**SELEÇÃO DE ESTIRPE FRACA DO *Zucchini yellow mosaic vírus*
(ZYMV) E CONTROLE DOS MOSAICOS COMUM (*Papaya ringspot
vírus*) E AMARELO (ZYMV) POR DUPLA PREMUNIZAÇÃO EM
ABOBRINHA-DE-MOITA**

LUIZ CLAUDIO RABELO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Abril – 2002

**SELEÇÃO DE ESTIRPE FRACA DO *Zucchini yellow mosaic vírus*
(ZYMV) E CONTROLE DOS MOSAICOS COMUM (*Papaya ringspot
vírus*) E AMARELO (ZYMV) POR DUPLA PREMUNIZAÇÃO EM
ABOBRINHA-DE-MOITA**

LUIZ CLAUDIO RABELO

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Abril – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rabelo, Luiz Claudio

Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot virus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita / Luiz Claudio Rabelo. - - Piracicaba, 2002.
55 p. il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Abobrinha 2. Anatomia vegetal 3. Mosaico (Doença de planta) 4
Potyvirus I. Título

CDD 635.62

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais,
Reinaldo e Elza
OFEREÇO.

À minha querida esposa Erica,
pelo incentivo, compreensão e
apoio; aos filhos Larissa, Sabrina e
Matheus pela alegria que sempre
trouxeram.

DEDICO

SUMÁRIO		Página
RESUMO.....		vii
SUMMARY.....		ix
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Preparo de plantas-teste.....	12
3.1.1	Para os testes em casa-de-vegetação.....	12
3.1.2	Para os testes em campo.....	13
3.2	Estirpes dos vírus.....	13
3.3	Inoculação mecânica.....	13
3.4	Superinoculação com estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W	14
3.5	Escala de notas de sintomas.....	14
3.6	Purificação do ZYMV.....	14
3.7	PTA-ELISA.....	15
3.8	Procura de estirpes fracas do ZYMV.....	16
3.8.1	A partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas em casa-de-vegetação.....	16
3.8.2	A partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas a 15 °C.....	17
3.8.3	A partir de lesões locais em plantas indicadoras inoculadas com suspensão purificada do vírus exposta à luz ultravioleta.....	17
3.9	Indexação das plantas e seleção de estirpes fracas.....	18
3.10	Avaliação da estabilidade das estirpes fracas do ZYMV.....	18

3.11	Teste de efeito protetor das estirpes fracas em casa-de-vegetação.....	19
3.12	Teste de efeito protetor das estirpes fracas em condições de campo.....	20
3.13	Análise estatística.....	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Estirpes fracas do ZYMV.....	23
4.1.1	Obtidas de lesões locais em plantas indicadoras mantidas em casa-de-vegetação.....	23
4.1.2	Obtidas de lesões em plantas indicadoras mantidas a 15 °C.....	24
4.1.3	Obtidas de lesões locais em plantas indicadoras inoculadas com suspensão purificada do vírus exposta à luz ultravioleta.....	25
4.2	Estabilidade da estirpe fraca ZYMV-M.....	26
4.3	Efeito protetor da estirpe fraca ZYMV-M em casa-de-vegetação	27
4.4	Proteção em condições de campo.....	31
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela minha família, pela oportunidade de crescimento e evolução;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação profissional;
Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola por toda a estrutura e assistência necessárias à realização desse trabalho;

Ao Professor Jorge Alberto Marques Rezende, pelo estímulo e ensinamentos recebidos no início da carreira científica e que muito contribuíram para alcançar essa etapa;

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração e agradável convívio;

Aos companheiros do laboratório de Virologia Vegetal: Danilo, Davi, Edivaldo, José Segundo, Juliana, Marília, Paulo, Quelmo, Ricardo e Zayame pelos bons momentos compartilhados;

Ao Sr. Pedro C. Arthuso que colaborou nos trabalhos de casa-de-vegetação e de campo do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ-USP.

Aos colegas do curso e a todos que ajudaram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos

SELEÇÃO DE ESTIRPE FRACA DO *Zucchini yellow mosaic vírus* (ZYMV) E CONTROLE DOS MOSAICOS COMUM (*Papaya ringspot vírus*) E AMARELO (ZYMV) POR DUPLA PREMUNIZAÇÃO EM ABOBRINHA-DE-MOITA

Autor: LUIZ CLAUDIO RABELO

Orientador: Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

RESUMO

No presente trabalho são apresentados os resultados da seleção de estirpes fracas do vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) e a sua eficiência para o controle do mosaico amarelo em abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta), através da premunização. Mostram também os resultados da eficiência da dupla premunização, com a estirpe fraca do ZYMV e uma estirpe fraca do *Papaya ringspot virus* – *type Watermelon*, denominada PRSV-W-1, no controle dos mosaico amarelo e comum e na produção das plantas de abobrinha-de-moita, em condições de campo. A procura de estirpes fracas do ZYMV foi realizada através das seguintes abordagens: a) a partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas em casa-de-vegetação; b) a partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas a 15 °C e c) a partir de lesões locais em plantas indicadoras inoculadas com suspensão parcialmente purificada do vírus, exposta à luz ultravioleta. Apenas uma estirpe fraca (“Mild”) do vírus, denominada ZYMV-M, foi obtida em abobrinha-de-moita diretamente inoculada com suspensão

parcialmente purificada do vírus, exposta à luz ultravioleta, durante 30 minutos. Essa estirpe fraca mostrou-se altamente estável, com base na sintomatologia, após 12 transferências sucessivas em plantas de abobrinha-de-moita, durante 15 meses.

Plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe ZYMV-M e superinoculadas (desafiadas) com estirpes severas originárias de Atibaia, SP (ZYMV-AT), de Iacri, SP (ZYMV-IA) e de Vargem Paulista, SP (ZYMV-VP), não exibiram sintomas severos da doença em testes em casa-de-vegetação. A mesma proteção foi observada em plantas duplamente premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1 e desafiadas com uma mistura de estirpes severas desses dois vírus, em condições de casa-de-vegetação.

Teste de proteção em campo, com plantas de abobrinha-de-moita premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, ou duplamente premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, também mostraram a eficiência dessa tecnologia para o controle dos mosaicos amarelo e comum, com ganhos significativos na produção de frutos comerciais. As plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, e duplamente premunizadas, tiveram médias de produções de semelhante, com média de 1,85 kg e 1,70 kg de frutos comerciais/planta, respectivamente. Os ganhos de produções dessas plantas, em relação às plantas inoculadas com as estirpes severas desses vírus foram de 101 % e 85 %, respectivamente.

Diante desses resultados, tornam-se necessários estudos para avaliar a eficiência da dupla premunização para o controle dos mosaicos amarelo e comum, em outras espécies de cucurbitáceas suscetíveis ao ZYMV e PRSV-W.

SELECTION OF MILD STRAIN OF *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) AND CONTROL OF *Papaya ringspot virus* AND ZYMV BY DOUBLE CROSS PROTECTION IN ZUCCHINI SQUASH

Author: LUIZ CLAUDIO RABELO

Adviser: Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

SUMMARY

Due to the present high incidence of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and the damage it causes to cucurbit crops, studies were carried out to select mild strains of the virus and evaluate their efficiency for the control of the disease by cross protection in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L. cv. Caserta). Studies were also done to evaluate the efficiency of double cross protection for the control of ZYMV and *Papaya ringspot virus – type W* (PRSV-W) in zucchini squash under greenhouse and field conditions. Searching for mild strains was carried out as follows: a) from local lesions caused by ZYMV on indicator hosts maintained under green house conditions; b) from local lesions caused on indicator hosts maintained at 15 °C; and c) from local lesions caused on indicator hosts inoculated with suspension of purified ZYMV, exposed to ultra-violet light. Only one very mild strain of the virus, named ZYMV-M, was obtained in zucchini squash plant directly inoculated with suspension of purified ZYMV exposed to ultra-violet light for 30 minutes. This mild strain remained stable for a period of 15 months, after 12 successive transfers in zucchini squash plants.

Experiments carried out under greenhouse showed that zucchini squash plants protected with ZYMV-M, at the cotyledonal stage, did not show severe symptoms of the disease after double challenge inoculation with severe strains of the virus, obtained from three regions of the State of São Paulo. Plants inoculated with the mild strain ZYMV-M and a mild strain of PRSV-W, named PRSV-W-1, were also protected against superinfection with severe strains of both viruses.

Field test carried out with zucchini squash protected with ZYMV-M and doubly protected with ZYMV-M and PRSV-W-1, showed that this technology was effective for the control of the mosaic diseases caused by severe strains of these viruses. The yield of marketable fruits from plants protected with ZYMV-M, or doubly protected, were 1.85 kg and 1.70 kg of fruits/plant, respectively. These yields were, respectively, 101 % and 85 % higher than the yield of marketable fruits from plants inoculated with a mixture of severe strains of both viruses.

Studies are necessary to evaluate the efficiency of double cross protection for the control of ZYMV and PRSV-W in other cucurbit species susceptible to these viruses.

1 INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae é constituída de cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies. Dentre essas, várias são de grande valor econômico e social na horticultura alimentar mundial. No Brasil, as espécies com maior expressão econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha-de-moita e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). Segundo Lopes (1991), o cultivo das cucurbitáceas, além do valor econômico e alimentar, também tem grande importância social na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda um grande número de mão de obra desde o cultivo até a comercialização.

As cucurbitáceas em geral estão sujeitas a várias doenças causadas por vírus, que podem reduzir substancialmente a sua produtividade. Mais de 20 vírus diferentes já foram encontrados na natureza infectando plantas dessa família (Lovisol, 1980). Desses, oito foram encontrados no Brasil até o final de 1995: o vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus* - SqMV) (Chagas, 1970); o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) (Costa et al., 1972); o vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type W - PRSV-W) (Albuquerque et al., 1972); o vírus da clorose letal da abobrinha (*Zucchini lethal chlorosis virus* – ZLCV) (Costa et al., 1972; Pozzer et al., 1994; Rezende et al., 1997); o vírus da necrose da abóbora (provável *Necrovirus*) (Lin et al., 1983); o vírus 2 do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* – 2 - WMV-2) (Sá & Kitajima, 1991), um possível *Rhabdovirus* (Kitajima et al., 1991) e o vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) (Vega et al., 1992, 1995; Caner et al., 1992).

O ZYMV foi constatado primeiramente nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, no início da década de 90 (Caner et al., 1992; Vega et al., 1992) e posteriormente nos Estados do Ceará (Lima et al., 1996; Oliveira et al., 2000), da Bahia (Novaes et al., 1999), do Rio Grande do Norte (Oliviera et al., 2000), do Pará (Poltronieri et al., 2000), do Mato Grosso do Sul (Stangarlin et al., 2001) e do Maranhão (Moura et al., 2001).

Estudos recentes sobre a incidência de viroses em cucurbitáceas no Estado de São Paulo confirmaram que o PRSV-W ainda é o vírus predominante, constatado em 48,3 % das amostras analisadas, seguido pelo ZYMV, que foi encontrado em 24,5 % das amostras (Yuki et al., 2000). Stangarlin et al. (2000), em um primeiro estudo realizado com amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas, também constataram que o PRSV-W e o ZYMV foram os vírus de maior incidência no Estado do Mato Grosso do Sul. Posteriormente, avaliando a incidência de viroses em ensaios de genótipos de abóboras e pepino nesse mesmo Estado, Stangarlin et al. (2001) verificaram que os vírus mais comuns foram o PRSV-W, o ZLCV e o ZYMV, com incidências médias de 63,4 %, 56,1 % e 41,4 %, respectivamente. No Estado do Maranhão também foi verificada a predominância do PRSV-W (64,4 %) em amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas, enquanto o ZYMV foi detectado em apenas 3,4 % das amostras analisadas (Moura et al., 2001). Na região do sub-médio do São Francisco, entretanto, estudos sobre a incidência de viroses em melão (*Cucumis melo* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) mostraram que o WMV-2 foi encontrado em 68,7 % das amostras analisadas, enquanto o PRSV-W foi detectado somente em 31,2 % (Cruz et al., 1999).

