**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização dos mecanismos de defesa do acesso PI414723 de
Cucumis melo L. ao *Zucchini yellow mosaic virus* e seleção de
candidatos a genes de resistência no *locus Zym-1***

Líllian Beatriz Januario Bibiano

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2020**

Lílian Beatriz Januario Bibiano
Engenheira Agrônoma

**Caracterização dos mecanismos de defesa do acesso PI414723 de
Cucumis melo L. ao *Zucchini yellow mosaic virus* e seleção de candidatos
a genes de resistência no *locus Zym-1*
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Bibiano, Lillian Beatriz Januario

Cacterização dos mecanismos de defesa do acesso PI414723 de *Cucumis melo* L. ao *Zucchini yellow mosaic virus* e seleção de candidatos a genes de resistência no locus *Zym-1* / Lillian Beatriz Januario Bibiano. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2020.

83 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. ZYMV 2. Melão 3. Quantificação viral 4. Genes R 5. Melhoramento genético I. Título

Aos meus amados pais João Bosco e Maria Aparecida, a minha irmã

Aline e ao meu companheiro Pedro, pelo amor, incentivo e apoio.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À força espiritual que me permite lutar e seguir em frente.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, pelas oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP.

Ao professor Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo pela orientação, confiança no meu trabalho e por me preparar para grandes desafios. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela valiosa ajuda na tese.

Ao laboratório de Virologia Vegetal, em especial ao Dr. David Spadotti.

À empresa Sakata Seed Sudamerica pelo fornecimento de materiais e equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular pela amizade: Mariana Cicarelli Cia, Camila Perdoncini Carvalho, Raphael Severo, Ana Galesi e Carolina Pereira.

À amiga Dra. Mariana Cia pelos ensinamentos teóricos e práticos, essenciais para a minha formação e realização deste trabalho.

À amiga Camila Perdoncini Carvalho pelo companheirismo e por contribuir grandemente para o *melon team*.

À amiga Sarah Galvão pela amizade antiga e verdadeira.

A todos os amigos fitopatologistas que me auxiliaram grandemente ao longo desta caminhada, em especial à Tiarla Souto.

Aos familiares que torcem pelo meu sucesso e se alegram com minhas vitórias.

Ao meu namorado Pedro Confort pelo apoio constante, amor e companheirismo.

Aos meus pais João Bosco Bibiano e Maria Aparecida Bibiano e irmã Aline Bibiano, pelo apoio emocional e por sempre lutarem ao meu lado. Amo vocês!

Obrigada a todos!

“Knowing where you came from is no less important than knowing where you are going.”

“A great challenge of life: Knowing enough to think you are right, but not know enough to know that you are wrong.”

Neil DeGrasse Tyson

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Referências	14
2. DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ZYMV E ANÁLISE DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO ACESSO PI414723	19
RESUMO	19
ABSTRACT	21
2.1. Introdução	20
2.2. Materiais e Métodos	23
2.2.1. Quantificação do ZYMV por qPCR	23
2.2.2. Inoculação do ZYMV	26
2.2.3. Quantificação do ZYMV por qPCR	27
2.2.4. Expressão de genes da via da resistência sistêmica adquirida (RSA)	28
2.2.5. Recuperação biológica do ZYMV	29
2.2.6. Teste de reação de hipersensibilidade (RH)	30
2.3. Resultados.....	31
2.3.1. Curva padrão e quantificação do vírus por qPCR.....	31
2.3.2. Expressão de genes da via da resistência sistêmica adquirida (RSA)	32
2.3.3. Recuperação biológica do ZYMV	32
2.3.4. Teste de reação de hipersensibilidade (RH)	33
2.4. Discussão.....	33
2.5. Conclusões.....	36
Referências	37
Apêndices	42
3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS NO LOCUS ZYM-1 DE RESISTÊNCIA AO ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS EM MELÃO	51
RESUMO	51
ABSTRACT	53
3.1. Introdução	52
3.2. Materiais e Métodos	54
3.2.1. Material vegetal	54

3.2.2. Inoculação com ZYMV	55
3.2.3. Identificação de genes candidatos de resistência ao ZYMV localizados no cromossomo 2.....	55
3.2.4. Expressão dos genes candidatos.....	57
3.3. Resultados	57
3.3.1. Identificação de genes candidatos de resistência ao ZYMV localizados no cromossomo 2.....	57
3.3.2. Seleção de genes normalizadores	59
3.3.3. Quantificação do ZYMV	59
3.3.4. Expressão dos genes candidatos.....	60
3.4. Discussão	61
3.5. Conclusões	65
Referências.....	65
Apêndices	72

RESUMO

Caracterização dos mecanismos de defesa do acesso PI414723 de *Cucumis melo* L. ao *Zucchini yellow mosaic virus* e seleção de candidatos a genes de resistência no *locus Zym-1*

O zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) é um patógeno que apresenta elevado potencial de dano para a cultura do meloeiro. O controle genético desse vírus é a forma mais eficiente de manejo e o acesso PI414723 é a única fonte de resistência efetivamente utilizada em programas de melhoramento. Sua resistência é controlada ao menos por um *locus* dominante, denominado *Zym-1*. Este estudo objetivou: *i*: caracterizar o mecanismo de resistência de PI414723 ao ZYMV relacionado à infecção, multiplicação e/ou invasão sistêmica viral e *ii*: selecionar genes candidatos de resistência no *locus Zym-1* utilizando as informações de mapas genéticos de meloeiro associados à sequência do genoma de *Cucumis melo* e quantificar os níveis de expressão dos genes selecionados. Para tanto, uma metodologia de quantificação absoluta do ZYMV por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi desenvolvida a fim de comparar o número de partículas virais entre os genótipos resistente PI414723 (PI) e suscetível 'Védraçais' (Ved). Para caracterizar a resistência em PI, o vírus foi inoculado na metade dos cotilédones de ambos os genótipos, os quais foram divididos em regiões inoculadas (I) e não inoculadas (NI). O vírus foi quantificado nessas regiões e foi realizada a recuperação biológica de partículas virais aos 3, 7 e 10 dias após a inoculação (dai) e em folhas apicais aos 10 dai. Ainda, foi avaliado se o mecanismo de resistência envolve uma reação de hipersensibilidade (RH) no ponto de inoculação assim como ativação da resistência sistêmica adquirida (RSA), através da análise da expressão de genes que codificam proteínas PR. Em todos os tempos e tecidos analisados, os títulos virais foram maiores em Ved em comparação à PI. O vírus não foi detectado em folhas apicais de PI, mas o foi em alto título em Ved aos 10 dai. Foi observada a formação de RH em cotilédones de PI às 12 e 24 horas após a inoculação, e o mesmo não foi observado em cotilédones de Ved. Os genes PR1 e PR4 foram positivamente regulados somente em PI após a inoculação. Tomados em conjunto, os resultados mostram que o vírus infecta e se multiplica em ambos os genótipos, mas não invade PI sistemicamente. Além disto, ocorre ativação da RSA no genótipo resistente e o vírus fica restrito ao ponto de inoculação devido ao mecanismo de RH. Em relação à escolha de candidatos no *locus Zym-1*, 13 genes foram selecionados no cromossomo 2 com base em seus domínios funcionais envolvidos na resistência ao vírus. A expressão dos candidatos foi analisada em cotilédones às 12 e 24 horas após a inoculação (hai) e o vírus foi quantificado nesses tempos e aos 7 dias após a inoculação (dai). O título viral não variou entre os genótipos às 12 hai, mas foi maior em Ved às 24 hai. Dois genes foram positivamente regulados às 12 hai em PI, os quais correspondem a cópias do gene RTM2 (*restricted TEV movement 2*), responsável por restringir o movimento de vírus a longa distância. Já às 24 hai, dois análogos de genes de resistência (RGA) foram negativamente regulados em Ved. Um desses RGAs codifica uma proteína CC-NB-LRR com domínio adicional *Rx-like* de reconhecimento de vírus e este foi positivamente regulado em PI. Portanto, mecanismos de defesa distintos são ativados no genótipo PI414723 em resposta à infecção pelo ZYMV, resultando na resistência à invasão sistêmica viral.

Palavras-chave: ZYMV, Melão, Quantificação viral, Genes R, Melhoramento genético

ABSTRACT

Characterization of defense mechanisms of PI414723 accession from *Cucumis melo* L. to the Zucchini yellow mosaic virus and selection of resistance candidate genes at the *Zym-1* locus

The zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is a pathogen that is able to severely reduce the yield of melon plants. The use of genetic control is the most efficient way of management for this virus, and the PI414723 (PI) melon accession is the only source of resistance effectively used in breeding programs. The PI resistance is controlled by at least a dominant *locus* called *Zym-1*. The objective of this study was: i: to characterize the mechanism of PI414723 resistance to ZYMV related to infection, multiplication and/or systemic viral spread and ii: to select resistance candidate genes at the *Zym-1* locus using the information from genetic maps associated with the genome sequence of *Cucumis melo*, and then quantify the expression levels of the selected genes. Therefore, a methodology for absolute quantification of ZYMV by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was developed to compare the number of viral particles between the resistant PI and susceptible 'Védraçais' (Ved) genotypes. To characterize the resistance in PI, the virus was inoculated into one half of the cotyledons of both genotypes, which were divided into inoculated (I) and non-inoculated (NI) regions. The virus was quantified in these regions and biological recovery of the viral particles was carried out at 3, 7 and 10 days after inoculation (dai) and in apical leaves at 10 dai. Furthermore, it was evaluated whether the resistance mechanism involves a hypersensitive reaction (HR) at the inoculation site as well as activation of the systemic acquired resistance mechanism (SAR), through the analysis of the expression of genes encoding PR proteins. In all evaluation times and analyzed tissues, viral titers were higher in Ved compared to PI. The virus was not detected in PI apical leaves, but it was highly detected in Ved at 10 dai. HR was observed in PI cotyledons at 12 and 24 hours after inoculation, the same was not observed in Ved cotyledons. The PR1 and PR4 genes were up regulated only in PI after inoculation. Taken together, the results show that the virus infects and multiplies in both genotypes but does not invade PI systemically. In addition, the SAR mechanism is activated in the resistant genotype and the virus is restricted to the inoculation site due to HR. Regarding the selection of candidate genes at the *Zym-1* locus, 13 genes were selected on chromosome 2 based on their protein domains involved in virus resistance. The expression of the candidate genes was analyzed in cotyledons at 12 and 24 hours after inoculation (hai) and the virus was quantified at these same periods, as well as at 7 days after inoculation (dai). The viral titer did not vary between genotypes at 12 hai, but was higher in Ved at 24 hai. Two genes were up regulated at 12 hai in PI, which are copies of the RTM2 gene (restricted TEV movement 2), responsible for restricting the virus long distance movement. At 24 hai, two resistance gene analogs (RGA) were down regulated in Ved. One of these RGAs encodes a CC-NB-LRR protein with additional virus recognition domain (*Rx-like*) and has been up regulated in PI. Therefore, distinct mechanisms are activated in PI414723 in response to ZYMV infection, enabling this PI to resist systemic viral spread.

Keywords: ZYMV, Melon, Virus quantification, R genes, Plant breeding

1. INTRODUÇÃO GERAL

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma cultura de grande importância ao comércio exterior brasileiro; em 2018 o país produziu 581.478 toneladas do fruto (FAOSTAT statistical database 2018) das quais mais de 233 mil toneladas foram exportadas, gerando uma receita de US\$ 162 milhões (“Anuário Brasileiro da Fruticultura,” 2018). Cerca de 90% das exportações brasileiras são destinadas ao mercado europeu, principalmente para a Holanda, Reino Unido e Espanha. Contudo, é fundamental que os produtores estejam preparados para esse mercado externo exigente por frutos de alta qualidade, sobretudo quanto à padronização no seu tamanho e às restrições fitossanitárias locais. O investimento em melhoramento genético no passado trouxe características importantes ao fruto, posicionando o Brasil em 2011 na liderança em produtividade da América do Sul (Guimarães & Aragão, 2019; Nick & Borém, 2019).

O cultivo dessa cucurbitácea se concentra principalmente na região Nordeste, nos polos de Mossoró, Baixo Jaguaribe e Submédio São Francisco, onde o zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) causa danos à cultura (Lima, 2011; Pavan, Rezende, & Krause-Sakate, 2016). Pertencente ao gênero *Potyvirus* e transmitido por afídeos, esse vírus compromete a fotossíntese, resultando em severo mosaico amarelo, formação de bolhas, redução do limbo foliar e do desenvolvimento da planta. A qualidade dos frutos também é severamente afetada devido à sua malformação, o que impede sua comercialização (Lima, 2011; Pavan et al., 2016).

O controle genético do ZYMV é a forma mais viável de manejo para a cultura, pois não onera a produção tanto quanto o controle químico e não impacta o meio ambiente. Existem quatro acessos resistentes a este vírus: IC274007, IC274014 (Dhillon et al., 2007), AM87 (Fergany et al., 2011) e PI414723 (Danin-poleg, Tadmor, Tzuri, Reis, & Hirschberg, 2002; Desbiez & Lecoq, 1997), sendo este último (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*) a única fonte de resistência efetivamente utilizada em programas de melhoramento (Danin-poleg et al., 2002; Desbiez & Lecoq, 1997). Além de resistente ao patótipo 0 de ZYMV, também o é a oito raças de *Podosphaera xanthii*, ao watermelon mosaic virus (WMV), ao papaya ringspot virus estirpe melancia (PRSV-W), ao pulgão *Aphis gossypii* e a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Pitrat and Lecoq 1984; Anagnostou et al. 2000; Fazza et al. 2013).

Por ser um acesso de ampla utilização, há uma boa gama de informações sobre a genética da resistência de PI414723 ao ZYMV, em especial ao *locus Zym-1*. O

primeiro mapa genético de meloeiro (Pitrat, 1991) localizou *Zym-1* no grupo de ligação denominado inicialmente de 4, ligado aos genes *Pm-x*, “a” e “h”, que controlam respectivamente resistência a oídio, presença ou ausência de estames (gene andromonóico) e a característica de halo clorótico cotiledonar. Posteriormente, foi posicionado no grupo de ligação 2 (LGII), próximo ao marcador microssatélite CMAG36 (Périn et al., 2002). Trabalhos subsequentes analisando cruzamentos entre este acesso e a cultivar suscetível “Dulce” indicaram a possibilidade da existência de outros dois *loci*, posteriormente denominados de *Zym-2* e *Zym-3* (Danin-poleg, Paris, Cohen, Rabinowitch, & Karchi, 1997). Portanto, a resistência parece ser oligogênica e conferida por três genes de ação dominante ou aditiva. No entanto, a localização do *Zym-2* ainda é imprecisa. Esse *locus* foi relatado como supostamente ligado ao marcador microssatélite CMCT134b no grupo de ligação 10 (LGX) (Danin-poleg et al., 2002) e nosso grupo de pesquisa gerou informações preliminares que parecem confirmar sua localização neste grupo, porém próximo aos marcadores microssatélites CMBR55, CMN04_09 e MU6549 (Bibiano, 2016; Wassano, 2014). No entanto, faz-se necessário uma maior saturação da região com marcadores para a identificação mais precisa do gene. A localização de *Zym-3*, se de fato existir, ainda é desconhecida.

Diferente dos mapas genéticos, construídos a partir dos padrões de co-segregação entre genes e/ou marcadores, os mapas genômicos são construídos pela determinação da ordem correta das sequências de DNA do genoma e, portanto, expressam a distância física real entre os genes (O’Rourke, 2014). Tendo em vista a disponibilidade da sequência do genoma de *Cucumis melo* L. (Garcia-Mas et al. 2012; Ruggieri et al. 2018), a análise integrada dos mapas genéticos (aqui também denominados de mapas de ligação) e genômicos é o passo inicial na identificação de genes cujos efeitos fenotípicos foram previamente associados a marcadores moleculares. Isto é, através da localização de marcadores ligados a um *locus* responsável por determinada característica fenotípica, em um mapa genômico é possível identificar neste *locus* gene(s) responsáveis pela característica em questão. Contudo, um dos desafios dessa abordagem é que não existe correlação entre as distâncias genéticas, expressas em cM, e as físicas (genômicas), expressas em pb (Brown, 2002). Além disso, um *locus*, aqui entendido como uma região cromossômica, abriga vários genes (Brown, 2002) e, assim, análises adicionais são necessárias para identificar qual(is) o(s) gene(s) responsável(eis) pela característica em questão. Análises bioinformáticas e de expressão gênica permitem identificar genes mais

prováveis (candidatos) e, em última instância, estabelecer relações diretas entre fenótipo e genótipo através de mutações nos genes candidatos.

Os mecanismos de resistência de plantas a viroses podem ser agrupados em passivos ou ativos (Cosson et al., 2012). No primeiro caso, a resistência resulta de uma incompatibilidade entre genes da planta e do patógeno que interferem em sua replicação; como exemplos destes temos os fatores eucarióticos de iniciação da tradução (*eukaryotic translation initiation factors*- eIF) (Robaglia & Caranta, 2006). Os vírus dependem desses fatores para sintetizar suas proteínas e, portanto, plantas mutantes para estes fatores são resistentes, pois restringem o movimento célula-a-célula das partículas virais. Por serem mutantes, estes genes de resistência geralmente são recessivos (Diaz-Pendon et al., 2004). Já a resistência ativa decorre do reconhecimento pelo hospedeiro de fatores virais e pode atuar por dois mecanismos: o primeiro mediado por genes R dominantes que ativam uma resposta de hipersensibilidade (RH) logo no início da infecção e o segundo representado pelo sistema de RNA interferente (RNAi), mediado por famílias multigênicas de enzimas que geram pequenos RNAs interferentes a partir do RNA dupla fita (dsRNA) produzido durante a replicação do vírus e direcionam o material genético viral para silenciamento pós-transcricional (Hull 2014; Pooggin 2017) .

