. Muitas das folhas já são utilizadas por famílias da área rural que possuem as plantações (EL-SOUKKARY, 2001; GUPTA et al., 2005; NEPA, 2006).

2.3 Viroses que afetam as cucurbitáceas

Na natureza, foram encontrados 46 vírus e um viróide infectando plantas da família das Cucurbitáceas (MALLOR, 2003). Dentre eles, os já encontrados e relatados em regiões brasileiras são: a) membros da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: vírus da mancha-anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* - PRSV), estirpe W (PRSV - W) e estirpe P (PRSV-P), vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* - WMV) e vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV); b) na família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*: o *Zucchini lethal chlorosis virus* - ZLCV (BEZERRA et al., 1999; POZZER et al., 1996); c) na família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*: vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV); d) na família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*: vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus* - SqMV) (MOURA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2000); e) vírus do amarelão, cuja etiologia ainda não está definida, possivelmente um novo vírus da família *Flexiviridae*, gênero *Carlavirus* (NAGATA et al., 2003; 2005) ou da família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus* (LIMA et al., 2002).

Dentre estes vírus, destacam-se o vírus do mosaico-da-abóbora (*Squash mosaic virus* - SqMV) e o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV).

2.3.1 *Squash mosaic virus*

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, ocorre com mais

frequência no Distrito Federal e nas regiões norte e nordeste, incluindo os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte (VIANA et al., 2001)

O SqMV, descrito por Freitag (1941, 1956), Lindberg, Hall e Walker (1956), é membro do gênero *Comovirus*, da família *Comoviridae* 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 no gênero *Cucurbita* e *Cucumis* (HAUDENSHIELD, PALUKAITIS, 1998; NELSON, KNUHTSEN, 1973). Assim como outros *Comovirus*, o SqMV tem um genoma de RNA bipartido senso positivo com RNA1 e RNA2, os quais estão separadamente encapsidados em partículas isométricas de 28 nm de diâmetro (Figura 1).

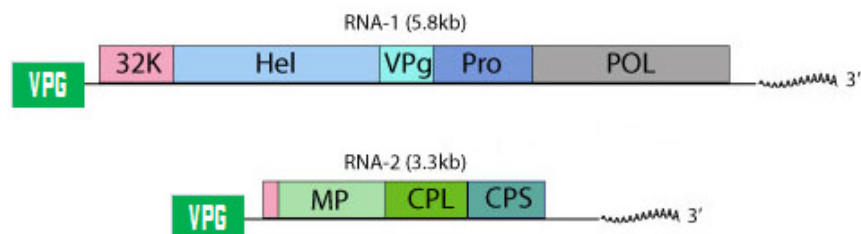


Figura 1 Estrutura do genoma do *Squash mosaic virus* (SqMV). Adaptado de http://expasy.org/viralzone/all_by_species/298.html

Os sintomas produzidos pelo SqMV em abobrinha (*Cucurbita pepo*) são mosaico severo e deformações foliares e, em *Cucumis sativus*, são clorose sistêmica nas nervuras e manchas amareladas (RAMOS et al., 2003).

O vírus do mosaico da abóbora pode ser transmitido por meio de sementes comerciais num percentual de até 10% (BLANCARD et al., 1996). Até há pouco tempo ausente nas plantações de melão do nordeste, foi recentemente

introduzido no estado do Rio Grande do Norte, provavelmente por intermédio de sementes comerciais importadas (FLORINDO, LIMA, 1993).

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).

2.3.2 Zucchini yellow mosaic virus

O ZYMV é classificado taxonomicamente como uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*. Suas partículas são alongadas, flexuosas, medindo aproximadamente 760-800 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro. O genoma (Figura 2) é constituído por uma molécula de RNA de fita simples senso positivo (LISA, 1981; LECOQ, 1984; PURCIFULL ET AL., 1984; DESBIEZ, LECOQ, 1997).

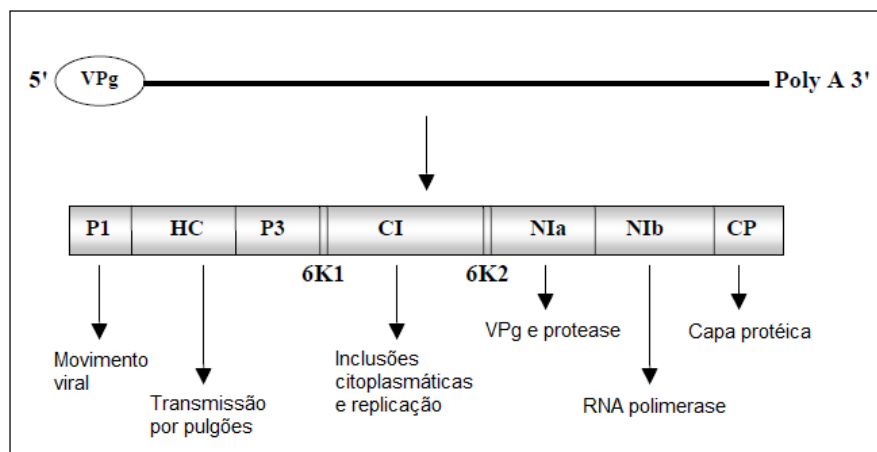


Figura 2 Estrutura do genoma do *Zucchini yellow mosaic virus*, poliproteína codificada pelo genoma e principais funções de algumas das proteínas (Mallor, 2003)

Na natureza este vírus é transmitido por diversas espécies de afídeos, sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente ou estiletar. Perring et al. (1992) relataram 9 espécies de afídeos vetores deste vírus, dentre elas as espécies de *Aphis gossypii* Glover, que representa uma praga para algumas cucurbitáceas (GALLO et al., 2002) e *Myzus persicae* Sulzer, considerada uma das espécies mais eficientes na transmissão de vírus de plantas.

Os relatos sobre a transmissão do ZYMV pelas sementes são conflitantes. Greber; Perley e Herrington (1988) e Schrijnwerkers; Huijberts e Bos (1991) demonstraram que o ZYMV foi transmitido por sementes de *C. pepo*, com taxas de 1,0% e 0,047%, respectivamente. Schrijnwerkers; Huijberts e Bos (1991) sugeriram que o vírus estava presente apenas externamente nas sementes. Ausência de transmissão pela semente foi relatada em testes com *Cucurbita maxima* Duch. Ex Lam., *C. moschata* Duch., *Cucumis melo* L. e *C. sativus* L. (DESBIEZ, LECOQ, 1997).

O ZYMV causa doença do tipo mosaico amarelo em diversas espécies da família *Cucurbitaceae*, induzindo a má formação foliar, além da deformação e

escurecimento dos frutos (LECOQ, LEMAIRE, 1991; LISA; LECOQ, 1984). As plantas infectadas, especialmente de abobrinha-de-moita, cessam a produção de frutos uma a duas semanas após a infecção, resultando em perdas significativas na produção. Quanto mais cedo ocorrer a infecção, maiores serão essas perdas.

O primeiro registro da ocorrência do ZYMV na América do Sul foi feito em 1992, nos estados de São Paulo e Santa Catarina (VEGA et al., 1992; CANER et al., 1992). Em 1996, o vírus foi constatado causando sérios problemas em abóbora, em Salta, na Argentina (GRACIA, 2000). Em seguida, o ZYMV foi identificado nos estados do Rio Grande do Norte (LIMA et al., 1996) e do Ceará (LIMA et al., 1997). A identificação do ZYMV no nordeste brasileiro (LIMA et. al., 1996) e sua expansão constatada por Oliveira et. al. (2000) são motivos de preocupação para produtores, em razão de elevados prejuízos em várias outras partes do mundo (PURCIFULL et. al., 1984b).

2.4 Técnicas de diagnose

Diferentes técnicas podem ser empregadas para a detecção de fitovírus, sendo classificadas como técnicas sorológicas, biológicas e moleculares. Tratando-se de técnicas sorológicas, o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é o método mais utilizado, devido à sua praticidade e rapidez, podendo ser ainda realizado em grande escala. O método apresenta também boa sensibilidade na diagnose de fitovírus (BERIAN, 1985; DANIELS, 1994; FIGUEIRA, 2000). Apesar da eficiência dessa técnica para grande parte dos vírus, existem ainda algumas limitações, como a incapacidade de se detectar baixas concentrações de vírus no tecido vegetal. Já os viróides também não podem ser detectados por ELISA, pois a técnica é baseada na reação de anticorpos com a capa protéica, que é ausente neste caso (ALMEIDA, 2001).

Os métodos biológicos para a diagnose de fitoviroses são simples e relativamente fáceis de serem executados. Para a sua realização, necessita-se, basicamente, de uma estrutura para o crescimento das plantas que serão utilizadas e de espécies vegetais capazes de demonstrar sintomas que servirão de subsídio para a tomada de decisão com relação à diagnose realizada. As grandes limitações desse método são o tempo gasto para o crescimento das plantas e o aparecimento dos sintomas e a imprecisão dos resultados, visto que estes nem sempre são conclusivos, necessitando de confirmação por sorologia ou outras técnicas moleculares, como a RT-PCR.

Mediante as limitações das técnicas citadas e com a facilidade atual de uso e eficiência das técnicas moleculares na diagnose de vírus, o seu uso tem sido o mais indicado para uma diagnose sensível, precisa e rápida. Embora as técnicas clássicas de PCR e RT-PCR para detecção de vírus também apresentem algumas limitações, quando comparadas a técnicas mais modernas e sofisticadas (ENGEL et al., 2009), 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 (RASMUSSEN, WULF, 1991; HENSON, FRENCH, 1993; PROSEN et al., 1993; FIRRAO, LOCCI, 1994; SCHAAD et al., 1995; FIGUEIRA et al., 1997; LOUWS et al., 1999; WANG et al., 1999; MCSPADDEN, GARDENER, 2001; SCHAAD et al, 2001; BOONHAM et al., 2002; GLAIS et al.,2005; MONTERO-ASTÚA et al., 2008; 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 (HADIDI et al., 1993; BRIOSO et al., 1996; FIGUEIRA et al., 1997; KROTH, 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 (BORJA, PONZ, 1992; FIGUEIRA et al., 1997; SINGH, SINGH, 1998; SING, NIE, 2001; BOONHAM, 2002; 2003; LORENZEN et al., 2006; 2008).

Em testes realizados por Figueira et al. (1997), visando à comparação de três técnicas para detecção de estirpes de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), a saber, TAS-ELISA, hibridização com cDNA e RT-PCR, os autores concluíram que a PCR foi a mais sensível na detecção de estirpes deste vírus, sendo capaz de detectar quantidades na ordem de 0,1pg de vírus em preparações purificadas e 0,5pg em tecidos vegetais infectados. Teoricamente, é possível fazer a detecção de quantidades de vírus na ordem de 1 fg, de acordo com Hadidi et al. (1993), por meio da utilização desta técnica.

O uso na identificação de estirpes proximamente relacionadas também tem sido bastante popular. Boonham et al. (2002) e Lorenzen (2008) realizaram trabalhos nos quais foi possível separar estirpes de *Potato virus Y* (PVY) e, ainda, variantes das estirpes, como no caso da estirpe PVY^{NTN} e obtiveram sucesso para a separação de isolados americanos de PVY^{NTN}. Em trabalhos recentes, foi mostrada, ainda, a eficiência da técnica de PCR no diagnóstico, tanto em plantas, demonstrando os sintomas da infecção viral, quanto em plantas ainda assintomáticas (ABARSHI et al, 2009).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta de extrema importância para a virologia, auxiliando no diagnóstico e na caracterização dos vírus, além de possibilitar estudos de interação entre espécies de vírus, da concentração de partículas virais no tecido infectado e de aspectos ultraestruturais. Além disso, a MET, aliada à sorologia, tem sido utilizada no diagnóstico de fitovírus, indexação de materiais vegetais e em estudos de

interação vírus-hospedeiro e vírus-vetor (HALL, 1964; ADAM et al., 1987; MILNE, LUISIONI, 1977; MIYAI et al., 2001).