Tanto o PRSV-W quanto o ZYMV são transmitidos com eficiência, de maneira não persistente, por diversas espécies de afídeos e causam doenças que provocam grandes danos à produção de cucurbitáceas em diversos países onde ocorrem (Lisa & Lecoq, 1984; Purcifull et al., 1984). No Brasil, apesar de o ZYMV estar presente em diversos estados, não há relatos sobre danos causados por esse vírus ou recomendações para o seu controle.

Diante do fato de que o ZYMV destaca-se como segundo vírus em incidência em algumas áreas produtoras de cucurbitáceas no país, tornam-se necessários estudos que visam o desenvolvimento de medidas para o seu controle. Entre as diferentes abordagens de controle encontra-se a de premunização com estirpes fracas do vírus.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos: (a) selecionar estirpes fracas do ZYMV; (b) avaliar o valor protetor das estirpes fracas em abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) em condições de casa de vegetação e em campo e (c) avaliar o efeito da dupla premunização, com estirpes fracas do ZYMV e do PRSV-W, para o controle dos mosaicos amarelo e comum, respectivamente, em abobrinha-de-moita em casa de vegetação e em campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O ZYMV é uma espécie do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* com partículas alongadas e flexuosas, de aproximadamente 750 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro, composto de RNA de fita simples com aproximadamente 9600 nucleotídeos. O RNA viral é protegido em uma capa protéica, cujas proteínas têm peso molecular de 36 kDa (Lisa e Lecoq, 1984; Van Regenmortel et al., 2000). O ZYMV induz a formação de inclusões cilíndricas, do tipo catavento, em plantas infectadas, que são geralmente do tipo I de acordo com a classificação de Edwardson & Christie (1978).

A transmissão do ZYMV na natureza é feita por diversas espécies de afídeos, sendo a relação vírus vetor do tipo não persistente (Lisa e Lecoq, 1984). Pelo menos 9 espécies de afídeos já foram relatadas como vetoras desse potyvirus: *Acyrtosiphon rondoi* Shinji, *A. pisum* (Harris), *Aphis craccivora* Koch, *A. gossypii* Glover, *A. middletonii* (Thomas), *A. spireacola* Van der Goot, *Lypaphis erysimi* Kaltenbach, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Myzus persicae* (Sulzer), *Uroleucon* sp. (Perring et al., 1992). Duas proteínas virais são requeridas pelos afídeos para a transmissão desse potyvirus: a proteína da capa protéica (CP) e uma proteína não estrutural, denominada componente auxiliar (“helper component” - HC) (Pirone, 1991). Há relatos também sobre a transmissão do ZYMV pela semente, porém as informações encontradas na literatura são conflitantes. Greber et al. (1988) e Schrijnwerkers et al. (1991), mostraram que o ZYMV foi transmitido por sementes de *C. pepo*, com taxas de 1,0 % e 0,047 %, respectivamente. Schrijnwerkers et al. (1991) sugeriram que o vírus estava presente apenas externamente nas sementes. Ausência de transmissão pela semente foi relatada em testes com *Cucurbita máxima* Duch. Ex Lam., *C.*

moschata, (Duchesne) Poir. *Cucumis melo* L. e *C. sativus* L. (Desbiez & Lecoq, 1997). Fora da família Cucurbitaceae, Al-Musa, (1989) relatou a transmissão do ZYMV por sementes de *Ranunculus sardous* Crantz (Ranunculaceae), cujas plantas foram inoculadas mecanicamente. Experimentalmente, o ZYMV é facilmente transmitido mecanicamente.

O círculo de hospedeiros experimentais do ZYMV inclui espécies de 11 famílias de dicotiledôneas, embora a infecção natural com esse vírus tem sido relatada principalmente em espécies da família Cucurbitaceae (Desbiez & Lecoq, 1997). As principais espécies cultivadas dessa família já foram relatadas como sendo suscetíveis ao ZYMV. Na Flórida, E.U.A., o ZYMV foi isolado de *Melothria pendula* L., que é uma espécie selvagem perene de cucurbitáceas (Aldler et al., 1983). No Brasil, Yuki et al., (1999) relataram a infecção natural desse potyvirus em outra cucurbitácea selvagem, denominada *Cayaponia tibiricae* (Naudin) Cogn. Os hospedeiros que não pertencem à família Cucurbitaceae, quando inoculados com o ZYMV, geralmente exibem sintomas localizados ou latentes (Desbiez & Lecoq, 1997), exceto *Sesamum indicum* L. que mostrou sintomas severos de mosaico quando inoculada com 22 isolados do ZYMV, no Sudão (Mahgoub et al., 1997). Na Jordania, *Moluccella laevis* Bells of Ireland (*Lamiaceae*) foi descrita como reserva natural de ZYMV (Al-Musa, 1989). *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn e *C. quinoa* Willd (*Chenopodiaceae*) são boas indicadoras do ZYMV, pois reagem com lesões locais nas folhas inoculadas (Desbiez & Lecoq, 1997).

O ZYMV causa doença do tipo mosaico nas diferentes espécies de cucurbitáceas. Além do mosaico, induz malformação foliar e deformação e escurecimento dos frutos. O ZYMV é considerado um dos vírus mais importantes no cultivo de cucurbitáceas em diversos países (Lecoq et al., 1991; Lisa & Lecoq, 1984; Nameth et al., 1985; Provvidenti et al., 1984). As plantas infectadas, especialmente abobrinha-de-moita (*C. pepo*), cessam de produzir frutos de uma a duas semanas após a infecção, resultando em danos significativos na produção. Esses danos são maiores quanto mais cedo as plantas são infectadas. No Estado da Califórnia, E.U.A., o ZYMV foi responsável por reduções de 40 a 50% na

produção de frutos de melão, numa área de aproximadamente 7.500 ha plantada na primavera de 1984 (Nameth et al., 1985). Na primavera de 1990, o mesmo vírus causou perda estimada em U\$ 22 milhões nessa mesma área cultivada com melão (Perring et al., 1992). Não parece existir dados quantitativos sobre danos causados pelo ZYMV em cucurbitáceas no Brasil.

As recomendações para o controle do mosaico amarelo causado pelo ZYMV em cucurbitáceas incluem, de modo geral, o uso de variedades resistentes ou tolerantes; a eliminação de possíveis hospedeiras contidas na vegetação espontânea, que ocorrem próximas da área de plantio; programas de controle de afídeos com inseticidas ou óleos minerais e uso de plásticos coloridos ou substâncias reflectoras no solo (Lovisol, 1980).

O uso de inseticidas é eficiente para a redução da população de espécies de afídeos que colonizam a cultura, mas de uma maneira geral não é eficiente para reduzir a disseminação do ZYMV dentro da cultura. Isso se deve provavelmente ao fato de os inseticidas existentes não serem suficientemente rápidos para matarem os afídeos antes da inoculação dos vírus na planta. Além disso, a maioria das espécies vetoras não colonizam plantas da família Cucurbitaceae (Perring & Farrar, 1993; Webb & Linda, 1993). Em alguns casos, a aplicação de inseticidas pode até aumentar a disseminação dos vírus de relação não persistente, devido à excitação causada pelos produtos durante as picadas de prova dos afídeos (Maelzer et al., 1986). Pulverizações com óleo mineral podem fornecer uma proteção temporária, porém não têm sido eficientes para a redução da taxa de disseminação do ZYMV (Makkouk & Menessa, 1985; Racciah, 1985; Webb & Linda, 1993).

Materiais reflectores, como superfícies aluminizadas, plásticos coloridos e casca de arroz têm sido utilizados experimentalmente com algum sucesso na redução da disseminação de vírus transmitidos por afídeos em algumas culturas, incluindo cucurbitáceas (Adlerz & Everett, 1968; Brown et al., 1993; Chalfant et al., 1977; Costa & Costa, 1971; Daiber & Donaldson, 1976; Moore et al., 1965; Orozco et al., 1994; Vani et al., 1989; Wyman et al., 1979; Yuki, 1990). No entanto, o alto custo de alguns deles e a grande quantidade necessária têm limitado a sua

utilização em áreas mais extensas. No caso dos plásticos e das superfícies aluminizadas, adiciona-se ao problema do custo, a questão ecológica, uma vez que a sua remoção e/ou eliminação após o cultivo traz inúmeras dificuldades. Para solucionar este último problema, Summers et al. (1995) estudaram o efeito da cobertura do solo com um látex prateado, solúvel em água e biodegradável, na redução da incidência do ZYMV em abobrinha-de-moita. Os resultados mostraram que a cobertura do solo retardou a incidência do mosaico e proporcionou um aumento na produção de frutos comerciais da ordem de 80 %, quando comparada com a das plantas em solo não coberto.

A utilização de cobertura do solo com casca de arroz, que pode ser considerado modelo genuinamente brasileiro, mostrou-se eficiente no controle do mosaico da abobrinha-de-moita causado pelo PRSV-W, em experimentos realizados em São Paulo (Costa & Costa, 1971; Yuki, 1990). Quanto ao problema associado com a quantidade de casca de arroz necessária para a cobertura de áreas extensas, Yuki (1990) demonstrou que faixas de 30 cm, aplicadas ao longo das linhas de plantio de abobrinha-de-moita 'Caserta', foram suficientes para reduzir significativamente a incidência de mosaico, com ganhos na produção. Mesmo assim, não se tem conhecimento do uso da casca de arroz no controle de viroses em plantios comerciais de abobrinha-de-moita, ou de outras cucurbitáceas.

Fontes de resistência ao ZYMV já foram identificadas em coleções de germoplasma de Cucurbitaceae, menos em *C. pepo*. A espécie selvagem *C. ecuadorensis* Cutler & Whitaker contém gene de resistência para esse potyvirus e tem sido utilizada em cruzamentos interespecíficos em programas de melhoramento. No entanto, a incorporação de genes de resistência através do melhoramento genético nem sempre tem alcançado o sucesso desejado, devido a problemas de incompatibilidade genética e ligações dos genes de resistência com características agrônomicas indesejáveis. Deve-se acrescentar que o melhoramento visando resistência é um processo demorado e não exclui o risco de aparecimento de estirpes do vírus capazes de quebrarem a resistência, como já foi observado em melão (Desbiez & Lecoq, 1997; Gilbert-Albertini et al., 1993; Provvidenti, 1993).

O desenvolvimento de plantas transgênicas tem apresentado grandes avanços no melhoramento para a resistência a vírus nos últimos anos. Essa tecnologia abre uma nova perspectiva para o controle de doenças causadas por vírus em diversas espécies cultivadas, incluindo as cucurbitáceas. Gonsalves et al. (1992), por exemplo, relataram que as plantas transgênicas de pepino, que expressavam o gene que codifica a proteína da capa protéica do CMV, foram resistentes à infecção com esse vírus. Resultado semelhante foi obtido com plantas transgênicas de melão em relação à infecção com o ZYMV (Fang & Grumet, 1993). Fuchs & Gonsalves, (1995) desenvolveram um híbrido transgênico de abobrinha-de-moita, denominado ZW-20, que expressou os genes que determinam a síntese das proteínas das capas protéicas do ZYMV e do WMV-2 em condições de campo. Esse híbrido, denominado Freedom II, foi aprovado para comercialização nos Estados Unidos em 1995 (Tricoli et al., 1995). Esta parece ter sido a primeira planta transgênica resistente a vírus liberada comercialmente. A possibilidade da utilização de genes que codificam a capa protéica de diferentes vírus, para a obtenção de plantas transgênicas com resistência múltipla, permitiu que Tricoli et al. (1995) desenvolvessem uma linhagem transgênica de abobrinha-de-moita resistente ao CMV, ao WMV-2 e ao ZYMV. Essa linhagem, todavia, é suscetível ao PRSV-W.

