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

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detecção, avaliação de danos em
abobrinha de moita e reação de espécies de cucurbitáceas

JOSÉ SEGUNDO GIAMPAN

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2007

José Segundo Giampan
Engenheiro Agrônomo

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detecção, avaliação de danos em abobrinha de moita e reação de espécies de cucurbitáceas

Orientador:

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2007

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

Giampan, José Segundo

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detecção, avaliação de danos em abobrinha de moita e reação de espécies de cucurbitáceas / José Segundo Giampan. - - Piracicaba, 2007.
51 p.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Diagnose foliar 2. Hortaliças curcubitáceas 3. Resistência genética vegetal 4. Vírus de plantas - danos. I. Título

CDD 635.6

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *José Giampan* e
Maria Fernandes de Jesus que tiveram
força e coragem para suportar a minha dor
nas horas difíceis e tanto me estimularam e
animaram para dar seqüência a esse trabalho,
pelo apoio, incentivo, confiança e exemplo de dignidade,

DEDICO

Ao meu irmão, *Marcos Antônio*;
à minha cunhada, *Jussara*; aos meus
sobrinhos, *Junior*, *Mateus* e *Milena*, e demais
parentes e amigos pelo convívio, carinho, apoio em
todos os momentos e, principalmente, pelas alegrias vividas,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida que me concedeu, pela proteção nos momentos que mais precisei, pela saúde que estou recuperando graças a Ele, e pelos dons recebidos;

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende que sempre esteve muito próximo, apoiando nos momentos que mais necessitei, pelo profissionalismo, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, pelos conselhos e incentivos na vida profissional. E, sobretudo, pela amizade e lições de vida;

In memorium ao professor Dr. Hiroshi Kimati, uma pessoa que sempre admirei e tive o prazer de conversar tantas vezes, em cada conversa um novo aprendizado, um nome que sempre fará muita falta na fitopatologia; e que colaborou com sua vasta experiência clínica na diagnose e na solução de problemas diversos nos meus trabalhos em campo, desde a minha iniciação científica;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, especialmente ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela oportunidade concedida à realização do curso;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado, sem a qual não teria condições de desenvolver este projeto;

Aos professores do Setor de Fitopatologia pelos valiosos ensinamentos e cobranças nas disciplinas;

À professora Sônia M. S. Piedade do Departamento de Ciências Exatas pela colaboração no planejamento e análise estatística dos dados;

Ao professor Angelo P. Jacomino pela amizade e grandiosos conselhos profissionais e vivenciais;

Aos funcionários do Setor de Fitopatologia, em especial José Edivaldo Buriola, José Rodolfo Groppo e Pedro C. Arthuso, que colaboraram diretamente nos trabalhos desenvolvidos;

Aos pesquisadores Dr. Quelmo S. Novaes, Dr. Ricardo Gioria, Dra. Juliana Freitas-Astúa e Dra. Marília G. S. Della Vecchia, os quais me ajudaram muito no início dos

trabalhos e com os quais tive o prazer de conviver, sempre aprendendo com suas experiências;

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal: Scheila C. Maciel, Adriana G. Moreira, Estela Bonilha, Débora M. S. Freitas, Ana Carolina C. N. Alves pela amizade, conselhos e colaboração nos trabalhos realizados;

Aos recém-doutores Dr. Ricardo Ferrari Silva e Dr. Silvio A. M. Alves pela colaboração direta nos trabalhos e pela amizade;

Aos demais colegas da Pós-graduação da Fitopatologia, pela amizade;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	16
2 DETECÇÃO ESPECÍFICA DO <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV) ATRAVÉS DE RT-PCR	19
Resumo	19
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	25
Referências	29
3 DANOS CAUSADOS PELO <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV) SOBRE A PRODUÇÃO DE FRUTOS COMERCIAIS DE ABOBRINHA DE MOITA 'CASERTA'.	33
Resumo	33
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	37
Referências	40
4 REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CUCURBITÁCEAS À INFECÇÃO COM O <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV).....	42
Resumo	42
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos	44
Resultados e Discussão	45
Referências	50

RESUMO

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detecção, avaliação de danos em abobrinha de moita e reação de espécies de cucurbitáceas