Os genes R são componentes essenciais do sistema imune das plantas e codificam proteínas que reconhecem, diretamente ou indiretamente, padrões moleculares associados à interação com o hospedeiro. Estes tem uma expressão que pode variar consideravelmente sob diferentes condições (MacQueen & Bergelson, 2016) e possuem domínios facilmente identificáveis por análises bioinformáticas. A maioria dos genes R que atuam contra vírus são da classe NB-LRR, isto é, possuem um domínio de adesão de nucleotídeos-NB e uma região rica em leucina-LRR (Gururani et al., 2012). Na resistência mediada por genes R a infecção viral é inibida através do mecanismo de RH, que geralmente é caracterizado pelo aparecimento de lesões necróticas visíveis devido à morte celular. Desse modo, a RH, ao restringir o vírus ao local de infecção, por consequência também restringe seu movimento sistêmico (Hull, 2014). Embora a necrose do tecido seja facilmente observada a olho nu como uma lesão local na maioria dos casos, existem situações nas quais essas lesões somente são observadas após a remoção da clorofila (Lindner, Kirkpatrick, & Weeks, 1959). Ainda nesta classe de genes, existem genes R atípicos que atuam contra potyvirus, pois não possuem os domínios NB-LRR, não ativam a RH e não

restringem localmente a replicação viral e sua movimentação célula-a-célula, mas interferem em sua movimentação a longas distâncias. Denominados genes RTM (*Restricted TEV Movement*), atualmente são conhecidos três: RTM1 codifica uma proteína da família jacalina (uma lecitina), RTM2 uma proteína similar a uma proteína de choque térmico (*heat shock protein*) e RTM3 uma proteína que interage com RTM1 através de seu domínio *coiled-coil* (Cosson et al., 2012).

No presente estudo, o mecanismo de resistência de PI414723 ao ZYMV foi caracterizado a fim de compreender se ocorre impedimento à infecção, multiplicação e/ou invasão sistêmica viral, utilizando uma metodologia desenvolvida para a quantificação do ZYMV por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Em uma segunda parte, o trabalho identificou genes candidatos localizados no *locus Zym-1* utilizando informação genética e genômica do meloeiro através da análise do contexto gênico desse *locus*. Foram utilizadas as premissas de que esses candidatos codificam domínios proteicos de reconhecimento de vírus e que sua expressão é induzida sob inoculação com o ZYMV. Os resultados indicaram que o *locus Zym-1* compreende um cluster de genes que atuam conjuntamente, porém com mecanismos de resistência distintos.

Referências

- Anagnostou, K., Jahn, M., & Perl-Treves, R. (2000). Inheritance and linkage analysis of resistance to zucchini yellow mosaic virus, watermelon mosaic virus, papaya ringspot virus and powdery mildew in melon. *Euphytica*, 116(3), 265–270. <https://doi.org/10.1023/A:1004005716806>
- Anuário Brasileiro da Fruticultura. (2018). Gazeta, 88.
- Bibiano, L. B. J. (2016). Análise de ligação do gene de resistência Zym-2 com marcadores microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV).
- Brown, T. A. (2002). Genomes. In *Genomes*. Wiley-Liss.
- Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Le Gall, O., Candresse, T., & Revers, F. (2012). The RTM Resistance to Potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural Variation of the RTM Genes and Evidence for the Implication of Additional Genes. *PLoS ONE*, 7(6), e39169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039169>

- Danin-poleg, Y., Paris, H. S., Cohen, S., Rabinowitch, H. D., & Karchi, Z. (1997). Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. 1, 331–337.
- Danin-poleg, Y., Tadmor, Y., Tzuri, G., Reis, N., & Hirschberg, J. (2002). Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. 4, 373–384.
- Desbiez, C., & Lecoq, H. (1997). Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46(06), 809–829. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x>
- Dhillon, N. P. S., Ranjana, R., Singh, K., Eduardo, I., Monforte, A. J., Pitrat, M., Dhillon, N. K., & Singh, P. P. (2007). Diversity among landraces of Indian snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(6), 1267–1283. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9108-2>
- Diaz-Pendon, J., Truniger, V., Nieto, C., J. G.-M., Bendahmane, A., & Aranda, M. (2004). Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 5(3), 223–233. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00223.X>
- FAOSTAT statistical database. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fazza, A. C., Dallagnol, L. J., Monteiro, C. C., Lima, B. M. Wassano, D. T., & Camargo, L. E. A. (2013). Mapping of resistance genes to races 1, 3 and 5 of *Podosphaera xanthii* in melon PI 414723. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13(4), 349–355. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000400005>
- Fergany, M., Balvir Kaur, A. J., Monforte, A. J., Pitrat, M., Rys, C., Lecoq, H., Dhillon, N. P. S., & Dhaliwal, S. S. (2011). Variation in melon (*Cucumis melo*) landraces adapted to the humid tropics of southern India. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2 (58), 225-243. (2011).
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., Hénaff, E., Câmara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., others, Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blanca, J., Cañizares, J., Ziarso, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., ... Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
- Guimarães, M. A., & Aragão, F. A. S. (2019). *Produção de Melão* (Editora UFV (Ed.); 1st ed.).

- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51–65. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2012.01.002>
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5th ed.). Academic Press.
- Lima, M. F. (2011). *Víroses de Cucurbitáceas*. Embrapa Hortaliças - Circular Técnica 95.
- Lindner, R., Kirkpatrick, H., & Weeks, T. (1959). Some factors affecting the susceptibility of cucumber cotyledons to infection by tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 49, 78–88.
- MacQueen, A., & Bergelson, J. (2016). Modulation of R-gene expression across environments. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2093–2105. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv530>
- Nick, C., & Borém, A. (2019). *Melão do Plantio à Colheita* (1st ed.). Editora UFV.
- O'Rourke, J. A. (2014). Genetic and Physical Map Correlation. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000819.pub3>
- Pavan, M. A., Rezende, J. A. M., & Krause-Sakate, R. (2016). Doenças das Cucurbitáceas. In *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas* (pp. 323–334).
- Périn, C., Hagen, S., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2002). A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 104(6–7), 1017–1034. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0864-x>
- Pitrat, M. (1991). Linkage Groups in *Cucumis melo* L. *Journal of Heredity*, 82(5), 406–411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111112>
- Pitrat, M., & Lecoq, H. (1984). Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. *Euphytica*, 33(1), 57–61. <https://doi.org/10.1007/BF00022750>
- Robaglia, C., & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2005.11.004>

- Ruggieri, V., Alexiou, K. G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., Benhamed, M., Bendahmane, A., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Puigdomènech, P., Casacuberta, J. M., & Garcia-Mas, J. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, 8(1), 8088. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2>
- Wassano, D. T. (2014). Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação de Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) em meloeiro [Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.11.2014.tde-20032014-170310>

2. DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ZYMV E ANÁLISE DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO ACESSO PI414723

RESUMO

O controle do zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) em melão se dá por meio de variedades resistentes. O acesso PI414723 (PI) é uma fonte doadora do gene dominante *Zym-1*. Contudo, o mecanismo de resistência deste acesso ainda é desconhecido. A infecção, replicação e invasão sistêmica do vírus foi avaliada em PI e no genótipo suscetível 'Védrantais' (Ved) pela quantificação do ZYMV por meio de RT-qPCR aos 3, 7 e 10 dias após a inoculação (dai) em regiões inoculadas (I) e não-inoculadas (NI) dos cotilédones e em folhas apicais aos 10 dai. Também foram avaliadas a expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida (RSA) e a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade (RH). Os resultados do qPCR foram validados por teste de recuperação biológica do vírus. No genótipo suscetível o vírus foi quantificado sempre em maior título do que no resistente tanto em áreas cotiledonares I como em NI nos três tempos de avaliação. Além disto, o ZYMV foi detectado em folhas apicais aos 10 dai, o que não foi verificado em PI. Os resultados foram corroborados pelos ensaios de recuperação biológica, pois o vírus somente foi recuperado de áreas I de cotilédones oriundos de PI aos 3 dai e de Ved o foi de todos os tecidos avaliados. Isso mostra que o vírus infecta e se multiplica em ambos os genótipos, mas não invade PI sistemicamente. Foi observada a formação de RH em cotilédones inoculados de PI às 12 e 24 horas após a inoculação, e o mesmo não foi observado em cotilédones de Ved. Em relação aos genes ativados, PR1 e PR4 aumentaram sua expressão em PI após a inoculação com o vírus, algo não observado em Ved. O gene PR-4 foi diferencialmente expresso nos genótipos aos 3 dai nas áreas I de cotilédones, sendo essa expressão positivamente regulada em PI e negativamente em Ved. Portanto, ocorre ativação da RSA em PI414723.

Palavras-chave: *Cucumis melo*, Título viral, PCR quantitativo

ABSTRACT

The control of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in melon crop is mainly through resistant varieties. PI414723 (PI) accession is a source of the *Zym-1* dominant resistance gene. However, its mechanism of resistance is still unknown. The virus infection, replication and systemic invasion were evaluated in both resistant PI and the susceptible genotype 'Védrantais' (Ved) by ZYMV quantification using RT-qPCR at 3, 7 and 10 days after inoculation (dai) in inoculated (I) and non- inoculated (NI) areas from cotyledons, and in apical leaves at 10 dai. The expression of genes related to systemic acquired resistance (SAR) and the occurrence of a hypersensitive response were also evaluated. The results of qPCR were validated by the biological test through virus recovery. The viral titer was greater in the susceptible genotype at all times compared to the resistant genotype, both in inoculated and non-inoculated cotyledon areas. In addition, ZYMV was detected in apical leaves at 10 dai, which was not verified in PI. The results were corroborated by the biological recovery assays, as the virus was only recovered from cotyledon I areas of PI at 3 dai, and from all evaluated tissues of Ved. It concludes that the virus infects and multiplies

within both genotypes but does not invade PI systemically. The formation of HR was observed in inoculated cotyledons of PI genotype at 12 and 24 hours after inoculation, and the same was not observed for Ved. PR1 and PR4 genes were up regulated in PI after virus inoculation, which was not observed in Ved. The PR-4 gene was differentially expressed in the I areas of cotyledons at 3 dai, which was positively regulated in PI and negatively in Ved. Therefore, the SAR mechanism is activated in PI414723.

Keywords: *Cucumis melo*, Viral titer, Quantitative PCR

2.1. Introdução

O melão está entre as dez frutas mais produzidas mundialmente, alcançando uma produção de 27 milhões de toneladas em 2018. A China é o maior produtor do fruto e também possui a maior área cultivada, sendo responsável por quase 55% da produção mundial (FAOSTAT 2018). Em relação à área plantada, o melão ocupa aproximadamente 1.050.000 de ha no mundo e, no Brasil, essa área abrange 23 mil ha. No país, 43% do montante produzido em 2018 (581.478 ton) foi destinado as exportações principalmente para a Europa (“Anuário Brasileiro da Fruticultura,” 2018).

O agronegócio do melão possui importância econômica estratégica para o Nordeste brasileiro, pois a região é responsável por 95% da produção e pela totalidade das exportações (Guimarães & Aragão, 2019; Nick & Borém, 2019). A região apresenta condições edafoclimáticas ideais para o cultivo dessa olerícola como níveis elevados de radiação solar e altas temperaturas, o que permite até três safras anuais. As principais variedades de melão cultivadas no país pertencem ao grupo Inodorus, onde se inclui o popular melão ‘Amarelo’. Contudo, existe uma tendência no mercado de aumento na procura por melões de outros grupos como o Cantalupensis, que possuem a polpa salmão e alto teor brix. A expansão na produção de outros tipos de melão como como Pele de Sapo, Gália e Charentais está ligada à preferência do mercado europeu. As principais cultivares exploradas no país são híbridas. Em geral, as sementes destas são mais caras, porém são de preferência dos produtores por apresentarem maior uniformidade de frutos e maior produtividade. Desse modo, o melhoramento genético de meloeiro se direciona à seleção de cultivares híbridas mais adaptadas às condições de cultivo na região e, também, à resistência múltipla a pragas e doenças (Guimarães & Aragão, 2019; Nick & Borém, 2019).

O mosaico amarelo, que tem como agente causal o zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), tem distribuição mundial e causa sensíveis danos à cultura (Simmons

et al., 2013). Além do mosaico internerval característico, os sintomas do ZYMV incluem subdesenvolvimento da planta e mancha nos frutos, podendo inviabilizar sua comercialização e levar a uma queda de até 94% da produção, como foi relatado na Califórnia-EUA (Blua & Perring 1989). Estudos recentes mostraram um aumento na incidência desse vírus em diferentes estados brasileiros, estando atrás somente do PRSV-W (Lima, 2011; Pavan et al., 2016). Isso é preocupante, pois em países onde o ZYMV é predominante, os danos na produção são drásticos (Pavan et al., 2016). O ZYMV pertence ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*, que abrange vírus de RNA. Seu genoma codifica uma poliproteína que ao ser clivada por proteases dá origem a nove proteínas e, dentre essas, a da capa proteica (CP) de aproximadamente 36kDa (Desbiez & Lecoq, 1997). A transmissão do ZYMV ocorre pelos afídeos vetores *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* através da interação entre o estilete do pulgão e das proteínas virais CP e HC-Pro (Helper Component-Proteinase) de maneira não-persistente, ou seja, durante as picadas de prova do inseto (Simmons et al., 2013).

Apesar de não codificarem uma única proteína destinada ao seu movimento, os potyvirus utilizam outras proteínas para esta função. Até o momento, pelo menos cinco proteínas virais são conhecidas por estarem envolvidas no movimento de potyvirus: CP, HC-Pro, de inclusão cilíndrica (CI), a “pretty interesting potyvirus ORF” (P3N-PIPO) e a proteína ligada ao genoma viral (VPg) (Dunham, Simmons, Holmes, Stephenson, & Simmons, 2014). Caso ocorram mutações nessas proteínas, seu movimento à longa distância pode ser prejudicado (Vuorinen, Kelloniemi, & Valkonen, 2011). A CP é necessária para o movimento a longa distância, podendo também facilitar o movimento célula-a-célula ao se ligar ao RNA viral, permitindo a passagem via plasmodesma. Ademais, a HC-Pro pode ter a função de aumentar a permeabilidade dos plasmodesmas durante o movimento do vírus. Já a CI está envolvida no movimento célula-a-célula guiando o complexo CP-RNA até o plasmodesma com auxílio da P3N-PIPO. A proteína VPg possui papel semelhante ao cap 5' do RNA mensageiro, e mutações nessa proteína levam a redução do movimento sistêmico viral (Dunham et al., 2014). Para ocorrer a infecção sistêmica é necessário o movimento do vírus célula-a-célula via plasmodesmas e para outros tecidos via floema. Isso requer o movimento a partir da epiderme até as células do mesofilo ou para outras células, como do parênquima, para então atingir os elementos de vaso. Dessa forma, o movimento viral segue o mesmo caminho dos fotoassimilados

(Dunham et al., 2014; Hull, 2014; Simmons et al., 2013). Em *Cucurbita pepo* L., espécie altamente suscetível ao ZYMV, foi demonstrado que após a inoculação dos cotilédones o vírus se movimenta para as raízes 3 dias após a inoculação (dai), para a haste aos 5 dai, para a primeira folha verdadeira aos 7 dai e, finalmente, pode ser detectado em todas as partes da planta aos 9 dai (Zellnig, Pöckl, Möstl, & Zechmann, 2014).

O acesso PI414723 é uma fonte de resistência pertencente ao grupo *Momordica* (melões indianos) amplamente utilizada em programas de melhoramento. Os acessos desse grupo são sexualmente compatíveis com melões comerciais e, portanto, são utilizados para o desenvolvimento de novas variedades (Román, Gómez, Picó, López, & Janssen, 2018). Além de ser resistente ao ZYMV, também o é ao *Papaya ringspot virus*, ao afídeo *A. gossypii* e ao fungo *Podosphaera xanthii* (McCreight, Bohn, & Kishaba, 1992). A herança genética da resistência de PI414723 ao ZYMV foi previamente caracterizada (Danin-poleg et al., 1997, 2002; Périn et al., 2002; Pitrat, 1991). É controlada supostamente por três *loci*, sendo o principal denominado *Zym-1*, localizado no cromossomo 2, e outros dois *loci* de efeito menor, denominados *Zym-2* e *Zym-3*, de localização cromossômica ainda incerta (Danin-poleg et al., 1997). Desse modo, a presença dos três genes é necessária para que ocorra resistência completa ao vírus (Lecoq & Katis, 2014). No entanto, a reação deste acesso varia em relação ao patótipo do ZYMV: o patótipo 0 não causa sintomas; o 1 causa necrose sistêmica e o 2 causa amarelecimento, mosaico e deformação das folhas (Pitrat & Lecoq, 1984).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de resistência aos vírus. A resistência passiva resulta de uma interação incompatível entre planta-vírus que leva ao impedimento de alguma etapa do ciclo de multiplicação viral e é controlada, em geral, por genes de resistência recessivos nos quais os fatores de iniciação da tradução da família eIF4 são exemplos. Neste sentido, plantas mutantes para estes fatores são resistentes, pois restringem o movimento das partículas virais (Robaglia & Caranta, 2006; Sanfaçon, Sanfaçon, & Hélène, 2015). Já a resistência ativa ocorre quando há reconhecimento direto de proteínas virais que culmina na ativação de mecanismos de resistência e pode ocorrer por dois mecanismos. No primeiro, a resistência é controlada por genes R de ação dominante, caracterizada por uma reação de hipersensibilidade (RH) que não inibe a replicação viral e o movimento célula-a-célula inicial para as células do mesófilo, porém bloqueia a entrada do vírus

para o transporte a longa distância através do floema (Vuorinen et al. 2011). A explosão oxidativa que ocorre durante a RH possui um papel importante na mediação da expressão de genes relacionados à defesa (Hull, 2014). A cascata de sinalização do sistema de defesa pode ocorrer de forma local ou sistêmica, esta última desencadeada em outras partes da planta e denominada de resistência sistêmica adquirida (RSA) (Hull 2014). A RSA é caracterizada pela ativação de genes relacionados à patogênese (genes PR), que compreendem elementos importantes do sistema de defesa do hospedeiro (Jain & Khurana, 2018; Musidlak, Nawrot, & Goździcka-Józefiak, 2017). O segundo mecanismo da resistência ativa envolve o sistema de RNA de interferência que tem como alvo a degradação do genoma viral, direcionando seu material genético para o silenciamento pós-transcricional. Um último mecanismo de resistência não envolve o reconhecimento direto do vírus e nem resulta em morte dos tecidos. Este é controlado por genes R atípicos denominados de RTM (*Restricted TEV movement*), que atuam restringindo o movimento a longa distância do vírus (Cosson et al., 2012; Hull, 2014).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a natureza da resistência de PI414723 em comparação ao genótipo suscetível 'Védrantais', relativa à capacidade de infecção, multiplicação e invasão sistêmica do ZYMV. Para tanto, o vírus foi quantificado por um protocolo inédito de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e recuperado de áreas inoculadas e não inoculadas de cotilédones. Também foram investigadas a ocorrência de uma reação de hipersensibilidade por microscopia e a expressão de genes PR ligados à RSA. Essa caracterização fornece informação relevante para compreender o papel de genes de resistência candidatos no mecanismo de defesa ao ZYMV, tópico que será abordado no capítulo seguinte.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Quantificação do ZYMV por qPCR

2.2.1.1. Clonagem do gene da capa proteica

Um protocolo de quantificação do ZYMV por qPCR em tempo real baseado no gene da capa proteica viral (CP) de um isolado chinês (GenBank: AF513552.1) foi

desenvolvido a partir de metodologia descrita por Zeng et al. (2007). O desenvolvimento de um novo protocolo foi necessário já que as sequências dos genes da CP de isolados brasileiros divergem em relação ao isolado usado por Zeng et al. 2007 na região de anelamento do *primer forward* (Figura 1) e também porque o protocolo destes autores não permite a quantificação absoluta do patógeno.