A premunização com estirpes fracas do vírus é outra alternativa atrativa para o controle dessa doença. O uso dessa tecnologia para o controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (ZYMV) foi inicialmente proposto por Lecoq et al. (1991) na França. Um variante que induzia sintomas fracos de mosaico nas folhas de melão e de abobrinha-de-moita e nenhum sintoma nos frutos foi selecionado a partir de um isolado obtido por Lecoq (1986). Resultados experimentais obtidos em testes em casa de vegetação, conduzidos em Taiwan, evidenciaram que a estirpe fraca introduzida da França protegeu as plantas de abobrinha-de-moita, de pepino e de melão contra a infecção por estirpes severas originárias dos Estados Unidos (Connecticut, Florida), da França e de Taiwan. No entanto, a proteção em geral foi mais eficiente contra a estirpe originária da França, a partir da qual foi obtida a estirpe fraca premunizante (Wang et al., 1991). Experimentos de campo

realizados em Taiwan e na França mostraram que a premunização permitiu o controle satisfatório da doença, bem como um aumento significativo da produção de até 14,7 vezes, quando esta foi comparada com a das plantas não premunizadas. Em Taiwan, Wang et al. (1991) mostraram que a estirpe fraca ZYMV-WK, selecionada por Lecoq et al. (1991), controlou a doença em campos de abobrinha-de-moita, com ganhos na produção da ordem de 116 % e 1.256 %, no primeiro e no segundo ano, respectivamente. Walkey et al. (1992), na Inglaterra, também relataram resultados positivos no controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita por premunização, com ganhos significativos na produção de frutos comerciais. Perring et al. (1995) mostraram resultados positivos de proteção em plantas de melão em condições de campo na Califórnia, E.U.A. A proteção foi satisfatória e somente 25% dos frutos colhidos foram considerados não comerciais.

O uso da premunização para o controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita em campo tem sido considerada uma alternativa viável, devido à ausência de fontes de resistência em coleções de germoplasma de *C. pepo* e à falta de outras medidas de controle que sejam econômicas e eficientes (Lecoq et al., 1991; Walkey et al., 1992; Wang et al., 1991). Além disso, Lecoq et al. (1991) acrescentaram como característica vantajosa o fato de a estirpe fraca em questão não ser eficientemente transmitida por afídeos, devido à deficiência nas funções do componente auxiliar de transmissão pelo vetor. Deve-se acrescentar ainda que, nos estudos de campo realizados na França e em Taiwan, houve incidência de outros vírus que normalmente infectam cucurbitáceas (CMV, WMV-2 e PRSV-W), porém não houve menção de ocorrência de sinergismo entre eles e a estirpe fraca do ZYMV presente nas plantas premunizadas.

A premunização para o controle do mosaico amarelo em abobrinha-de-moita já vem sendo utilizado comercialmente no Havaí (Cho et al., 1992) e em Israel (Yarden et al., 2000). Neste último país, essa tecnologia vem sendo aplicada nos últimos 5 anos para o controle do mosaico amarelo em abobrinha-de-moita, abóbora, melão e melancia. Somente em 1999, quase 800 ha de cucurbitáceas premunizadas foram plantadas em Israel.

O mosaico amarelo da abobrinha não é o único exemplo de virose de cucurbitáceas controlada eficientemente por premunização. Estudos iniciados por Rezende et al. (1994), mostraram que estirpes fracas do PRSV-W, selecionadas de bolhas de folhas com mosaico, ofereceram alta proteção contra estirpes comuns do vírus. Testes de proteção em campo proporcionaram aumentos na produção de frutos comerciais de abobrinha-de-moita da ordem de 633 % e de 344 % no primeiro e segundo experimento respectivamente (Rezende & Pacheco, 1998).

A premunização com estirpes fracas do PRSV-W, combinada com a tolerância da abóbora 'Menina Brasileira' ao mosaico, permitiu um melhor controle da doença em campo, acompanhado por ganhos na produção. Plantas premunizadas produziram, em média, 33% a mais de frutos comerciais em relação às plantas infectadas naturalmente pela estirpe comum do vírus (Rezende et al., 1999).

Mais recentemente, Dias & Rezende (2000) demonstraram que a premunização também foi eficiente no controle do mosaico causado pelo PRSV-W em abóbora híbrida (*C. moschata* x *C. máxima*) do tipo Tetsukabuto, resultando em ganhos quantitativos e qualitativos na produção. Em um primeiro experimento em campo, as plantas premunizadas produziram, aproximadamente, 2,0 vezes mais frutos/planta (peso) do que as infectadas com estirpes severas do vírus. Qualitativamente, 83,7 % dos frutos colhidos das plantas protegidas foram classificados como comerciais, enquanto as infectadas com estirpes severas produziram somente 25 % de frutos dessa categoria. Em um segundo experimento, o ganho na produção oferecido pela premunização foi semelhante ao do primeiro ensaio. Além disso, 97,1% dos frutos colhidos das plantas protegidas foram comerciais, em contraste com 2,1 % de frutos dessa classe colhidos de plantas não protegidas, infectadas naturalmente com estirpes severas do vírus.

A premunização de plantas de melancia não tem mostrado a mesma eficiência encontrada nos casos descritos anteriormente. Neste caso, dois problemas foram verificados: a) dificuldade de infectar 100 % das mudas de melancia com as estirpes fracas do PRSV-W; b) as plantas premunizadas, apesar

de protegidas, tiveram uma produção, aproximadamente, 40 % inferior à daquelas que permaneceram sadias em campo (Dias & Rezende, 2001).

A aplicação prática da premunização para o controle do mosaico causado pelo PRSV-W em abóbora e abobrinha-de-moita já vem ocorrendo desde a divulgação dessa tecnologia em fins de 1996. Diversos pequenos agricultores têm obtido inóculo no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, juntamente com orientação para a produção de mudas premunizadas.

A premunização também se mostrou eficiente no controle do mosaico causado pelo WMV-2, em testes realizados em casa de vegetação, com plantas de abóbora, pepino, melão e melancia, no Japão (Kameya-Iwaki et al., 1992). Testes em casa de vegetação e em campo, no Estado de Maryland, E.U.A., também mostraram que a premunização foi eficiente para o controle do mosaico induzido pelo CMV em plantas de melão (Montasser et al., 1998).

A múltipla premunização foi estudada experimentalmente no Japão para o controle dos mosaicos causados pelo CMV, ZYMV e WMV-2. Plantas de pepino (*C. sativus*) inoculadas com estirpes fracas desses vírus tiveram menos danos na produção do que as plantas infectadas com as estirpes severas, durante epidemias em campo ocorridas em 1994 e 1995. No entanto, as plantas com tripla premunização apresentaram sintomas sinérgicos e tiveram uma redução de 15% na produção de frutos comerciais, quando comparada com a produção das plantas sadias. Devido a esse fato, a premunização múltipla tem sido recomendada apenas para os plantios realizados no início do verão, quando os danos causados por infecções múltiplas com estirpes severas do CMV, do ZYMV e do WMV-2 são bem maiores do que os provocados pela inoculação das estirpes fracas desses vírus (Kosaka & Fukunishi, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo de plantas-teste

3.1.1 Para os testes em casa de vegetação

Nos testes que foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, foram utilizadas plantas de abobrinha-de-moita (*C. pepo* cv. Caserta).

Com o objetivo de ter constante disponibilidade de plantas-teste para as experimentações, as sementeiras foram feitas a intervalos de 15 a 20 dias. As sementeiras foram realizadas em vaso de alumínio esterilizados, de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, contendo terra misturada com composto de matéria orgânica e adubo mineral, previamente preparada e autoclavada durante 2 h, a 121 °C. Na sementeira foram colocadas 3 sementes por vaso, devidamente espaçadas uma das outras e numa profundidade de aproximadamente 0,5 cm. O desbaste foi feito no estágio de folha cotiledonar, deixando-se 2 plantas por vaso. Quinzenalmente as plantas foram tratadas com Aldicarb no solo e pulverizadas com Rubigan (0,6 mL/L), para o controle da mosca branca (*Bemisia tabaci* Gennadius) e do oídio (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci, respectivamente. Foram freqüentemente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia por vaso.

3.1.2 Para os testes em campo

Nos testes em campo também foram utilizadas plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta'. As plantas foram obtidas em bandejas de isopor com 72 células, em casa de vegetação. Usou-se o substrato Plantmax, e a semeadura foi feita colocando-se uma semente por célula, numa profundidade aproximada de 0,5 cm.

3.2 Estirpes dos vírus

Foram utilizadas 4 estirpes severas do ZYMV, coletadas nos municípios de Atibaia, SP (ZYMV-AT), de Belém, PA (ZYMV-BE), de Iacri, SP (ZYMV-IA) e de Vargem Paulista, SP (ZYMV-VP). Também foram utilizadas uma estirpe fraca do PRSV-W, denominada PRSV-W-1, selecionada por Rezende et al. (1994) e uma estirpe severa desse vírus, coletada em Campinas, SP (PRSV-W-C). Todas as estirpes foram mantidas separadamente em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', em casa de vegetação.

3.3 Inoculação mecânica

Os inóculos das estirpes do ZYMV e do PRSV-W foram obtidos de folhas de abobrinha-de-moita infectadas, maceradas em almofariz de porcelana, na presença de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade. As inoculações foram feitas geralmente nas folhas cotiledonares das plantas, previamente polvilhadas com carbureto de silício ("carborundum"), grãos 320, friccionando-as com o indicador umedecido na solução de inóculo. Em seguida, as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de "carborundum" e de inóculo.

3.4 Superinoculação com estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W

Entende-se por superinoculação o processo de inoculação realizado em plantas já infectadas por uma estirpe do vírus, geralmente a estirpe fraca. A superinoculação também pode ser denominada inoculação de desafio.

A superinoculação com as diferentes estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W foi feita através do método de inoculação mecânica, conforme descrito anteriormente, porém o inóculo foi aplicado em 2 a 3 folhas expandidas do ponteiro das plantas.

3.5 Escala de notas de sintomas

A leitura dos sintomas nas plantas-teste geralmente foi iniciada 7 dias após a inoculação, tempo este suficiente para que ocorresse a invasão sistêmica dos vírus. As leituras foram feitas periodicamente, durante o tempo necessário para a conclusão do teste.

Para avaliação dos sintomas foi utilizada uma escala de notas de severidade, com nota zero para plantas sem sintomas; nota 1 para plantas com sintomas de mosaico fraco, sem deformações foliares e bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico, e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido. Essa escala de notas foi utilizada em todas as fases de desenvolvimento das plantas.

3.6 Purificação do ZYMV

Quando necessária, a purificação parcial de qualquer estirpe do ZYMV foi feita a partir de plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', inoculadas mecanicamente e mantidas em casa de vegetação. Após 21 dias, foram coletadas

200 g de folhas sintomáticas, as quais foram trituradas em presença de tampão fosfato 0,25 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,01 M e 0,2 % de 2-mercaptoetanol (1 g de folha/2 mL de tampão). O extrato obtido foi coado em gaze e centrifugado a 8000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, Polietilenoglicol (PEG 6000) foi adicionado na concentração final de 4% e a suspensão foi agitada durante 1 h, a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. Logo depois, o precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,01 M. No volume obtido foi adicionado 0,25 % de Triton X-100 e a suspensão foi centrifugada a 8500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 24500 rpm por 1:30 h, a 4 °C. O precipitado foi dissolvido em 1,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo EDTA 0,01 M. O vírus parcialmente purificado foi armazenado a -20 °C.