O *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) é uma espécie do gênero *Tospovirus*, transmitido por tripes, que infecta diversas espécies da família Cucurbitaceae. Já foi constatado em diversos estados brasileiros e sua incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos em algumas regiões. Por se tratar de uma virose em potencial para as cucurbitáceas, pouco se conhece sobre os danos causados e a reação das diferentes espécies de cucurbitáceas à infecção em campo. Esse trabalho teve por objetivos: estudar a eficiência da RT-PCR para a detecção rápida e específica do ZLCV em cucurbitáceas; avaliar os danos causados pelo ZLCV em abobrinha de moita em campo e a reação de sete espécies/variedades de cucurbitáceas à infecção natural. A detecção do ZLCV por RT-PCR foi estudada utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores, desenhados com base na sequência do S-RNA do ZLCV (AF067069). Quatro espécies de tospovírus (TSWV, TCSV, GRSV e CSNV) e outros vírus que infectam cucurbitáceas (PRSV-W-1, PRSV-W-C, ZYMV-M, ZYMV-Atibaia e CMV) foram incluídos no teste. Na reação de RT-PCR foi obtido um fragmento de aproximadamente 350 pb, amplificado somente a partir de RNA total extraído de planta infectada com o ZLCV. A sequência obtida desse fragmento apresentou 98,2 % de identidade com a sequência de nucleotídeos do S-RNA do ZLCV depositada no GenBank. Os danos causados pelo ZLCV em abobrinha de moita 'Caserta' foram avaliados em campo na ESALQ/USP, Piracicaba-SP, onde esse vírus é freqüente. As plantas foram monitoradas semanalmente quanto à infecção pelo ZLCV por meio dos sintomas e por PTA-ELISA. As plantas foram agrupadas em função da época de aparecimento dos sintomas do ZLCV, avaliando a produção de frutos comerciais (FC) e não comerciais (FNC) de cada grupo e comparando com a de plantas que permaneceram sem sintomas até o final do experimento. As plantas que apresentaram sintomas até os 23 dias após a emergência (DAE) não produziram qualquer tipo de frutos. FC foram colhidos de plantas que apresentaram sintomas a partir dos 42 DAE. Mesmo assim, houve redução de 78,5 % na produção de FC. Plantas que mostraram sintomas por ocasião da última colheita (55 DAE) apresentaram redução na produção de FC de 9,6 %. A infecção com o ZLCV até o início da frutificação inviabiliza a produção de FC de abobrinha de moita 'Caserta'. A reação de sete espécies/variedades de cucurbitáceas à infecção com o ZLCV foi avaliada em campo, por meio da infecção natural e em casa de vegetação, onde as plantas foram duplamente inoculadas mecanicamente com o ZLCV no estágio cotiledonar. A avaliação foi feita com base no monitoramento dos sintomas e por PTA-ELISA. A abobrinha de moita 'Caserta' e a abóbora híbrida 'Takaiama' apresentaram alta suscetibilidade ao ZLCV. O pepino 'Safira' apresentou baixa infecção em campo e intermediária em casa de vegetação. Enquanto que a melancia 'Crimson Sweet', o maxixe do Norte, a abóbora rasteira 'Menina Brasileira' e a moranga 'Alice' apresentaram valores menores de infecção. A

moranga 'Exposição' foi altamente resistente, pois não foi infectada nos ensaios em campo e em casa de vegetação.

Palavras-chave: Tospovirus; RT-PCR; Danos; Resistência; Cucurbitaceae

ABSTRACT

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV): detection, evaluation the damage on zucchini squash and the reaction of species of cucurbits