A sequência do gene CP do isolado ZYMV-RN oriundo do Rio Grande do Norte (GenBank: JX502668.1) (Spadotti et al., 2015) foi utilizada para o desenho dos *primers* CPF/CPR2 (F: GGTTATGATGGACGGGAATG e R: ATATCGTGCCAACTCCTATCC), os quais amplificam um fragmento de 199 pb. Para a extração de RNA e síntese de cDNA do ZYMV, foram utilizadas folhas apicais infectadas do genótipo suscetível 'Védrantais'. A extração de RNA e síntese do cDNA foram realizadas como explicitado no item 2.2.3. O fragmento foi amplificado por uma reação de PCR composta por 3,25µl de água livre de nucleases, 6,25µl de Go Taq® Colorless Master Mix (Promega®), 0,5µl de MgCl₂ (25mM), 0,5µl de cada primer a 5uM (CPF e CPR2) e 1,5µl de cDNA para um volume final de 12,5 µL. Foi utilizada desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C, por 45 segundos, extensão a 72°C por 1,5 min e extensão final a 72°C por 5 min.

O fragmento foi purificado utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), clonado no vetor pGEM®- T Easy Vector System II (Promega®) e transformado em *Escherichia coli* JM109 (High Efficiency Competent Cells (Promega®)). A reação de ligação do fragmento ao plasmídeo utilizou 2,5 µL do produto amplificado, 1 µL do vetor (25 ng. µL⁻¹), 5 µL de tampão ligase 2X, 1 µL de T4DNA ligase (3 U. µL⁻¹) e 0,5 µL de água deionizada autoclavada, totalizando 10 µL de volume final de reação. A reação foi incubada por 12 horas a 4°C.

Células competentes de *E. coli* (50 µL de células na concentração de 0,1ng/µL), foram incubadas com 2 µL do produto da ligação em gelo por 30 minutos, submetidas a um choque térmico a 42 °C por 50 segundos e incubadas no gelo por 2 minutos. Após este tratamento, adicionou-se 250 µL de meio SOC (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,001 mM MgCl, 0,02 mM de glicose e água até completar o volume de 1000 mL) e as células foram cultivadas sob agitação a 200 rpm por 2 horas a 37 °C. Aliquotas de 80, 50, 25 e 10 µL da suspensão bacteriana foram plaqueadas em meio LB (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,6% de ágar) contendo ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-

galactopiranosida) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) nas concentrações finais de 100 mg.mL⁻¹, 4% e 20%, respectivamente e incubadas a 37 °C por 12 horas. Colônias brancas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL contendo o meio TB (1,2 % de triptona, 2,4 % extrato de levedura, 0,4% Glicerol, 17 mM fosfato de potássio, monobásico (KH₂PO₄), 72 mM fosfato de potássio, dibásico (K₂HPO₄) e pH 7.0) e ampicilina (100 mg.mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 12 horas sob agitação a 200 rpm.

Os plasmídeos foram extraídos com o kit Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para confirmação da clonagem do fragmento realizou-se uma reação de PCR com o par de *primers* CPF/CPR2, como descrito anteriormente.

2.2.1.2. Construção de curva padrão de quantificação do vírus a partir do DNA plasmidial

A quantificação absoluta do vírus se baseou no número de cópias do gene da capa proteica (CP) que está presente em cópia única no genoma do vírus; portanto, cada cópia do gene CP detectado na reação de qPCR corresponde a uma partícula viral. Diluições seriadas do plasmídeo recombinante de 3.199 pb com a sequência parcial do gene CP (3.000 pb do vetor e 199 pb do inserto) foram utilizadas para a construção da curva de quantificação do ZYMV. O número de cópias do gene nas amostras-padrão foi calculado utilizando a fórmula: $Y \text{ moléculas de cDNA viral } \mu\text{L}^{-1} = (X \text{ g } \mu\text{L}^{-1} \text{ DNA plasmidial} / [\text{tamanho total do plasmídeo recombinante em pares de base} \times 660]) \times (6,022 \times 10^{23})$ (QIAGEN 2014). O estoque para construção da curva padrão foi preparado contendo 10⁹ cópias do gene/ μ L, a partir do qual foram feitas seis diluições em série de 10⁻¹ cada, resultando em concentrações de 10⁸ a 10³ cópias do gene/ μ L.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems®) utilizando o kit GoTaq Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em duplicatas técnicas em uma mesma placa, nas seguintes condições: 3,25 μ L de água livre de nucleases, 6,25 μ L de GoTaq® Master Mix (Promega)®, 0,5 μ L de cada *primer* (CPF e CPR2) a

10uM e 2µl de cDNA para um volume final de reação a 12,5 µL. Foi utilizada desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 segundos, e anelamento e extensão a 61°C por 45 segundos. Ao término da amplificação determinou-se a curva de dissociação do fragmento amplificado para verificar a especificidade do produto amplificado, com variação de temperatura de 60 a 95°C, intervalo de 0,2°C e leitura por 15 segundos. O logaritmo do número de cópias do gene CP correspondente a cada diluição foi plotado ao longo do eixo x e os valores de CT correspondentes ao longo do eixo y. A equação da regressão linear [$y = m \cdot x + b$] foi gerada no qual $y = CT$, $m = \text{declive}$, $x = \log$ do número de cópias (moléculas de cDNA viral μL^{-1}), $b = \text{intercepto}$, ou seja, $CT = m \cdot (\log \text{ do número de cópias}) + b$. Os valores de *cycle threshold* (CT) foram transformados de acordo com a eficiência da reação calculada pelo software LingReg PCR (Ramakers, Ruijter, Deprez, & Moorman, 2003).

2.2.2. Inoculação do ZYMV

Um experimento em casa de vegetação foi conduzido com o intuito de determinar se a resistência do acesso PI414723 ao vírus está relacionada à infecção, multiplicação e/ou invasão sistêmica e se a infecção ativa genes relacionados à resistência sistêmica adquirida (RSA). A motivação para o experimento foram evidências preliminares de que neste genótipo ao inocular-se os cotilédones o vírus é detectado neste tecido 24 horas após a inoculação (hai) mas não é detectado nas folhas apicais aos 7 e 21 dias após a inoculação (dai) (L. Bibiano, dados não publicados). Ademais, as plantas não apresentam sintomas. Em contraste, em plantas de 'Védrantais' o vírus é encontrado em alto título mesmo nas folhas apicais não inoculadas e os sintomas são intensos.

Quatro sementes de cada genótipo foram semeadas em vasos de 1 litro contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças-Vida Verde®. Após a germinação realizou-se o desbaste permanecendo 3 plantas por vaso. Cotilédones de plantas de PI414723 e de 'Védrantais' foram inoculados na metade mais externa (região I), sendo que a metade mais próxima ao caule não foi inoculada (região NI) (Figura 2). As plantas foram inoculadas duas vezes no período de 24 horas. A fonte de inóculo foi proveniente de folhas infectadas de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta'. As folhas foram maceradas em tampão de fosfato de potássio 0,02 M (pH 7,0) acrescido de sulfito de

sódio 0,02 M na proporção de 1:10 (p:v). O homogenato foi friccionado com carborundum na região de inoculação aos 14 dias após a semeadura. Tecidos das regiões I e NI foram coletados aos 3, 7 e 10 dai. Para observar se houve translocação do vírus para tecido jovem não inoculado, a primeira folha apical totalmente expandida foi coletada aos 10 dai.

O experimento consistiu de 8 tratamentos para cada genótipo que correspondem a plantas inoculadas com o vírus ou inoculadas somente com tampão, tecidos cotiledonares coletados aos 3, 7 e 10 dai e tecido da primeira folha apical totalmente expandida coletado aos 10 dai. As amostras de tecido cotiledonar foram coletadas nas áreas I e NI (Figura 2). O esquema experimental foi totalmente ao acaso com três repetições biológicas por tratamento compostas por três plantas cada. O experimento foi repetido uma vez.

2.2.3. Quantificação do ZYMV por qPCR

O material vegetal foi macerado em N₂ líquido e o RNA foi extraído com o kit PureLink RNA Mini kit (Invitrogen®) acrescido de 1mL de Trizol® para cada 100 mg de tecido vegetal macerado, de acordo com as recomendações do fabricante. Um gel de agarose a 1% foi preparado para verificar a qualidade do RNA. Após a extração, o RNA foi tratado com 1 uL de enzima DNase, utilizando o kit DNase I (Sigma-Aldrich®) seguindo o protocolo estabelecido. Posteriormente, o RNA foi quantificado em aparelho NanoDrop® e sua concentração padronizada em H₂O tratada com DEPC para 100 ng/uL. A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega®) de acordo com as informações do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems®) como explicitado anteriormente. O número de partículas virais foi comparado entre as áreas inoculadas (I) e não inoculadas (NI) dos genótipos PI414723 e 'Védrantais' para cada tempo após a inoculação (3,7 e 10 dai). As análises estatísticas foram realizadas no software RStudio v.1.0.136 e os dados foram transformados (log₁₀) para normalização da distribuição, avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e de Barlett (p=0,05).

2.2.4. Expressão de genes da via da resistência sistêmica adquirida (RSA)

Os *primers* para amplificação de genes que codificam PR-proteínas (Tabela 1) foram desenhados com base na região correspondente aos seus exons utilizando o software Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) segundo os parâmetros: a) tamanho do produto amplificado: 100 a 200 pb; b) tamanho do primer : 18 a 23 pb; c) temperatura de melting entre 57 e 63 °C; d) quantidade de teor GC do primer entre 40 a 60%. Os pares de *primers* foram avaliados no software Beacon Designer (PREMIER Biosoft International) para a possível formação de estruturas secundárias como hairpins, auto-dimer e cross-dimer.

As quantificações dos níveis de expressão dos genes PR foram realizadas por RT-qPCR em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems®) utilizando o kit GoTaq Master Mix (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram feitas com alíquotas de cDNA provenientes dos tratamentos nas seguintes condições: 2,75µl de água livre de nucleases, 6,25µl de GoTaq® Master Mix (Promega)®, 0,75µl de cada oligonucleotídeo iniciador para amplificação do gene candidato a 10uM e 2µl de cDNA para um volume final de reação a 12,5 µL. Foi utilizada desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 segundos, e anelamento e extensão por 45 segundos, alterando a temperatura dessa etapa para cada gene analisado (Tabela 2). Após o término da reação determinou-se a curva de dissociação do fragmento amplificado e os valores Ct foram transformados de acordo com a eficiência da reação, conforme mencionado anteriormente. As reações foram realizadas em duplicatas técnicas numa mesma placa.

Como normalizadores, foram testados os genes GAPDH, CYP7, β -Actina, tubulina alpha-5, proteína ribossomal L2, proteína ribossomal L, RNA 18S ribossomal, Actina 7, proteína ubiquitina de extensão e o fator ADP de ribosilação1 segundo Kong et al. (2016, 2017) (Tabela 3). Esses genes foram testados e avaliados pela plataforma RefFinder (Xie, Xiao, Chen, Xu, & Zhang, 2012) (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) que integra os programas Δ Ct method (Silver, Best, Jiang, & Thein, 2006), BestKeeper (Michael W Pfaffl, 2004), NormFinder (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004) e GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Através da análise conjunta desses três programas foi selecionada a melhor combinação de genes normalizadores para este estudo.

Amostras oriundas das regiões I e NI de plantas inoculadas com o vírus foram analisadas em relação às amostras inoculadas somente com tampão e carborundum. As análises foram feitas a partir da média de seis repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes e foram realizadas separadamente dentro de cada genótipo (PI414723 e 'Védrantais') e tempo após a inoculação (3,7 e 10 dai). A quantificação da expressão relativa foi calculada com base no método $\Delta\Delta CT$ (Michael W Pfaffl, 2004) e as análises estatísticas foram geradas no programa REST (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl et al., 2002). A diferença estatística quanto aos níveis de expressão foi considerada significativa para p-valores < 0,05.

2.2.5. Recuperação biológica do ZYMV

A recuperação biológica do vírus foi feita a partir das regiões I e NI dos cotilédones (3, 7 e 10 dai) e das folhas apicais (10 dai) de plantas de ambos os genótipos inoculados com o vírus ou somente com tampão com a finalidade de confirmar a presença do patógeno. Os tecidos foram macerados e uma suspensão foi inoculada em três plantas de abobrinha 'Caserta', conforme descrito anteriormente (item 2.2.2). A presença do vírus foi avaliada através de teste sorológico ELISA segundo metodologia de Mowat & Dawson (1987) utilizando antissoro policlonal contra partículas purificadas de ZYMV desenvolvido no Laboratório de Virologia Vegetal da Esalq/ USP, Piracicaba-SP, Brasil. Folhas apicais de abobrinha 'Caserta' foram coletadas aos 10 dai e o tecido foliar foi macerado em almofariz adicionando 500 μ L de tampão carbonato, pH 9,6, seguindo a proporção de 1:10 (p/v). Cem microlitros de cada extrato foram transferidos para placas de ELISA em duplicata (repetição técnica). As placas foram incubadas a 37 °C por 15 minutos e lavadas três vezes consecutivas com PBS-T (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 100 μ L de antissoro diluído em tampão PBS-TPB (1:1000) e as placas foram incubadas a 37 °C por duas horas. Juntamente à etapa de adição do antissoro realizou-se a fase de pré-adsorção, acrescentando-se tecido não inoculado ao extrato para eliminar a interferência de proteínas da planta no processo. Após duas horas, as placas foram triplamente lavadas com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de

imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025) diluída em tampão PBS-TPB de acordo com a recomendação do fabricante. A reação foi incubada por duas horas a 37°C e em seguida as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Depois, foram adicionados 100 µL de p- fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105) diluído em tampão de dietanolamina, pH 9,8, na concentração de 0,6 mg/mL e a reação foi incubada em temperatura ambiente na ausência de luz. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em leitor ELISA Metertech Σ960 na faixa de 405 nm. Os valores de absorbância foram comparados com o controle negativo, ou seja, plantas não inoculadas de ambos os genótipos, sendo que uma amostra foi considerada positiva quando apresentou um valor de absorbância três vezes maior que o observado no controle negativo (Spadotti et al., 2015). Folhas apicais do genótipo 'Védrantais', coletadas aos 10 dai, foram utilizadas como controle positivo para verificar a eficácia do método.

2.2.6. Teste de reação de hipersensibilidade (RH)

A ocorrência de uma reação de hipersensibilidade ao ZYMV em cotilédones foi investigada em ambos os genótipos através do método da coloração do amido segundo Lindner et al. (1959). Os cotilédones foram inoculados como descrito anteriormente e coletados às 12 e 24 hai. Previamente ao teste, as plantas foram mantidas em câmara escura por 24 h, exceto para o tratamento de 12 hai, para evitar a translocação do amido acumulado nas células infectadas para outras partes do cotilédone em razão do aumento da taxa respiratória nessas lesões. Os cotilédones foram colocados em um tubo cônico tipo Falcon contendo 10 mL de etanol 70% e incubados em banho-maria a 80°C por 40-50 minutos para a completa descoloração da clorofila. Em seguida, esses cotilédones foram lavados com água destilada e corados por 1 minuto com 5 mL da solução de iodo 1:20, preparada adicionando-se 1 mL da solução de iodo estoque (2% I + 6% IKI) em 20 mL de ácido láctico puro. O tempo de coloração de 1 minuto foi suficiente neste estudo para a formação do complexo iodo-amido. Após a coloração, os cotilédones foram lavados com água destilada e a formação de RH foi observada a olho nu e por microscopia óptica (Dijkstra & Jager 1998).

2.3. Resultados

2.3.1. Curva padrão e quantificação do vírus por qPCR

A equação $[CT = -3,167 * (\log \text{ quantidade de partículas virais}) + 40,18]$ ($R^2 = 0,98$, eficiência=102%, $T_{\text{melting}}=81,8$) foi utilizada para relacionar valores de CT com a quantidade de partículas virais. Os seis pontos da curva padrão de quantificação absoluta do vírus, dado em valores de CT, foram 15, 18, 21, 24, 27 e 31, respectivamente para as concentrações que variaram de 10^3 a 10^8 partículas virais, ou de 3 a 8 em valores de $\log_{(10)}$ (Figura 3).

Ao contrário de PI414723, plantas de 'Védrantais' inoculadas com ZYMV apresentaram sintomas típicos da doença aos 10 dai em suas folhas apicais. As plantas dos tratamentos inoculados somente com tampão e carborundum de ambas as variedades não apresentaram sintomas, como esperado.

Não foram detectadas partículas virais nas amostras inoculadas somente com tampão e carborundum (*dados não apresentados*), ou seja, foram obtidos valores de CT acima do limite (CT=36) quando a amostra passa a ser considerada negativa e são geradas curvas de *melting* não específicas para o fragmento alvo. Em todos os tempos e tecidos analisados, os títulos virais foram maiores em 'Védrantais' do que em PI414723, como esperado (Figura 4). A menor diferença foi verificada aos 3 dai na região inoculada (I), onde o título viral no primeiro genótipo foi superior ($\log_{(10)} = 4,4$) ao observado no resistente ($\log_{(10)} = 2,3$). A diferença de título viral entre os genótipos acentuou-se ao longo do tempo e nos tecidos avaliados. Na variedade suscetível o vírus foi detectado nos cotilédones nas duas regiões do cotilédone, em todos os tempos de avaliação e também na folha apical aos 10 dai, que apresentou o maior título viral ($\log_{(10)} = 6,8$). Já na variedade resistente o vírus também foi detectado nas duas regiões cotiledonares nos três tempos de avaliação, mas houve redução no título viral entre os 7 e 10 dai. Ademais, o vírus não foi detectado nas folhas apicais aos 10 dai.