2.5 Métodos de controle

Como para as demais doenças viróticas, o controle de viroses em cucurbitáceas se resume na produção de mudas sadias, sob telado à prova de vetores, eliminação de plantas hospedeiras dos vírus e dos vetores nas proximidades do local de produção, aplicação de inseticidas para reduzir o inseto vetor, quando da obtenção de mudas e/ou no início do desenvolvimento da planta em campo e também a pré-imunização com estirpes fracas (REZENDE, 1999; BONILHA, 2009).

Em várias espécies de cucurbitáceas, o uso da pré-imunização demonstrou-se eficiente no controle do mosaico causado por PRSV-W em abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) (REZENDE, PACHECO, 1998), abóbora-rasteira (*C. moschata* (Duch. ex Lam) Duch ex Poir cv. Menina Brasileira) (REZENDE et al., 1999) e em abóbora híbrida (*C. maxima* Duch. ex Lam x *C. moschata*) do tipo tetsukabuto (DIAS, REZENDE, 2000). Dessa forma, o uso dessa técnica surge como possível alternativa para o controle de viroses dessa família.

Em outros estudos foi demonstrado também que a pré-imunização de cucurbitáceas para o controle do mosaico amarelo (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) também tem se mostrado eficiente em abobrinha-de-moita, na França, em Taiwan e na Inglaterra (LECOQ et al., 1991; WANG et al., 1991; WALKEY et al., 1992) e em melão, na Califórnia, EUA (PERRING et al., 1995).

Todas essas medidas, entretanto, são consideradas paliativas e nem sempre alcançam a eficiência esperada. A medida de controle mais desejável seria a utilização de espécies que possuem resistência genética (da forma

tradicional ou por meio de transgenia), por ser considerada a melhor e mais eficiente forma de controle de viroses.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de diagnosticar, por meio do teste de ELISA e RT-PCR, isolados virais de abóbora e melancia coletados por docentes da Universidade Federal do Tocantins (UFT) e estudar a sua variabilidade genética por meio da análise do segmento genômico desses vírus, referente à região da capa protéica. A identificação destes isolados tem o propósito de oferecer subsídios para os programas de melhoramento de cucurbitáceas da UFT. Além disso, objetivou-se verificar o efeito do *Squash mosaic virus* em diferentes hospedeiras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nas dependências do Laboratório de Virologia Molecular, no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais e nas casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Identificação dos isolados

3.1.1 Coleta e preservação das amostras

Vinte e cinco amostras foliares de cucurbitáceas, sendo quatorze de abóbora ‘Caserta’, uma de ‘Kabutiá’ e dez de melancia, foram coletadas de áreas produtoras do Rio Formoso (Formoso do Araguaia), Lagoa da Confusão, Porto Nacional e Gurupí, no estado do Tocantins (Tabela 1). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados com relação à data da coleta, cultivar, região onde foi coletada e nome do responsável pela coleta, e imediatamente transferidas para o DFP/UFLA e/ou armazenadas em refrigerador.

Esses isolados foram mantidos em folhas de abóbora ‘Caserta’, desidratadas e/ou a -80°C , no DFP/UFLA.

Tabela 1 Identificação dos isolados coletados em diferentes locais do estado do Tocantins, infectando plantas de abóbora e melancia

Isolado	Local de coleta	Espécie infectada
PTY1	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY2	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY3	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY4	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY5	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY6	Campo UFT Gurupi	Abóbora Caserta
PTY7	Campo UFT Gurupi	Kabotιά
PTY9	Campo UFT Gurupi	Abóbora Caserta
PTY10	Campo UFT Gurupi	Melancia
PTY11	Campo UFT Gurupi	Melancia
PTY12	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY13	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY14	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY15	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY16	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY17	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY18	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
FA1	Formoso do Araguaia	Melancia
GR1	Gurupi	Melancia
GR2	Gurupi	Melancia
LC1	Lagoa da Confusão	Melancia
LC2	Lagoa da Confusão	Melancia
LC3	Lagoa da Confusão	Melancia
PN1	Porto Nacional	Melancia
PN2	Porto Nacional	Melancia

3.1.2 Diagnose e estudo dos vírus

Os isolados obtidos foram inoculados em plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta, as quais foram mantidas em casa de vegetação. Para cada vírus inoculado foram utilizadas duas repetições de cada planta a ser testada.

A obtenção dessas plantas se deu por meio de sementes em bandejas de plástico, empregando-se o substrato apropriado (Plantmax®), com posterior transplante para vasos, com capacidade de 2 kg, 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 (Figura 4).

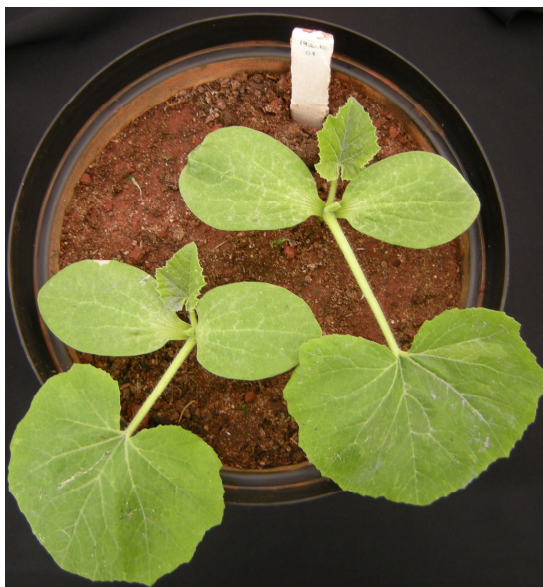


Figura 4 Estágio de inoculação das plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta

A inoculação mecânica foi feita 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-teste receptoras, previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício (Carborundum) e, em seguida, as plantas foram lavadas com água corrente. Plantas sadias, inoculadas somente com a solução extratora, serviram como controle.

As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até o final da avaliação dos sintomas, que foi feita de acordo com a escala de notas desenvolvida por Moreira (2009), sendo:

- 0 - sem sintomas;
- 1 - mosaico fraco sem deformações foliares e bom desenvolvimento;
- 2 - mosaico moderado e pouca deformação foliar;
- 3 - mosaico e deformação foliar moderada;
- 4 - mosaico intenso e deformação foliar;
- 5 - mosaico e deformação foliar intensos e desenvolvimento reduzido.

Foram realizados dois ensaios, sendo um na época mais quente (março/2010), quando a temperatura variou entre 20°C e 35°C e o outro na época mais fria (julho/2010), com a temperatura variando entre 5°C e 25°C. Estas duas épocas foram escolhidas para se verificar o comportamento do vírus quando as plantas inoculadas foram colocadas em diferentes temperaturas.

3.1.3 Testes sorológicos

Após o aparecimento dos sintomas nas plantas inoculadas, as folhas foram coletadas e submetidas ao teste de diagnose DAS-ELISA (CLARK ,

ADAMS, 1977) com antissoros específicos disponíveis contra o SqMV e CMV, produzidos pela Bioreba. O procedimento foi o recomendado pelo fabricante.

3.1.4 RT-PCR

A diagnose por meio de RT-PCR foi feita empregando-se *primers* desenhados com base nos genomas dos vírus do mosaico da abóbora (SqMV: Foward: 5'- TTTGACGGCATGGTC 3' e Reverse: 5' GGAAAGAAGCCACAAC 3'), do vírus do mosaico do pepino (CMV: Foward: 5'- TCATGGATGCTTCTCC -3' e Reverse: 5'- GCTGGATGGACAACC -3'), do vírus as mancha anelar do mamoeiro estirpe P (PRSV-P: Foward: 5'- GCTGTGGATGCTGGTTTGA -3' e Reverse: 5'- CTAAAAGCACGGAGG -3') e do vírus do mosaico da melancia (WMV: Foward: 5'- CAGTGTCTCTGCAATCAGGA -3' e Reverse: 5'- CCCTTGCACTGTCCTCTCAG -3' disponíveis no GenBank. Já para o vírus do mosaico amarelo da abóbora (ZYMV: Foward: 5'- GATTTGAATGAGCAACAGATGG-3' e Reverse: 5'- CTCCGCTGCATCTGAGAAGT-3') e vírus as mancha anelar do mamoeiro estirpe W (PRSV-W: Foward: 5'- GATTTGAATGAGCAACAGATGG -3' e Reverse: 5'- CTCCGCTGCATCTGAGAAGT -3') desenhados por Stipp (2009).

3.1.5 Extração de RNA total

A extração do RNA foi pelo método do Trizol, a partir das folhas das plantas infectadas. Primeiramente, as folhas foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e ao pó obtido adicionou-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, 5% de

glicerol), na proporção de 1g/10mL. 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, adicionando-se 300 µl de clorofórmio a cada microtubo que, posteriormente, 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. Passado esse tempo, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos, descartando-se, posteriormente, o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 75% gelado, centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o tubo foi secado a vácuo. O pellet obtido foi ressuscitado em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi visualizado em gel de agarose a 0,7%.

3.1.6 Síntese do cDNA

A transcrição reversa foi realizada empregando-se 0,5 µL do *primer reverse*, 1,0 µL do RNA extraído e 4,0 µL 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 µL de tampão da transcriptase reversa (RT M-MLV buffer da USB), 0,5 µL de dNTP a 10 mM, 0,2 µL da enzima RT (USB) e 1,8 µL 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.

3.1.7 Reação de amplificação (PCR)

Para a reação de PCR, utilizou-se o tampão, $MgCl_2$ (25 mM), dNTP 10 mM, *primer* senso (*primer forward*) e antissenso (*primer reverse*), enzima Go Taq Flexi DNA polimerase, cDNA, completando-se o volume para uma alíquota determinada (50 μ L) com água ultrapura tratada com DEPC. A amplificação consistiu de desnaturação inicial de 95°C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação: 72°C, 30 segundos; 49°C para o SqMV, 50,7°C para ZYMV, 45,5°C para o PRSV-P, 55°C para o WMV e CMV e 50°C para PRSV-W, por um minuto; 72°C, por 2 minutos e uma extensão final de 72°C. O produto da RT-PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed (Biotium).

3.1.8 Sequenciamento 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 norte-americana Genewiz, onde foi realizado o sequenciamento genômico. As sequências foram analisadas e comparadas entre si e com outras sequências do GenBank 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 CLUSTALW (European Bioinformatics Institute, 2008). Distâncias genéticas e árvores filogenéticas foram geradas utilizando-se o programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011), com bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições.

3.1.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Pequenas porções de tecidos foliares, medindo 1x2mm, foram fixadas em solução de Karnovsky modificado: glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M PH 7,2, por 48 horas, lavadas em tampão cacodilato 0,1M (3x 15 min.) e pós-fixadas, por 1 hora, com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após rápidas lavagens com solução salina 0,9%, foram coradas “in bloco” com acetato de uranila 2,5% em água “overnight” e desidratadas com séries crescentes de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, 100%)

Posteriormente, os espécimes foram incluídos em resina Spurr, a 70°C, por 48 horas. Os cortes ultrafinos (60-90nm) foram depositados em grades de cobre recobertas com formvar, contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo. Esses cortes foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM-900) operando em 50 Kv e fotografias digitalizadas foram obtidas.