Zucchini lethal chlorosis virus is a specie of the Genus *Tospovirus*, transmitted by thrips (*Frankliniella zucchini*), which infects some species of the family *Cucurbitaceae*. The occurrence of this tospovirus has already been reported for several Brazilian states and its incidence in cucurbit crops has increased in the last years in some regions. Considering the importance of this tospovirus for cucurbit crops, very little is known about the damage caused by this virus and the reaction of the different species of cucurbits to infection. This work aimed: to study the efficiency of the RT-PCR for the fast and specific detection of ZLCV, to evaluate the damage caused by this virus on zucchini squash under field condition and the reaction of seven species/varieties of cucurbits to infection with this tospovirus. The detection of ZLCV by RT-PCR was studied using a pair of primers designed based on the nucleotide sequence of the S-RNA of ZLCV (AF067069). Four other tospovirus species (TSWV, TCSV, GRSV and CSNV) and other virus that infect cucurbits (mild strain PRSV-W-1, wild strain PRSV-W-C, mild strain ZYMV-M, wild strain ZYMV-Atibaia and CMV) were included in this test. The RT-PCR reaction generated a fragment of approximately 350 bp, only amplified from total RNA extracted from plant infected with ZLCV. The sequence of this fragment presented 98.2 % identity with the corresponding nucleotide sequence of the S-RNA of ZLCV deposited in the GenBank. The damage caused by ZLCV on zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) was evaluated under field condition. Zucchini squash plants were weekly monitored for the presence of characteristic symptoms induced by ZLCV and PTA-ELISA for virus indexing. Plants were grouped based on the time the symptoms were first seen. Fruits harvested from each plant within each group were classified on marketable (M) and non-marketable (NM) based on the phenotype. Plants that did not show symptoms by the end of the crop were considered still healthy and their yield was used as control. Zucchini squash plants that showed symptoms of ZLCV infection up to 23 days after emergency (DAE) did not yield any fruit. Marketable fruits were first harvested only from plants that showed symptoms 42 DAE. However, the yield of marketable fruits was reduced by 78.5 %, as compared to that from asymptomatic plants. Plants that showed symptoms 55 DAE showed a reduction on the yield of marketable fruit of 9.6%. The reaction of seven species/varieties of cucurbits to infection with ZLCV was evaluated under field and greenhouse conditions. In the field experiment, ZLCV infection occurred naturally. In the greenhouse, plants were twice mechanically inoculated with ZLCV at the cotyledonal stage. Evaluations were based on symptoms expression and PTA-ELISA. Zucchini squash 'Caserta' and hybrid squash 'Takaiama' were highly susceptible. The cucumber 'Safira' presented low percentage of infected plants in the field and intermediate in the greenhouse. Watermelon 'Crimson Sweet', northern gherkin, long neck squash 'Menina Brasileira' and winter squash 'Alice'

presented lower values of infected plants. Winter squash 'Exposição' was highly resistant to infection under field and greenhouse conditions.

Keywords: Tospovirus; RT-PCR; Yield loss; Resistance; Cucurbits

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 mundial. No Brasil, as espécies com maior expressão econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). A produção mundial das principais cucurbitáceas, no ano de 2005, estimada pela FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO (2006), foi acima de 187 milhões de toneladas, sendo que a melancia é a principal espécie dessa família, com cerca de 96,4 milhões de toneladas, seguida pelo pepino (41,8 mi t), melão (28,9 mi t) e abóboras e abobrinhas (19,8 mi t). Para o Brasil, este mesmo órgão estimou, no mesmo ano, a produção apenas de melancia (1,85 mi t) e melão (190 mil t). O INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA (2006) estimou que a produção das principais cucurbitáceas no Estado de São Paulo, no ano de 2005, foi ao redor de 569,8 mil t, sendo que desta, as produções de melancia, abóbora, chuchu, pepino, abobrinha e melão foram de 300,5; 93; 86,9; 55,4; 33,2 e 0,6 mil t, respectivamente.

As cucurbitáceas são afetadas por diversas viroses, sendo que mais de 30 vírus podem infectar naturalmente plantas desta família (Robinson & Decker-Walters, 1997). Desses, oito já foram encontrados no Brasil infectando diferentes espécies de cucurbitáceas. Entre esses, encontra-se uma espécie do gênero *Tospovirus*, caracterizada como *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (Bezerra et al., 1999; Pozzer et al., 1996). Embora a caracterização dessa nova espécie seja relativamente recente, os primeiros relatos da infecção de cucurbitáceas com tospovírus no Brasil foram feitos nas décadas de 70 e 80 (Kitajima & Costa, 1972; Costa et al., 1972; Cupertino et al., 1974; e Silveira Jr. et al., 1985). Naquela ocasião, o vírus foi identificado como sendo o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), causador do vira-cabeça do tomateiro. Como a incidência desse tospovírus em plantios de cucurbitáceas era esporádica, sem danos significativos à produção, o problema foi considerado sem importância e não recebeu adicional atenção. Nos últimos anos, todavia, esse quadro mudou e o ZLCV tem sido encontrado com mais freqüência em alguns plantios de cucurbitáceas, algumas vezes

associado a danos na produção (Giampan 2002; Nagata et al., 1998; Rezende et al., 1995; Rezende et al., 1997; Stangarlin et al., 2000 e Yuki et al., 2000).