3.7 PTA-ELISA

A confirmação da infecção das plantas nos diferentes experimentos foi feita através do teste sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”), com algumas modificações da forma descrita por Mowat & Dawson (1987). Para este teste, foi utilizado antissoro contra o ZYMV, disponível no laboratório de Virologia da ESALQ. O procedimento do PTA-ELISA foi o seguinte: 100 µL das amostras, diluídas 1:20 (p:v) em tampão PBS (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,4), foram colocados em placas de ELISA de 96 pocinhos, marca Costar. Cada amostra foi colocada em pocinhos duplicados e posteriormente incubadas por 16 horas, a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (1L PBS + 0,5 mL Tween 20). A etapa seguinte envolveu a colocação de 100 µL, por pocinho, do antissoro diluído (1:1000) em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2). As placas foram incubadas por 2 horas, a 37 °C. Depois de lavadas como anteriormente, foi colocado o conjugado enzimático (SIGMA Anti-Rabbit IgG, A-3687) diluído 1:34000 em tampão Tris-HCl. Após nova incubação

por 2 horas, a 37 °C, as placas foram lavadas 3 vezes. A seguir, foram colocados 100 µL de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, N-9389), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL⁻¹), por pocinho. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada um dos pocinhos foi medida no leitor de ELISA, Metertech Σ 960, utilizando-se filtro de 405 nm. Extratos de plantas sadias e sabidamente infectadas com o ZYMV foram usadas como controles. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância foi superior a três vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia.

3.8 Procura de estirpes fracas do ZYMV

3.8.1 A partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas em casa de vegetação

A utilização de lesões locais como forma de segregação de estirpes do complexo normal de um vírus é fato amplamente conhecido e empregado em trabalhos com vírus de plantas (Hull, 2002).

Folhas de plantas de *Chenopodium amaranticolor* e de *C. quinoa*, inoculadas mecanicamente com estirpes severas do ZYMV, geralmente exibem sintomas de lesões locais cloróticas 5 a 7 dias após a inoculação, em condições de casa de vegetação. As lesões locais foram individualmente retiradas das folhas com o auxílio de vazadores com diâmetro de 2 - 4 mm. Essas lesões foram colocadas individualmente na superfície áspera de etiquetas plásticas, utilizadas para marcação de vasos, em presença de uma gota de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, e maceradas com outra etiqueta para a extração do inóculo viral. Cada extrato foi inoculado individualmente em folhas cotiledonares de uma planta de abobrinha-de-moita 'Caserta'. A inoculação foi feita esfregando-se levemente a etiqueta, contendo o inóculo, na superfície do cotilédone

previamente polvilhado com “carborundum”. Após a inoculação, as plantas foram lavadas para retirar o excesso de inóculo e de abrasivo e mantidas em casa de vegetação para posteriores avaliações.

3.8.2 A partir de lesões locais em plantas indicadoras mantidas a 15 °C

A procura de estirpes fracas em plantas infectadas com o ZYMV e submetidas a baixa temperatura, foi feita com base no método utilizado com sucesso por Kosaka & Fukunishi (1993), para o vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus*- SMV) e por Kosaka & Fukunishi (1997), para o ZYMV e o CMV, com algumas adaptações.

Plantas de *C. quinoa* foram inoculadas mecanicamente com as diferentes estirpes severas do ZYMV e mantidas em câmara climática (Convicon CMP 3244) à temperatura de 15 °C, 12 horas de luz e umidade de 50 %, até o aparecimento de lesões locais nas folhas inoculadas (aproximadamente 20 a 30 dias). Essas lesões foram retiradas com vazadores e os respectivos extratos foram inoculados em plantas de abobrinha-de-moita no estágio cotiledonar, conforme descrito anteriormente. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação para posteriores avaliações.

3.8.3 A partir de lesões locais em plantas indicadoras inoculadas com suspensão purificada do vírus exposta à luz ultravioleta

A procura de estirpes fracas através da prévia exposição do inóculo à luz ultravioleta foi feita com base no trabalho de Kameya-Iwaki et al. (1992). Uma estirpe menos severa que as estirpes comuns do ZYMV, obtida de lesão local de planta de *C. quinoa* mantida a 15 °C, foi multiplicada em abobrinha-de-moita ‘Caserta’ e parcialmente purificada. A suspensão purificada foi dividida em 5 partes iguais de 300 µL, as quais foram expostas à luz ultravioleta (UV) de uma

câmara asséptica, do laboratório de Fitopatologia Molecular, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP. Os tempos de exposição de cada porção foram de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, respectivamente. Após cada período de exposição, as respectivas amostras foram inoculadas mecanicamente em plantas de *C. amaranticolor*, de *C. quinoa* e de abobrinha-de-moita. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. As plantas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* foram avaliadas com base no aparecimento de lesões locais. Extratos das lesões locais seriam inoculados em plantas de abobrinha-de-moita para a procura de estirpes fracas do ZYMV. As plantas de 'Caserta' foram avaliadas com base na manifestação e intensidade dos sintomas sistêmicos.

3.9 Indexação das plantas e seleção de estirpes fracas

As plantas de abobrinha-de-moita, inoculadas com extratos obtidos através dos diferentes procedimentos descritos anteriormente, foram avaliadas com base na manifestação e intensidade dos sintomas sistêmicos, utilizando-se a escala de notas descrita no item 3.6. A confirmação da infecção com o ZYMV foi feita através do teste sorológico de PTA-ELISA. Uma planta foi considerada portadora de uma estirpe fraca do ZYMV quando apresentou reação positiva no teste sorológico e recebeu nota zero de sintoma durante o período de observações.

3.10 Avaliação da estabilidade das estirpes fracas do ZYMV

A estabilidade das estirpes fracas obtidas foi estudada em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', em condições de casa de vegetação. As estirpes fracas selecionadas foram estabelecidas em plantas-teste de abobrinha, através de inoculação mecânica. Periodicamente, as estirpes fracas presentes em plantas mais velhas foram transferidas, por inoculação mecânica, para plantas novas da

mesma cultivar, no estágio cotiledonar. Em cada transferência, foram utilizadas plantas saudas e infectadas com as estirpes severas, como controles.

A estabilidade das estirpes fracas foi avaliada através de leituras periódicas de sintomas, utilizando-se a escala de notas descrita anteriormente.

3.11 Teste do efeito protetor das estirpes fracas em casa de vegetação

Plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', cultivadas em vaso, em casa de vegetação, foram inoculadas mecanicamente com as estirpes fracas do ZYMV, no estágio cotiledonar. Dez dias após a inoculação, confirmada a infecção por sintomas e/ou teste sorológico de PTA-ELISA, as plantas foram superinoculadas (desafiadas) com as estirpes severas ZYMV-AT, ZYMV-IA e ZYMV-VP. A superinoculação foi feita através da inoculação mecânica, em três folhas expandidas do ponteiro. Dez dias depois da primeira superinoculação, as plantas foram novamente desafiadas com as mesmas estirpes severas, inoculadas mecanicamente em três folhas expandidas, porém diferentes daquelas utilizadas no primeiro desafio. Nos testes foram comparados os seguintes tratamentos: (a) plantas premunizadas com as estirpes fracas do ZYMV e não desafiadas; (b) plantas premunizadas e superinoculadas com as estirpes severas, separadamente; (c) plantas da mesma idade, inicialmente saudas, inoculadas com as diferentes estirpes severas separadamente, por ocasião das superinoculações e (d) plantas saudas. As plantas do tratamento (c) serviram de controle dos inóculos das superinoculações e para comparações de sintomas.

Todas as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação, onde foram feitas leituras periódicas de sintomas, para avaliação do valor protetor das estirpes fracas. A proteção foi considerada positiva quando as plantas premunizadas e superinoculadas não apresentaram alterações dos sintomas iniciais fracos.

Também foi avaliada a proteção em plantas de abobrinha-de-moita inoculadas com estirpes fracas do ZYMV e PRSV-W. Neste caso, foram

comparados os seguintes tratamentos: (a) plantas premunizadas com as estirpes fracas de ambos os vírus; (b) plantas premunizadas com as estirpes fracas de ambos os vírus e desafiadas com a estirpe severa PRSV-W-C; (c) plantas premunizadas com as estirpes fracas de ambos os vírus e desafiadas com a estirpe severa ZYMV-BE; (d) plantas premunizadas com as estirpes fracas de ambos os vírus e desafiadas com as estirpes severas PRSV-W-C e ZYMV-BE; (e) plantas sadias inoculadas com a estirpe severa PRSV-W-C por ocasião da superinoculação; (f) plantas sadias inoculadas com a estirpe severa ZYMV-BE por ocasião da superinoculação; (g) plantas sadias inoculadas com as estirpes severas PRSV-W-C e ZYMV-BE por ocasião da superinoculação e (g) plantas sadias.

3.12 Teste do efeito protetor das estirpes fracas em condições de campo

Neste teste foram utilizadas plantas de abobrinha-de-moita cv. Caserta, obtidas em bandejas em casa de vegetação. As mudas, em estágio cotiledonar, foram inoculadas mecanicamente com as estirpes fracas do ZYMV e a estirpe fraca PRSV-W-1, separadamente e em mistura. Os inóculos foram obtidos macerando-se folhas de plantas de abobrinha infectadas com as respectivas estirpes fracas. Três dias após a inoculação de premunização, as mudas foram transplantadas em campo da área experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, em covas previamente preparadas com adubo mineral e matéria orgânica. Cada cova recebeu duas mudas. Vinte dias após o transplante foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta vigorosa por cova. O espaçamento utilizado foi de 1 x 1 m. As plantas foram irrigadas por aspersão e receberam os tratos culturais convencionais requeridos pela cultura.

O teste de proteção foi realizado comparando-se os seguintes tratamentos: (a) plantas premunizadas com as estirpes fracas do ZYMV; (b) plantas premunizadas com a estirpe fraca PRSV-W-1; (c) plantas duplamente premunizadas com as estirpes fracas do ZYMV e a estirpe PRSV-W-1; (d) plantas

sadias inoculadas com a mistura das estirpes severas ZYMV-BE e PRSV-W-C, aos 30 dias após o transplante e (e) plantas sadias, protegidas com sombrite 50 % até o início do florescimento. O delineamento experimental foi o de blocos casualizado, com 8 repetições e 5 plantas por parcela.

As inoculações de desafio das plantas premunizadas foram feitas aos 30 e 45 dias após a premunização, através de inoculação mecânica. As plantas premunizadas com a estirpe fraca do ZYMV e a estirpe PRSV-W-1, separadamente, foram desafiadas com as respectivas estirpes severas desses vírus. As plantas duplamente premunizadas foram desafiadas com uma mistura das estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W. As superinoculações foram feitas para assegurar que todas as plantas foram desafiadas com as estirpes severas desses vírus.

A proteção foi avaliada comparando-se a severidade dos sintomas e a produção, quantitativa e qualitativa, das plantas dos diferentes tratamentos. Para avaliação dos sintomas foi utilizada a escala de notas de severidade, previamente descrita. A produção foi comparada com base na colheita dos frutos, realizada durante 3 semanas, em dias alternados. Os frutos foram colhidos de cada planta individualmente, classificados em comerciais e não comerciais e pesados. Foram classificados como não comerciais os frutos que apresentavam qualquer deformação e a casca escurecida. As plantas naturalmente infectadas com o *Zucchini lethal chlorosis virus* (gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*), que causa sintomas característicos de clorose, redução do limbo foliar, enrolamento dos bordos das folhas para cima e drástica redução no desenvolvimento, foram identificadas com base nos sintomas e eliminadas do campo para não servirem de fonte de inóculo. Os valores de produção das plantas com sintomas de infecção com esse tospovirus por ocasião da colheita, foram desconsiderados para a análise dos dados.