3.2 Efeito do *squash mosaic virus* em diferentes hospedeiras

3.2.1 Plantas teste

As espécies/variedades testadas em casa de vegetação foram: abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. ‘Caserta’), abóbora-rasteira (*C. moschata* ‘Menina Rajada’), melancia (*Citrullus lanatus* ‘Crimson Sweet’), melão (*Cucumis melo*), mamão (*Carica papaya*), pepino (*Cucumis sativus*), *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnose dos vírus

4.1.1 Testes sorológicos

Dos 25 isolados analisados, nenhum reagiu com o antissoro para o vírus do mosaico do pepino (CMV). Por outro lado, quatorze isolados, ou seja, 56%, foram identificados como *Squash mosaic virus*, tendo sete deles sido provenientes de abóbora Caserta e 7 de melancia (Tabela 2). Isso mostrou, portanto, a prevalência do SqMV nas regiões onde as amostras foram coletadas. Além de ser o primeiro relato da presença desse vírus no estado do Tocantins, esses resultados foram surpreendentes, pois o SqMV não é considerado de grande importância no Brasil (OLIVEIRA et al., 2000; MOURA et al., 2001; HALFELD-VIEIRA et al., 2004). Além disso, esse vírus, geralmente, tem sido encontrado em plantas de abóbora, ao passo que metade dos isolados positivos para SqMV, detectados, estavam infectando naturalmente melancia no campo.

Silveira et al. (2009) realizaram ampla coleta de amostras na região do submédio São Francisco e observaram que o vírus que ocorreu em maior incidência foi o PRSV-W, seguido pelo PRSV-P e ZYMV, nessa ordem, não tendo sido detectada nenhuma planta infectada com o SqMV. Eles sugeriram que os programas de melhoramento genético na região nordeste deveriam considerar fontes de resistência para os três vírus prevalentes, o que não poderia ser considerado no estado de Tocantins, onde a incidência de SqMV foi bastante alta nas amostras analisadas. Um levantamento mais amplo, com maior número de amostras, seria indicado para um resultado mais representativo.

Tabela 2 Isolados identificados como SqMV

Isolado	Local de coleta	Espécie amostrada
PTY1	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY2	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY4	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY5	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY10	Campo UFT Gurupi	Melancia
PTY12	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY14	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
PTY15	Chácara Gurupi	Abóbora Caserta
FA1	Formoso do Araguaia	Melancia
GR2	Gurupi	Melancia
LC2	Lagoa da Confusão	Melancia
LC3	Lagoa da Confusão	Melancia
PN1	Porto Nacional	Melancia
PN2	Porto Nacional	Melancia

4.1.2 Microscopia eletrônica

Cortes ultrafinos de tecidos de abóbora Caserta, infectados com os isolados que não foram caracterizados como SqMV ou CMV, foram observados ao microscópio eletrônico. Foram visualizadas inclusões do tipo catavento (Figura 5), estrutura típica do gênero *Potyvirus*. Com essas evidências seguiu-se a identificação destes isolados utilizando *primers* específicos para diversas espécies do gênero *Potyvirus*, capazes de infectar plantas de abóbora e melancia, como o ZYMV e o PRSV estirpes W e P.

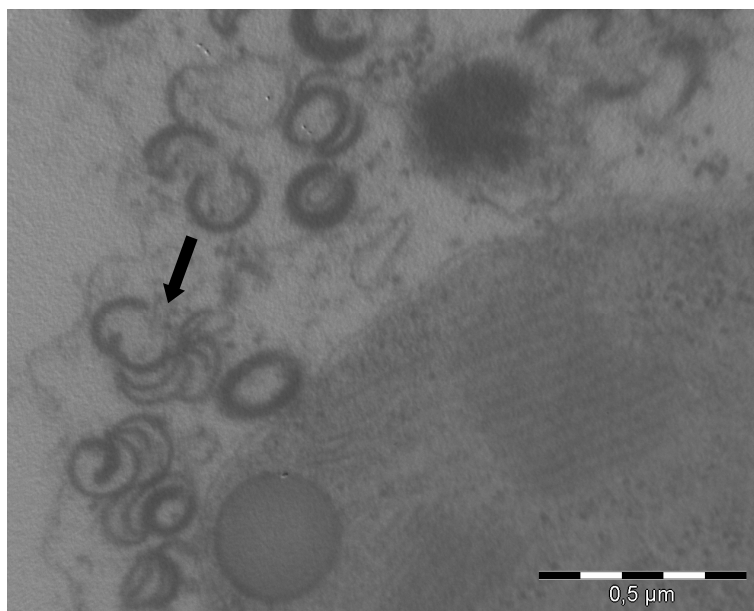


Figura 5 Eletromicrografia, obtida ao microscópio eletrônico, de tecidos de plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta. A seta indica a inclusão citoplasmática do tipo catavento, estrutura típica do gênero *Potyvirus*

4.1.3 RT-PCR

Todos os vírus que foram ELISA positivos para o SqMV (PTY1, PTY2, PTY4, PTY5, PTY10, PTY12, PTY14, PTY15, FA1, GR2, LC2, LC3, PN1 e PN2) tiveram uma banda de 818 pb amplificada, compreendendo uma parte da região 3' da proteína maior (L proteína) e toda a proteína menor (SM) do capsídeo desse vírus (Figura 6). Sabe-se que o índice de infecções mistas é elevado pelo fato de várias espécies de vírus serem transmitidas de forma não persistente por várias espécies de afídeos (SILVEIRA et al., 2009). Entretanto, embora as amostras que foram ELISA positivas para SqMV tenham sido testadas com *primers*, para CMV, PRSV P e W, ZYMV e WMV não houve amplificação de bandas para nenhum desses vírus.

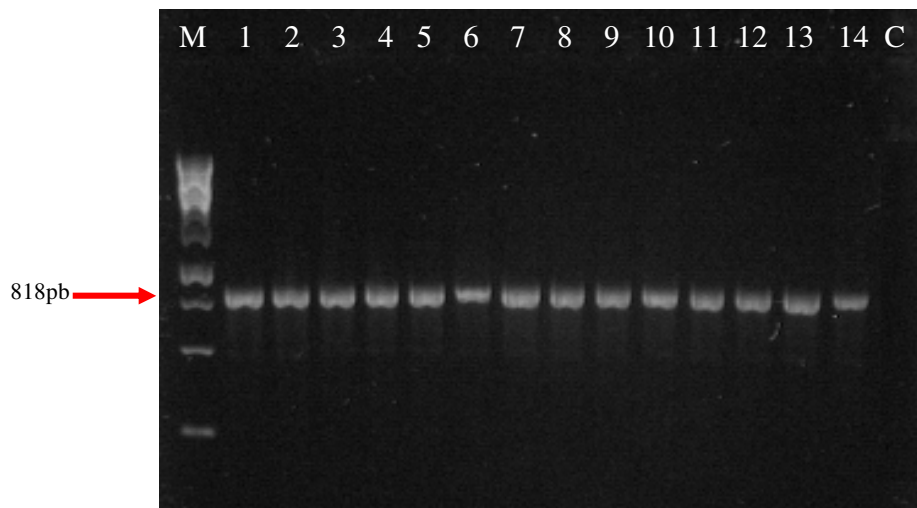


Figura 6 Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* desenhados para *squash mosaic virus*. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 14: isolados: PTY-1, PTY-2, PTY-4, PTY-5, PTY-10, PTY-12, PTY-14, PTY-15, FA, GR2, LC2, LC3, PN1 e PN2. C: controle negativo

Quando as demais amostras foram testadas (PTY3, PTY6, PTY7, PTY9, PTY11, PTY13, PTY16, PTY17, PTY18, GR1 e LC1), houve amplificação de bandas para todos eles, apenas com os *primers* para ZYMV, tendo sido amplificada uma banda de 200 pb (Figura 7).

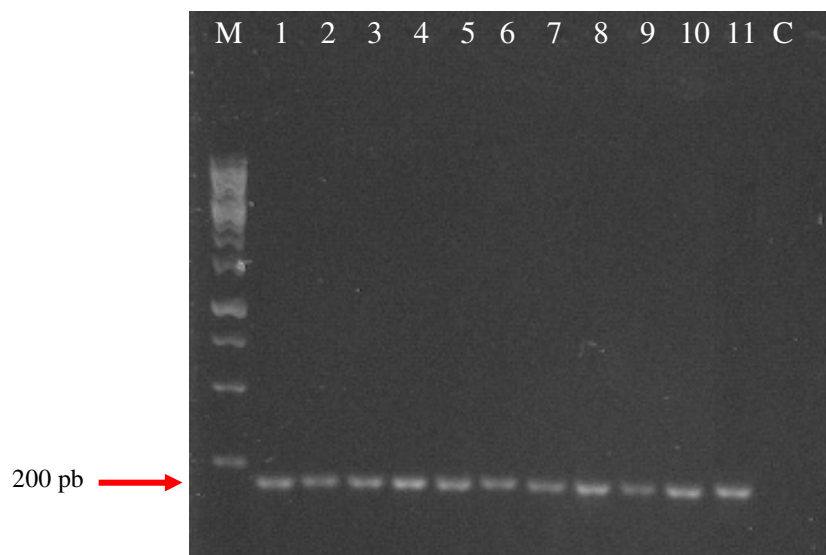


Figura 7 Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* desenhados para *zucchini yellow mosaic virus*. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 11: isolados PTY-3, PTY-6, PTY-7, PTY-9, PTY-11, PTY-13, PTY-16, PTY-17, PTY-18, GR1 e LC1. C: controle negativo

4.2 Sintomas induzidos pelos isolados

4.2.1 Avaliação da severidade dos sintomas induzidos em abóbora cv. Caserta

Os sintomas apresentados pelas plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta inoculadas mecanicamente na primeira época de avaliação, no verão, pelos diferentes isolados, foram mais severos para a maioria dos isolados. Com exceção dos sintomas induzidos pelo PTY4 e PTY14, que foram avaliados com a nota 4, todos os isolados induziram sintomas que receberam nota 5. Por outro lado, a grande maioria das plantas inoculadas no inverno apresentou sintomas avaliados com a nota 4, tendo apenas cinco deles, o PTY9 (ZYMV) e PN1, FA1, LC3, PN2 (SqMV), induzido sintomas severos (nota 5) nas plantas infectadas.

Moura et al. (2005) também verificaram que a incidência dos sintomas em acessos de abóbora para ZYMV no verão foi mais intensa do que no inverno.

A maioria dos sintomas apresentados pelas plantas inoculadas com os isolados de SqMV se caracterizou por mosaico, deformação foliar, banda ao longo das nervuras e subdesenvolvimento da planta (Figura 8).