Essa variabilidade na incidência do ZLCV pode ser constatada em relatos sobre a ocorrência de viroses em cucurbitáceas em diversos estados brasileiros. Rezende et al. (1997) verificaram a ocorrência do ZLCV em campos experimentais de abobrinha de moita e de abóbora rasteira, localizados na região de Campinas, de 1991 a 1994, com incidências de 20 % a 78 %, alcançando uma média de 50,6 %. Estudos realizados no Estado de São Paulo mostraram que o *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) é o vírus predominante, seguido pelo *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). O ZLCV foi constatado em 7,8 % das amostras analisadas (Yuki et al., 2000). Em um experimento de premunização de melancia com estirpes fracas do PRSV-W, em Anhembi-SP, Giampan (2002) observou alta incidência do ZLCV, atingindo 63,5 %. Em um primeiro estudo realizado com amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Stangarlin et al. (2000) também constataram que o PRSV-W e o ZYMV foram os vírus de maior incidência, seguidos pelo ZLCV. 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. O ZLCV também foi relatado afetando a cultura do pepino no Distrito Federal (Nagata et al., 1998).

Como membro do gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*, o ZLCV pode ser transmitido, na natureza, apenas por tripes. Entretanto, Bezerra et al. (1999) e Nagata (dados ainda não publicados) não obtiveram êxito na transmissão desse vírus através de várias espécies de tripes (*Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi*). Por outro lado, verificou-se que *F. zucchini*, descrita por Nakahara & Monteiro (1999), foi a espécie de tripes predominantemente coletada de folhas e flores de plantas infectadas com o ZLCV em Piracicaba-SP. Em testes de transmissão preliminares, essa espécie transmitiu o ZLCV para plantas de abobrinha de moita (Rezende, comunicação pessoal).

O ZLCV apresenta partículas esféricas envelopadas, de aproximadamente 80 a 90 nm de diâmetro, constatadas no interior do retículo endoplasmático no citoplasma,

onde também foram observadas massas amorfas densas (viroplasma) (Rezende et al., 1997). O genoma desse vírus apresenta três segmentos de RNA com tamanhos correspondentes aos do TSWV. A homologia da sequência de aminoácidos deduzidos do gene da proteína do nucleocapsídeo do ZLCV com a de outros tospovírus variou de 20 a 80 % (Bezerra et al., 1999; Resende et al., 1996). As maiores homologias foram observadas com o *Chrysanthemum stem necrosis virus* - CSNV (80 %), o *Groundnut ring spot virus* - GRSV (75 a 78 %), o *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV (64 a 73 %) e o *Tomato spotted wilt virus* - TSWV (63 a 72 %). Estudos de relacionamento serológico entre isolados do ZLCV e outros tospovírus [CSNV, GRSV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), TCSV, TSWV e *Watermelon silver mottle virus* (WSMV)] mostraram que o ZLCV apresentou reação positiva apenas com o antissoro homólogo em testes do DAS-ELISA e Western Blot (Ávila et al., 1993; Pozzer et al., 1994; Resende et al., 1996).

O círculo de hospedeiros do ZLCV foi estudado por alguns autores em condições experimentais em casa de vegetação. Resende et al. (1996) verificaram que o ZLCV infectou apenas algumas espécies das famílias Amaranthaceae, Cucurbitaceae e Solanaceae. No caso dessa última família, dentre as espécies inoculadas, o ZLCV infectou sistemicamente *Datura stramonium*, *Capsicum annuum* e *C. chinense* PI 159236.