2.3.2. Expressão de genes da via da resistência sistêmica adquirida (RSA)

Em PI414723, os níveis de expressão dos genes PR-Homeodomain, PR1 e PR4 aumentaram em função da inoculação com o patógeno em relação ao controle inoculado com o tampão, fato não verificado para o gene PR-5, cuja expressão não foi distinta ao controle em todos os tempos avaliados (Figura 5). Para o primeiro gene, o aumento foi verificado somente nas áreas não inoculadas (NI) do cotilédone aos 3 e 10 dai. No caso de PR1, o aumento foi detectado tanto na área inoculada (I) (7 e 10 dai) e nas folhas apicais e na área NI aos 10 dai. Quanto ao PR-4, o aumento foi detectado somente nas áreas I e NI dos cotilédones, porém mais cedo, aos 3 dai. No entanto, este gene apresentou a maior diferença no nível de expressão, sendo aproximadamente 3 vezes superior em comparação ao controle inoculado com tampão.

Ao contrário do genótipo resistente, em 'Védrantais' a expressão de PR-1 e PR-4 foi reduzida em função da inoculação com o vírus e a do gene PR-homeodomain foi positivamente aumentada como em PI414723, mas apenas em folhas apicais. A maior alteração em expressão foi a de PR-4, com *fold change* de 9 a 14 vezes inferior ao controle nas áreas I e NI aos 10 dai, respectivamente. Já a de PR-5 permaneceu inalterada em comparação ao controle inoculado com tampão em todos os tempos e área.

2.3.3. Recuperação biológica do ZYMV

Plantas de abobrinha cv. Caserta inoculadas com tecidos de plantas de PI414723 e 'Védrantais' que haviam sido inoculadas somente com tampão e carborundum testaram negativas para a presença do ZYMV pelo teste ELISA e tampouco apresentaram sintomas (dados não apresentados).

O vírus foi recuperado de PI414723 somente de área I coletada aos 3 dai de uma planta inoculada com o patógeno, dado que esta testou positiva no teste ELISA e apresentou sintomas (Tabela 3). Já plantas testadas com inóculo oriundo da área inoculada de 'Védrantais' coletado aos 3, 7 e 10 dai foram positivas, sendo duas plantas infectadas de três repetições biológicas no EXP1 e uma no experimento 2 (EXP 2). No caso de inóculo oriundo de áreas cotiledonares não inoculadas, em ambos os experimentos as amostras foram negativas aos 3 dai, mas aos 7 dai uma

planta foi positiva no EXP2 e aos 10 dai todas as plantas foram positivas. Entretanto, em ambos os experimentos, o patógeno foi recuperado de todas as folhas apicais.

2.3.4. Teste de reação de hipersensibilidade (RH)

As plantas de 'Védrantais' inoculadas com ZYMV apresentaram sintomas de mosaico aos 10 dai, ao passo que nenhuma planta inoculada tanto de PI414723 como também as inoculadas somente com tampão de ambos genótipos apresentaram sintomas (dados não apresentados). A análise qualitativa do teste de coloração de amido mostrou que às 12 e 24 hai o genótipo resistente PI414723 apresentou típicas lesões necróticas locais (LNL) caracterizando uma reação de hipersensibilidade (RH) em resposta à inoculação cotiledonar do vírus (Figura 6A). O rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção foi observado em PI414723 às 12 e 24 hai, ao passo que este fenômeno não foi observado em 'Védrantais' (Figura 6B).

2.4. Discussão

A severidade da infecção do zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) em melão é avaliada através de escala visual de sintomas, desenvolvida por Danin-poleg et al. (1997), em que notas são atribuídas às diferentes severidades de sintomas, sendo 0= ausência de sintomas, 1= plantas com pontos cloróticos, 2= sintoma típico de mosaico, 3= mosaico severo e distorção do limbo foliar e 4= necrose das folhas. No entanto, apesar de simplicidade e rapidez de uso, a escala não permite quantificar o patógeno. A técnica de ELISA é uma opção para tal devido à sua especificidade e sensibilidade asseguradas pelo uso de anticorpos específicos para cada vírus. Contudo, outras técnicas são necessárias para ensaios que objetivam uma quantificação de maior sensibilidade e que permitam a quantificação de baixos títulos em tecidos infectados (Abd El-Aziz, 2019). A exemplo, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi mais sensível que o ELISA na quantificação do zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) em cotilédones de *Cucurbita maxima*, onde os títulos virais são baixos em genótipos resistentes (Ramos, Spadotti, Bampi, & Rezende, 2018). O presente trabalho desenvolveu um protocolo de quantificação de partículas virais do ZYMV a partir da

clonagem do gene da capa proteica viral (CP) e difere de metodologia anteriormente reportada para este vírus com base no mesmo gene (Zeng et al. ,2007) uma vez que permite a quantificação absoluta e não relativa do patógeno, neste caso onde a quantidade do RNA viral é normalizada em relação ao gene 18S RNA ribossomal do hospedeiro. Além disto, nosso protocolo se baseou em novos *primers* devido aos polimorfismos na sequência do gene CP entre os isolados do Brasil e da China. O protocolo mostrou-se confiável e reproduzível, a julgar pelo valor da regressão ($R^2=0,98$) e análise das curvas de dissociação, além de sensível, permitindo a detecção de até 100 partículas virais ainda que por extrapolação, já que o último ponto da curva padrão corresponde a 1000 partículas. Isso foi particularmente importante na análise do genótipo resistente, no qual o vírus foi detectado em baixas concentrações (100 a 3000 partículas virais). Portanto, este protocolo é adequado para estudos da biologia do ZYMV e de sua interação com cucurbitáceas.

Os resultados da quantificação do vírus nos genótipos resistente e suscetível indicaram que embora este tenha sido detectado em ambos, diferenças interessantes foram identificadas em relação à replicação e colonização ao longo do tempo. Em 'Védrantais' ocorre a infecção, multiplicação e invasão sistêmica, ao passo que em PI414723 o vírus infecta e pode, ocasionalmente, ser translocado célula-a-célula nos cotilédones, uma vez que foi detectado nas áreas cotiledonares inoculadas (I) e não inoculadas (NI), muito embora este último caso tenha sido verificado em apenas uma planta aos 10 dias após a inoculação (dai). No entanto, a infecção não se tornou sistêmica, pois o patógeno não foi detectado nas folhas apicais aos 10 dai em nenhuma planta. A resistência à colonização sistêmica foi relatada em *Cucurbita maxima* variedade 'Exposição' ao zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) (Ramos et al., 2018). Neste estudo, o vírus foi inoculado e detectado em cotilédones, porém não o foi em folhas apicais aos 7 e 20 dias após a inoculação. O baixo nível de replicação do ZYMV na área inoculada de PI414723 foi confirmada no ensaio de recuperação biológica, dado que somente uma planta de 'Caserta' apresentou sintomas e testou positiva no teste de ELISA, ao contrário de 'Védrantais' onde o vírus foi recuperado de todos os tecidos e tempos de avaliação. O uso da metodologia de Lindner et al. (1959) para visualização da resposta de hipersensibilidade (RH) através da coloração do amido acumulado em folhas desclorofiladas permitiu a visualização de lesões características desta reação no genótipo resistente às 12 e 24 hai, mas não no suscetível. Desta forma, conclui-se que a RH seja a responsável pelos baixos níveis

de ZYMV e por impedir sua translocação do ponto de inoculação aos tecidos vasculares em PI414723. Em *Cucurbita pepo* 'Jaguar', parcialmente resistente ao ZYMV, também foi relatada a ocorrência de RH durante a fase inicial de infecção, aos 6 dai, inferida pelo acúmulo de proteínas envolvidas na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e à rápida ativação de mecanismos de defesa, afetando negativamente a replicação viral em folhas (Nováková et al. 2015).

A expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) é induzida em resposta a ataque de fitopatógenos, levando ao acúmulo local dessas proteínas e sinalização para a ativação das vias do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ). Em geral, patógenos biotróficos, como os vírus, ativam a resistência sistêmica adquirida (RSA) mediada pelo AS, cuja assinatura é a expressão dos genes PR-1 e PR-5. Já patógenos necrotróficos, via de regra ativam a resistência sistêmica induzida (RSI) mediada pelo AJ, cuja assinatura é a expressão de PR-4 (Jain & Khurana 2018; Ali et al. 2018). As análises indicaram que a resposta de resistência de PI414723 ao ZYMV resulta na ativação das duas vias, haja vista que em um primeiro momento (3 dai) a via do AJ foi ativada neste genótipo a julgar pelo padrão de expressão do gene da PR-4 e, posteriormente, também houve ativação da via do AS, inferida a partir da expressão de PR-1 na área inoculada inicialmente aos 7 dai, mas também aos 10 dai, neste caso tanto nos cotilédones quanto nas folhas apicais. Em contrapartida, estes genes foram negativamente regulados em 'Védrantais', evidenciando a supressão dessas vias no genótipo suscetível. Até o presente momento, o papel das PR-proteínas na resposta ao vírus não está completamente elucidado, mas alguns trabalhos mostram que a super expressão dos genes PR-1, PR-2 e PR-3, que codificam proteínas antifúngicas, estão envolvidas na resistência ao TMV em tabaco (Musidlak et al., 2017), ao passo que a PR-10 possui atividade de ribonuclease contra o TMV em *Capsicum annuum* (Ali et al., 2018). Foi também demonstrado que a aplicação exógena de AS em *Cucumis sativus*, previamente à inoculação do ZYMV, leva à ativação de genes de defesa e a produção de PR-proteínas, as quais suprimem o movimento e a replicação viral (Ummad-ud-Din et al., 2016). Em relação à PR-*homeodomain* selecionada neste estudo, sabe-se que é um fator de transcrição (FT) pertencente à família *homeobox* de proteínas, as quais possuem um papel generalista no desenvolvimento da planta (Viola & Gonzalez 2016), não essencialmente ligado à resistência aos patógenos, o que explica sua

expressão positiva tanto em áreas cotiledonares NI de PI414723 aos 3 e 10 dai quanto em folhas apicais da variedade suscetível. Contudo, o papel de proteínas *homeobox* na regulação do sistema de defesa já foi relatado, como é o caso do gene OCP3 de *Arabidopsis thaliana* que codifica um FT *homeodomain* regulador da defesa a patógenos necrotróficos (Coego et al., 2005).

O gene PR-4 foi o único diferencialmente expresso entre os genótipos em áreas inoculadas aos 3 dai, sugerindo um papel relevante deste gene na fase inicial da infecção. De fato, Guevara-Morato et al. (2010) mostraram que uma PR-4 purificada de *Capsicum chinense*, classificada no subgrupo II, não possuía atividade de quitinase como reportado previamente, mas sim de RNase e DNase como demonstrado na reação do acesso resistente PI159236 de *C. chinense* ao pepper mild mottle virus (PMMoV). Além disso, o mecanismo de defesa está associado a uma resposta de hipersensibilidade, resultando na formação de uma lesão local necrótica que restringe o vírus ao sítio de infecção inicial. A análise *in silico* da proteína PR-4 de melão realizada neste trabalho também revelou que se trata de um membro do subgrupo II devido à ausência do domínio heveína de adesão à quitina e que, portanto, é possível que também tenha atividade de RNase durante o mecanismo de defesa ao ZYMV.

Muito embora o modo de herança da resistência do acesso PI414723 ao ZYMV seja bem conhecido e este genótipo seja utilizado como fonte de resistência ao vírus, este trabalho foi o primeiro a caracterizar sua reação ao patógeno sob o ponto de vista biológico e molecular utilizando uma ferramenta que permite quantificar o título viral com grande sensibilidade. Em adição a isto, os resultados viabilizam estudos que necessitem de uma ferramenta molecular precisa que possibilite a compreensão da relação entre a diversidade de sintomas observados em plantas infectadas pelo ZYMV e seus genótipos.

2.5. Conclusões

- O protocolo de quantificação absoluta do ZYMV por qPCR permitiu detectar o vírus com alta sensibilidade;
- Em 'Védrantais' ocorre infecção, multiplicação e invasão sistêmica do ZYMV, com aumento de título viral observado ao longo do tempo, ao contrário de

PI414723, onde o vírus se multiplica no ponto de inoculação e se movimenta para áreas adjacentes, mas não coloniza sistemicamente a planta;

- A resistência à colonização sistêmica no genótipo resistente provavelmente decorre de uma reação de hipersensibilidade e da ativação da via de resistência sistêmica induzida.

Referências

- Abd El-Aziz, M. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. *Journal of Plant Science and Phytopatholog*, 3(3), 101–106. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001039>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S. T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. In *Microbiological Research* (Vols. 212–213, pp. 29–37). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Anuário Brasileiro da Fruticultura. (2018). Gazeta, 88p.
- Blua, M. J. (1989). Effect of Zucchini Yellow Mosaic Virus on Development and Yield of Cantaloupe (*Cucumis melo*). *Plant Disease*, 73(4), 317. <https://doi.org/10.1094/pd-73-0317>
- Coego, A., Ramirez, V., Gil, M. J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Vera, P. (2005). An arabidopsis homeodomain transcription factor, overexpressor of cationic peroxidase 3, mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. *Plant Cell*, 17(7), 2123–2137. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032375>

- Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Le Gall, O., Candresse, T., & Revers, F. (2012). The RTM Resistance to Potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural Variation of the RTM Genes and Evidence for the Implication of Additional Genes. *PLoS ONE*, 7(6), e39169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039169>
- Danin-poleg, Y., Paris, H. S., Cohen, S., Rabinowitch, H. D., & Karchi, Z. (1997). Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. 1, 331–337.
- Danin-poleg, Y., Tadmor, Y., Tzuri, G., Reis, N., & Hirschberg, J. (2002). Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. 4, 373–384.
- Desbiez, C., & Lecoq, H. (1997). Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46(06), 809–829. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x>
- Dijkstra, J., & Jager, C. P. (1998). Infectivity Assay on Hosts Producing Starch Lesions. In *Practical Plant Virology* (pp. 78–81).
- Dunham, J. P., Simmons #2, H. E., Holmes, E. C., Stephenson, A. G., & Simmons, H. E. (2014). Analysis of viral (zucchini yellow mosaic virus) genetic diversity during systemic movement through a *Cucurbita pepo* vine. *Virus Res*, 191, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.030>
- FAOSTAT statistical database. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Guimarães, M. A., & Aragão, F. A. S. (2019). *Produção de Melão* (Editora UFV (Ed.); 1st ed.).
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5th ed.). Academic Press.
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 265–281). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Lecoq, H.; Katis, N. Control of Cucurbit Viruses. In: *Advances in Virus Research*. Academic Press Inc., 2014. 90p. 255–296.
- Lima, M. F. (2011). *Viroses de Curcubitáceas*. Embrapa Hortaliças - Circular Técnica 95.
- Lindner, R., Kirkpatrick, H., & Weeks, T. (1959). Some factors affecting the susceptibility of cucumber cotyledons to infection by tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 49, 78–88.

- McCreight, J., Bohn, W., & Kishaba, A. (1992). Pedigree of PI 414723 melon. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 15, 51–52.
- Mowat, W., & Dawson, S. (1987). Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virology Methods*, 15, 233–247.
- Musidlak, O., Nawrot, R., & Goździcka-Józefiak, A. (2017). Which Plant Proteins Are Involved in Antiviral Defense? Review on In Vivo and In Vitro Activities of Selected Plant Proteins against Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2300. <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>
- Ngeles Guevara-Morato, M. A. ´, García De Lacoba, M., García-Luque, I., & Serra, M. T. (2010). Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L 3 plants with dual RNase and DNase activities. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3259–3271. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq148>
- Nick, C., & Borém, A. (2019). *Melão do Plantio à Colheita* (1st ed.). Editora UFV.
- Pavan, M. A., Rezende, J. A. M., & Krause-Sakate, R. (2016). Doenças das Cucurbitáceas. In *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas* (pp. 323–334).
- Périn, C., Hagen, S., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2002). A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 104(6–7), 1017–1034. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0864-x>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. <https://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 30, Issue 9). <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/>
- Pitrat, M. (1991). Linkage Groups in *Cucumis melo* L. *Journal of Heredity*, 82(5), 406–411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111112>
- Pitrat, M., & Lecoq, H. (1984). Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. *Euphytica*, 33(1), 57–61. <https://doi.org/10.1007/BF00022750>

- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. . (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Ramos, V. C. S., Spadotti, D. M. A., Bampi, D., & Rezende, J. A. M. (2018). Resistance of *Cucurbita maxima* 'Exposição' to zucchini lethal chlorosis virus is likely associated with restriction to the systemic movement of the virus. *Tropical Plant Pathology*, 43(5), 433–438. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0235-z>
- Robaglia, C., & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2005.11.004>
- Román, B., Gómez, P., Picó, B., López, C., & Janssen, D. (2018). Candidate gene analysis of Tomato leaf curl New Delhi virus resistance in *Cucumis melo*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.005>
- Sanfaçon, H., Sanfaçon, & Hélène. (2015). Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses*, 7(7), 3392–3419. <https://doi.org/10.3390/v7072778>
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). BMC Molecular Biology Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- Simmons, H. E., Dunham, J. P., Zinn, K. E., Munkvold, G. P., Holmes, E. C., & Stephenson, a G. (2013). Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Research*, 176(1–2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.016>
- Spadotti, D. M. de A., Wassano, D. T., Rezende, J. A. M., Camargo, L. E. A., Inoue-Nagata, A. K. (2015). Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Scientia Agricola*, 72(2), 187–191. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0197>
- Ummad-ud-Din, U., Syed, A. H. N., Azhar, A. K., Samiya, M. K., Ateeq-ur, -Rehman, Rashida, P., & Muhammad, E.-H. (2016). Management of zucchini yellow mosaic virus in cucumber through genetic and salicylic acid induced resistance. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53(1), 187–194.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. (2016). Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes. In *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects* (pp. 101–112). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00006-3>
- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., & Valkonen, J. P. T. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science*, 181(4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.06.008>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84.
- Zellnig, G., Pöckl, M. H., Möstl, S., & Zechmann, B. (2014). Two and three dimensional characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus induced structural alterations in *Cucurbita pepo* L. plants. *Journal of Structural Biology*, 186(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2014.03.006>
- Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D., & Chen, J. (2007). Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae Hosts Tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(6), 431–437. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00292.x>

Apêndices

Query	718	ACATCCAGGTTGTTTGGCTTGA	TGGAAATGTTGCTACAAGTAGCGAAGACACTGAACGG	777
Sbjct	718	TCTTCAAGGTTGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGG		777

Figura 1 Alinhamento entre as sequências parciais do gene da capa proteica do isolado chinês AF513552.1(*Query*) e do isolado brasileiro JX502668.1(*Sbjct*). As setas mostram os 3 *gaps* entre o alinhamento da sequência do *primer forward* desenvolvido por Zeng et al. (2007) (área alaranjada) e a região correspondente no isolado brasileiro.