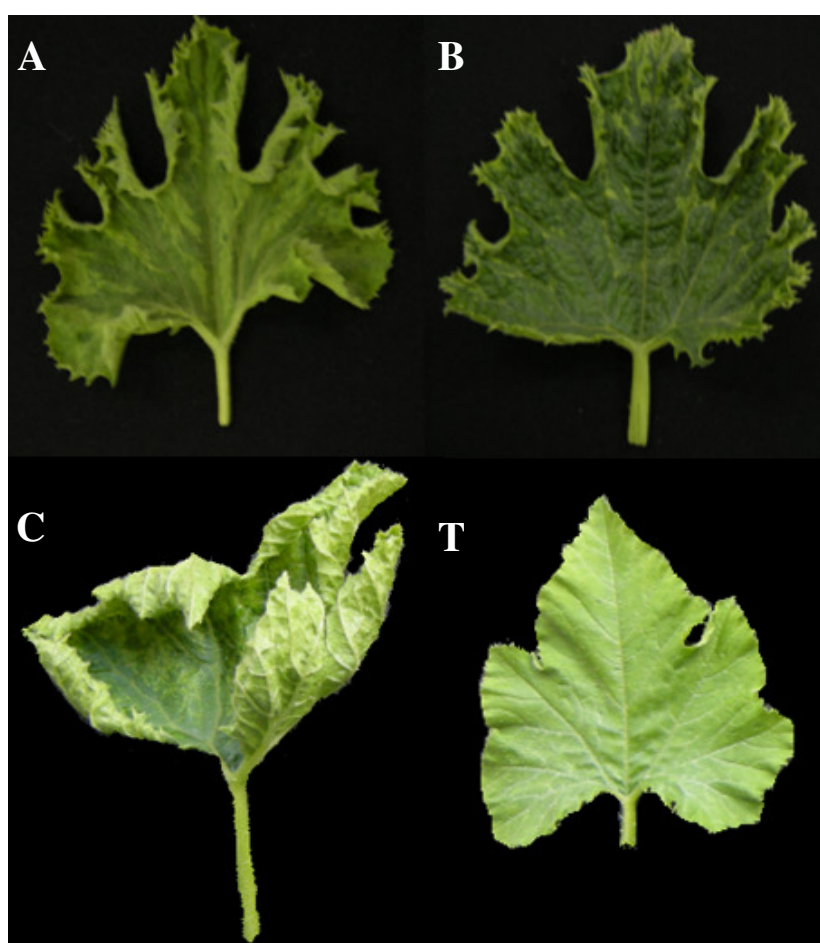


Figura 8 Padrão dos sintomas dos isolados em *Cucurbita pepo* cv. Caserta. A, B e C: Mosaico, redução e deformação foliar, mosaico, bolhamento e “dark green vein-banding”; T: testemunha

4.2.2 Efeito do *Squash mosaic virus* em diferentes hospedeiras

O *Squash mosaic virus* foi capaz de infectar todas as plantas da família *Cucurbitaceae* (Figura 9), causando sintomas que variaram com a espécie (Tabela 3). De modo geral, eles se caracterizaram por mosaicos, com diferentes intensidades.

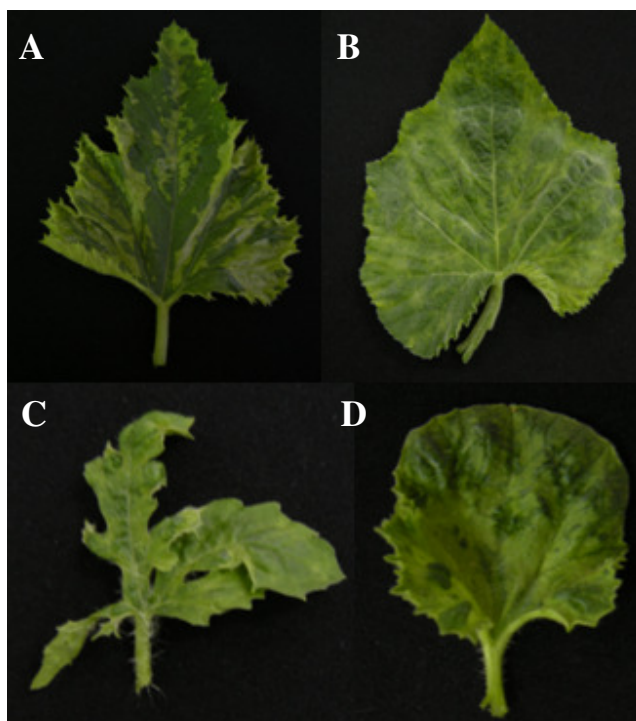


Figura 9 Sintomas induzidos pelo *Squash mosaic virus* nas folhas das plantas de (A) abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta'); (B) abóbora-rasteira (*C. moschata* 'Menina Rajada'); (C) melancia (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet') e (D) melão (*Cucumis melo*)

Tabela 3 Reação de espécies/variedades inoculadas com os quatorze isolados de *Squash mosaic virus*

	Abobrinha- de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta')	Abóbora- rasteira (<i>C. moschata</i> 'Menina Rajada')	Melancia (<i>Citrullus lanatus</i> 'Crimson Sweet')	Melão (<i>Cucumis melo</i>)	Mamão (<i>Carica papaya</i>)	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
Isolados	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.	21 D.A.I.
PTY-1	MI,DFI,DR	MI,DF	MI,DF	MM,PD	SS	PA	PC	SS
PTY-2	MI,DF	MI,DF	MI,DF	MI,DF	SS	PA	PC	SS
PTY-4	MI,DFI, DR	MI,DFI, DR	MI,DF	MI,DF	SS	PA	PC	SS
PTY-5	MI,DF	MF	M,DM	MF	SS	PA	PC	SS
PTY-10	MI,DFI,DR	M,DM	MI,DF	MM,PD	SS	PA	PC	SS
PTY-12	MI,DFI,DR	MI,DF	MI,DF	MI,DFI,DR	SS	PA	PC	SS
PTY-14	MI,DFI,DR	MI,DFI, DR	MI,DF	MI,DF	SS	PA	PC	SS
PTY-15	MI,DF	M,DM	MM,PD	MM,PD	SS	PA	PC	SS
FA	MI,DFI,DR	M,DM	MI,DF	M,DM	SS	PA	PC	SS
GR2	MI,DFI,DR	M,DM	MI,DF	M,DM	SS	PA	PC	SS
LC2	MI,DF	MI,DF	MI,DF	MI,DFI,DR	SS	PA	PC	SS
LC3	MI,DFI,DR	MI,DF	MI,DFI,DR	MI,DF	SS	PA	PC	SS
PN1	MI,DFI,DR	MI,DF	MI,DF	MORTE	SS	PA	PC	SS
PN2	MI,DFI,DR	MI,DF	MI,DF	MI,DF	SS	PA	PC	SS

M: mosaico; MF: mosaico fraco; MM:mosaico moderado; MI: mosaico intenso; DF: deformação foliar; PD: pouca deformação foliar;DM:deformação foliar moderada; DFI: deformação foliar intensa; DR: desenvolvimento reduzido; PA: pontos amarelados; PC: pontos cloróticos; SS: sem sintomas

O isolado PN1 (SqMV), além de ser bem mais agressivo no verão, também induziu sintomas mais severos quando inoculado em melão, levando a planta à morte aos quatorze dias após a inoculação.

Os sintomas mostrados pelo pepino, constituídos por pontos amarelados (Figura 10), confirmaram a presença do SqMV, pois esta é uma planta indicadora para esse vírus (FREITAG, 1941).



Figura 10 Sintomas exibidos pela planta de pepino inoculada com *Squash mosaic virus*

Nelson e Knuhtsen (1973) demonstraram que isolados de SqMV induziam, em melancia, somente lesões locais, diferentemente do que foi obtido neste estudo. Além disso, os autores afirmaram que somente os membros de SqMV do sorotipo I foram capazes de infectar melancia, o que leva a crer que os isolados estudados provavelmente são deste grupo, mesmo porque os membros deste grupo têm sido mais numerosos.

Estudos da reação de diferentes espécies/variedades à infecção com o SqMV tem sido realizados no mundo (NELSON, KNUHTSEN, 1973; FREITAG, 1956; THOMAS, 1973), porém, este parece ser o primeiro estudo, no Brasil, sobre esse tipo de interação. Dessa forma, maiores estudos devem ser realizados para a caracterização deste vírus e, assim, poder trazer maior colaboração para os programas de melhoramento de cucurbitáceas da Universidade Federal do Tocantins.

4.2.3 Efeito do *Zucchini yellow mosaic virus* em diversas hospedeiras

Os sintomas induzidos pelos demais isolados em diversas hospedeiras podem ser vistos na Tabela 4. Plantas de pepino e abóbora ‘Caserta’ foram infectadas com todos os isolados, apresentando sintomas que variaram de mosaico leve a intenso, muitas vezes semelhantes aos induzidos por SqMV. Isso demonstra a dificuldade de se fazer a diagnose visual, quando se quer identificar os diferentes vírus que podem infectar cucurbitáceas.

Os isolados ZYMV estão restritos, principalmente, às espécies da família *Cucurbitaceae* (DESBIEZ, LECOQ, 1997), porém, experimentalmente, os hospedeiros pertencentes a esta família geralmente podem causar infecções localizadas, como visto em *Chenopodium amaranticolor* (com os isolados PTY9 e PTY13), ou latentes (DESBIEZ, LECOQ, 1997).

Não há relatos de que os isolados de ZYMV tenham a capacidade de infectar plantas de mamoeiro, porém, esta espécie foi utilizada para descartar a possibilidade da identificação errônea de outro vírus, como, por exemplo, o *Papaya ringspot virus* estirpe P (PRSV-P).

Tabela 4 Sintomas induzidos pelos isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas hospedeiras

ISOLADOS	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Abobrinha- de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta')	Mamão (<i>Carica papaya</i>)	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) preto campinas	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Gomphrena</i> sp.
PTY-3	M	MI, DF,	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-6	M	MI, DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-7	M	MM, DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-9	M	MI,DF	SS	SS	PC	SS	SS	SS
PTY-11	M	MI,DR	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-13	M	MI,DF	SS	SS	PC	SS	SS	SS
PTY-16	M	MI,DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-17	M	MI,DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
PTY-18	M	MI,DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
GR1	M	MI,DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS
LC1	M	MI,DF	SS	SS	SS	SS	SS	SS

PC: pontuações cloróticas; M = mosaico; MI = mosaico intenso; MM = mosaico médio; DF = deformação foliar

4.3 Análise dos fragmentos genômicos amplificados

Todos os isolados coletados e identificados como SqMV e como ZYMV foram seqüenciados e analisados.

4.3.1 SqMV

As seqüências de SqMV obtidas foram comparadas a seis isolados que se encontram disponíveis no GenBank (Tabela 5). O fragmento genômico estudado compreende a região da proteína menor do capsídeo, que se encontra no RNA2 do vírus com 22kDa de peso molecular e 551 pares de bases.

Tabela 5 Isolados obtidos do GenBank (NCBI, 2011) e utilizados para comparação entre os isolados de SqMV estudados

Vírus	Acesso	Origem	Autor
SqMV	EU421060	China	Hu et al., 2009
SqMV	DQ868881	China	Gu et al. (não publicado)
SqMV	AF059532	Estados Unidos	Haudenshield & Palukaitis, 1998
SqMV	AF059533	Estados Unidos	Haudenshield & Palukaitis, 1998
SqMV	AB054689	Japão	Han et al., 2002
SqMV	M96148	Estados Unidos	Hu et al., 2003

A comparação entre as seqüências dos nucleotídeos dos isolados brasileiros de SqMV mostrou identidades que variaram de 86% a 100% (Tabela 6). A menor identidade (86%) foi verificada quando se comparou o isolado PN2 aos isolados PTY1, PTY10, PTY12, PTY14, PTY15, FA1, GR2 e LC2, indicando uma maior variabilidade nesse isolado.