Rezende et al. (1995) testaram a transmissão mecânica do ZLCV para 21 espécies de plantas, representando sete famílias. Além de algumas cucurbitáceas (melancia 'Rajada' e pepino 'Caipira'), o vírus causou sintomas locais em *Gomphrena globosa*, *C. annuum*, *C. chinense* PI 159236, *D. stramonium* e *Nicotiana tabacum* 'Turkishi' e 'TNN'. Sistemicamente, infectou as espécies *C. annuum*, *C. chinense* PI 159236 e *D. stramonium*, além de diversas cucurbitáceas (melão 'Amarelo', pepino 'Caipira' e abobrinha de moita 'Caserta' e 'Clarinda'). Rezende et al. (1997), embora tenham verificado, em teste complementares, que certas espécies e cultivares de cucurbitáceas (melancia 'Charleston Gray', abóbora 'Menina Brasileira' e a abóbora híbrida 'Tetsukabuto'), não foram experimentalmente infectadas pelo ZLCV, apontaram que esses resultados devem ser interpretados com cautela. Enquanto todas as tentativas de transmitir o ZLCV mecanicamente para plantas de 'Menina Brasileira' em

casa de vegetação falharam, oito de 35 plantas em campo foram naturalmente infectadas pelo vírus. Esse fato pode ser explicado através da observação feita por Resende et al. (1996) de que, após poucas passagens mecânicas, o vírus dificilmente infecta hospedeiros da família Cucurbitaceae. Os mesmos problemas foram encontrados por Scagliusi et al. (1996) para um tospovírus encontrado naturalmente infectando *Chrysanthemum grandiflorum*, o qual não foi transmitido para as mesmas espécies por meio de inoculações mecânicas e por garfagem. Esses autores atribuíram esse fato à maior eficiência do tripses vetor em transmitir esse vírus quando comparado ao método usado na transmissão experimental.

Bezerra et al. (1999), estudando o círculo de hospedeiros do ZLCV, verificaram que, além de causar sintomas sistêmicos em cucurbitáceas (melancia, pepino, melão e abobrinha de moita), o vírus causou sintomas locais em *G. globosa*, *N. benthamiana* e *N. occidentalis*. *G. globosa* e *N. benthamiana* também foram invadidas sistemicamente.

Os sintomas causados pelo ZLCV em plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) no campo começam com uma coloração verde clara em todas as folhas. Em seguida, as folhas mais novas tornam-se cloróticas, com bordos encurvados. Folhas de plantas doentes são mais espessas do que aquelas de plantas saudáveis. Algumas folhas basais normalmente mostram necroses sistêmicas. Plantas infectadas definham e morrem em pouco tempo, especialmente quando a infecção ocorre antes do florescimento. Plantas infectadas após o florescimento exibem quase os mesmos sintomas, mas não morrem. Elas se tornam atrofiadas e têm sua produção drasticamente reduzida (Rezende et al., 1997).

Em plantas de abóbora (*C. moschata*) 'Menina Brasileira', os sintomas dessa doença são caracterizados principalmente por mosaico amarelo, rugosidade foliar, internódios reduzidos e folhas levemente encurvadas nas bordas. No entanto, ao contrário do caso anterior, não causa morte de plantas. Este fato sugere que esta espécie é aparentemente mais tolerante à doença do que a abobrinha de moita 'Caserta' (Rezende et al., 1997). Em plantas de melancia (*Citrullus lanatus*), os sintomas iniciais são caracterizados por epinastia foliar, ocorrendo, algumas vezes, um encurvamento dos bordos das folhas para cima. O vírus causa ainda clorose, rugosidade, deformação foliar e necrose nas folhas e redução nos internódios. A planta

apresenta atrofiamento, produzindo frutos menores, os quais podem apresentar pontos necróticos na casca e descoloração interna.

Em chuchuzeiro (*Sechium edule*) infectado com um tospovírus, descrito como um isolado do TSWV, Silveira Jr. et al. (1985) observaram sintomas de clareamento de nervura, manchas cloróticas irregulares e deformação foliar. E em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) infectadas com esse tospovírus, Nagata et al., (1998) observaram amarelecimento, mosqueado e mosaico das nervuras nas folhas.

A diagnose da clorose letal da abobrinha tem sido feita principalmente através de testes biológicos, serológicos e exames de microscopia eletrônica. Embora a reação em plantas hospedeiras ainda seja adotada como uma maneira de diagnosticar tospovírus, esta parece não ser uma técnica adequada quando se deseja separar espécies, visto que freqüentemente ocorre sobreposição do círculo de hospedeiras entre elas (Ávila, 1992). Desse modo, o uso de hospedeiras seria útil apenas para indicar que se trata de um isolado de tospovírus e, para isso, a *Petunia hybrida* tem sido utilizada com eficiência, uma vez que os isolados de tospovírus induzem nela lesões típicas entre um a três dias após a inoculação (Ávila, 1993; Ie, 1970). Vale ressaltar o fato desse teste necessitar de longo período de tempo para formação das mudas e requerer espaço em casa de vegetação.