3.13 Análise estatística

A comparação entre as médias dos diferentes tratamentos foi feita por meio do modelo estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 6.11, através do programa ANOVA (SAS, 1990), com aplicação do teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (Gomes, 1990).

4 RESULTADOS

4.1 Estirpes fracas do ZYMV

4.1.1 Obtidas de lesões locais em plantas indicadoras mantidas em casa de vegetação

Os resultados da procura de estirpes fracas do ZYMV, a partir de lesões locais em folhas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, inoculadas com estirpes severas do ZYMV e mantidas em casa de vegetação, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Reação de plantas de abobrinha-de-moita inoculadas com extratos de lesões locais obtidas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, inoculadas com estirpes severas do ZYMV e mantidas em casa de vegetação.

Origem das lesões locais	Nº de plantas inoculadas / Nº de plantas infectadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas			
		0	1	2	3
<i>C. amaranticolor</i>	41/32	0	0	0	32
<i>C. quinoa</i>	298/220	0	0	0	220

Extratos de 339 lesões locais foram inoculados individualmente em abobrinha-de-moita. Desses, 252 infectaram as plantas-testes e causaram sintomas severos da doença. As 87 plantas que não mostraram sintomas tiveram reação negativa com o antissoro contra o ZYMV, em teste de PTA-ELISA.

Nenhuma estirpe fraca foi selecionada através desse procedimento.

4.1.2 Obtidas de lesões locais em plantas indicadoras mantidas a 15 °C

Os resultados de procura de estirpes fracas do ZYMV através de lesões locais produzidas em folhas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, inoculadas com estirpes severas do ZYMV e mantidas a 15 °C, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Reação de plantas de abobrinha-de-moita inoculadas com extratos de lesões locais obtidas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* inoculadas com estirpes severas do ZYMV e mantidas a 15 °C.

Origem das lesões locais	Nº de plantas inoculadas / Nº de plantas infectadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas			
		0	1	2	3
<i>C. amaranticolor</i>	15/11	0	0	0	11
<i>C. quinoa</i>	172/121	0	0	1	120

Cento e oitenta e sete plantas de abobrinha-de-moita foram inoculadas, individualmente, com extratos de lesões locais produzidas pelo ZYMV em folhas de *C. amaranticolor* e de *C. quinoa*. Dessas, 55 não exibiram sintomas e tiveram

reação negativa com o antissoro contra o ZYMV, em PTA-ELISA. Das 132 plantas infectadas, 131 apresentaram sintomas severos da doença e foram descartadas. Uma apresentou sintoma intermediário (nota 2) e foi mantida em casa de vegetação para estudos posteriores.

4.1.3 Obtidas de lesões locais em plantas indicadoras inoculadas com suspensão purificada do vírus exposta à luz ultravioleta

Através do procedimento anterior, obteve-se uma estirpe que induziu leve mosaico na borda foliar de plantas de abobrinha-de-moita e pouca deformação foliar. Essa estirpe foi multiplicada em plantas de abobrinha-de-moita e uma suspensão parcialmente purificada foi exposta à radiação UV, em câmara asséptica, durante 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Os extratos foram inoculados em plantas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e de abobrinha-de-moita e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Reação de plantas de abobrinha-de-moita inoculadas com suspensão parcialmente purificada de uma estirpe do ZYMV, exposta à luz ultravioleta, por diferentes intervalos de tempo.

Tempo de exposição Ultravioleta (min.)	Nº de plantas inoculadas/ Nº de plantas infectadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas			
		0	1	2	3
5	5/5	0	0	0	5
10	5/5	0	0	0	5
15	5/5	0	0	0	5
20	5/5	0	0	0	5
30	5/5	1	0	3	1

Nenhuma planta de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* apresentou lesão local quando inoculada com as suspensões parcialmente purificadas e expostas à luz ultravioleta. A maioria das plantas de abobrinha-de-moita inoculadas mostraram sintomas intermediários (nota 2) ou severos (nota 3) de mosaico. Uma planta não exibiu sintomas de mosaico. Extrato foliar dessa planta apresentou reação positiva com o antissoro contra o ZYMV, em PTA-ELISA. Essa estirpe fraca (“Mild”) foi denominada ZYMV-M, e encontra-se ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Planta de abobrinha-de-moita infectada com a estirpe fraca ZYMV-M.

4.2 Estabilidade da estirpe fraca ZYMV-M

A estabilidade da estirpe fraca ZYMV-M foi estudada durante o período de 19/10/2000 a 18/01/2002 (15 meses). Nesse espaço de tempo, a estirpe fraca foi transferida 12 vezes, de plantas de abobrinha-de-moita ‘Caserta’ infectadas, para plantas saudáveis em estágio cotiledonar. As plantas inoculadas foram observadas durante 50 a 60 dias, antes de servirem de fonte de inóculo para nova transferência da estirpe fraca. A estabilidade foi avaliada tomando-se como parâmetro os sintomas causados nas plantas de abobrinha-de-moita.

Durante as sucessivas transferências, a estirpe fraca ZYMV-M não causou sintomas severos de mosaico em nenhuma das 59 plantas avaliadas.

4.3 Efeito protetor da estirpe fraca ZYMV-M em casa de vegetação

Os resultados de três experimentos independentes, para avaliar o efeito protetor da estirpe fraca ZYMV-M em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta,' contra a infecção com estirpes severas de 3 origens, estão apresentados na Tabela 4, e ilustrados na Figura 2.

Tabela 4. Reação de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M e desafiadas com estirpes severas do vírus de Atibaia (ZYMV-AT), Iacri (ZYMV-IA) e Vargem Paulista (ZYMV-VP).

Tratamentos	Total de plantas testadas/ Nº de plantas com sintomas severos		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
ZYMV-M	4/0	4/0	4/0
ZYMV-M + Desafiada ZYMV-AT	6/0	6/0	6/0
ZYMV-M + Desafiada ZYMV-IA	6/0	6/0	6/0
ZYMV-M + Desafiada ZYMV-VP	6/0	6/0	6/0
Sadias + ZYMV-AT*	4/4	4/4	4/4
Sadias + ZYMV-IA*	4/4	4/4	4/4
Sadias + ZYMV-VP*	4/4	4/4	4/4
Sadias	4/0	4/0	4/0

* Duas plantas foram inoculadas com as respectivas estirpes severas do ZYMV por ocasião do primeiro desafio das plantas premunizadas. Outras duas plantas foram inoculadas no segundo desafio.

Todas as plantas premunizadas e não desafiadas com as estirpes severas do vírus não apresentaram intensificação de sintomas durante o período de 55 dias de observações. A estirpe fraca ZYMV-M protegeu eficientemente as plantas premunizadas contra a infecção e/ou manifestação de sintomas das 3 estirpes severas. As plantas inicialmente sadias, inoculadas com as estirpes severas, separadamente, apresentaram sintomas severos de mosaico e desenvolvimento reduzido. As plantas premunizadas e premunizadas e desafiadas tiveram desenvolvimento semelhante ao daquelas que permaneceram sadias.

Figura 2 - Plantas de abobrinha-de-moita inoculadas com a estirpe severa ZYMV-AT (A); com a estirpe fraca ZYMV-M (B) e com estirpe fraca ZYMV-M e desafiada com a estirpe severa ZYMV-AT (C).

Na tabela 5 são apresentados os resultados de dois experimentos independentes da dupla premunização de abobrinha-de-moita, com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1. Todas as 6 plantas duplamente premunizadas não apresentaram intensificação de sintomas depois de desafiadas com a estirpe severa PRSV-W-C. O mesmo ocorreu com as 6 plantas duplamente protegidas e desafiadas apenas com a estirpe severa ZYMV-BE. As 6 plantas duplamente premunizadas e desafiadas com estirpes severas de ambos os vírus também não apresentaram intensificação dos sintomas, 45 dias após a superinoculação mecânica. O desenvolvimento dessas plantas foi semelhante ao das plantas saudáveis. Por outro lado, todas as plantas saudáveis, inoculadas com as estirpes severas ZYMV-BE e PRSV-W-C, separadamente ou em mistura, apresentaram sintomas severos e redução de desenvolvimento.

Tabela 5. Reação de plantas de abobrinha-de-moita duplamente premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1 e desafiadas com as estirpes severas PRSV-W-C e ZYMV-BE, separadamente e em mistura.

Tratamentos	Total de plantas testadas/ Nº de plantas com sintomas severos	
	Exp. 1	Exp. 2
ZYMV-M + PRSV-W-1	9/0	9/0
ZYMV-M + PRSV-W-1 + Desafiada PRSV-W-C	3/0	3/0
ZYMV-M + PRSV-W-1 + Desafiada ZYMV-BE	3/0	3/0
ZYMV-M + PRSV-W-1 + Desafiada PRSV-W-C + ZYMV-BE	3/0	3/0
Sadia + PRSV-W-C	4/4	4/4
Sadia + ZYMV-BE	4/4	4/4
Sadia + PRSV-W-C + ZYMV-BE	4/4	4/4
Sadia	6/0	6/0

4.4 Proteção em condições de campo

Antes de apresentar os resultados dos testes de proteção com plantas premunizadas de abobrinha-de-moita 'Caserta', expostas em condições de campo, é necessário mencionar que no campo experimental ocorreu a incidência indesejável do ZLCV, em 7 % das plantas. Os valores de produção dessas plantas foram desconsiderados na análise dos dados.

Os resultados do experimento de proteção com a estirpe fraca ZYMV-M, separadamente ou em combinação com a estirpe fraca PRSV-W-1, em condições de campo, estão na tabela 6. Das 38 plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M e desafiadas com a estirpe severa homóloga, 34 exibiram sintomas fracos ou nenhum sintoma, após 50 dias de exposição em campo. Quatro plantas apresentaram sintomas intermediários a severos no final das avaliações. Proteção semelhante ocorreu com as 37 plantas premunizadas com a estirpe fraca PRSV-W-1 e desafiadas com a estirpe severa homóloga. As plantas duplamente premunizadas (ZYMV-M + PRSV-W-1) tiveram comportamento semelhante após terem sido desafiadas com as estirpes severas homóloga desse vírus. Trinta e duas plantas duplamente premunizadas ficaram protegidas contra a manifestação das estirpes severas, enquanto apenas 3 plantas mostraram sintomas intermediários a severos. Por outro lado, a maioria das plantas inicialmente sadias e inoculadas com as estirpes severas do ZYMV e PRSV-W mostraram sintomas acentuados da doença. Apenas 11 plantas, das 36 que permaneceram cobertas até o florescimento, foram infectadas e mostraram sintomas com intensidade variável.

Os resultados da produção dessas plantas estão apresentados nas Figuras 3 e 4. As plantas premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, separadamente ou em mistura, tiveram produções estatisticamente semelhantes em número e peso de frutos comerciais. As plantas premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-M-1, separadamente, tiveram produções médias de frutos comerciais semelhantes de 1,85 kg e 1,84 kg de frutos/planta, respectivamente. Esta foi 101 % superior à produção média de frutos comerciais das plantas inoculadas com as estirpes severas de ambos os vírus (0,92 kg frutos/planta). A produção de frutos comerciais das plantas duplamente premunizadas foi de 1,70 kg de frutos/planta, 85 % superior à inoculadas com as estirpes severas dos vírus. A produção média de frutos não comerciais das plantas premunizadas com as estirpes de ambos os vírus, separadamente e em mistura, foi de 0,26 kg/planta. Esta foi 76,4 % inferior à produção de frutos não comerciais das plantas inoculadas com as estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W.