Tabela 6 Porcentagem de identidade dos nucleotídeos da menor proteína do capsídeo (SP) entre os isolados estudados e entre eles e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A PTY 1	-	87	87	87	100	100	100	100	97	100	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
B PTY2		-	99	100	87	87	87	87	87	87	87	100	100	90	88	87	88	87	88	87
C PTY4			-	99	87	87	87	87	87	87	87	99	99	90	88	87	88	87	88	87
D PTY5				-	87	87	87	87	87	87	87	100	100	90	88	87	88	87	88	87
E PTY10					-	100	100	100	97	100	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
F PTY12						-	100	100	97	100	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
G PTY14							-	100	97	100	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
H PTY15								-	97	100	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
I FA1									-	97	97	87	87	86	86	87	87	87	86	87
J GR2										-	100	87	87	86	87	87	87	87	86	87
K LC2											-	87	87	86	87	87	87	87	86	87
L LC3												-	100	90	88	87	88	87	88	87
M PN1													-	90	88	87	88	87	88	87
N PN2														-	86	86	86	86	87	86
O M96148															-	99	90	90	94	90
P AF059533																-	90	90	94	90
Q AF059532																	-	99	88	99
R EU421060																		-	88	100
S AB054689																			-	88
T DQ868881																				-

A maior identidade (100%) foi verificada entre os isolados PTY1 e PTY10, PTY12, PTY14, PTY15, GR2 e LC2- e entre os isolados PTY2 e PTY5, LC3 e PN1. Comparando-se os isolados brasileiros com os isolados do GenBank, as identidades variaram entre 86% e 88%, sendo a menor identidade entre o isolado AB054689 do Japão e os isolados PTY1, PTY10, PTY12, PTY14, PTY15, FA1, GR2 e LC2, e ainda entre o isolado PN2 e todos os isolados do banco de dados com exceção desse isolado do Japão, com o qual mostrou identidade de 87%. A maior identidade entre os isolados estudados e o do banco de dados foi verificada entre os isolados americanos M96148 e AF059532 com os isolados PTY2, PTY4, PTY5, LC3 e PN1. Entre os isolados do banco de dados, a maior identidade foi de 100%, entre o isolado japonês e os três Americanos.

As identidades entre os aminoácidos dos isolados brasileiros variaram de 95%, entre o isolado PN2 e todos os outros isolados estudados, a 100% entre os isolados PTY1 e PTY10, PTY12, PTY14, PTY15, FA1, GR2 e LC2; PTY2 e PTY5; LC3 e PN1 (Tabela 7). Quando comparados com os isolados do GenBank, as identidades variaram de 91% (entre o isolado PN2 e os isolados DQ868881.1 e EU421060.1, ambos da China e o isolado AF059533.1 dos Estados Unidos) a 97%, entre diversos isolados.

A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros, se encontra na Figura 11. Os isolados se dividiram em dois grande agrupamentos, que por sua vez se subdividiram em dois subgrupos cada. No primeiro ficaram o PTY15, LC2, GR2, PTY1, PTY10, PTY12 e PTY14. No segundo ficou apenas o FA1. No primeiro grupo de segundo subgrupo o PN2 ficou separado, enquanto que os PN2, PTY4, PTY2, PN1, PTY5 e LC3, ficaram no segundo subgrupo. Na Figura 12 observa-se a árvore filogenética gerada com base no alinhamento das sequências de aminoácidos desses isolados. Houve uma ligeira modificação em relação à árvore anterior,

sendo que os isolados também se dividiram em dois principais agrupamentos, mas o primeiro se dividiu em dois grupos, que por sua vez se dividiram em mais dois subgrupos. No primeiro subgrupo ficaram o PTY10, PTY12, PTY15, LC2 e o PTY1, e no segundo, o PTY14, FA1 e GR2. No primeiro subgrupo do segundo grupo ficou o LC3 separado e no segundo o PTY2, PTY4, PTY5 e PN1. O PN2 ficou separado de todos, no segundo agrupamento. Mesmo não tendo ocorrido em 100% dos casos, muitas substituições de nucleotídeos resultaram em mudanças de aminoácidos, caracterizando substituições do tipo sinônima (NEI, GOJOBORI 1986).

Tabela 7 Porcentagem de identidade dos aminoácidos da menor proteína do capsídeo (SP) entre os isolados estudados e outros isolados de SqMV do GenBank

ISOLADOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A PTY 1	-	97	96	97	100	100	100	100	100	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
B PTY2		-	99	100	97	97	97	97	97	97	97	100	100	95	96	96	93	93	95	93
C PTY4			-	99	96	96	96	96	96	96	96	99	99	95	96	96	93	93	96	93
D PTY5				-	97	97	97	97	97	97	97	100	100	95	96	96	93	93	95	93
E PTY10					-	100	100	100	100	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
F PTY12						-	100	100	100	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
G PTY14							-	100	100	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
H PTY15								-	100	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
I FA1									-	100	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
J GR2										-	100	97	97	95	97	97	96	96	97	96
K LC2											-	97	97	95	97	97	96	96	97	96
L LC3												-	100	95	96	96	93	93	95	93
M PN1													-	95	96	96	93	93	95	93
N PN2														-	93	93	91	91	93	91
O M96148.1															-	100	96	96	99	96
P AF059533.1																-	96	96	99	96
Q AF059532.1																	-	98	96	98
R EU421060.1																		-	96	100
S AB054689.1																			-	96
T DQ868881.1																				-

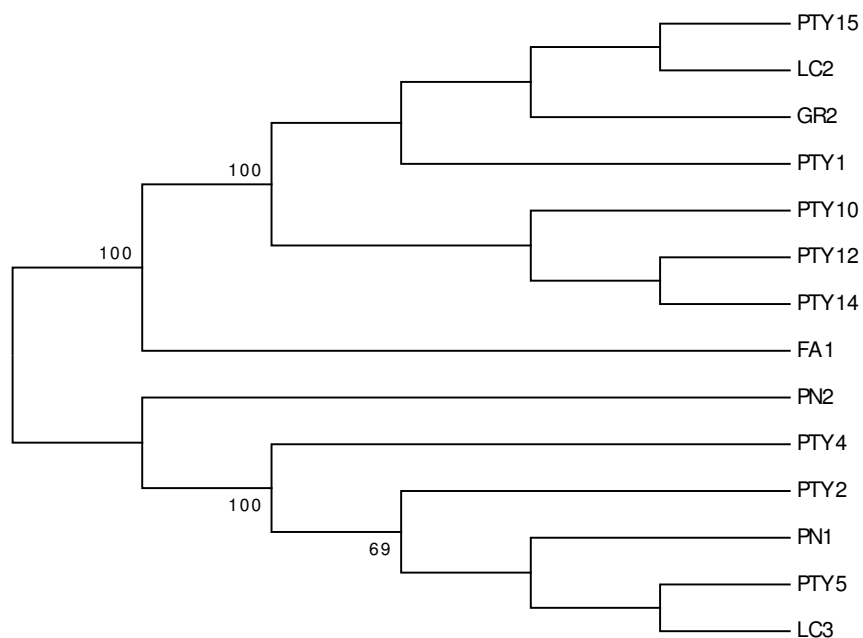


Figura 11 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento UPGMA, com 2.000 repetições

Na Figura 13 é possível observar a árvore filogenética baseada no alinhamento de nucleotídeos e na figura 14 a baseada no alinhamento dos aminoácidos dos isolados brasileiros e dos seis isolados encontrados no GenBank. Os isolados brasileiros se agruparam, em ambas as árvores, em subgrupos separados dos isolados do banco de dados. Na árvore baseada na sequência de nucleotídeos os isolados brasileiros PTY2, LC3, PTY5, PN1, PTY4 e PN2 apresentaram uma menor distância genética dos isolados do banco de dados. Entretanto, essa situação se inverteu quando se construiu a árvore filogenética com base na sequência de aminoácidos. Os isolados da China se agruparam separadamente dos isolados dos Estados Unidos e do Japão.

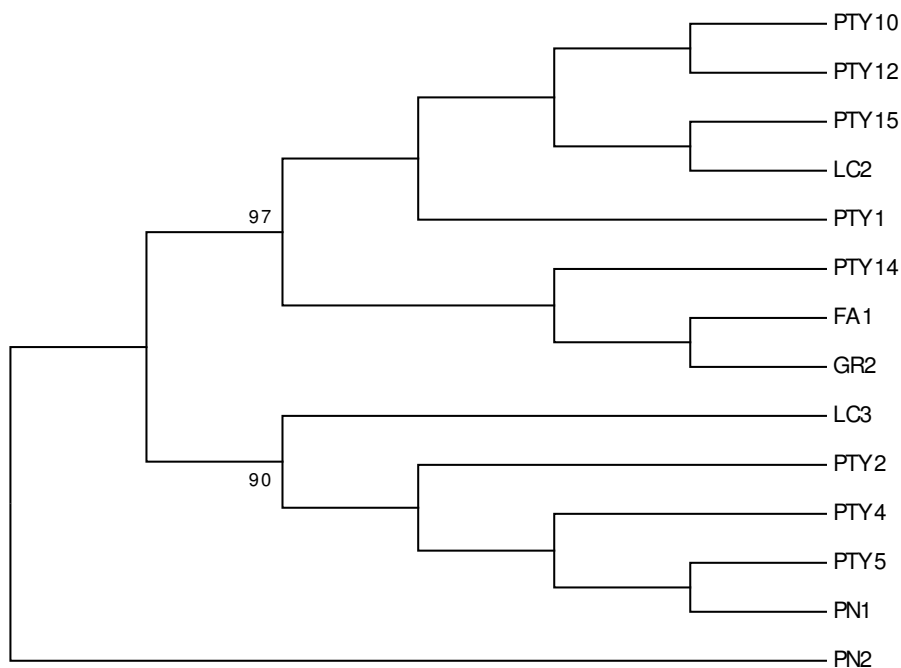


Figura 12 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining, com 2.000 repetições

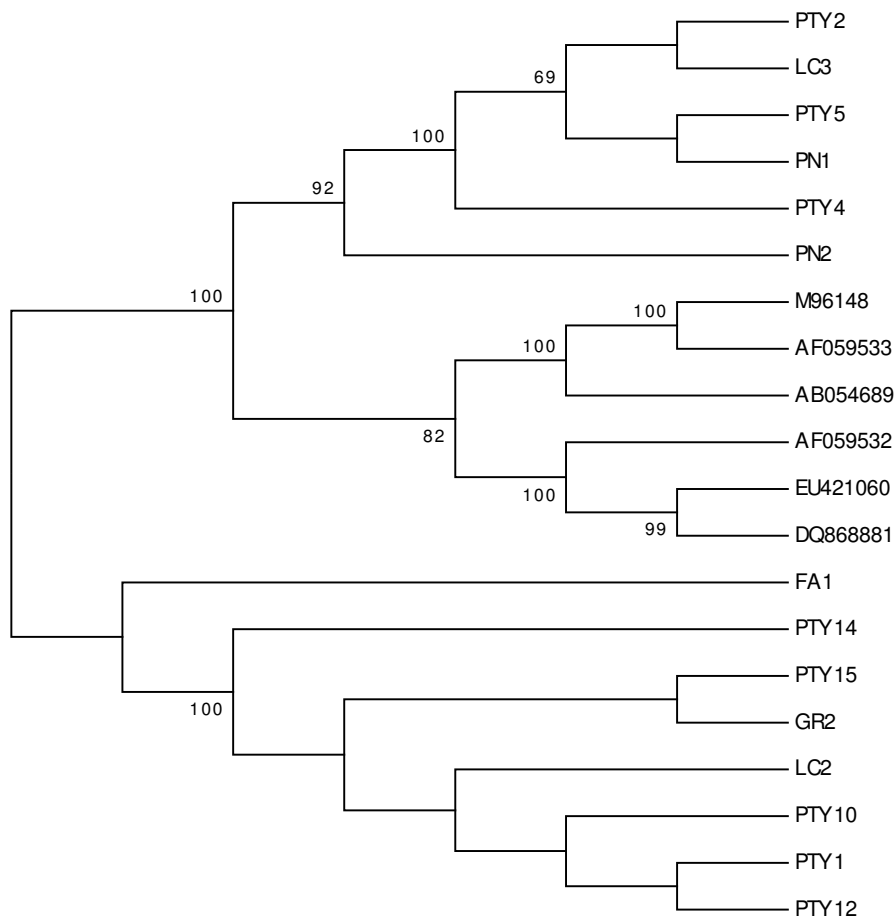


Figura 13 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e de isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento UPGMA, com 2.000 repetições