Figura 2 Esquema da inoculação, com o sinal indicando as plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI).

A

B

Figura 3 Quantificação absoluta do zucchini yellow mosaic virus por qPCR. **A.** Gráfico de amplificação (*Amplification Plot*) de diferentes concentrações de cDNA do gene da capa proteica viral (CP) nas amostras-padrão, representando no eixo y o ΔR_n (intensidade de fluorescência normalizada) e no eixo x o CT (número de ciclos). **B.** Curva padrão preparada a partir de uma série de diluições (10^{-1}) de plasmídeo recombinante contendo o gene CP viral, e obtida pela análise de regressão linear plotando os valores de CT versus a quantidade (*Quantity*), dada pelo logaritmo do número de cópias do gene=logaritmo do número de partículas virais (título viral). Os valores de CT plotados para cada diluição são médias de duas réplicas técnicas na placa.

Figura 4 Quantificação absoluta do ZYMV por qPCR em áreas de cotilédones inoculadas (I) ou não inoculadas (NI) aos 3, 7 e 10 dias após a inoculação (dai) e nas folhas apicais aos 10 dai nos genótipos PI414723 e 'Védrantais'. As barras representam a média de seis repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes e a barra de erros indica o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas para cada tempo após a inoculação no programa R v.1.0.136. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) para análises feitas entre os genótipos e dentro de cada tempo após a inoculação, separadamente.

Figura 5 Expressão relativa de genes que codificam PR-proteínas de *Cucumis melo* L. de áreas inoculadas (I) com o ZYMV, não inoculadas (NI) e folhas apicais aos 3, 7 e 10 dias após a inoculação (dai) no genótipo resistente PI414723 e no suscetível 'Védrantais'. As barras representam a média de seis repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram

feitas dentro de gene para cada genótipo, e cada tempo após a inoculação. O asterisco nas barras indica diferença estatística em relação as áreas inoculadas somente com tampão ($P < 0,05$).

Figura 6 Teste de coloração de amido para visualização da reação de hipersensibilidade (RH). **A.** Cotilédones inoculados com o vírus ou somente com tampão, dos genótipos resistente PI414723 e

suscetível 'Védrrantais' antes e após a coloração com iodo às 12 e 24 horas após a inoculação (hai). **B.** visualização da RH no aumento de 100x em microscópio óptico.

A

B

Figura 7 Análise *in silico* de proteínas PR-4 pelo programa InterPro. **A.** PR-4 de *Hevea brasiliensis* (204 aa) codificada pelo gene HEV 1 (UniProtKB - P02877) mostrando os domínios *Barwin* (IPR001153) e *Chitin-binding type 1* (IPR001002) envolvidos no mecanismo de defesa a patógenos, principalmente a fungos e bactérias. **B.** PR-4 de *Cucumis melo* L. (142 aa) mostrando a presença do domínio *Barwin* e ausência do domínio *Chitin-binding type 1*, caracterizando essa PR-4 como pertencente à classe II.

Tabela 1 Genes PR de *Cucumis melo* usados em ensaio de expressão gênica mostrando o código do gene em bancos de dados (Gene ID), sua localização no cromossomo, a proteína codificada pelo gene, os *primers* para amplificação, a temperatura de anelamento correspondente (Ta) e o tamanho esperado do fragmento em pares de base (pb)

Gene ID ^a	Cromossomo	Anotação ^b	Sequências de <i>primers</i> ^c	Ta (°C)	Fragmento (pb)
MELO3C017429.2	Chr02	PR (“homeodomain”)	F: GTGGGAATGCGTTGCTTAAT R: CTTCTCACTTCCGTTGTCA	60	111
MELO3C017496.2	Chr02	PR-1	F: CCGATTGTCCCCCTTAGTTT R: AGTCCACTCATTGCCGCTAC	62	145
MELO3C009903.2	Chr04	PR-5 (“thaumatin-like”)	F: GCGGGAAGAATCTGAATGAA R: ATAGTACGACGGGCAAGCAT	61	197
MELO3C004386.2	Chr05	PR-4	F: AATGCTCAAAGTGCCACAAA R: GAAAGCAGTCCAACCGTACC	60	153

^a Gene ID do banco de dados *Melonomics* (<https://melonomics.net/genome/>) e *Cucurbit Genomics Database* (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>)

^b Anotação de acordo com o banco de dados *Melonomics* v4.0

^c F: *primer forward*; R: *primer reverse*

Tabela 2 Genes de *Cucumis melo* L. selecionados para ensaios de expressão visando a seleção de genes normalizadores mostrando os códigos dos genes (Gene ID), as proteínas codificadas (anotação), os *primers* utilizados para amplificação dos genes, as temperaturas de anelamento (Ta) correspondentes e o tamanho do fragmento esperado em pares de base (pb)

Gene ^a	Gene ID ^b	Anotação ^c	Sequências de <i>primers</i> ^d	Ta (°C)	Fragmento (pb)
CmACT	MELO3C023264	β-Actina	F: GAGCATCTAAACGGAGAGTTGG R: GCCATCGTTTATAGATACTTGAGGA	58	104
CmACT7	MELO3C008032	Actina-7	F: CCCTGGTATTGCAGACAGGA R: ACATCTGCTGGAAGGTGCTT	58	149
Cm18SrRNA	MU60789	RNA 18S ribossomal	F: CGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTA R: CTACGAGCTTTTAACTGCAACAA	58	137
CmTUA5	MELO3C026613	Tubulina alfa-5	F: AGGACTGGGACATACCGACA R: CGGCTAATTTTCGCACTCGG	58	145
CmL2	MELO3C000111	Proteína ribossomal L2	F: AAACTTCTACCCCGAGCACA R: TATGACCTCCCCCTCTATGC	58	150
CmRPL	MELO3C023039	Proteína ribossomal L	F: CGACAATACTGGAGCCAAGAA R: CATCACCATATCTCCACACAA	58	100
CmGAPDH	MELO3C019633	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	F: CATGGTGTTTTCAACGGAACCA R: CCCATGGGATATCTGCAGGG	58	110
CmEF1α	MELO3C020441	Fator de elongação 1-α	F: CTGCTTGCTCCTGCGTTAAA R: CCACGATGTTGATATGAGTCTTTTC	58	113
CmUBI	MELO3C016083	Proteína de extensão da ubiquitina	F: AAGTGTGGACACAGCAACCA R: AAGCCAAATGGCTCTAAGCA	58	132
CmADP	MELO3C023630	Fator de ribosilação ADP-1	F: ATATTGCCAACAAAGGCGTAGA R: TGCCCGTAAACAAGGGATAAA	58	93

^a Terminologia utilizada por Kong et al. (2014, 2016)

^b Gene ID do banco de dados *Melonomics* (<https://melonomics.net/genome/>) e *Cucurbit Genomics Database* (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>)

^c Anotação de acordo com o banco de dados *Melonomics* v4.0

^d F: *primer forward*; R: *primer reverse*

Tabela 3 Resultado do teste de ELISA para folhas apicais de abobrinha ‘Caserta’ coletadas aos 10 dias após a inoculação (dai) inoculadas com cotilédones dos genótipos ‘Védrantais’ e PI414723 coletados aos 3, 7 e 10 dai de áreas inoculadas (I) ou não inoculadas (NI) com ZYMV e de folhas apicais inoculadas com o vírus

Tempo e área de coleta do inóculo	Origem do inóculo			
	'Védrantais'		PI414723	
	EXP1 ^a	EXP2	EXP 1	EXP2
3dai- I	2/3 ^b	1/3	1/3	0/3
3dai- NI	0/3	0/3	0/3	0/3
7dai- I	2/3	1/3	0/3	0/3
7dai -NI	0/3	1/3	0/3	0/3
10dai- I	2/3	1/3	0/3	0/3
10dai -NI	3/3	3/3	0/3	0/3
Folha apical 10dai (vírus)	3/3	3/3	0/3	0/3

^a Experimento 1(EXP1); Experimento 2 (EXP2)

^b Número de amostras positivas de três repetições biológicas (+/3)

3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS NO *LOCUS ZYM-1* DE RESISTÊNCIA AO ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS EM MELÃO

RESUMO

A resistência do acesso PI414723 de melão ao zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) é controlada pelo *locus* dominante *Zym-1*, localizado no cromossomo 2 (chr2), e supostamente também por *Zym-2* e *Zym-3*, cujas localizações ainda são desconhecidas. Os objetivos do trabalho foram identificar genes de resistência candidatos no *locus Zym-1* e quantificar seus níveis de expressão nos genótipos resistente PI414723 (PI) e suscetível 'Védraçais' (Ved). Os candidatos foram escolhidos entre os genes presentes em uma região definida pelo alinhamento de marcadores ligados ao *locus Zym-1* e à sequência anotada do chr2, e pela análise de domínios proteicos envolvidos na resistência a vírus. A expressão destes foi analisada em cotilédones às 12 e 24 horas após a inoculação (hai) e o vírus foi quantificado nesses tempos e aos 7 dias após a inoculação (dai). O título viral não variou entre os genótipos às 12 hai, mas foi maior em Ved às 24 hai. Em folhas apicais, o vírus não foi detectado aos 7 dai em PI, mas o foi em altos níveis em Ved. De treze genes candidatos identificados, três foram positivamente regulados em PI, sendo dois às 12 hai e um às 24 hai. Os primeiros correspondem a cópias do gene RTM2 (*restricted TEV movement 2*) de *Arabidopsis* envolvidos na restrição do movimento a longa distância do *Tobacco etch virus* (TEV) da família Potyviridae, ao passo que o terceiro corresponde a um análogo de genes de resistência (RGA) que codifica uma proteína CC-NB-LRR com domínio homólogo ao gene *RX* de batata para reconhecimento do *Potato virus X* (PVX). Conclui-se que o *locus Zym-1* compreende um cluster de genes que provavelmente atuam conjuntamente na resistência através de mecanismos de defesa distintos.

Palavras-chave: Genes R, RGA, ZYMV

ABSTRACT

The resistance of PI414723 melon accession to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is controlled by the dominant *Zym-1 locus* located on chromosome 2 (chr2), and likely also by *Zym-2* and *Zym-3*, whose locations are still unknown. The goals of this work were to identify resistance candidate genes in the *Zym-1 locus* and to quantify their expression levels in the resistant PI414723 (PI) and susceptible 'Védraçais' (Ved) genotypes. The gene candidates were chosen from a region defined by the alignment of the markers linked to the *Zym-1 locus* and the chr2 genome sequence, and by analyzing the protein domains involved in virus resistance. The gene expression was analyzed in cotyledons at 12 and 24 hours after inoculation (hai) and the virus was quantified at these same evaluation times, and also at 7 days after inoculation (dai). The viral titer did not vary among genotypes at 12 hai but was higher in Ved at 24 hai. In apical leaves, the virus was not detected in PI but it was at high levels in Ved at 7 dai. Of thirteen gene candidates, three were positively regulated in PI, two at 12 hai and one at 24 hai. The former corresponded to the *Arabidopsis* RTM2 gene (*restricted TEV movement 2*) involved in the restriction of the long distance movement of the *Tobacco etch virus* (TEV) from Potyviridae family. The third gene is a resistance gene analog (RGA) that encodes a CC-NB-LRR protein with homologous domain to the *RX* potato gene for *Potato virus X* (PVX).

recognition. It is concluded that the *Zym-1 locus* comprises a cluster of genes that presumably work together using different defense mechanisms.

Keywords: R genes, RGA, ZYMV

3.1. Introdução

A produção mundial de melão foi cerca de 27,3 milhões de toneladas no ano de 2018, segundo dados da FAO. Os maiores produtores são a China, Turquia, Irã, Estados Unidos e Espanha que, juntos, correspondem a 65% da produção mundial. Atualmente, o melão está entre as dez frutas mais exportadas no mundo, com destaque para a Espanha na primeira colocação. O Brasil é um dos maiores produtores da América do Sul e o cultivo dessa olerícola representa uma importante atividade do ponto de vista socioeconômico por ser desenvolvida principalmente por pequenos produtores em áreas de agricultura familiar. A região Nordeste é a maior produtora do fruto, com destaque para os estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Nick & Borém, 2019). Nos últimos anos, o Ceará tem sido o maior exportador desse fruto por questões de infraestrutura e logística favoráveis da região, gerando uma receita de US\$ 78,6 milhões (Guimarães & Aragão, 2019).

As viroses são um fator limitante para a cultura, principalmente quando ocorrem infecções mistas envolvendo, entre outros, o potyvírus zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) (Lecoq & Katis 2014; Pavan et al. 2016). O ZYMV causa sérios danos em cucurbitáceas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais no mundo (Desbiez and Lecoq 1997; Lecoq & Katis 2014) e a redução na produção pode chegar a 100 % se as plantas forem infectadas precocemente (Blua & Perring 1989). Este vírus possui distribuição mundial (EPPO, 2020) e foi detectado no Brasil no início da década de 90, em cultivos de melancia em São Paulo e de pepino em Santa Catarina (Lima, 2011). Atualmente, é provável que o ZYMV já ocorra em todos os estados brasileiros que cultivam cucurbitáceas, com predominância de isolados do patótipo 0 do vírus no país (Spadotti et al., 2015). O ZYMV é transmitido por nove espécies de afídeos e causa o sintoma típico de mosaico que aparece nas folhas jovens na forma de um amarelecimento entre as nervuras que, com o avanço da infecção, evolui para deformações foliares e formação de bolhas. A infecção leva ao subdesenvolvimento da planta e à má formação de frutos, que ficam de tamanho reduzido e com mudanças de cor na polpa (Pavan et al., 2016). O controle químico do vetor é eficiente para

reduzir a população de afídeos, mas não reduz a disseminação do ZYMV dentro da cultura já que a relação vírus-vetor é do tipo não-persistente. Portanto, o controle de viroses através do uso de cultivares resistentes é a forma mais viável de manejo da doença.

O acesso indiano de meloeiro PI414723 (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*) é uma importante fonte de resistência múltipla a patógenos (Pitrat & Lecoq 1984; McCreight et al. 1992; Danin-poleg et al. 2002). É resistente ao patótipo 0 do ZYMV, a oito raças de *Podosphaera xanthii*, ao watermelon mosaic virus, ao papaya ringspot virus estirpe melancia, ao pulgão *Aphis gossypii* e ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Anagnostou, Jahn, & Perl-treves, 2000; Fazza et al., 2013; McCreight et al., 1992; Pitrat & Lecoq, 1984). Neste acesso, um *locus* dominante de resistência a ZYMV, de grande efeito fenotípico, denominado de *Zym-1* foi localizado no grupo de ligação 2 que corresponde ao cromossomo 2 de melão (Périn et al., 2002). *Zym-1* está localizado na extremidade do grupo, onde há a provável existência de um cluster de genes de resistência a patógenos (Fazza et al., 2013; Périn et al., 2002). Trabalhos posteriores indicaram a provável existência de outros dois *loci* de resistência de efeitos menores neste acesso, denominados de *Zym-2* e *Zym-3* (Danin-poleg et al. 1997), mas suas localizações ainda não foram determinadas.

A integração de informações de sequências genômicas com as de mapas genéticos de ligação representa uma ferramenta estratégica para a identificação de genes de interesse agrônomo, incluindo os de resistência a patógenos (Gururani et al., 2012). Este é o caso de melão, cujo genoma foi sequenciado recentemente (Garcia-Mas et al. 2012; Ruggieri et al. 2018) e para o qual existem mapas genéticos relatando a posição de vários *loci* de interesse econômico, como é o caso do *locus Zym-1*. O alinhamento de mapas de ligação aos mapas genômicos é feito através da localização, nestes últimos, das sequências dos marcadores moleculares usados na construção dos mapas genéticos. Desta forma, um *locus* gênico identificado em um mapa genético também pode ser identificado na sequência de um genoma, analisando-se o posicionamento de marcadores ligados à ele. Em um segundo passo, no caso de genes de resistência, informações sobre suas estruturas podem ser usadas para identificar genes candidatos nestes *locus*, valendo-se de abordagens bioinformáticas (Fritsche-Neto & Borém 2012).

Genes dominantes de resistência a vírus se enquadram como típicos genes R por codificarem proteínas com domínios do tipo *nucleotide-binding* (NB) e *leucine-rich-repeat* (LRR) que reconhecem padrões moleculares virais, resultando numa resistência do tipo ativa ou induzida (Cosson et al., 2012). Contudo, existe a resistência passiva, não-induzida, que envolve genes recessivos, como os fatores eucarióticos de tradução (eIFs). Nestes casos, a ausência ou incompatibilidade de um fator no hospedeiro essencial para a multiplicação viral torna a planta resistente (Robaglia & Caranta, 2006; Rodríguez-Hernández et al., 2012; Sanfaçon et al., 2015). Um terceiro tipo de resistência envolve genes R atípicos por não terem os domínios característicos destes, sendo exemplos os genes RTM (*Restricted TEV movement*), que restringem o movimento a longa distância de alguns potyvírus sem envolver o reconhecimento direto de fatores virais. Esses genes foram primeiramente caracterizados em *Arabidopsis thaliana* na interação específica com o vírus TEV e posteriormente foi demonstrado serem ativados também contra os potyvirus, *Lettuce mosaic virus* (LMV) e *Plum pox virus* (PPV) (Cosson et al., 2012).

Embora o modo de herança do *locus Zym-1* de PI414723 esteja bem caracterizado, ainda não se sabe qual(is) gene(s) controlam esta resistência e os diferentes mecanismos envolvidos na resposta de defesa ao vírus. A identificação de genes candidatos que correspondam ao *locus Zym-1* abre a perspectiva para estudos subsequentes de clonagem destes genes e seu uso em abordagens transgênicas de melhoramento para resistência.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Material vegetal

Foi utilizado o acesso PI414723 pertencente ao grupo Momordica (melão indiano) e a cultivar 'Védrantais', uma linhagem comercial francesa pertencente ao grupo Charentais. O patótipo 0 de ZYMV induz sintomas severos em 'Védrantais' mas não induz sintomas em PI414723 (Pitrat & Lecoq, 1984).