A produção de frutos não comerciais foi pequena para as plantas premunizadas, com média aproximada de 0,26 kg frutos/planta. Já as plantas infectadas com as estirpes severas tiveram média de 1,1 kg frutos não comerciais por planta.

Tabela 6. Distribuição das plantas de abobrinha-de-moita, premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, sós ou em mistura, de acordo com as notas de sintomas atribuídas na última avaliação, realizada 50 dias após a inoculação de premunização, em condições de campo.

Tratamentos	Nº plantas testadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas			
		0	1	2	3
Premunizada ZYMV-M ^a	38	26	08	03	01
Premunizada PRSV-W-1 ^a	37	28	05	03	01
Premunizada ZYMV-M + PRSV-W-1 ^a	35	15	17	02	01
Infectada ZYMV + PRSV-W ^b	40	03	09	10	18
Coberta até o florescimento	36	25	05	04	02

^a As plantas premunizadas foram desafiadas com as estirpes severas homólogas, aos 30 e 45 dias após a inoculação de proteção.

^b Plantas inicialmente sadias inoculadas com uma mistura das estirpes severas ZYMV-AT, ZYMV-BE, ZYMV-VP e PRSV-W-C, 30 dias após o transplante.

Figura 3. Número médio de frutos comerciais e não comerciais de abobrinha-de-moita, colhidos de plantas premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, separadamente; de plantas duplamente premunizadas; de plantas inoculadas com as estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W, aos 30 dias após o transplante e de plantas cobertas até o florescimento.

* Colunas com letras distintas, entre os tratamentos, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

** Plantas inicialmente sadias inoculadas com uma mistura das estirpes severas ZYMV-AT, ZYMV-BE, ZYMV-VP e PRSV-W-C, 30 dias após o transplante.

Figura 4. Peso médio de frutos (Kg) comerciais e não comerciais de abobrinha-de-moita, colhidos de plantas premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, separadamente; de plantas duplamente premunizadas; de plantas inoculadas com mistura de estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W, aos 30 dias após o transplante e de plantas cobertas até o florescimento.

* Colunas com letras distintas, entre os tratamentos, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

** Plantas inicialmente sadias inoculadas com uma mistura das estirpes severas ZYMV-AT, ZYMV-BE, ZYMV-VP e PRSV-W-C, 30 dias após o transplante.

5 DISCUSSÃO

A execução de um projeto de pesquisa para o estabelecimento da premunização como alternativa de controle de uma fitovirose passa, segundo Rezende e Müller (1995), por cinco etapas interligadas em uma seqüência lógica. São elas: a) seleção de estirpes fracas do vírus; b) teste do valor protetor em condições de casa de vegetação; c) teste do valor protetor em experimentos pilotos em campo; d) avaliação da estabilidade das estirpes fracas e do seu efeito no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade do produto; e e) integração da técnica de premunização no sistema de manejo da cultura.

No presente trabalho, que teve como objetivo geral estudar a possibilidade de controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita por premunização, as quatro primeiras etapas do projeto foram adequadamente desenvolvidas, com resultados altamente satisfatórios.

Entre as diferentes alternativas para a procura de estirpes fracas, abordadas por Rezende e Müller (1995), neste trabalho adotou-se o modelo de lesões locais, como forma de promover a segregação das estirpes do complexo normal (severo) do ZYMV. É fato geralmente aceito de que uma única partícula viral infecciosa é necessária para infectar uma célula e dar origem a uma lesão local visível (Hull, 2002). O tratamento do inoculo antes da inoculação, por meio de agentes mutagênicos, tais como ácido nitroso e luz ultravioleta, ou a exposição das plantas inoculadas em condições de temperatura variada, podem aumentar a chance de aparecimento de estirpes fracas do vírus nas lesões locais formadas em indicadores apropriadas. Exemplos positivos de produção de estirpes fracas para fins de premunização, por meio de lesões locais obtidas após o tratamento do complexo normal do vírus com o ácido nitroso podem ser encontrados nos

trabalhos de Rast (1975), com o *Tomato mosaic virus* (ToMV), de Tomlinson & Shepherd (1978), com o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), de Yeh & Gonsalves (1984), com o *Papaya ringspot virus – type P*, de Wang & Gonsalves (1992), com o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), entre outros. No caso da luz ultravioleta, Kameya-Iwaki et al. (1992), parecem ter sido os primeiros a obterem uma estirpe fraca do WMV-2, a partir de lesões locais produzidas em folhas de *Chenopodium quinoa*, após exposição do inóculo a esse agente mutagênico. Exemplos de seleção de estirpes fracas em plantas indicadoras de lesões locais submetidas a tratamento térmico (baixa e alta temperaturas) também são encontrados na literatura. No caso da exposição à baixa temperatura, Kosaka & Fukonishi (1993) tiveram sucesso na obtenção de estirpes fracas do *Soybean mosaic virus* (SMV), no Japão.

No presente trabalho, apesar do esforço para se obter estirpes fracas do ZYMV a partir de lesões locais produzidas em folhas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, com diferentes tratamentos, os resultados foram negativos. Das 384 lesões locais obtidas nos diferentes tratamentos, cujos extratos infectaram plantas de abobrinha-de-moita, apenas uma deu origem a uma estirpe menos severa, caracterizada por induzir mosaico nas bordas das folhas e pouca malformação foliar (nota 2). Tentativa para atenuar ainda mais essa estirpe, através da exposição de suspensão parcialmente purificada à luz ultravioleta e posterior passagem por lesão local em *C. amaranticolor* e *C. quinoa* não deu resultado satisfatório. Nenhuma planta indicadora apresentou lesões locais do ZYMV. No entanto, por razões desconhecidas, uma única planta de abobrinha-de-moita, inoculada com a suspensão purificada e exposta por 30 minutos à luz ultra-violeta, não apresentou sintomas de mosaico, mas mostrou-se infectada com o ZYMV em teste de PTA-ELISA. Testes posteriores confirmaram trata-se de uma estirpe fraca do vírus. Apesar do desconhecimento da natureza dessa estirpe fraca, a primeira etapa do projeto foi concluída e a estirpe fraca (“Mild”) foi denominada ZYMV-M. Na França, a estirpe fraca selecionada por Lecoq et al. (1991) proveio de uma haste axilar de melão, que exibia sintomas atenuados, produzida em uma planta infectada com uma estirpe severa do vírus.

A estabilidade da estirpe ZYMV-M foi estudada concomitantemente com as etapas de testes do efeito protetor em casa de vegetação e em campo. Conforme constatado, durante 15 meses de avaliações e após 12 transferências sucessivas para plantas de abobrinha-de-mota, a estirpe ZYMV-M manteve-se estável, com base na sintomatologia. Esse resultado é semelhante ao relatado por Rezende & Pacheco (1997) para a estirpe fraca PRSV-W-1, que manteve-se estável durante 28 meses, após 18 transferência sucessivas para abobrinha-de-moita 'Caserta'. A estirpe fraca do ZYMV, selecionada em 1989 por Lecoq et al. (1991), também parece ser bastante estável, pois até o momento não há relato na literatura sobre intensificação de sintomas em plantas premunizadas.

Os resultados dos testes do valor protetor da estirpe ZYMV-M realizados com plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', em condições de casa de vegetação, foram satisfatórios sob dois aspectos que merecem considerações. Em primeiro lugar, verificou-se que a estirpe fraca não causou sintomas severos (nota 0), em qualquer planta de abobrinha-de-moita com ela infectada. Segundo, a estirpe fraca ofereceu proteção total contra as estirpes severas do ZYMV, provenientes de três regiões do Estado de São Paulo (Atibaia, Iacri e Vargem Paulista), mesmo após as plantas premunizadas terem sido duplamente desafiadas através do processo de inoculação mecânica.

Considerando-se que o ZYMV e o PRSV-W são os dois principais vírus em culturas de cucurbitáceas em alguns estados brasileiros, (Stangarlin et al., 2000; Yuki et al., 2000) e a existência de uma estirpe fraca estável do PRSV-W, com comprovada eficiência para o controle do mosaico comum em campo (Dias & Rezende, 2000; Rezende et al., 1999; Rezende & Pacheco, 1998), tornou-se imprescindível avaliar o efeito da dupla premunização (ZYMV-M + PRSV-W-1) no controle dos mosaicos amarelo e comum em abobrinha-de-moita. Os resultados de dois experimentos independentes, em casa de vegetação, foram bastante satisfatórios. Além de as plantas duplamente premunizadas terem sido protegidas contra a infecção e/ou manifestação das estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W, utilizadas no desafio, não foi observado qualquer efeito sinérgico aparente entre as estirpes fracas na sintomatologia e no desenvolvimento das plantas. É

importante mencionar que, nesses experimentos, a estirpe severa do ZYMV, utilizada no desafio das plantas premunizadas, foi coletada em Belém, Estado do Pará. Assim sendo, o conjunto dos resultados dos testes de proteção em casa de vegetação, mostraram que a estirpe fraca ZYMV-M protegeu as plantas contra estirpes severas de diferentes regiões geográficas do país. A estirpe fraca do ZYMV, selecionada por Lecoq et al. (1991) a partir de uma estirpe severa do vírus da França, ofereceu proteção contra estirpes severas de diferentes países, em testes em casa de vegetação. Quando introduzida em Taiwan, no entanto, Wang et al. (1991) verificaram que a proteção foi maior quando as plantas premunizadas foram desafiadas com a estirpe severa da França, do que com as estirpes severas de Connecticut, Flórida e Taiwan. A estirpe fraca obtida por Lecoq et al. (1991) foi também introduzida na Inglaterra (Walkey et al., 1992; Spence et al., 1996), na Califórnia (Perring et al., 1995) e em Israel (Yarden et al., 2000) e mostrou-se eficiente na proteção de diferentes espécies de cucurbitáceas em campo.

A etapa seguinte do projeto consistiu na avaliação da premunização, simples (ZYMV-M) e dupla (ZYMV-M + PRSV-W-1), no controle dos mosaicos amarelo e comum, no desenvolvimento das plantas e na produção de frutos comerciais em campo. A premunização das plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, confirmou os resultados positivos de proteção obtidos nos experimentos em casa de vegetação, pois poucas foram as plantas que mostraram sintomas mais acentuados no final das avaliações. Das 38 plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, três obtiveram nota 2 de sintoma e uma, nota 3. Entre as 35 plantas duplamente premunizadas, duas receberam nota 2 e uma, nota 3. Por outro lado, 28, das 40 plantas inicialmente sadias, inoculadas com a mistura das estirpes severas PRSV-W-C, ZYMV-AT, ZYMV-BE e ZYMV-VP, 30 dias após o transplante em campo, mostraram sintomas severos de mosaico e deformações foliares (notas 2 e 3). A intensificação dos sintomas observada em algumas plantas premunizadas pode ser atribuída aos seguintes fatores: a) ausência de infecção (proteção) com uma ou as duas estirpes fracas, após a inoculação de premunização; b) alteração na estirpe fraca de um, ou de ambos os vírus, originando variantes capazes de

induzirem sintomas severos, semelhante ao sugerido por Rezende & Costa (1987) para as estirpes fracas do PRSV-P em mamoeiro; c) quebra de proteção e; d) no caso das plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, pode ter ocorrido infecção natural com a estirpe severa do PRSV-W, para a qual a estirpe fraca não oferece proteção. A intensificação de sintomas em algumas plantas premunizadas em campo também foi observada por Lecoq et al. (1991) na França, e foi atribuída à ausência da estirpe fraca, ou quebra na proteção ou infecção com outro vírus. Em Taiwan, Wang et al. (1991) também relataram a ocorrência de plantas premunizadas com sintomas severos no final do experimento. No entanto, não puderam concluir se houve quebra de proteção, pois as plantas sintomáticas estavam comprovadamente infectadas com o PRSV-W. Há ainda relatos de intensificação de sintomas em plantas premunizadas com estirpe fraca do ZYMV feitos por Perring et al. (1995); Spence et al. (1996); Walkey et al. (1992); Yarden et al. (2000).