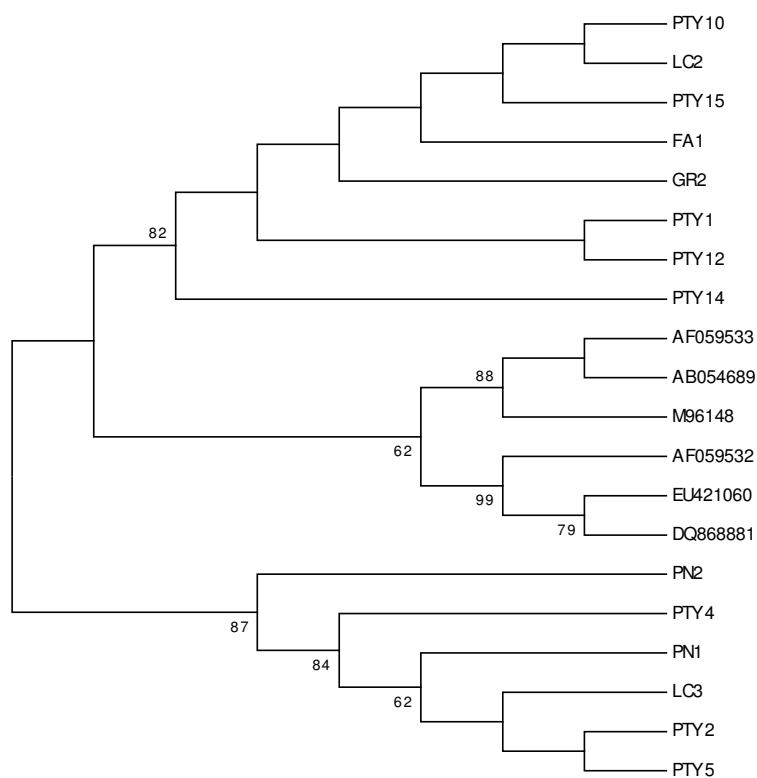


Figura 14 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do capsídeo dos isolados brasileiros de *Squash mosaic virus* e de isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining, com 2.000 repetições

4.3.2 ZYMV

As sequências de ZYMV obtidas foram comparadas com sete isolados que se encontram disponíveis no GenBank (Tabela 8). O fragmento genômico estudado encontra-se dentro da região da capa protéica do vírus.

Tabela 8 Isolados do GenBank (NCBI, 2011) usados para comparação entre os isolados de ZYMV estudados

Vírus	Acesso	Origem	Autor
ZYMV	GU586790	Brasil	Jadao, A.S., Buriola, J.E. & Rezende, J.A.M.
ZYMV	FJ705272	Irã	Massumi, H., Shaabani, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A. & Rahimian, H.
ZYMV	FJ705253	Irã	Massumi, H., Shaabani, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A. & Rahimian, H.
ZYMV	EU999757	Síria	Al-Tamimi, N.A., Kawas, H., Akel, M. & Arabiat, A.H.
ZYMV	AJ420019	Alemanha	Pfossner, M.F. & Baumann, H.
ZYMV	AB004641	Japão	Kundu, A.K., Ohshima, K. & Sako, N.
ZYMV	JF308189	Sérvia	Vucurovic, A., Bulajic, A., Stankovic, I., Ristic, D., Berenji, J., Jovic, J. & Krstic, B.

Na Tabela 9 observam-se os valores de similaridades obtidos com base no alinhamento das sequências dos nucleotídeos. Comparando-se os isolados brasileiros, entre si, as identidades variaram de 95% entre os isolados PTY13 e LC1, a 100% entre vários isolados, mostrando que essa região da capa protéica é bastante conservada. Comparando-se esses com os isolados do GenBank, a menor identidade (95%) foi observada entre o isolado PTY13 e todos os do banco de dados e a maior identidade (98%) ocorreu entre o isolado LC1 e GR1 com os demais isolados, com exceção do isolado JF308189.1 da Sérvia.

Tabela 9 Porcentagem de identidade dos nucleotídeos entre os isolados estudados e outros isolados de ZYMV do GenBank

ISOLADOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
A PTY18	-	100	100	100	100	100	96	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97
B PTY6		-	100	100	100	100	96	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97
C PTY3			-	100	100	100	96	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97
D PTY7				-	100	100	96	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97
E PTY9					-	100	96	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	96
F PTY11						-	100	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97	96
G PTY13							-	96	96	96	95	95	95	95	95	95	95	95
H PTY16								-	100	99	98	97	97	97	97	97	97	97
I PTY17									-	99	98	97	97	97	97	97	97	97
J GR1										-	98	98	98	98	98	98	98	97
K LC1											-	98	98	98	98	98	98	97
L GU586790.1												-	98	98	98	100	98	98
M FJ705272.1													-	100	100	100	98	99
N FJ705253.1														-	100	100	98	99
O EU999757.1															-	100	98	99
P AJ420019.1																-	98	99
Q AB004641.1																	-	98
R JF308189.1																		-

Ao se analisar a identidade entre os aminoácidos dos isolados brasileiros e do GenBank (Tabela 10), observou-se que todos foram iguais, ou seja, mostraram uma identidade de 100% corroborando a observação anterior sobre o fato de essa região ser bastante conservada. Assim sendo, essa pequena região não se mostrou adequada para fazer estudos de filogenia, pois se apresentaram sem variação em todos os isolados, brasileiros e estrangeiros.

Desse modo, as árvores filogenéticas construídas com base na sequência de nucleotídeos dos isolados estudados (Figura 15) até apresentaram alguma tendência, como a de apresentar uma maior distância genética isolado entre os isolados PTY13 e LC1. Já na árvore baseada na sequência de aminoácidos (Figura 16), não houve essa diferença. Assim sendo, a substituição de nucleotídeos não resultou em mudança dos aminoácidos, sendo essas substituições chamadas não sinônimas (NEI, GOJOBORI, 1986)

Na árvore construída com base na sequência de nucleotídeos desses isolados e do GenBank (Figura 17), os isolados estudados se agruparam separadamente de todos os outros isolados. Porém, novamente houve 100% de identidade entre os aminoácidos, fazendo com que nenhuma conclusão pudesse ser embasada (Figura 18).

Tabela 10 Porcentagem de identidade dos aminoácidos entre os isolados estudados e outros isolados de ZYMV do GenBank

ISOLADOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
A PTY18	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B PTY6		-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C PTY3			-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D PTY7				-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E PTY9					-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
F PTY11						-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G PTY13							-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
H PTY16								-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
I PTY17									-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
J GR1										-	100	100	100	100	100	100	100	100
K LC1											-	100	100	100	100	100	100	100
L GU586790.1												-	100	100	100	100	100	100
M FJ705272.1													-	100	100	100	100	100
N FJ705253.1														-	100	100	100	100
O EU999757.1															-	100	100	100
P AJ420019.1																-	100	100
Q AB004641.1																	-	100
R JF308189.1																		-

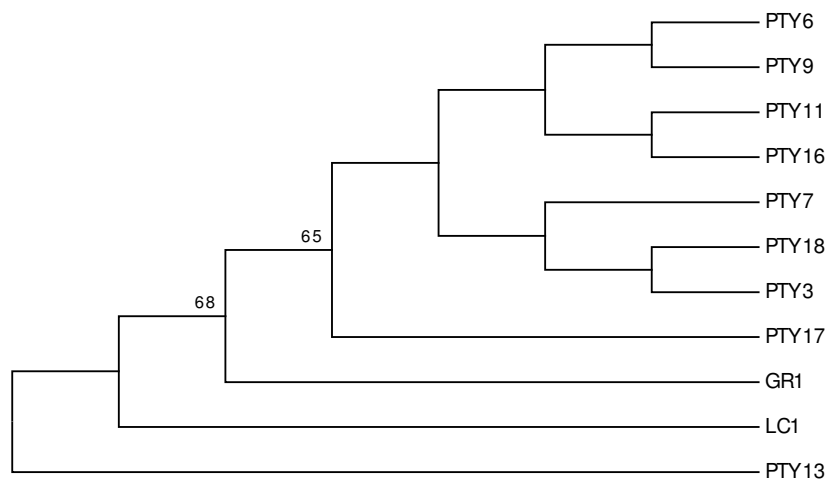


Figura 15 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do capsídeo dos isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* estudados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento UPGMA, com 2.000 repetições

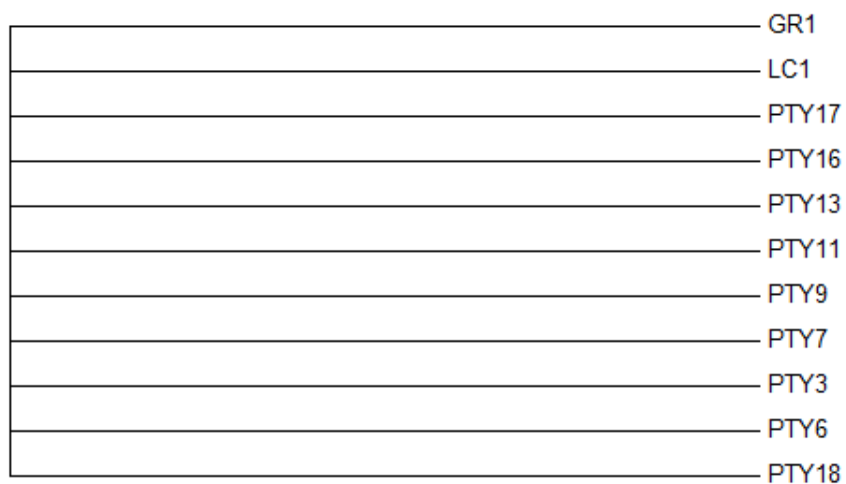


Figura 16 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do capsídeo dos isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* estudados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining, com 2.000 repetições

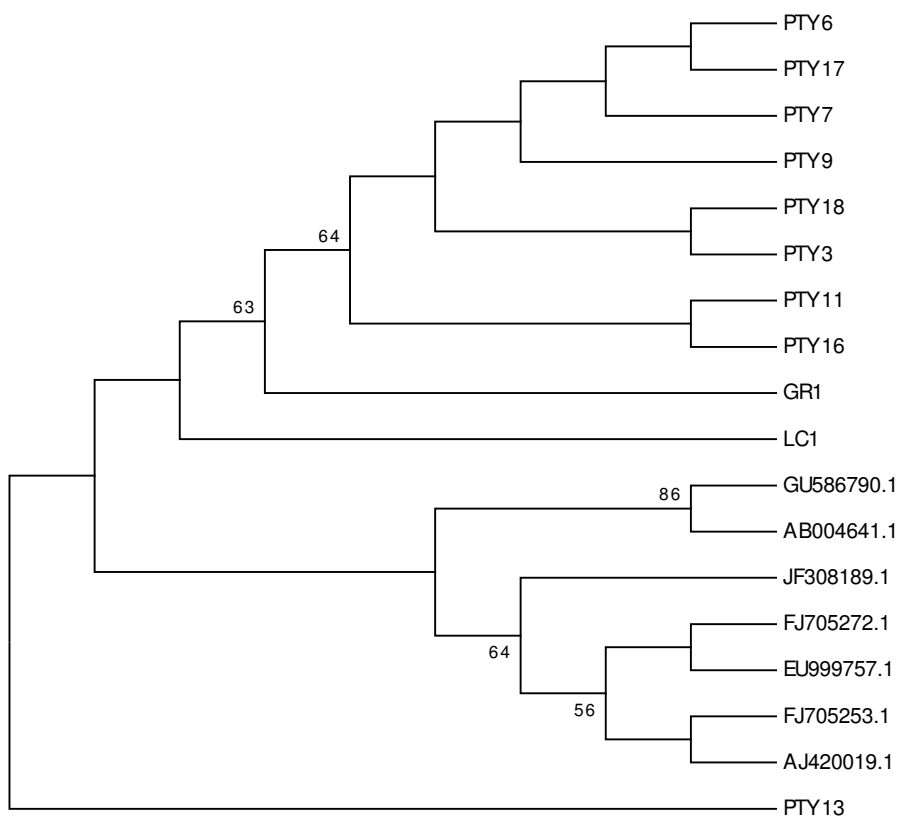


Figura 17 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos do capsídeo dos isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* estudados e de isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento UPGMA, com 2.000 repetições