3.2.2. Inoculação com ZYMV

Sementes dos genótipos foram semeadas em vasos de 1 litro (3 sementes por vaso) contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças-Vida Verde®. Após a germinação, realizou-se o desbaste permanecendo 2 plantas por vaso. Dois experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura aproximada de 25°C, em delineamento inteiramente ao acaso. A inoculação foi realizada uma única vez com o isolado (patotipo 0) do ZYMV. O inóculo foi preparado a partir de uma folha infectada de abobrinha 'Caserta', que foi macerada em tampão de fosfato de potássio 0,02 M (pH 7,0) acrescido de sulfito de sódio 0,02 M na proporção de 1:10 (p:v). O homogenato foi friccionado com carborundum nos cotilédones entre 12 e 14 dias após a semeadura quando plantas estavam no estágio de expansão da primeira folha verdadeira. Como controle foram usadas plantas inoculadas somente com tampão fosfato e carborundum (*mock-inoculation*).

O experimento consistiu de 6 tratamentos para cada genótipo que correspondem a plantas inoculadas com o vírus ou inoculadas somente com tampão e tecidos cotiledonares coletados às 12 e 24 horas após a inoculação (hai) e a primeira folha apical totalmente expandida coletada aos 7 dias após a inoculação (dai). Foram utilizadas 5 repetições biológicas para cada tratamento, cada uma correspondendo a uma amostra composta por 4 cotilédones de duas plantas/repetição. Após as coletas, o material foi armazenado a -80 °C para extração de RNA e análise da expressão gênica. O vírus foi quantificado por qPCR de acordo com a metodologia explicitada no item 2.2.4.

3.2.3. Identificação de genes candidatos de resistência ao ZYMV localizados no cromossomo 2

Sequências de primers *forward* e *reverse* utilizados para amplificar marcadores microssatélites (SSR) e de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) pertencentes ao grupo de ligação 2 foram utilizadas para alinhar o mapa de ligação deste grupo com a sequência do cromossomo 2 (Chr2) de *Cucumis melo* L. Os marcadores foram escolhidos com base em informação de oito mapas de ligação (Deleu et al., 2009; Diaz et al., 2011; Fernandez-Silva et al., 2008; Fukino et al., 2008;

Gonzalo et al., 2005; Harel-Beja et al., 2010; Li et al., 2011; Ritschel et al., 2004). O alinhamento foi realizado com o software BLASTn versão 2.8.0+ (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) utilizando os parâmetros padrão do programa com adição do filtro '*Cucumis melo*'. Os parâmetros 'query cover/identity' e 'E-value' de cada hit foram analisados, sendo considerados os valores ideais próximos a 100% e menores que 0,05, respectivamente. A montagem v3.6.1 do genoma e a anotação v4.0 do banco de dados *Melonomics* foram utilizadas como referência (<https://www.melonomics.net/melonomics.html#/>). O cromossomo 2 é composto por 7 *scaffolds* que totalizam 27.064.691 pb contendo 2.063 genes anotados (Garcia-Mas et al. 2012; Ruggieri et al. 2018). O programa MapChart v2.32 (Voorrips, 2002) foi utilizado para gerar um mapa contendo os marcadores integrados aos *scaffolds* correspondentes do cromossomo 2, com a distância entre eles expressa em pares de bases (pb).

A localização dos marcadores moleculares permitiu definir um intervalo de busca para os genes candidatos entre os marcadores SSR DE1765 e DM0052 (Diaz et al., 2011), que flanqueiam o *scaffold* no qual o marcador SSR CMAG36 ligado ao *locus Zym-1* (Périn et al., 2002) foi posicionado. Os marcadores do cromossomo 2, selecionados na etapa anterior, foram utilizados para delimitar e os intervalos entre *scaffolds*. Os genes deste intervalo dentro do *scaffold* (4.677.790 pb) foram funcionalmente reanotados através do software Blast2Go v.4.0.7 (Conesa & Götz 2008) e genes candidatos foram selecionados com base em similaridade à sequências com genes R (Gururani et al., 2012), onde se incluem os receptores proteicos (RLP) e receptores-quinases (RLK) (Macho & Zipfel, 2014), com genes recessivos de resistência que codificam fatores eucarióticos de iniciação da tradução (Robaglia & Caranta, 2006; Sanfaçon et al., 2015), com genes RTM (*Restricted TEV Movement*) envolvidos na movimentação de partículas e genes envolvidos no mecanismo de morte celular. Os domínios proteicos codificados pelos genes selecionados foram preditos utilizando o alinhamento BLASTx (Altschul et al., 1990), o banco de dados de proteínas Uniprot (The UniProt Consortium, 2019) e o website InterPro (Hunter et al., 2009). Os genes R foram classificados segundo o *Plant Resistance Gene Database* (Osuna-Cruz et al., 2017) utilizando a ferramenta *Disease Resistance Analysis and Gene Orthology* (DRAGO 2) que faz a anotação de genes de resistência e detecta os domínios LRR (*leucine rich repeat*), KIN (quinase), NB (*nucleotide binding*), CC (*coiled-coil*), TIR (*toll-interleukin receptor*) e TM (*transmembrane domain*) e classifica

nas seguintes classes de acordo com a estrutura dos domínios funcionais: TNL: TIR-NB-LRR; CNL: CC-NB-LRR ; RLK: quinase-LRR; RLP: serina/treonina-LRR; KIN: quinase (Sanseverino & Ercolano 2012). Em adição a essas, também foi considerada a classe Oth-R (*other R genes*) que consiste em genes R que não se enquadram em nenhuma das cinco classes conhecidas.

3.2.4. Expressão dos genes candidatos

A extração do RNA total e a síntese do cDNA a partir do RNA padronizado (400 ng/uL) foi realizada como descrito no item 2.2.3. O desenho de *primers* e a quantificação dos níveis de expressão dos genes deu-se por qPCR em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems®), como detalhado no item 2.2.5, variando a temperatura de anelamento para cada gene e foram testados genes normalizadores (Tabela 1). As análises foram feitas a partir da média de dez repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes com cinco repetições cada e realizadas separadamente para cada genótipo (PI414723 e 'Védrantais') e tempo após a inoculação (12 e 24 hai). A quantificação da expressão relativa entre amostras inoculadas com o vírus e amostras inoculadas somente com tampão e carborundum foi calculada com base no método $\Delta\Delta CT$ (Michael W Pfaffl, 2004) e as análises estatísticas foram geradas no programa REST (Pfaffl et al. 2002). O teste t de Student foi utilizado para testar diferenças entre níveis de expressão (p-valores < 0,05).

3.3. Resultados

3.3.1. Identificação de genes candidatos de resistência ao ZYMV localizados no cromossomo 2

Um total de 105 marcadores SSR e SNP pertencentes ao grupo de ligação II foi utilizado para alinhar os mapas genéticos à sequência do cromossomo 2. Estes se distribuíram entre os 7 scaffolds que compõem o cromossomo 2 de *Cucumis melo* L. (scaffolds 00025 (29), 00024 (6), 00012 (19), 00099 (5), 00069 (7), (26), 00089 (13). O mapa de ligação de Harel-Beja et al. (2010) foi selecionado a fim de correlacionar distâncias genéticas e físicas entre pares de marcadores microssatélites localizados

num mesmo scaffold, resultando numa estimativa que 1 cM neste mapa corresponde a aproximadamente 110 mil pb no mapa físico (Tabela 2). O *locus Zym-1* foi mapeado a 4 cM (400 mil pb) do marcador CMBR041 localizado no início do LGII (Harel-Beja et al., 2010), e o marcador SSR CMAG36 (Périn et al., 2002) foi posicionado a 900.721 pb no scaffold25, que representa a extremidade do cromossomo 2 (Figura 1). Este scaffold possui 4.677.790 bp e corresponde a 17% do tamanho total do cromossomo 2, abrigando 443 genes. Desses, 309 foram reanotados pelo programa Blast2Go, sendo que 13 foram selecionados como candidatos a partir da análise de seus domínios funcionais (Tabela 3, Figura 2).

Entre os candidatos selecionados, seis pertencem às classes de genes R que contem domínios de quinases MELO3C015340.2 (KIN: TM-quinase), MELO3C015376.2 (CK: CC-quinase), MELO3C015415.2 (RLK: LRR-TM-quinase), MELO3C015524.2 (KIN: TM-quinase), MELO3C015567.2 (KIN: TM-quinase) e MELO3C015676.2 (KIN: TM-quinase) (Figura 2B, E,F,G,I,M) e dois análogos de genes de resistência de plantas (RGAs). Esses últimos pertencem à classe NB-LRR, sabidamente envolvidas no reconhecimento de vírus.

Cinco genes previamente descritos como fatores de resistência a vírus, mas não classificados como genes R típicos (classe “Oth-R genes”) também foram selecionados. Estes incluem genes que codificam fatores de iniciação da tradução (MELO3C015319.2 e MELO3C015553.2), proteínas *heat shock* (RTM2: MELO3C015587.2 e MELO3C015589.2) e de morte celular programada (MELO3C015632.2) (Figura 3 A, H, J, K, L).

O alinhamento das sequências de proteínas codificadas pelos genes RTM2 (MELO3C015587.2 e MELO3C015589.2) mostrou que essas possuem alta similaridade entre si (73,32%) (Figura 3A). A análise de suas regiões idênticas revelou que a sequência de 67 aminoácidos (aa) da posição 32 ao aminoácido 98 corresponde ao domínio *Alpha crystallin/Hsp20* (IPR002068), característico das proteínas *heat shock*. As outras regiões idênticas não foram consideradas domínios pois não possuíam o tamanho mínimo de 50 aa para serem analisadas como tal. A sequência de aa que inicia na posição 302 até o final da proteína presente em MELO3C015589.2 e ausente em MELO3C015587.2, corresponde a três domínios adicionais: um citoplasmático, um transmembranar e um não citoplasmático, indicando que esta última proteína fica provavelmente ancorada na membrana plasmática.

Em contraste, as sequências de proteínas dos genes RGA (MELO3C015353.2 e MELO3C015354.2) possuem baixa similaridade (38,53%) entre si. Nenhuma das regiões idênticas entre as proteínas dos RGA atingiram o tamanho mínimo em número de aminoácidos para serem analisadas como domínios funcionais (Figura 3B).

3.3.2. Seleção de genes normalizadores

O resultado do programa Reffinder mostra que menores valores no eixo y do gráfico indicam maior estabilidade de expressão do gene e, logo, são indicados como normalizadores para o estudo, sejam sozinhos (Figura 4A) ou em combinação (Figura 4B). A expressão de seis genes normalizadores foi altamente variável entre os tratamentos inoculados ou não com o vírus, ou seja, variação de 2 a 4 unidades nos valores de CT; são esses: GAPDH, CYP7, β -Actina, tubulina alpha-5, proteína ribossomal L2 e proteína ribossomal L (*dados não apresentados*). No entanto, os níveis de variação em expressão de RNA 18S ribossomal (Cm18S), Actina 7 (CmACT7), proteína de extensão da ubiquitina (CmUBI) e fator de ribosilação ADP 1 (CmADP) foram menores (1 a 1,5 unidades nos valores de CT). Desses, os que formaram a combinação mais estável foram o CmUBI, que codifica uma proteína conservada e constituinte estrutural do ribossomo, e o CmADP, envolvido no transporte intracelular de proteínas do aparelho de Golgi ao retículo endoplasmático. Portanto, estes foram utilizados conjuntamente para normalizar os dados de expressão gênica.

3.3.3. Quantificação do ZYMV

Em ambos experimentos, plantas de 'Védrantais' inoculadas com o ZYMV apresentaram sintomas típicos de mosaico aos 7 dai nas folhas apicais, já aquelas do genótipo PI414723 não apresentaram sintomas. Plantas dos tratamentos inoculados somente com tampão e carborundum também não apresentaram sintomas, como esperado.

O número de partículas virais nas amostras de cotilédones inoculados com o patógeno de PI414723 e 'Védrantais' foi igual às 12 hai. Contudo, esse valor foi estatisticamente diferente entre os genótipos às 24 hai, quando o de PI414723 foi menor que de 'Védrantais' (Figura 5). Já aos 7dai, o vírus não foi detectado em folhas apicais do genótipo resistente (valores obtidos acima do limite de detecção, $CT > 36$), ao passo que um alto título viral foi observado em 'Védrantais' ($\log_{10} = 8$). Portanto, o vírus infectou ambos os genótipos, como pode ser deduzido do resultado da avaliação às 12 hai, mas sua replicação diminuiu na área inoculada no genótipo resistente às 24 hai e não houve colonização sistêmica, ao contrário do observado no genótipo suscetível, a julgar pela ausência de sintomas.

3.3.4. Expressão dos genes candidatos

Em PI414723, os níveis de expressão dos genes RTM2 (MELO3C015587.2 e MELO3C015589.2) que codificam proteínas da classe *small heat shock* aumentaram em função da inoculação com o vírus às 12 hai, assim como o análogo de gene de resistência (RGA:MELO3C015354.2) que codifica uma proteína com domínio CC-NB-LRR, um fator de iniciação da tradução 3 (eIF3: MELO3C015553.2) e uma quinase (MELO3C015676.2) foram positivamente regulados às 24 hai (Figura 6). Esse último gene atingiu o maior nível de expressão em PI414723, sendo esse valor 4 vezes maior em comparação ao controle inoculado somente com tampão.

Já no genótipo 'Védrantais', a expressão dos genes que codificam quinases (MELO3C015415, MELO3C015676) e uma proteína de morte celular (MELO3C015632) foram positivamente alteradas após a inoculação com o vírus às 12 hai, mas o gene que codifica o análogo de gene de resistência com domínio NB-LRR (RGA: MELO3C015353.2) foi negativamente regulado neste tempo de avaliação, o qual atingiu os menores níveis de expressão às 24 hai, sendo esse valor 3 vezes menor em relação ao controle ($\text{Log}_2\text{FC} = -1,5$), assim como foi observado para o outro RGA (MELO3C015354.2) ($\text{Log}_2\text{FC} = -1,3$). Esse último, que possui o domínio CC-NB-LRR e um adicional homólogo ao *RX* de reconhecimento do *Potato virus X* (PVX), foi o único diferencialmente expresso às 24 hai entre os genótipos (Figura 6).

3.4. Discussão

Plantas podem resistir passiva ou ativamente a infecção viral. No primeiro caso, o patógeno não se replica devido a mutações em genes do hospedeiro essenciais para o ciclo viral, como os fatores de tradução. No segundo, o sistema de defesa reconhece as proteínas do vírus via genes R, resultando numa resposta de hipersensibilidade que restringe a colonização ao ponto de infecção. Um terceiro mecanismo não é classificado em passivo ou ativo e restringe a movimentação sistêmica da partícula viral, neste caso, mediada por genes RTM descritos em *Arabidopsis thaliana* contra o tobacco etch virus pertencente ao gênero *Potyvirus* (Cosson et al., 2012). O alinhamento do grupo de ligação ao cromossomo 2 realizado neste trabalho resultou na definição de uma região genômica na qual foram identificados genes candidatos destas três classes. Esse alinhamento baseou-se na disponibilidade de sequências de marcadores microssatélites ligados ao *locus Zym-1*, com destaque para o marcador CMAG36. Na região de busca foram encontrados 13 genes candidatos, sendo 2 classificados como fatores de tradução, 8 como genes R e 3 como genes R atípicos.

Embora a resistência conferida por *Zym-1* seja de natureza dominante, optou-se pelo estudo dos padrões de expressão de dois fatores de iniciação da tradução, muito embora esta classe de genes esteja envolvida na resistência passiva, como é o caso de membros da família 4 (eIF4E e eIF4G) e suas isoformas já implicados na resistência aos potyvírus ZYMV e papaya ringspot virus estirpe melancia (PRSV-W), uma vez que são utilizados pelo vírus como fatores de replicação (Shopan, Lv, Hu, Zhang, & Yang, 2020). Assim como foi descrito em melão, a resistência natural ao melon necrotic spot virus (MNSV) ocorre devido à uma mutação no gene eIF4 (Nieto et al., 2006) e o gene *zym* de resistência ao ZYMV em melancia também codifica um eIF4E (Lecoq & Katis, 2014). Os genes encontrados neste estudo, no entanto, não pertencem a esta classe, mas sim às classes 3 (eIF3, MELO3C015553.2) e 6 (eIF6, MELO3C015319.2), sendo que somente o primeiro foi positivamente regulado no genótipo resistente às 24 hai. O fator eIF3 interage com a subunidade 40S do ribossomo e está envolvido no mecanismo de reiniciação da tradução do cauliflower mosaic virus (CaMV) (Sanfaçon 2015), já o fator eIF6 está envolvido na biogênese de ribossomos (Kato, Konishi, Shigyo, Yoneyama, & Yanagisawa, 2010). Portanto, dado

que não existem relatos dos papéis desses fatores na resistência aos vírus de plantas e considerando que a resistência ao ZYMV em PI414723 é de caráter dominante, a ativação de eIF3 no genótipo resistente provavelmente ocorreu para atender a demanda de fatores para a tradução de proteínas de defesa.

Na região genômica estudada, foram identificados oito genes análogos a genes R, sendo 6 da classe de quinases (RLKs) e 2 da classe NB-LRR. A presença de genes R em *clusters* nas extremidades dos cromossomos de *Cucumis melo*, incluindo o chr2, já havia sido relatada mostrando a importância evolutiva da transferência conjunta de genes R em melão (Garcia-Mas et al. 2012). O gene RLK MELO3C015676.2 foi positivamente regulado no genótipo suscetível às 12 hai e no resistente às 24 hai, porém em maior intensidade, com *fold change* 4 vezes superior ao controle inoculado somente com tampão, comparado ao valor de 1,8 em 'Védrantais'. Dado sua expressão mais significativa em PI414723, é possível inferir a relevância deste RLK na resistência ao ZYMV. Embora a expressão de RLKs com domínios de lecitina esteja geralmente associada a resposta aos estresses abióticos, sua atividade é intensificada sob infecções a patógenos (Wang & Bouwmeester 2017).

Já um típico representante da classe RLK com domínio extracelular (MELO3C015415.2) foi positivamente regulado somente no genótipo suscetível às 12 hai, sendo essa expressão provavelmente associada à capacidade dos RLKs extracelulares em reconhecer elicitores gerais, como padrões do hospedeiro (DAMPs), não necessariamente envolvidos na resistência (Goff & Ramonell 2007). Muito embora alguns trabalhos tenham demonstrado a atuação de um RLK transmembrana no reconhecimento do tobacco mosaic virus (TMV) em *Arabidopsis*, denominado BAK1, que atua no controle da expressão de genes associados à resistência basal (Kørner et al., 2013).