A proteção oferecida pelas estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1 teve reflexo positivo na quantidade e na qualidade dos frutos produzidos. As plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M tiveram um ganho de aproximadamente 101 % na produção de frutos comerciais (peso) e de 76,6 % no número médio de frutos por planta, quando comparados aos das plantas inoculadas com as estirpes severas dos vírus, aos 30 dias após o transplante em campo. As plantas duplamente premunizadas (ZYMV-M + PRSV-W-1) tiveram um ganho médio na produção de frutos comerciais de 85 %, em relação ao peso dos frutos, e de 70 %, em relação ao número de frutos por planta, quando comparados aos das plantas infectadas com as estirpes severas. Quanto aos frutos não comerciais, as plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M e as duplamente premunizadas produziram, em média, 0,3 kg/planta, contra 1,1 kg/planta daquelas infectadas com a mistura das estirpes severas. O ganho na produção proporcionado pela premunização, apenas com a estirpe ZYMV-M está de acordo com aqueles obtidos no controle do mosaico amarelo em outros países (Lecoq et al., 1991; Walkey et al., 1992; Spence et al., 1996; Perring et al., 1995; Yarden et al., 2000).

As plantas duplamente premunizadas tiveram uma redução na produção de frutos comerciais (peso) da ordem de 9,2 %, quando comparada com as produções daquelas premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, separadamente. É provável que essa redução esteja associada a um certo efeito sinérgico das estirpes fracas desses vírus. Fato semelhante foi constatado por Kosaka & Fukunishi (1997) em experimentos de múltipla proteção em pepino, no Japão. Plantas premunizadas com as estirpes fracas do CMV, WMV-2 e ZYMV, desenvolveram sintomas de mosaico mais pronunciados e produziram 15 % menos frutos comerciais do que as plantas sadias. A pequena redução na produção das plantas duplamente premunizadas, encontradas no presente trabalho, é compreensível e pode ser considerada aceitável, diante dos danos provocados pela infecção das plantas com as estirpes severas desse vírus. São necessários estudos complementares para avaliar o efeito da dupla premunização no desenvolvimento e na produção de outras espécies cultivadas de cucurbitáceas.

Conforme apontado anteriormente, o ZYMV e o PRSV-W são os vírus predominantes em alguns estados brasileiro, representando mais de 70% das infecções com vírus nas culturas de cucurbitáceas. Várias são as espécies de cucurbitáceas cultivadas e, dentro de cada espécie, algumas são representadas por diversas variedades ou híbridos, sendo a maioria suscetível a esses vírus. Diante desse quadro, a dupla premunização pode ser de grande utilidade, pois poderá ser aplicada em praticamente qualquer variedade suscetível, de qualquer espécie cultivada de cucurbitácea. Caso seja desenvolvida uma cultivar resistente de uma determinada espécie, através do melhoramento genético clássico ou por meio de incorporação de genes resistência através de técnicas moleculares (transgênica), a premunização pode ser interrompida e as estirpes fracas armazenadas de modo a manterem a infectividade. Porém, havendo quebra da resistência, as estirpes fracas poderão ser imediatamente ativadas e aplicadas novamente para a premunização da cultivar em questão.

O uso da premunização como método de controle de fitoviroses tem inúmeras vantagens, pois pode ser considerada uma forma ecologicamente

correta de controle. Entre as vantagens, pode-se citar o fato de não ser poluente e de não trazer riscos para o aplicador e o consumidor do produto. Além disso, trata-se de uma medida de controle que não interfere com outras práticas convencionais da cultura; é simples de ser utilizada e de baixo custo. É sempre bom lembrar que diversos autores (Fulton, 1986; Posnette & Todd, 1995; Rezende & Müller, 1995) que escreveram sobre a aplicação prática da premunização para o controle de fitoviroses, sempre apontaram para possibilidade de alguns riscos, entre os quais o efeito sinérgico, que pode ocorrer em plantas infectadas com a estirpe fraca e que venham a ser inoculadas com outro(s) vírus que também infecta(m) a mesma espécie. O dano ocasionado por esta infecção múltipla poderia ser maior do que o efeito de cada um dos vírus isoladamente. Nos trabalhos de premunização para o controle do mosaico amarelo da abobrinha, realizados na França e em Taiwan, foi constatada a ocorrência de infecção com outros vírus que infectam cucurbitáceas, porém não foi mencionada a ocorrência de sinergismo entre a estirpe fraca do ZYMV e algum desses vírus posteriormente inoculados nas plantas premunizadas em campo (Lecoq et al., 1991; Wang et al., 1991). Estudos dessa natureza deverão ser feitos no caso da premunização com estirpes fracas do ZYMV e do PRSV-W, uma vez que outros vírus capazes de infectar cucurbitáceas também ocorrem no Brasil.

Para que a estirpe fraca ZYMV-M possa ser utilizada pelos agricultores é necessário, primeiramente estudar a sua eficiência no controle do mosaico amarelo em outras espécies cultivadas, tais como abóboras, melancia, melão e pepino. É necessário avaliar também o efeito da dupla premunização nessas espécies. Paralelamente a estas investigações, deve-se estabelecer um procedimento simples, rápido e eficiente para a inoculação (premunização) massal das plantas. Yeh et al. (1988) premunizaram eficientemente mudas de mamoeiro com uma estirpe fraca do PRSV-P, aplicando o inóculo com uma pistola para pintura, com pressão de 4 - 6 kgf cm⁻². O inóculo da estirpe fraca foi diluído na proporção de 1 g de tecido para 20 mL de tampão. Perring et al. (1995) verificaram que uma solução de 10 % (g de tecido/mL de tampão) da estirpe fraca do ZYMV, aplicada em plantas de melão, com pressão de 2,1 kgf cm⁻², resultou numa

infecção aproximada de 80 % das plantas. Rezende & Pacheco (1998), em trabalho de inoculação massal de abobrinha-de-moita com a estirpe PRSV-W-1, verificaram que inóculos diluídos entre 1:50 e 1:200, e aplicados sob pressão de $2,8 \text{ kgf cm}^{-2}$, com uma pistola para pintura, causaram infecção em 100% das mudas. Dias et al. (2000), utilizando o mesmo processo de inoculação, com pressão de $7,0 \text{ kgf cm}^{-2}$, obtiveram 79% de infecção de mudas de abóbora híbrida do tipo Tetsukabuto. É bem provável que este procedimento, com alguns ajustes, poderá ser eficiente para a inoculação massal de mudas de cucurbitáceas com a estirpe ZYMV-M, ou com a mistura das estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1. A inoculação simultânea das estirpes fracas tem a vantagem de não ocasionar incremento no tempo e na mão de obra requerida para a premunização das mudas. Esse fato poderá ter reflexo positivo no preço final das mudas premunizadas.

6 CONCLUSÕES

1. Foi obtida uma estirpe fraca (“Mild”), denominada ZYMV-M, a partir de suspensão parcialmente purificada do vírus exposta à luz ultravioleta;
2. A estirpe fraca ZYMV-M protegeu plantas de abobrinha-de-moita contra a infecção com as estirpes severas do ZYMV de Atibaia, Iacri e Vargem Paulista, em testes em casa de vegetação;
3. A dupla premunização com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, protegeu as plantas de abobrinha-de-moita contra as estirpes severas desses vírus, em testes em casa de vegetação e em campo;
4. As plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M tiveram um ganho médio na produção de frutos comerciais (peso) de 101 %, em relação às plantas infectadas com as estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W, aos 30 dias após o transplante em campo;
5. As plantas duplamente premunizadas (ZYMV-M + PRSV-W-1) tiveram um ganho médio na produção de frutos comerciais (peso) de 85 %, em relação às plantas infectadas com as estirpes severas desses vírus, aos 30 dias após o transplante em campo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.C.; IKEDA, H.; COSTA, A.S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia (*Citrullus vulgaris* Schvad.) em plantações de melão (*Cucumis melo* L.) na região de Belém- PA. **Revista de Olericultura**, v.12, p.94, 1972.
- ALDLERZ, W.C.; EVERETT, P.H. Aluminum foil and white polyethylene mulches to repel aphids and control watermelon mosaic. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1276-1279, 1968.
- ALDLERZ, W.C.; PURCIFULL, D.E.; SIMONE, G.W.; HIEBERT, E. *Zucchini yellow mosaic virus*: a pathogen of squash and other cucurbits in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.96, p.72-74, 1983.
- AL-MUSA, A.M. Oversummering hosts for some cucurbit viruses in the Jordan Valley. **Journal of Phytopathology**, v.127, p.49-54, 1989.
- BROWN, J.E.; DANGLER, J.M.; WOODS, F.M.; TILT, K.M.; HENSHAW, M.D.; GRIFFEY, W.A.; WEST, M.S. Delay in mosaic virus onset and aphid vector reduction in summer squash grown on reflective mulches. **Hort Science**, v.28, p.895-896, 1993.

- CANER, J.; GALLET, S.R.; LOTZ, I.P.M.; OLIVEIRA, J.M. Natural infection of cucumber (*Cucumis sativus*) by zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in Santa Catarina, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 6., São Lourenço, 1992. **Anais**. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1992. p.180.
- CHAGAS, C.M. Mosaico da abóbora em pepino. **O Biológico**, v.36, p.326, 1970.
- CHALFANT, R.B.; JAWORSKI, C.A.; JONHSON, A.W.; SUMNER, D.R. Reflective film mulches, millet barriers, and pesticides effect on watermelon mosaic virus, insects, nematodes, soil borne fungi, and yield of yellow summer squash. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.102, p.11-15, 1977.
- CHO, J.J.; ULLMAN, D.E.; WHEATLEY, E.; HOLLY, J.; GONSALVES, D. Commercialization of ZYMV cross protection for zucchini production in Hawaii. **Phytopathology**, v.82, p.1073, 1992.
- COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista de Olericultura**, v.12, p.100-101, 1972. /Resumo/.
- COSTA, C.L.; COSTA, A.S. Redução da disseminação de mosaico em abóbora de moita (*Cucurbita pepo* var. *melo pepo*) com superfícies reflectivas repelentes aos afídeos vectores. **Revista de Olericultura**, v.11, p.24-25, 1971. /Resumo/.
- CRUZ, E.S.; PAZ, C.D.; PIO-RIBEIRO, G.; BATISTA, D.C.; PEREIRA FILHO, G.G.; ANDRADE, G.P. Levantamento de viroses em melancia e melão no submédio São Francisco. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.21, 1999. /Resumo/

- DAIBER, C.C.; DONALDSON, J.M.I. Watermelon mosaic virus in vegetable marrows: The effect of aluminum foil on the vector. **Phytophylactica**, v.8, p.85-86, 1976.
- DESBIEZ, C.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. **Plant Pathology**, v.46, p.809-829, 1997.
- DIAS P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida 'Tetsukabuto' para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus – type W*. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.390-398, 2000.
- DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Problemas na premunização de melancia para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot vírus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.651-654, 2001.
- EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, p.31-55, 1978.
- FANG, G.; GRUMET, R. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.6, p.358-367, 1993.
- FUCHS, M.; GONSALVES, D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus 2* to mixed infections by both potyviruses. **Bio/Technology**, v.13, p.1466-1473, 1995.
- FULTON, R.W. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.67-81, 1986.