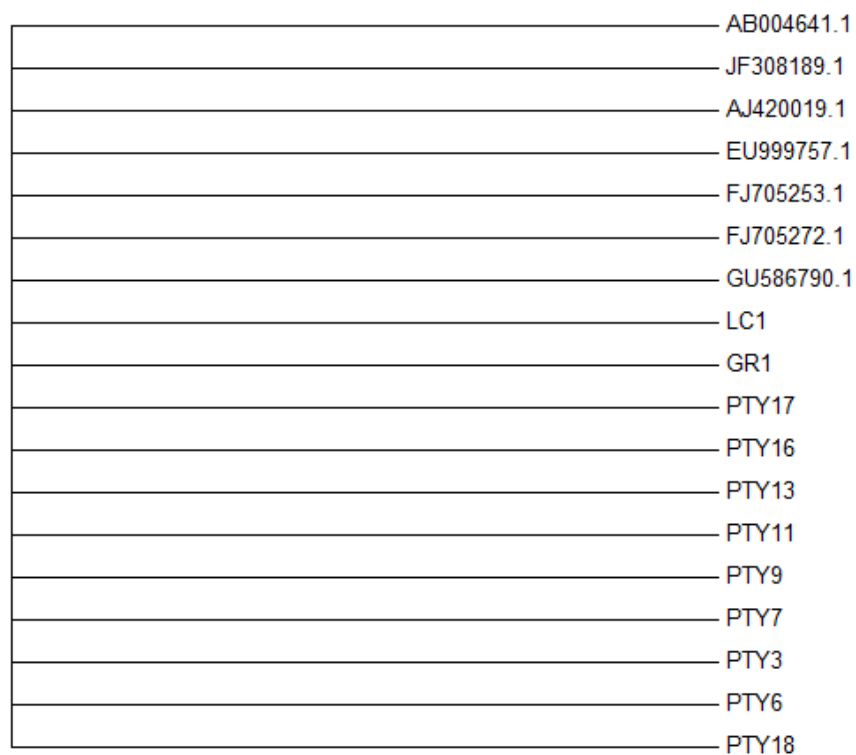


Figura 18 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos do capsídeo dos isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* estudados e de isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Mega, utilizando o método de agrupamento Neighbor Joining, com 2.000 repetições

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Squash mosaic virus* tem sido considerado de menor importância no território brasileiro, de modo que, em algumas regiões, como no nordeste do Brasil, considera-se que os programas de melhoramento devem considerar apenas o PRSV, estirpes W e P, e o ZYMV. Entretanto, os resultados aqui obtidos mostraram que essa não é a mesma realidade que ocorre no estado do Tocantins, onde a maioria das amostras estava infectada com esse vírus. Isso demonstra que o SqMV pode ter encontrado as condições ideais, na região do Tocantins, para se disseminar e infectar as hospedeiras locais.

Poucos são os estudos realizados com o SqMV no Brasil, de modo que não se pode, no momento, inferir sobre a variabilidade genômica desse vírus e fazer qualquer correlação com a sua prevalência em Tocantins, devido ao fato de que no estudo realizado somente uma parte da proteína do capsídeo do vírus foi analisada. Além disso, o número de amostras coletadas naquela região foi relativamente baixo, de modo que existe a necessidade de se continuar com essa investigação, abrangendo um maior número de amostras e de municípios. O estudo genômico desses vírus, incluindo um fragmento que inclua todo o RNA2 do mesmo e, se possível, o genoma completo, será de grande interesse para permitir um maior conhecimento para uma avaliação segura da sua variabilidade e possível influência nos programas de melhoramento visando resistência à virose.

Quanto aos isolados de ZYMV, observou-se que a identidade de aminoácidos do fragmento genômico estudado, de todos os isolados, inclusive os do banco de dados, foi igual a 100%, revelando-se como uma região altamente conservada. Portanto, para estudo de variabilidade será necessário utilizar a capa protéica completa, para avaliar adequadamente a sua filogenia.

6 CONCLUSÕES

- a) ao contrário do que ocorre em outras regiões brasileiras, o *Squash mosaic virus* foi o vírus prevalente nas amostras de abóbora e melancia coletadas em Tocantins, com incidência de 56%, enquanto o ZYMV, que é relatado como o de maior incidência em outras regiões, foi detectado em 46% delas;
- b) os isolados de *Squash mosaic virus* infectaram melancia, causando mosaico e distorção foliar, diferentemente do que tem sido descrito por diversos autores em outras partes do Brasil;
- c) a sequência de aminoácidos da região analisada, dos isolados de ZYMV brasileiros e estrangeiros, mostrou-se altamente conservada, com 100% de identidade, sendo portanto inadequada para estudos de variabilidade e filogenia;
- d) dentre os isolados de SqMV, os que apresentaram maior variabilidade genética foi o PN2.

REFERÊNCIAS

- ABARSHI, M.M., MOHAMMED, I.U., WASSAWA, P., HILLOCKS, RORY, HOLT, JOHN, LEGG, J.P., SEAL, SUSAN AND MARUTHI, M.N. Optimization of diagnostic RT-PCR protocols and sampling procedures for the reliable and cost-effective detection of Cassava brown streak virus. *Journal of Virological Methods*, 163 (2). pp. 353-359, 2010.
- ADAM, G.; CHAGAS, C.M.; LESEMANN, D.E. Comparison of three plant rhabdovirus isolates by two different serological techniques. *J. Phytopathol.*, v.120, n.1, p.31-43, 1987.
- Al-Tamimi, N. A., Kawas, H., Akel, M.; Arabiat, A. H. Biological and Molecular Characterization of some *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) isolates from southern Syria and Jordan Valley. Unpublished
- ALMEIDA, A.M.R. Detecção e quantificação de vírus pelo teste ELISA. In: Almeida, A.M.R. & Lima, J.A.A. (Eds.) *Princípios e técnicas aplicados em fitovirologia*. Fortaleza. Fitopatologia Brasileira. 2001. pp.63-94.
- ASBRAER, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE EXTENSÃO RURAL. Disponível em: http://www.asbraer.org.br/portal.cgi?flagweb=tpl_conteudo&id=3319. Acesso em: 8 jan. 2011.
- BERIAN, L. O. S. A serologia como método auxiliar no controle de fitovírus. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 121-126, mar. 1985.
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; AVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999
- BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. *Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar y luchar*. Madri: Mundi-Prensa, 1996. 301p.
- BONILHA, E.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; VECCHIA, P. T. D.; PIEDADE, S. M. S.; REZENDE, J. A. M. Produção de variedades de *Cucurbita pepo* premunizadas com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* - type W e do *Zucchini yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola*. 2009, vol. 66, n.3, pp. 419-424.

BOONHAM, N. K. WALSH A, P. SMITH A, K. MADAGAN B, I. GRAHAM B, I. BARKER. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal Virology Methods*, v.108, n.2, p.181-187, 2003.

BOONHAM, N.; WALSH, K.; PRESTON, S.; NORTH, J.; SMITH, P.; BARKER, I. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N, and PVY^C strains using RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 102, p. 103-112, 2002.

BORJA, M.J.; PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of walnut strain of Cherry leafroll virus. *J. Virol. Methods*, 36: 73-83. 1992.

BRIOSO, P. S. T.; SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; OLIVEIRA, D. E. 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.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHE, R, E. J. 1996. Plant Viruses online: descriptions and lists from the Vide Database. Versão: 20/08/1997. Disponível em: <
<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>. Acesso em: 15 out. 2009.

CANER, J.; GALLET, S.R.; LOTZ, I.P.M.; OLIVEIRA, J.M. Natural infection of cucumber (*Cucumis sativus*) by *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in Santa Catarina, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 6, 1992, São Lourenço. Anais. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1992. p.180.

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

COHEN, S.; NITZANY, F. E. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. *Ibid.* 53: 193-6. 1963

CPTEC, CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS. Disponível em: <http://www7.cptec.inpe.br/noticias/noticia/15357>. Acesso em: 08 jan 2011.

DANIELS, J. Utilização de técnicas sorológicas para detecção de vírus em batata-doce. Brasília: EMBRAPA/CPACT, 1999. p. 1-3. (Comunicado Técnico 46).

DANIELS, J. Produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. Horti Sul, Pelotas, v.3, n.1, p.12-15, 1994.

DESBIEZ, C.; LECOQ. Zucchini yellow mosaic virus. Plant Pathology, Wageningen, v. 46, p. 809-829, 1997. (Review).

DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida Tetsukabuto para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus* - type W. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.390-398, 2000.

DUSI, A. N.; PESSOA, H. B. S. U.; GAMA, M. I. C. S. Ocorrência de viroses em pepino industrial no município de Janaúba-MG. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 15, n.1, p. 89-90, 1990.

DUSI, A. N.; TAKESHI, N. Y.; DIAS, R. C. S. Ocorrência de WMV-2 em cucurbitáceas no Submédio São Francisco. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 16, n.1, p. 26, 1991.

EL-SOUKKARY, F.A.H. Evaluation of pumpkin seed products for bread Fortification. Plant Foods for Human Nutrition, v. 56, p. 365-384, 2001.

EMATER-RS, EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site>. Acesso em 8 jan. 2011.

ENGEL, E.A., ESCOBAR, P.F., ROJAS, L.A., RIVERA, P.A., FIORE, N.; VALENZUELA, P.D. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. . J. Virol. Methods 163, 445-451, 2010

FERREIRA, M. A. J. F. Abóboras, morangas e abobrinhas: estratégias para coleta, conservação e uso. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/kw_storage>. Acesso em: 06 out. 2009.

FIGUEIRA, A. R., Manejo de doenças viróticas. 99 p. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002

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* 81(11): 1236 – 1240. 1997.

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 - DF, v.18, p.278, 1993. Resumo.

FREITAG, J. H. Bettle transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. *Ibid.* 46: 73-81, 1956.

FREITAG, J. H. Insect transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. *Ibid.* 31: 8(Abs), 1941.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GIAMPAN, J.S. Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detecção, avaliação de danos em abóbora de moita e reação de espécies de cucurbitáceas. 2007. 51 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GRACIA, O. First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in Argentina. *Plant Disease* 84:371. 2000.

GREBER, R.S.; PERLEY, D.M.; HERRINGTON, M.E. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.39, n.6, p.1085-1094, 1988.

GU, Q., PENG, B., DENG, C., LIANG, X., MENG, J., LIU, L.; LIL. Subgrouping of an isolate of squash mosaic virus from Shanxi province of China. Unpublished.