Dois RGAs encontrados no intervalo do cromossomo 2 são citoplasmáticos e provavelmente atuam diretamente no reconhecimento do vírus (Gururani et al., 2012). O gene NB-LRR MELO3C015353.2 foi negativamente regulado no genótipo suscetível às 12 hai, ao passo que a expressão do gene CC-NB-LRR MELO3C015354.2 foi diferencialmente regulada entre os genótipos às 24 hai, ou seja, foi observada a expressão aumentada em PI414723, sugerindo sua importância na interação com o vírus. Isso se confirma pelo fato de que a maioria dos produtos de genes R de resistência a vírus possuem domínios CC-NB-LRR e conferem resistência do tipo monogênica e dominante, apenas alguns genes pertencem à classe TIR-NB-LRR

como é o caso do gene *Pvr1* de resistência ao papaya ringspot virus em melão (Gururani et al. 2012; Musidlak et al. 2017; Ronde et al. 2014). Esses dois RGAs citoplasmáticos já foram relatados como candidatos de resistência ao fungo *Podosphaera xanthii* no genótipo de melão 'Edisto47' (Natarajan et al., 2016). Portanto, é provável que o candidato MELO3C015354.2 seja um gene R de atuação a ambos os patógenos (*P. xanthii* e ZYMV). Ademais, esse RGA possui o domínio *Rx*, homólogo àquele de reconhecimento específico do potyvírus (PVX) em batata, sendo um forte candidato de resistência ao ZYMV.

A resistência dominante conferida por genes R envolve uma resposta de hipersensibilidade (RH), a qual pode desencadear uma morte celular programada (PCD) que rapidamente mata as células infectadas e impede o movimento sistêmico do vírus, hipótese aventada no primeiro capítulo como um dos mecanismos de resistência de PI414723. Contudo, o gene que codifica uma proteína de PCD (MELO3C015632.2) não foi positivamente regulado no genótipo resistente, mas o foi no genótipo suscetível às 12 hai. Essa expressão positiva em 'Védrantais' pode estar relacionada à manipulação do hospedeiro pelo vírus que culmina no aparecimento de sintomas, ou seja, a expressão do gene de morte celular em interações suscetíveis pode ser induzida pelo patógeno a fim de intensificar sua colonização (Greenberg, 1997).

Os genes MELO3C015587.2 e MELO3C015589.2 não pertencem à classe de genes NB-LRR, mas sim à classe RTM. Os dois genes RTM2 codificam proteínas *heat shock* e possuem alta similaridade entre si. Ambos foram positivamente regulados no genótipo resistente às 12 hai, porém não apresentaram expressão alterada no genótipo suscetível. Esses genes atuam impedindo o movimento sistêmico do vírus, não permitindo sua entrada no floema e sua disseminação sistêmica dentro do hospedeiro, embora neste mecanismo não esteja envolvida a interação direta de proteínas RTM e proteínas virais (CP), conhecida como um típico gene *Avr* (Cosson et al., 2012). Os genes RTM provavelmente atuam na replicação viral inibindo essa etapa essencial para o ciclo do patógeno, o que confirma os dados de quantificação no qual o título viral no genótipo resistente reduziu em comparação ao suscetível. Esse mecanismo foi relatado para outro gene R atípico de tomate, *Tm-1*, de resistência ao tomato mosaic virus (ToMV), que codifica uma proteína que se liga as proteínas virais inibindo a replicação do RNA (Ronde et al. 2014). A resistência ao

ZYMV que atua no movimento a longa distância ou impede a multiplicação viral também foi comprovada em pepino, sendo controlada por um gene recessivo (*zym*). O vírus foi localizado somente nas nervuras das primeiras folhas pela técnica de ELISA e nenhuma partícula viral foi detectada em folhas apicais (Ullah & Grumet, 2002). Isso foi observado em *Cucurbita moschata* 'Menina' resistente ao ZYMV, embora neste caso a resistência seja controlada pelo gene dominante *Zym-1* e outros genes complementares, assim como em melão (Lecoq & Katis, 2014). Sendo assim, os genes RTM2 escolhidos neste trabalho são fortes candidatos de resistência ao ZYMV, confirmando o resultado do capítulo anterior, onde foi verificado que o vírus é impedido de realizar a invasão sistêmica.

Tomados em conjunto, os resultados permitem propor um modelo de resposta de PI414723 ao ZYMV. Existem diferentes respostas dentro da imunidade desencadeada por efetores (ETI) variando de imunidade completa, na qual o vírus não se replica, restrição do vírus ao redor do sítio de infecção e impedimento da invasão sistêmica (Hull, 2014). A localização do vírus ao redor do sítio de infecção geralmente está associada à ocorrência de uma reação de hipersensibilidade, mas que nem sempre é visível a olho nu, como foi demonstrado em PI414723 no capítulo anterior. Nessas situações, é provável que este mecanismo seja uma via secundária de defesa (RGA às 24 hai) induzida somente quando a resposta inicial ao vírus (genes RTM2 às 12 hai) não tenha sido suficiente para restringi-lo abaixo de um título viral limite (Hull, 2014). Portanto, é proposto neste trabalho que a resistência de PI414723 ao ZYMV envolva duas respostas de defesa distintas, embora em ambas, esteja relacionada a resistência ativa com atuação dos genes R. Em um primeiro momento, a planta tenta impedir a invasão sistêmica através dos genes RTM2, e se o título viral ainda permanecer elevado, o mecanismo de resistência mediado por RGAs é ativado, limitando o vírus ao ponto de infecção em função da RH.

A posição do *locus Zym-1* no grupo de ligação 2 foi confirmada em trabalhos de mapeamento genético anteriores (Brotman et al., 2002; Danin-poleg et al., 1997, 2002; Diaz et al., 2011; Harel-Beja et al., 2010; Périn et al., 2002). Contudo, a identidade dos genes que compõem essa região foi primeiramente relatada no presente estudo. Dessa forma, os resultados desse trabalho abrem a perspectiva para trabalhos que envolvam a clonagem dos genes RGA (MELO3C015354.2) e RTM2 (MELO3C015587.2, MELO3C015589.2) de melão, ou para estudos que confirmem o

envolvimento desses candidatos na resistência ao ZYMV através do silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).

3.5. Conclusões

- O título viral em cotilédones inoculados de PI414723 e ‘Védrantais’ foi igual às 12 hai, mas o número de partículas virais no genótipo resistente foi menor às 24 hai;
- A resistência de PI414723 provavelmente não envolve fatores de tradução de natureza recessiva pertencentes às famílias 3 e 6;
- A resposta de defesa inicial ao vírus envolve a ativação de genes RTM2 às 12 hai e, posteriormente, ocorre ativação às 24 hai de um RGA (CC-NB-LRR) com domínio *Rx* homólogo ao de reconhecimento de vírus;
- Em ‘Védrantais’, os RGAS (NB-LRR) de resistência ativa são reprimidos às 12 e 24 hai;
- O *locus Zym-1* compreende um *cluster* de genes de resistência ativa que atuam na defesa ao ZYMV com mecanismos distintos.

Referências

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anagnostou, K., Jahn, M., & Perl-treves, R. (2000). Inheritance and linkage analysis of resistance to zucchini yellow mosaic virus , watermelon mosaic virus , papaya ringspot virus and powdery mildew in melon. 1997, 265–270.
- Blua, M. J. (1989). Effect of Zucchini Yellow Mosaic Virus on Development and Yield of Cantaloupe (Cucumis melo). *Plant Disease*, 73(4), 317. <https://doi.org/10.1094/pd-73-0317>

- Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Perin, C., Dogimont, C., Pitrat, M., Klingler, J., Thompson, G., & Perl-Treves, R. (2002). Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6), 1055–1063. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0808-x>
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/619832>
- Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Le Gall, O., Candresse, T., & Revers, F. (2012). The RTM Resistance to Potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural Variation of the RTM Genes and Evidence for the Implication of Additional Genes. *PLoS ONE*, 7(6), e39169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039169>
- Danin-poleg, Y., Paris, H. S., Cohen, S., Rabinowitch, H. D., & Karchi, Z. (1997). Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. 1, 331–337.
- Danin-poleg, Y., Tadmor, Y., Tzuri, G., Reis, N., & Hirschberg, J. (2002). Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. 4, 373–384.
- Deleu, W., Esteras, C., Roig, C., González-To, M., Fernández-Silva, I., Gonzalez-Ibeas, D., Blanca, J., Aranda, M. A., Arús, P., Nuez, F., Monforte, A. J., Picó, M. B., & Garcia-Mas, J. (2009). A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biology*, 9(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-90>
- Desbiez, C., & Lecoq, H. (1997). Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46(06), 809–829. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x>
- Diaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J. E., Zalapa, J. E., Cuevas, H. E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M., Hofstede, R., van Koert, P., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., ... Monforte, A. J. (2011). A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, 11(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-111>
- EPPO global database. (2016).

- Fazza, A. C., Dallagnol, L. J., Fazza, A. C., Monteiro, C. C., Lima, B. M. de, Wassano, D. T., & Camargo, L. E. A. (2013). Mapping of resistance genes to races 1, 3 and 5 of *Podosphaera xanthii* in melon PI 414723. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13(4), 349–355. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000400005>
- Fernandez-Silva, I., Eduardo, I., Blanca, J., Esteras, C., Pic??, B., Nuez, F., P., Garcia-Mas, J., & Monforte, A. J. (2008). Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0883-3>
- Fritsche-Neto, R., & Borém, A. (2012). *Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos*. (Editora UFV (Ed.); 1st ed.).
- Fukino, N., Ohara, T., Monforte, A. J., Sugiyama, M., Sakata, Y., Kunihiya, M., & Matsumoto, S. (2008). Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 165–175. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0885-1>
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., Heñaff, E., Cañara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blancae, J., Cañizares, J., Ziarso, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., ... Puigdomenech, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
- Goff, K. E., & Ramonell, K. M. (2007). The Role and Regulation of Receptor-Like Kinases in Plant Defense. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1, 167.
- Gonzalo, M. J., Oliver, M., Garcia-Mas, J., Monfort, A., Dolcet-Sanjuan, R., Katzir, N., Arús, P., & Monforte, A. J. (2005). Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 802–811. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1814-6>
- Greenberg, J. T. (1997). PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 48). www.annualreviews.org
- Guimarães, M. A., & Aragão, F. A. S. (2019). *Produção de Melão* (Editora UFV (Ed.); 1st ed.).

- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51–65. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2012.01.002>
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, A., Libhaber, S. E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougèdoire, A., Stalh, C., ... Katzir, N. (2010). A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(3), 511–533. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1327-4>
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5th ed.). Academic Press.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., ... Yeats, C. (2009). InterPro: The integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn785>
- Kato, Y., Konishi, M., Shigyo, M., Yoneyama, T., & Yanagisawa, S. (2010). Characterization of plant eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF6) genes: The essential role in embryogenesis and their differential expression in Arabidopsis and rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(4), 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.001>
- Kørner, C. J., Klauser, D., Niehl, A., Domínguez-Ferreras, A., Chinchilla, D., Boller, T., Heinlein, M., & Hann, D. R. (2013). The Immunity Regulator BAK1 Contributes to Resistance Against Diverse RNA Viruses. 26(11), 1271–1280. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-13-0179-R>
- Lecoq, H. (2014). Control of Cucurbit Viruses. *Advances in Virus Research*, 90, 255–296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00005-6>
- Li, D., Cuevas, H. E., Yang, L., Li, Y., Garcia-Mas, J., Zalapa, J., Staub, J. E., Luan, F., Reddy, U., He, X., Gong, Z., & Weng, Y. (2011). Syntenic relationships between cucumber (*Cucumis sativus* L.) and melon (*C. melo* L.) chromosomes as revealed by comparative genetic mapping. *BMC Genomics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-396>

- Lima, M. F. (2011). *Viroses de Cucurbitáceas*. Embrapa Hortaliças - Circular Técnica 95.
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, 54(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.03.028>
- McCreight, J., Bohn, W., & Kishaba, A. (1992). Pedigree of PI 414723 melon. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 15, 51–52.
- Musidlak, O., Nawrot, R., & Goździcka-Józefiak, A. (2017). Which Plant Proteins Are Involved in Antiviral Defense? Review on In Vivo and In Vitro Activities of Selected Plant Proteins against Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2300. <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>
- Natarajan, S., Kim, H.-T., Thamilarasan, S. K., Veerappan, K., Park, J.-I., & Nou, I.-S. (2016). Whole Genome Re-Sequencing and Characterization of Powdery Mildew Disease-Associated Allelic Variation in Melon. *PLOS ONE*, 11(6), e0157524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157524>
- Nick, C., & Borém, A. (2019). *Melão do Plantio à Colheita* (1st ed.). Editora UFV.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomènech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., Garcia-Mas, J., Aranda, M. A., & Bendahmane, A. (2006). An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal*, 48(3), 452–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02885.x>
- Osuna-Cruz, C. M., Paytuvi-Gallart, A., Donato, A. Di, Sundesha, V., Andolfo, G., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., & Ercolano, M. R. (2017). PRGdb 3.0: a comprehensive platform for prediction and analysis of plant disease resistance genes. *Nucleic Acids Research*, 46, 1197–1201. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1119>
- Pavan, M. A., Rezende, J. A. M., & Krause-Sakate, R. (2016). Doenças das Cucurbitáceas. In *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas* (pp. 323–334).

- Périn, C., Hagen, S., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C., & Pitrat, M. (2002). A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 104(6–7), 1017–1034. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0864-x>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36e – 36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pfaffl, Michael W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. <https://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>
- Pitrat, M., & Lecoq, H. (1984). Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. *Euphytica*, 33(1), 57–61. <https://doi.org/10.1007/BF00022750>
- Ritschel, P. S., Cesar De Lima Lins, T., Lourenço Tristan, R., Salles, G., Buso, C., Buso, J. A., & Ferreira, M. E. (2004). BMC Plant Biology Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/9>
- Robaglia, C., & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2005.11.004>
- Rodríguez-Hernández, A. M., GOSALVEZ, B., SEMPERE, R. N., BURGOS, L., ARANDA, M. A., & TRUNIGER, V. (2012). Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-eIF4E show broad virus resistance. *Molecular Plant Pathology*, 13(7), 755–763. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00785.x>
- Ronde, D., Butterbach, P., & Kormelink, R. (2014). Dominant resistance against plant viruses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue JUN, p. 307). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00307>
- Ruggieri, V., Alexiou, K. G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., Benhamed, M., Bendahmane, A., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., Puigdomènech, P., Casacuberta, J. M., & Garcia-Mas, J. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, 8(1), 8088. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2>

- Sanfaçon, H. (2015). Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses*, 7(7), 3392–3419. <https://doi.org/10.3390/v7072778>
- Sanseverino, W., & Ercolano, M. R. (2012). In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. *BMC Research Notes*, 5(1), 678. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-678>
- Shopan, J., Lv, X., Hu, Z., Zhang, M., & Yang, J. (2020). Eukaryotic Translation Initiation Factors Shape RNA Viruses Resistance in Plants. *Horticultural Plant Journal*, 6(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.03.001>
- Spadotti, D. M. de A., Wassano, D. T., Rezende, J. A. M., Camargo, L. E. A., Inoue-Nagata, A. K. (2015). Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Scientia Agricola*, 72(2), 187–191. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0197>
- The UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Ullah, Z., & Grumet, R. (2002). Localization of Zucchini yellow mosaic virus to the veinal regions and role of viral coat protein in veinal chlorosis conditioned by the zym potyvirus resistance locus in cucumber. *Physiological and molecular plant pathology*, 60(2), 79-89.
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), 77–78. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>
- Wang, Y., & Bouwmeester, K. (2017). L-type lectin receptor kinases: New forces in plant immunity. In *PLoS Pathogens* (Vol. 13, Issue 8). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006433>

Apêndices

Figura 1 Alinhamento entre os mapas físico e genético representados pelo Scaffold00025 do Cromossomo 2 (esquerda) e o grupo de ligação 2 (LGII) (direita). A distância no mapa físico foi dada em pares de base (pb) e no mapa genético em centimorgans (cM). A figura mostra os marcadores SSRs e SNPs (azul), o marcador CMAG36 ligado ao *locus Zym-1* (vermelho) e os genes candidatos (verde). A imagem foi gerada pelo programa MapChart v2.32 (Voorrips, 2002).

Figura 2 Proteínas codificadas pelos genes candidatos e seus domínios funcionais com base no banco de dados InterPro. Figura gerada pelo software DOG 2.0. **A.** Domínio CBFA_NFYB_dom: *Transcription factor CBF/NF-Y/archaeal histone domain* (IPR003958); **B.** Domínio Ser- Thr/Tyr_kinase_cat_dom: Serine-threonine/tyrosine-protein kinase, catalytic domain (IPR001245); **C.** Domínio LRR_dom_sf: Leucine-rich repeat domain superfamily (IPR032675) ; **D.** Domínio RX-like_CC: Virus X resistance protein-like, coiled-coil domain (IPR038005) , Domínio: NB-ARC (IPR002182) ; Domínio LRR_dom_sf: Leucine-rich repeat domain superfamily (IPR032675) **E.** Domínio Prot_kinase_dom : Protein kinase domain (IPR000719) ; **F.** Leu-rich_rpt: Leucine-rich repeat (IPR001611), Domínio Prot_kinase_dom : Protein kinase domain (IPR000719) ; **G.** Domínio Prot_kinase_dom : Protein kinase domain (IPR000719) ; **H.** Domínio CSN8/PSMD8/EIF3K (IPR033464) ; **I.** Domínio Prot_kinase_dom : Protein kinase domain (IPR000719); **J.** Domínio A-crystallin/Hsp20_dom: Alpha crystallin/Hsp20 domain (IPR002068); **K.** Domínio A-crystallin/Hsp20_dom: Alpha crystallin/Hsp20 domain (IPR002068); **L.** Domínio Znf_MYND: Zinc finger, MYND-type (IPR002893), PDCD2_C: Programmed cell death protein 2, C-terminal (IPR007320) ; **M.** Domínio Bulb-type_lectin_dom: Bulb-type lectin domain (IPR001480), Domínio Prot_kinase_dom : Protein kinase domain (IPR000719).