Testes serológicos de DAS-ELISA, utilizando antissoro específico contra a proteína do nucleocapsídeo do ZLCV, tem se mostrado eficiente para a diagnose. Técnicas moleculares também vem sendo relatadas para a detecção de tospovírus. Eiras et al. (2001) testaram a técnica de "Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) para a detecção das seguintes espécies de tospovírus: TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, INSV, ZLCV e IYSV. Usando RNA total na reação, os autores verificaram que a técnica de RT-PCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos aos genes N (BR60/BR65), NSm (NS1/CLA1), G1/G2 (BR035/PDH006) e L (PDH001/L1), não foi capaz de amplificar simultaneamente todas as espécies de tospovírus e falhou consistentemente na detecção do ZLCV e IYSV. Contudo, todas as espécies foram detectadas por RT-PCR, com os primers BR60/BR65, NS1/CLA1 e BR035/PDH006, quando o RNA viral purificado foi usado na reação. A não detecção de ZLCV e IYSV,

usando RNA total extraído de plantas doentes, parece estar relacionada à baixa concentração ou à instabilidade desses vírus nessas preparações.

Com relação ao controle dessa virose, devido à pouca informação sobre aspectos epidemiológicos e reação de cultivares, poucas medidas têm sido recomendadas. As medidas geralmente preconizadas são: produção de mudas sadias, quando pertinente, sob telados à prova de tripses; eliminação de hospedeiros do vírus e do vetor próximo ao local de produção; e aplicação de inseticidas durante a obtenção de mudas e no início do desenvolvimento das plantas no campo para reduzir a população de vetores (Kurozawa et al., 2005). A resistência genética, seja da forma tradicional ou por meio da transgenia, é considerada a melhor e mais eficiente forma de controle de viroses em geral. Apesar disso, até o momento, não são conhecidas fontes de resistência ou tolerância ao vírus e nem variedades transgênicas resistentes.

Este trabalho teve como objetivos aprimorar técnicas de diagnose, realizar estudos epidemiológicos, avaliar os danos causados por esse tospovírus e a reação de espécies de cucurbitáceas a esta virose com a finalidade de obter subsídios para auxiliar nas recomendações de controle, que sejam eficientes e seguras ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, A.C. **Diversity of Tospoviruses**. 1992. 136p. Ph.D. Thesis - Agricultural Wageningen University, Wageningen, 1992.

ÁVILA, A.C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.179-183, 1993.

ÁVILA, A.C.; DE HAAN, P.; SMEETE, M.L.L.; RESENDE, R.O.; KORMELINK, R.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, Amsterdam, v.128, p.211-227, 1993.

BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista de Olericultura**, Brasília, v.12, p.100-101, 1972. Resumo.

CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; KITAJIMA, E.W.; MATOS, J.K.A.; ARAUJO, M.T. Vírus de cucurbitáceas no Distrito Federal. **Fitopatologia**, Lima, v.9, n.2, p.51, 1974. Resumo.

EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; MISSIAGGIA, A.A.; ÁVILA, A.C. RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, n.2, p.170-175, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Faostat (classic): Production/crops primary**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 20 out. 2006.

GIAMPAN, J.S. **Infectividade e proteção de três estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia**. 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

IE, T.S. **Tomato spotted wilt virus**. Richmond: Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists (C.M.I./ A.A.B.), 1970. 4p. (Description of Plant Viruses, 39).

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Banco de dados IEA**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 20 out. 2006.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Alterações no complexo de Golgi associada a infecção de tecido foliar de plantas infectadas por uma estirpe do vírus do vira-cabeça. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Fortaleza, v.5, p.180-181, 1972. Resumo.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005 . cap.32, p.293-302.

NAGATA, T.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.Z. First report on natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis tospovirus* on cucumber and Chrysanthemum stem necrosis tospovirus on tomato in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.1403, 1998. Abstract.

NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R.C. *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of tospovirus in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington D.C., v.101, n.2, p.290-294, 1999.

POZZER, L.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R. DE O.; ÁVILA, A.C. A new tospovirus infecting Cucurbitaceae in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, Suplemento, p.321, 1994. Abstract.