GRUPTA, S.; LAKSHMI, A. J.; MANJUNATH, M. N.; PRAKASH, J. Analysis of nutrient and anti-nutrient content of underutilized green leafy vegetables. *Food Science and Technology*, 38, 339-345. 2004

- HADIDI, A.; MONTASSER, M. S.; LEVY, L.; GOTH, R. W., CONVERSE, R.H.; MADKOUR, M. A.; SKRZECKOWSKI, L. J. Detection of potato leaf roll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Dis.* 77: 595-601. 1993.
- HALL, C.E. Electron microscopy: principles and application to virus research. In: CORBETT, M.K. & SISLER, H.D. (Eds.) *Plant Virology*. Florida: University of Florida Press, 1964. p.253-266.
- HAN, S.S., YOSHIDA, K., KARASEV, A.V.; IWANAMI, T. Nucleotide sequence of a Japanese isolate of Squash mosaic virus. Brief report *Arch. Virol.* 147 (2), 437-443 (2002)
- HAUDENSHIELD. J. S.; PALUKAITIS. P. Diversity among isolates of squash mosaic virus. *Journal of General Virology* (1998), 79, 2331–2341.
- HU, J., ZHOU, T., LIU, L., PENG, B., LI, H., FAN, Z.; GU, Q. The genomic sequence of a Chinese isolate of Squash mosaic virus with novel 5' conserved ends. *Virus Genes* 38 (3), 475-477 (2009).
- HU, J.S., PANG, S.Z., NAGPALA, P.G., SIEMIENIAK, D.R., SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. The coat protein genes of squash mosaic virus: cloning, sequence analysis, and expression in tobacco protoplasts *Arch. Virol.* 130 (1-2), 17-31 (1993)
- IBRAF, INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exporta%C3%A7%C3%A3o/ComparativoExportacoesBrasileiras2008-2007.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2011.
- JADAO, A.S., BURIOLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. *Trichosanthes cucumerina*: a new natural host of *Papaya ringspot virus* - type W and *Zucchini yellow mosaic virus* in Brazil. Unpublished
- KUNDU, A. K., OHSHIMA, K.; SAKO, N. Nucleotide sequences of the coat protein genes of two Japanese *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. *Acta Virol.* 41 (5), 297-301 (1997)
- KROTH, L.L.; DANIELS, J; PIEROBOM, C. R. Utilização de um método simplificados de RT-PCR para detecção do *Sweet potato feathery mottle virus 1*. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.11, n. 1, p. 109-111, jan-mar, 2005.

KUROZAWA, C. Abóbora. Globo Rural. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://globoruraltv.globo.com/GRural/0,27062,LTP0-4373,00.html>>. Acesso em: 20 out. 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

LASTRA, T. 1968: Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela. Plant disease Reporter 53: 171-4.

LECOQ, H.; LEMAIRE, J.M; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. Plant Disease, Saint Paul, v.75, n.2, p.208-211, 1991.

LECOQ, H.; PITRAT, M.; CLEMENT, M. Identification et caracterization d'un potyvirus provoquant la meladie du rubougressement jaune du melon. Agronomie, Paris, v. 1, n.4, p. 827-834, 1981.

LIMA, J. A. A., VALE, C. C., MIRANDA, A. C. M. M.; OLIVEIRA, V. B. Identificação sorológica do "Zucchini yellow mosaic virus" em plantios de melão no Rio Grande do Norte. Fitopatologia Brasileira 21:426. 1996. (Resumo).

LIMA, J.A.A.; VALE, C.C. do; OLIVEIRA, V.B. Viruses that infect cucurbits in the northeast of Brazil. Viruses: Reviews & Research Journal of the Brazilian Society for Virology, São Paulo, v.2, n.1/2, p.202, nov. 1997.

LIMA, M. F., BARBOSA, L. F.; ÁVILA, A. C. Levantamento de viroses na cultura da melancia na região do Submédio São Francisco. Fitopatologia Brasileira 22:337. 1997 (Resumo).

LINDBERG, G. D.; HALL, D. H.; WALKER, J. C. 1956: A study of melon and squash mosaic viruses. *Ibid.*46: 489-95.

LISA, V.; BOCARDO, G.; DAGOSTINO, G.; DELAVALLE, G.; D'AQUILLO, M. Characterization of potyvirus that causes *Zucchini yellow mosaic*. Phytopathology, St. Paul, v. 71, n.7, p. 668-672, 1981.

LISA, V.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses, Kew, n.282, 1984.

LORENZEN, J. H.; NOLTE, P.; MARTIN, D.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. *Arch Virology*, v. 153, p. 517-525, Jan. 2008.

LORENZEN, J. H.; PICHE, L. M.; GUDMESTAD, N. C.; MEACHAM, T.; SHIEL, P. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease, Quebec*, v. 90, p. 935-940, 2006.

MALLOR, C.G. Comportamiento de material vegetal de melón (*Cucumis Melo* L.) frente a virus. caracterización de la respuesta del cv. 'Doublon' al virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). 2003. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular e Celular). UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, 2007.

MIRANDA, R. F; RODRIGUES, G. A; SILVA, R. H; SILVA, C. L. W; SATURNINO, M. H; FARIA, S. H. F; Instruções Técnicas sobre a cultura da melancia, Belo Horizonte: EPAMIG, 1997. 28P. – (EPAMIG. Boletim Técnico, 51).

MASSUMI, H., SHAABANIAN, M., HEYDARNEJAD, J., HOSSEINI POUR, A.; RAHIMIAN, H. Biological characteristics and phylogenetic analysis of Iranian *Zucchini yellow mosaic virus* isolates. Unpublished

MILNE, R.G.; LUISIONI, E. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSKI, H. (Eds.). *Methods in Virology*. New York: Academic Press, 1977, v.6, p.265-281.

MIYAI, T.; FARIAS, P.; EIRAS, M.; GALLETI, S.R.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A. Estudo da concentração de partículas do *Cucumber mosaic virus*, através de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes hospedeiras. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo, SP. Resumos. *Arq. Inst. Biol.*, v.68, p.46, 2001. Suplemento. ISSN 0020-3653.

MOREIRA, A.G. Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no estado do Espírito Santo; Avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esses vírus; Caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (Carica papaya) em campo. 2009. 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOURA, M.C.C.L., LIMA J.A.A., OLIVEIRA V.B., GONÇALVES M.F.B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 26:90-92; 2001.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.15, p.233-247, 1987.

NAGATA, T. ; ALVES, D M T ; INOENAGATA, A K ; TIAN, T Y ; KITAJIMA, W ; ÁVILA, A C de . A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. *Archives of Virology*, v. 150, p. 379-387, 2005.

NAGATA, T. ; KITAJIMA, E. W. ; ALVES, D M T ; CARDOSO, J E ; INOUE-NAGATA, A.K. ; OLIVEIRA, M R V de ; ÁVILA, A. C. . Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. *Plant Pathology*, v. 52, p. 797, 2003.

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

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

NEPA. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 2ed., v.2, Campinas: NEPA- UNICAMP. 2006. Disponível em:<
<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. Acesso em: 20 out. 2009.

OLIVEIRA, V.B., LIMA, J.A.A., VALE, C.C.; PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Fitopatologia Brasileira* 25:628-636. 2000.

PACHECO, D.A. Biomassa, estimativa da concentração viral e sintomatologia de cucurbitáceas infectadas com estirpes fracas e severa do *Papaya ringspot virus*. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; BLUA, M.J.; WANG, H.L.; GONSALVES, D. Cross protection of cantaloupe with a mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus*: effectiveness and application. *Crop Protection*, v.14, n.7, p.601-606, July 1995.

PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; MAYBERRY, K.; BLUA, M.J. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. *California Agriculture*, Oakland, v.46, p.35-40, 1992.

PFOSSER, M. F.; BAUMANN, H. Phylogeny and geographical differentiation of *Zucchini yellow mosaic virus* isolates (Potyviridae) based on molecular analysis of the coat protein and part of the cytoplasmic inclusion protein genes. *Arch. Virol.* 147 (8), 1599-1609 (2002)

PINTO, Z. V.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A. Transmissão do *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV), sós ou em mistura por três espécies de afídeos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, p. 518-519, 2001 (Suplemento).

POZZER, L.; RESENDE, R.O.; BEZERRA, M.I.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; AVILA, A.C. *Zucchini lethal chlorotic virus* (ZLCV), a proposed new species in Tospovirus genus. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília v.21, Suplemento, p.432, 1996. Resumo.

PURCIFULL, D. J.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. Watermelon mosaic 1 potyvirus.. *Kew, England, CMI/AAB.* 1984b. 5p. (Descriptions of plant viruses n° 292).

PURCIFULL, D.; HIEBERT, E.; EDWARDSON, J. Watermelon mosaic virus 2. *Kew, England, CMI/ABB.* 1984a. 7p. (Descriptions of plant viruses n° 293.)

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* 28:1999-203. 2003.

RAMOS, N.F.; LIMA, J.A.A.; SANTOS, A.A.; GONÇALVES, M.F.B. Plantas de meloeiro com infecção mista de espécies de vírus em campos experimentais. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.211, 202. Suplemento

REZENDE, J.A.M., GALLETI, S.R.; POZZER, L.; RESENDE, R.O.; AVILA, A.C.; SCAGLIUSI, S.M.M. Incidence, biological and serological characteristics of a tospovirus in experimental fields of zucchini in São Paulo State, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.92-95, 1997.

REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of *Papaya ringspot virus*-Type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. *Plant Disease*, v.82, p.171-175, 1998.

REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A.; IEMMA, A.F. Efeitos da premunização da abóbora 'Menina Brasileira' com estirpes fracas do vírus-do-mosaico-do-mamoeiro-estirpe melancia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, p.141-148, 1999.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. *Cucurbits*. Wallingford: CAB International, 1997. 226p.

SÁ, P. B.; KITAJIMA, E. W. Characterization of an isolate of *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2) from Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 16, n.3, p. 217- 223. 1991.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F.; MANIATIS T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 417 p

SCHRIJNWERKERS, C.C.F.M.; HUIJBERTS, N.; BOS, L. *Zucchini yellow mosaic virus*: two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.97, n.3, p.187-191, 1991.

SEAGRO-TO, SECRETARIA DA AGRICULTURA, DA PECUÁRIA E DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO DO ESTADO DO TOCANTINS. Disponível em: <http://ceasa.to.gov.br/noticia/tocantins-encerra-decada-de-2010-com-avancos-no-setor-agropecuario/33>. Acesso em: 02 jan. 2011.

SHERF, A.F.; MACNAB, A.A. *Vegetable Diseases and Their Control*. New York. John Wiley & Sons. 1986. pp. 599-696.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford, England. 1994. 516p.

SILVEIRA, Lindomar Maria da et al. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical plant pathology* [online]. 2009, vol.34, n.2, pp. 123-126. ISSN 1982-5676.

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*, v.91, p. 37-49. 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, 1998.

SITTERLY, W.R., 1960. A new vector of *Squash mosaic virus*. *Plant disease reporter*. 44, 134-5

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; BURIOLLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p.532, 2001. Resumo.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.26, n.2, p.295, 2000. Resumo.

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

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press), 2011

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy: Classified Nomenclature of Viruses; Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2000. 1162p.

VEGA, J.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A. Detecção do Vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita no Brasil: Caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p.72-79, 1995.

VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; NAGAI, H. Constatação do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita ("*Zucchini yellow mosaic virus*") no Brasil através de MEIAD e ELISA. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, p.188, 1992. Resumo.

VUCUROVIC, A., BULAJIC, A., STANKOVIC, I., RISTIC, D., BERENJI, J., JOVIC, J.; KRSTIC, B. Mosaic viruses infecting pumpkin and squash crops in the Vojvodina province of Serbia. Unpublished

WALKEY, D.G.A.; LECOQ, H.L.; COLLIER, R.; DOBSON, S. Studies on the control of *Zucchini yellow mosaic virus* in courgettes by mild strain protection. *Plant Pathology*, v.41, p.762-771, 1992.

WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucumber, melon and squash. *Plant Disease*, v.75, p.203-207, 1991.

ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., COSTA, H., *Controle de doenças de plantas – hortaliças*, v. 2, Viçosa, 2000.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família Potyviridae: parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. '7, p.1-66, 1999.