- GILBERT-ALBERTINI, F.; LECOQ, H.; PITRAT, M.; NICOLET, J.L. Resistance of *Cucurbita moschata* to watermelon mosaic virus type 2 and its genetic relation to resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. **Euphytica**, v.69, p.231-237, 1993.
- GOMES, F.D. **Curso de estatística experimental**, 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.
- GONSALVES, D.; CHEE, P.; PROVVIDENTI, R.; SEEM, R. SLIGHTON, J. Comparison of coat protein-mediated and genetically derived resistance in cucumber to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations. **Bio/Technology**, v.10, p.1562-1570, 1992.
- GREBER, R.S.; PERLEY, D.M.; HERRINGTON, M.E. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.1085-1094, 1988.
- HULL, R. **Matthew's plant virology**. London: Academic Press, 2002. 1001p.
- KAMEYA-IWAKI, M.; TOCHIHARA, H.; HANADA, K.; TORIGOE, H. Attenuated isolate of watermelon mosaic virus (WMV-2) and its cross protection against virulent isolate. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.3, p.491-494, 1992.
- KITAJIMA, E.W.; SÁ, P.B.; DE RITZINGER, C.H.S.P.; RODRIGUES, M.G.R. Detecção de partículas do tipo rhabdovirus em algumas compostas, abóboreira e mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.141-144, 1991.
- KOSAKA, Y.; FUKUNISHI, T. Attenuated isolates of soybean mosaic virus derived at a low temperature. **Plant Disease**, v.77, p.882-886, 1993.

- KOSAKA, Y.; FUKUNISHI, T. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus diseases. **Plant Disease**, v.81, p.733-738, 1997.
- LECOQ, H. A poorly aphid transmissible variant of zucchini yellow mosaic virus. **Phytopathology**, v.76, p.1063, 1986.
- LECOQ, H.; LEMAIRE J.M.; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. **Plant Disease**, v.75, p.208-211, 1991.
- LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, V.B.; VALE, C.C. Purification and serology of *Zucchini yellow mosaic virus* isolated from *Cucumis melo* 'AF-522'. ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8., São Lourenço, MG. 1996. **Anais**. São Lourenço, MG. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1996. p.278.
- LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; MUNHOZ, J.O. Isolamento e propriedade do vírus da necrose da abóbora, um possível membro do grupo "Tobacco Necrosis Vírus". **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.622, 1983.
- LISA, V.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. CMI/AAB. **Descriptions of Plant Viruses**, n.282, p.4, 1984.
- LOPES, J.F.I. Simpósio Brasileiro Sobre Cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.98-99, 1991.
- LOVISOLO, O. Virus and virioid diseases of cucurbits. **Acta Horticulturae**, v.88, p.33-71, 1980.

- MAELZER, D.A.; MCLEAN, G.D.; GARRET, R.G., RUESINK, W.G.. Integrated control of insect vectores of plant virus deseases. In: **Plant virus epidemics.**, New York, Academic Press: 1986. p.483-512,
- MAHGOUB, H.A.; DESBIEZ, C.; WIPF-SCHEIBEL C.; DAFALLA G.; LECOQ, H. Characterization and occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in Sudan. **Plant Phatology**, v.46, p.800-805, 1997.
- MAKKOUK, K.M.; MENESSA, R.E. Effects of a mineral oil spray on aphid transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* to cucumbers. **Arab Journal of Plant Protection**, v.3, p.18-23, 1985.
- MONTASSER, M.S.; TOUSIGNANT, M.E.; KAPER, J.M. Virus satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) diseases in field-grown pepper and melon plants. **Plant Disease**, v.82, p.1298-1303, 1998.
- MOORE, W.D.; SMITH, F.F.; JOHNSON, G.V.; WOLDENBARGER, W.O. Reduction of aphid population and delayed incidence of virus infection on yellow straight neck squash by the use of aluminum foil. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.78, p.187-191, 1965.
- MOURA, M.C.C.L.; LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, V.B.; GONÇALVES, M.F.B. Identificação sorológica de espécie de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.90-92, 2001.
- MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, v.15, p.233-247, 1987.

- NAMETH, S.T.; DODDS, J.A.; PAULUS, A.O.; KISHABA, A. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in southeastern California desert valleys. **Plant Disease**, v.69, p.785-788, 1985.
- NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência dos vírus do mosaico amarelo e da clorose letal em cucurbitáceas no Estado da Bahia. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.37, 1999. /Resumo/.
- OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J.A.A.; VALE, C.C.; PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.628-636, 2000.
- OROZCO, S.M.; LOPES, A.O.; PEREZ, Z.O.; DELGADILLO, S.F. Effect of transparent mulch, floating row covers and oil sprays on insect populations, virus disease and yield of cantaloup. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.10, p.229-234, 1994.
- PERRING, T.M.; FARRAR, C.A. Stimulation of growth and yield of virus-infected cantaloupe with pyrethroids. **Plant Disease**, v.77, p.1077-1080, 1993.
- PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; MAYBERRY, K.; BLUA, M.J. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. **California Agriculture**, v.46, p.35-40, 1992.
- PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; BLUA, M.J.; WANG, H.L.; GONSALVES, D. Cross protection of cantaloupe with a mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus*: effectiveness and application. **Crop Protection**, v.14, p.601-606, 1995.
- PIRONE, T.P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, v.2, p.81-87, 1991.

- POSNETTE, A.F.; TODD, J.Mc.A. Virus diseases of cacao in West Africa. IX. Strain variant and interference in virus 1A. **Annals of Applied Biology**, v.43, p.433-453, 1955.
- POLTRONIERI, L.S.; NOVAES, Q.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M.; TRINDADE, D.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; KITAJIMA, E.W. Constatação do *Zucchini yellow mosaic virus* em cucurbitáceas no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.669, 2000.
- POZZER, L.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R. O.; ÁVILA, A.C. A new tospovirus infecting Cucurbitaceae in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.21, 1994. /Abstract/.
- PROVVIDENTI, R. Resistance to viral diseases of cucurbits. In: **Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding**, Portland: Timber Press, 1993. p.8.
- PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; HUMAYDAN, H.S. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. **Plant Disease**, v.68, p.443-446, 1984.
- PURCIFULL, D.E.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. **Description of Plant Viruses**, n.292, 8p, 1984.
- RACCAH, B. Use of a combination of mineral oils and pyrethroids for control of non-persistent viruses. **Phytoparasitica**, v.13, p.280, 1985.
- RAST, A.T.B. Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crop by resistance breeding and cross protection. Wageningen: 1975. 76p. /Report, 834/

- REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Intensificação dos sintomas dificulta o controle do mosaico do mamoeiro por premunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.101-110, 1987.
- REZENDE, J.A.M.; MÜLLER, G.W. Mecanismo de proteção entre vírus e controle de viroses por premunização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.3, p.185-226, 1995.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Estabilidade de isolados fracos premunizantes do vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.64-68, 1997.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of papaya ringspot virus type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, v.82, p.171-175, 1998.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A.; IEMMA, A.F. Efeitos da premunização da abóbora 'Menina Brasileira' com estirpes fracas do vírus-do-mosaico-do-mamoeiro – estirpe melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1481-1489, 1999.
- REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.F.; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.55-61, 1994.
- REZENDE, J.A.M.; GALLETTI, S.R.; POZZER, L.; RESENDE, R. O; ÁVILA, A. C.; SCAGLIUSI, S.M.M. Incidence, biological and serological characteristics of a tospovirus infecting experimental fields of zucchini in São Paulo State, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.92-95, 1997.

- SÁ, P.B.; KITAJIMA, E.W. Characterization of an isolate of watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.217-233, 1991.
- SCHRIJNWERKERS, C.C.F.M.; HUIJBERTS, N.; BOS, L. *Zucchini yellow mosaic virus*; two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.97, p.187-191, 1991.
- SPACE, N.J.; MEAD, A.; MILLER, A.; SHAW, E.D.; WALKEY, D.G.A. The effect on yield in courgette and marrow of the mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus* used for cross-protection. **Annals of Applied Biology**, v.129, p.247-259, 1996.
- STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.295, 2000.
- STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; BURIOLLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.532, 2001.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS / STAT user's guide**. 4. ed: Carry, 1990. 943p.
- SUMMERS, C.G.; STAPLETON, J.J.; NEWTON, A.S.; DUNCAN, R.A.; HART, D. Comparison of sprayable and film mulches in delaying the onset of aphid-transmitted virus diseases in zucchini squash. **Plant Disease**, v.79, p.1126-1131, 1995.
- TOMLINSON, J.A.; SHEPHERD, R.J. Studies on mutagenesis and cross-protection of cauliflower mosaic virus. **Annals of Applied Biology**, v.90, p.223-231, 1978.

- TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSELL, P.F.; MCMASTER, J.R.; GROFF, D.W.; HADDEN, K.C.; HIMMEL, P.T.; HUBBARD, J.P.; BOESHORE, M.L.; QUEMADA, H.D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. **Bio/Technology**, v.13, p.1458-1465, 1995.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FARQUET, C.M.; BISHOP, D.H.C; CARTENS, E.B; ESTER, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MC GEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Ed.) **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of virus. San Diego: Academic Press, 2000. 1162p.
- VANI, S.; VARMA, A.; MORE, T.A.; SRIVASTAVA, K.P. Use of mulches for the management of mosaic disease in muskmelon. **Indian Phytopathology**, v.42, p.227-235, 1989.
- VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A. Detecção do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita no Brasil: caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.72-79, 1995.
- VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; NAGAI, H. Constatação do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita ("zucchini yellow mosaic vírus") no Brasil, através de MEIAD e ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.118, 1992. /Resumo/.
- WALKEY, D.G.A; LECOQ, H; COLLIER, R.; DOBSON, S. Studies on the control of *Zucchini yellow mosaic virus* in courgettes by mild strain protection. **Plant Pathology**, v.41, p.762-771, 1992.

- WANG, H.L.; GONSALVES, D. Artificial induction and evaluation of a mild isolate of tomato spotted wilt virus. **Journal Phytopathology**, v.135, p.233-244, 1992.
- WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H. Effectiveness of cross protection by mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucumber, melon, and squash. **Plant Disease**. v.75, p.203-207, 1991.
- WEBB, S.E.; LINDA, S.B. Effect of oil and insecticides on epidemics of potyviruses in watermelon in Florida. **Plant Disease**, v.77, p.869-874, 1993.
- WYMAN, J.A.; TOSCANO, N.C.; KIDO, K.; JONSON, H.; MAYBERRY, K. Effects of mulching on the spread of aphid-transmitted watermelon mosaic virus to summer squash. **Journal of Economic Entomology**, v.72, p.139-143, 1979.
- YARDEN, G.; HEMO, R.; LIBEN, H.; MAOZ, E.; LEV, E.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Cross-protection of Cucurbitaceae from *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. **Acta-Horticulturae**, v.510, p.349-356, 2000.
- YEH, S-D; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of *Papaya ringspot virus* for control by cross protection. **Phytopathology**, v.74, p.1086-1091, 1984.
- YEH, S-D; GONSALVES, D.; WANG, H-L; NAMBA, R.; CHIU, R-J. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. **Plant Disease**, v.72, p.375-380, 1988.
- YUKI, V.A. Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita. Piracicaba, 1990. 84p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROPPPO, G.A.; PAVAN, M.A.. *Cayaponia tibiricae*: new host of *Zucchini yellow mosaic virus* in Brazil. **Plant Disease**, v.83, p.486, 1999.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROPPPO, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v.84, p.516-520, 2000.