A

MELO3C015587.2	1	MDPSSSAKNTCEFEPRYDWVHHFDSHVLVVRLSGFRSNQLKQVITSTGKLRVSGERKLG	60
MELO3C015589.2	1	MDPSSSAKNTCEFEPRYDWVHHFDSHVLVVRLSGFRSNQLKQVITSTGKLRVSGERKLG	60

MELO3C015587.2	61	GWLRFEKEIDIPADADTKISAKLEEGILYVQPKKLSATSSNIPFVQOPKPKFQSQPF	120
MELO3C015589.2	61	GWLRFEKEIDIPADADTKISAKLEEGILYVQPKKLSATSSNIPFVQOPKPKFQSQPF	120

MELO3C015587.2	121	PAATKPTADPPTVRES:PKS:NER:EPPKPAATEPTVAPPTVGPKAPESQNERADIPS	180
MELO3C015589.2	121	PAATKPTADPPTVRES:PKS:NER:EPPKPAATEPTVAPPTVGPKAPESQNERADIPS	180

MELO3C015587.2	181	A-KTNVINYAPRPTVGNAPKSNDRPQSQASGKQIPTPPKPEEATGAPETSMSGSGQF	240
MELO3C015589.2	181	A-KTNVINYAPRPTVGNAPKSNDRPQSQASGKQIPTPPKPEEATGAPETSMSGSGQF	235

MELO3C015587.2	241	VEDLAKNEKTEEGKAHTKLQDAVEKTRTEEGKEEEGSSMGGGERASWR	290
MELO3C015589.2	236	VEDLAKNEKTEEGKAHTKLQDAVEKTRTEEGKEEEGSSMKAEEHMEVGEKRRRRMR	295

MELO3C015587.2	291	-FEFEFEK-----	299
MELO3C015589.2	296	RNEEMGEESGLRRRREGYKQVIDGVVKEIRTNMVTALGVAVFAILYLNLSENGHI	351

B

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	1	MAESILFTLANIATKLGSGFHLHELGLLWTFHEELDKLKDTLSAIQAVLLDAEEKQYKS	60

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	61	YAVKEWVSRLKDAFYDIDDLMEFYSIESIKRQVMIKHRTNNKQVRIFFSESQIAFLRM	120

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	121	GYSIKRVREKLDIVADKAQFNLSYREIRNDETTKRPETSSFILEGEVIGRDDDKGI	180

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	181	VHFLDNTVAQENVAVVAIIGMGLGKTLAQSIVGDMKENKHFEITMWCISEEFVVKI	240

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	241	IVEKIIESLTKKRPEPNLQDITLQNMRLREKIDGKRYLLVMDVWNVNREKWINLKAFITG	300

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	301	GAKGSRILITRTHQVAHTSETVLFHHLSELNKNSSWELFRMAFSNESEVLNSKLVII	360

MELO3C015353.2	1	-----	0
MELO3C015354.2	361	GKEIVANLKGSLALRVIGSVLYSKKTEKDWLSFKDNELGTIMQQENIQSLIKISFNQL	420

MELO3C015353.2	1	-----MAQSEIQPNKKTMEDVGDVDYFKELMGASFF	31
MELO3C015354.2	421	SSGLKQCFTYCALFPKDYEIQKDDLIKQMAQSEIQPNKKTMEDVGDVDYFKELMGASFF	480

MELO3C015353.2	32	QDIRKNKWEIKEFKHDIIHDLACSVVENDCVLANDDTKSIDKRTLVST----SKTRW	87
MELO3C015354.2	481	QDIRKNKWEIKEFKHDIIHDLACSVVENVCVLINDDTKSIDKRTLVSTSTFI--SKTRW	540

MELO3C015353.2	88	EUVKESIKAKNLRITLNNASENVYGGKIFIDLSNHLRLATINLESHYYVLDTPROIGIKMK	147
MELO3C015354.2	541	KVITESIKAKNLRITLNYCD-----KIDLSNHLRLATINVDV---LYHVERKIGIKMK	590

MELO3C015353.2	148	HLAYIN:SHSDDEFLRGVTELYHLETLIIRDCMKTRFSPDIKNLINLRHLDKKNLIHF	207
MELO3C015354.2	591	HLAYVLSNIMDELEKFIETKINLETLIIRDCQRMGMSPDIKNLINLRHLDKKNLIHF	647

MELO3C015353.2	208	DVWVRGRGSVMEKMGSMITLQTMNLYVLGNKGGELSELNGLINLRGSLSTRELQFOCK	267
MELO3C015354.2	648	----NSNCSSSMEVGLGSMITLQTMNLYVLGNKGGELSELNGLINLRGSLSTRELQFOCK	703

MELO3C015353.2	268	PIGLENAKYLEEKSGIRKLKHC-IFGRKLSKIDYDEKVLKLECLPFPNLOKCIKGYR	326
MELO3C015354.2	704	TPLENAKYLEEKSGIKLPLHWDSSYIGRNTFNDEKVLKLECLPFPNLOKCIKRIEGYR	763

MELO3C015353.2	327	GVKLCNWFSGNIGSLVNIKLNWCEKLOHLRFDOQFPFLKHLHLSLPNIEFIDNNKIVS	386
MELO3C015354.2	764	GVKLCNWFSGNIGSLVNIKLCCEKLOHLRFDOQFPFLKHLHLSLPNIEFIDNNKIVS	823

MELO3C015353.2	387	HSLTIFFPSLEKLSITDLPKLKENWKGFIQDITTFPTILHHLISLTFNCPOLGSIKPK	446
MELO3C015354.2	824	SLLTIFFPSLEKLSITDLPKLKENWKGFIQDITTFPTILHHLISLTFNHCPOLGSIKPK	883

MELO3C015353.2	447	GPIHSLDISDISLQFLVMEVMAITNIIVGSDSSSSATISLSSIRSNMDFEFVLYDL	506
MELO3C015354.2	884	GPIHSLDVGVSLSLQFLVMEVMAITNIIVGSDSSSSATISLSSISWDMDFEELQHL	942

MELO3C015353.2	507	FSNMTHLEFVYLLCKKNKMSSSLDGVINWGLGSLRRRIIWSIPLEVLPKGLQVTTLO	566
MELO3C015354.2	943	FSNMTHLKSIVYLLCKKNKMSSSREGVINWGLGSLRRRIIWSIPLEVLPKGLQVTTLO	1002

MELO3C015353.2	567	YEISDQPNLYP-----	578
MELO3C015354.2	1003	CHLYDGRNLVSIEGIEHLTSLSLEIEYCPNLISVPQEMQLTSLRLRINGCPNLPSL	1062

MELO3C015353.2	579	-----	578
MELO3C015354.2	1063	PEGLRHVTFMYEDLFTP	1080

Figura 3 Alinhamento das seqüências de proteínas codificadas pelos genes candidatos RTM2 e RGA. **A.** Proteínas dos genes RTM2 (MELO3C015587.2 e MELO3C015589.2) que possuem 73,32% de similaridade entre si e 261 posições idênticas (*). **B.** Proteínas dos genes RGA (MELO3C015353.2 e MELO3C015354.2) que possuem 38,53% de similaridade entre si e 423 posições idênticas. Alinhamento realizado no programa ClustalOmega v.1.2.2 da plataforma Uniprot.

A

Genes Geomean of ranking values
 CmUBI 1.19
 CmADP 1.86
 Cm18S 2.83
 CmACT7 3.22

B

Gene name	Stability value
CmUBI CmADP	0.632
CmACT7	0.696
Cm18S	1.034

Figura 4 Estabilidade de genes normalizadores analisados individualmente (A) ou conjuntamente (B), de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo programa RefFinder. CmUBI= proteína de extensão da ubiquitina, CmADP= fator de ribosilação ADP 1, CmACT7= Actina 7 e Cm18S=18S ribossomal.

Figura 5 Quantificação absoluta do ZYMV por qPCR às 12 e 24 horas após a inoculação (hai) de cotilédones inoculados e aos após a inoculação da primeira folha completamente expandida e de PI414723 e 'Védrantais'. As barras representam a média de dez repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes e a barra de erros indica o desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas para cada tempo após a inoculação no programa R v.1.0.136. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) para análises feitas entre os genótipos e dentro de cada tempo após a inoculação, separadamente.

Figura 6 Expressão relativa de genes candidatos de *Cucumis melo* L. por qPCR. As amostras inoculadas com o vírus foram comparadas com amostras *mock* de plantas resistentes (PI414723) e suscetíveis ('Védrantais') para cada tempo após a inoculação (12 e 24 hai). Os valores representam as médias de dez repetições biológicas oriundas de dois experimentos independentes e. As comparações estatísticas foram feitas dentro de genótipos e de cada tempo de avaliação. O asterisco nas barras indica diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 1 Genes de *Cucumis melo* L. selecionados como normalizadores das análises de expressão gênica por qPCR mostrando os códigos dos genes (Gene ID), as proteínas codificadas (anotação), os *primers* utilizados para amplificação dos genes, as temperaturas de anelamento (Ta) correspondentes e o tamanho do fragmento esperado em pares de base (pb)

Gene ^a	Gene ID ^b	Anotação ^c	Sequências de <i>primers</i> ^d	Ta (°C)	Fragmento (pb)
CmACT	MELO3C023264	β-Actina	F: GAGCATCTAAACGGAGAGTTGG R: GCCATCGTTTATAGATACTTGAGGA	58	104
CmACT7	MELO3C008032	Actina-7	F: CCCTGGTATTGCAGACAGGA R: ACATCTGCTGGAAGGTGCTT	58	149
Cm18SrRNA	MU60789	RNA 18S ribossomal	F: CGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTA R: CTACGAGCTTTTAACTGCAACAA	58	137
CmTUA5	MELO3C026613	Tubulina alfa-5	F: AGGACTGGGACATACCGACA R: CGGCTAATTTTCGCACTCGG	58	145
CmL2	MELO3C000111	Proteína ribossomal L2	F: AAATTCTACCCCGAGCACA R: TATGACCTCCCCCTCTATGC	58	150
CmRPL	MELO3C023039	Proteína ribossomal L	F: CGACAATACTGGAGCCAAGAA R: CATCACCATATCTCCCACACAA	58	100
CmGAPDH	MELO3C019633	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	F: CATGGTGTTTTCAACGGAACCA R: CCCATGGGATATCTGCAGGG	58	110
CmEF1α	MELO3C020441	Fator de elongação 1-α	F: CTGCTTGCTCCTGCGTTAAA R: CCACGATGTTGATATGAGTCTTTTC	58	113
CmUBI	MELO3C016083	Proteína de extensão da ubiquitina	F: AAGTGTGGACACAGCAACCA R: AAGCCAAATGGCTCTAAGCA	58	132
CmADP	MELO3C023630	Fator de ribosilação ADP-1	F: ATATTGCCAACAAGGCGTAGA R: TGCCCGTAAACAAGGGATAAA	58	93

^aTerminologia utilizada por Kong et al. (2014, 2016)

^bGene ID do banco de dados *Melonomics* (<https://melonomics.net/genome/>) e *Cucurbit Genomics Database* (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>)

^c Anotação de acordo com o banco de dados *Melonomics* v4.0

^d F: *primer forward*; R: *primer rev*

Tabela 2 Posição em centimorgans (cM) dos marcadores no mapa genético e sua posição física em pares de base (pb) para cada um dos sete *scaffolds* que compõem o cromossomo 2 de *Cucumis melo*

SSR	Posição no mapa genético (cM) ^a	Posição no mapa físico (pb) ^b	Cromossomo2
CMBR041	0	490.530	scaffold00025
CMBR120	2	787.823	scaffold00025
CMSNP6	2	849.361	scaffold00025
CMAG36	3	900.721	scaffold00025
<i>Zym-1</i>	4		
CMAGN39	4	900.724	scaffold00025
CU160	10	1.149.069	scaffold00025
CmHK1	11	1.482.244	scaffold00025
CmSUS1	12	2.784.333	scaffold00025
ECM61	17	3.307.608	scaffold00025
CMSNP27	20	5.964.696	scaffold00024
CMAAGN283	21	7.476.606	scaffold00024
CMSNP48	27	15.180.957	scaffold00012
TJ24	27	16.187.633	scaffold00012
CMSNP51	35	18.154.404	scaffold00099
CMCGGN210	38	20.821.579	scaffold00069
CMBR066	37	23.059.628	scaffold00030
CMCTTN179	58	24.768.406	scaffold00030
CMGCTN187	75	25.871.308	scaffold00030
CMSNP26	74	25.953.839	scaffold00030
CMCT44	86	26.615.819	scaffold00089

^a Posição segundo o mapa genético de Harel-Beja et al. (2010)

^b Posição no mapa físico de *Cucumis melo* v3.6.1 disponível em *Melonomics* (<https://melonomics.net/genome/>) e *Cucurbit Genomics Database* (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>)

Tabela 3 Genes candidatos de resistência ligados ao *locus Zym-1* no cromossomo 2 de *Cucumis melo*, mostrando o código do gene em bancos de dados (Gene ID), sua posição no cromossomo 2, a proteína codificada pelo gene, os *primers* para amplificação, a temperatura de anelamento para amplificação (Ta) e o tamanho esperado do fragmento em pares de base (pb)

Gene ID	Início(nt) ^a	Fim(nt) ^a	Anotação ^b	Sequências de <i>primers</i> ^c	Ta (°C)	Fragmento (pb)
MELO3C015319.2	737.929	742.033	Fator eucariótico de iniciação da tradução 6 (eIF6)	F: GTCTGCTTTGGGAAACACGA R: TTGATGGTGATGAAACAAGTGA	55,5	116
MELO3C015340.2	864.934	868.230	Proteína serina/treonina quinase CDL1	F: CACCACACAATCCACCACAT R: TTCTCCCAGAGTTTCCTCCA	61	133
CMAG36 ^d	900.721	900.856	Marcador microssatelite ligado ao <i>Zym-1</i>	F: TACATTATGGGTAAGGTAAG R: CCATCTCTTAACCTTCTCTC	51	135
MELO3C015353.2	985.162	987.242	Proteína de resistência a doença RGA2- <i>like</i>	F: CCGCCCTTGCTCAATCTATC R: TGAAGGTTGGACTCGGGTTT	61	154
MELO3C015354.2	990.582	993.823	Proteína de resistência a doença RGA2- <i>like</i>	F: TTTCTCAAGCACCTTCATCTCG R: TTCCCCTTTCCACCATTCTTTC	61	153
MELO3C015376.2	1.171.283	1.180.440	Proteína quinase	F: TCTGGATTGGAGCACTGTCA R: CCATAAGGTAACCAACCCGACT	54,5	168
MELO3C015415.2	1.475.488	1.479.074	Receptor do tipo proteína quinase 5	F: GGGGAAGTTGGCACTGAAT R: CAAGATGCTGCGACGAAAT	60	188
MELO3C015524.2	2.550.378	2.551.882	Receptor do tipo quinase	F: AGACCGACGATGAACGAAGT R: ATTGCTCGCCCCATTTTCT	60	192
MELO3C015553.2	2.796.241	2.799.599	Fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade k (eIF3)	F: TGCCTTCTTCGTCTCTACCAG R: AAAACCATCCAGCAACAACC	61,5	140
MELO3C015567.2	2.934.501	2.938.347	Proteína quinase	F: TGCTCGCTTATCATTGCTTG R: TTGTTTCAGATGCCGCTACT	60	120
MELO3C015587.2	3.111.146	3.112.834	Proteína da classe <i>heat shock</i> I de 18.2 KDa (RTM2)	F: AGAGCCGACATTCCATCAATC R: TTGGAGGAGTGGGGATTTGTTT	58	142
MELO3C015589.2	3.116.494	3.118.389	Proteína da classe <i>heat shock</i> I de 18.2 KDa (RTM2)	F: CAAGAACTCCCCACCACCT R: TTCGGCTCTTTGGAACACTT	61	140
MELO3C015632.2	3.581.687	3.585.990	Proteína de morte celular programada 2	F: GAGATTGGTGCGGTGGAAT R: AACGAAACCCAAAACCACTG	59	141

MELO3C015676.2	4.513.375	4.515.783	Proteína serina/treonina quinase	F: GTTTCATCTACCACCGCAGA R: ATCCTCGTCCCAGTTCTTCC	60	135
----------------	-----------	-----------	----------------------------------	--	----	-----

^aPosição do gene no scaffold00025 do cromossomo 2

^bAnotação de acordo com o banco de dados *Melonomics*, genoma v3.6.1 e anotação v4.0 (<https://melonomics.net/genome/>)

^cF: *primer forward*; R: *primer reverse*

^dPérin et al. (2002)

Tabela 4 BLASTp de proteínas codificadas pelos genes candidatos de resistência ligados ao *locus Zym-1* no cromossomo 2 de *Cucumis melo* pelo programa Uniprot, mostrando o código do gene (Gene ID), a anotação da proteína, hits, identidade (%) e E-value com proteínas próximas de outras espécies

Gene ID	Anotação	Hits (espécie, entry Uniprot)	Identidade (%)	E-value
MELO3C015319.2	Fator eucariótico de iniciação da tradução 6 (eIF6)	Fator eucariótico de iniciação da tradução 6-2 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , Q9M060)	86,3	2,2e-149
MELO3C015340.2	Proteína serina/treonina quinase CDL1	Proteína quinase (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0LYI7)	97,2	0
MELO3C015353.2	Proteína de resistência a doença RGA2- <i>like</i>	Proteína de domínio NB-ARC (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0M1L7)	69,5	0
MELO3C015354.2	Proteína de resistência a doença RGA2- <i>like</i>	Proteína de domínio Rx_N (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0KIT2)	68,6	0
MELO3C015376.2	Proteína quinase	Proteína serina/treonina quinase (<i>Arabidopsis thaliana</i> , At1g54610)	68,3	0
MELO3C015415.2	Receptor do tipo proteína quinase 5	Proteína quinase (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0LWA3)	93,3	0
MELO3C015524.2	Receptor do tipo quinase	Proteína serina/treonina quinase PBL13 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , F4JZW1)	74,9	1,4e-105
MELO3C015553.2	Fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade k (eIF3)	Fator eucariótico de iniciação da tradução 3 subunidade k (<i>Arabidopsis thaliana</i> , Q9SZA3)	70,1	1,4e-108
MELO3C015567.2	Proteína quinase	Proteína serina/treonina quinase PBL16 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , Q9FM85)	77,3	0
MELO3C015587.2	Proteína da classe <i>heat shock</i> I de 18.2 KDa (RTM2)	Proteína da classe small <i>heat shock</i> (SHSP) (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0M2E7)	78,7	8e-162
MELO3C015589.2	Proteína da classe <i>heat shock</i> I de 18.2 KDa (RTM2)	Proteína da classe small <i>heat shock</i> (SHSP) (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0M2E7)	80,9	0
MELO3C015632.2	Proteína de morte celular programada 2	Proteína de domínio do tipo <i>zinc finger</i> -MYND (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0LZV6)	95,5	0
MELO3C015676.2	Proteína serina/treonina quinase	Receptor serina/treonina quinase (<i>Cucumis sativus</i> , A0A0A0LZJ7)	94,1	0