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

RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; GIORDANO, L.B.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n.431, p.78-89, 1996.

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

REZENDE, J.A.M.; GALLETI, S.R.; SCAGLIUSI, S.M.M.; POZZER, L.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. de. Incidência e algumas características biológicas e serológicas de um tospovirus em abobrinha de moita em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.343-344, 1995. Suplemento. Resumo.

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

SCAGLIUSI, S.M.M.; REZENDE, J.A.M.; BETTI, J.A.; COSTA, A.S. Diferenciação de isolados de tospovirus baseada na sintomatologia de plantas indicadoras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.388-391, 1996.

SILVEIRA JR., W.G.; ÁVILA, A.C.; MUNOZ, J.O. Chuchu (*Sechium edule* Sw.): nova espécie hospedeira do vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.661-665, 1985.

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**, Fortaleza, v.26, p.532, 2001. Suplemento. Resumo.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.132, 2000. Resumo.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.5, p.516-520, 2000.

2 DETECÇÃO ESPECÍFICA DO *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) ATRAVÉS DE RT-PCR

Resumo

As cucurbitáceas vêm sendo severamente afetadas, nos últimos anos, por um vírus do gênero *Tospovirus*, *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), transmitido por tripes. A detecção do ZLCV tem sido feita principalmente por testes serológicos e plantas indicadoras. Neste trabalho foi estudada a detecção do ZLCV por RT-PCR. Um par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado com base na sequência do S-RNA do ZLCV (AF067069). Oligonucleotídeos iniciadores ZLCV-P1 [5'-TCAACCCATAAGCCTGAACC-3'] e ZLCV-P2 [5'-TGTTGCTTTGCTGACTCA -3'] são complementares aos terminais 3' (posição 619-638 nt) e 5' (posição 274-291 nt) do S-RNA, respectivamente. Quatro espécies de tospovírus (TSWV, TCSV, GRSV e CSNV) e outros vírus que infectam cucurbitáceas (PRSV-W-1, PRSV-W-C, ZYMV-M, ZYMV-Atibaia e CMV) foram incluídos no teste. RNA total foi extraído de plantas infectadas com cada um desses vírus, separadamente. O produto do RT-PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1 %. Um fragmento de aproximadamente 350 pb foi amplificado somente a partir de RNA total extraído de planta infectada com o ZLCV. Este produto do RT-PCR foi purificado do gel de agarose e diretamente sequenciado. A sequência obtida apresentou 98,2 % de identidade com a sequência de nucleotídeos do S-RNA do ZLCV depositada no GenBank. Estes resultados demonstraram que o teste foi sensível e específico para detectar o ZLCV. Portanto, o RT-PCR pode ser usado na diagnose e em estudos epidemiológicos desse vírus.

Palavras-chave: Tospovirus; Cucurbitaceae; Diagnose

Abstract

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) is a species of the genus *Tospovirus*, transmitted by thrips, whose incidence in cucurbit crops has increased substantially in the last years. The detection of ZLCV in infected cucurbits has been done mainly by serological test and indicator plants. In this work, it was studied the detection of ZLCV by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). A pair of primers was designed based on the nucleotide sequence of the S-RNA of ZLCV (AF067069). Primers ZLCV-P1 [5'-TCAACCCATAAGCCTGAACC-3'] and ZLCV-P2 [5'-TGTTGCTTTGCTGACTCA -3'] are complementary to the 3' (position 619 – 638 nt) and 5' (position 274 – 291 nt) ends of the S-RNA, respectively. Four other tospovirus species (TSWV, TCSV, GRSV and CSNV) and other virus that infect cucurbits (mild strain PRSV-W-1, wild strain PRSV-W-C, mild strain ZYMV-M, wild strain ZYMV-Atibaia and CMV) were included in this test. Total RNA was extracted from infected plants with

each one of these viruses, separately. The product of the RT-PCR was submitted to electrophoresis in 1 % agarose gel. A fragment of approximately 350 bp was only amplified from total RNA extracted from plant infected with ZLCV. This RT-PCR product was purified from the agarose gel and directly sequenced. The obtained sequence presented 98.2 % identity with the corresponding nucleotide sequence of the S-RNA of ZLCV deposited in the GenBank. These results demonstrated that the test was sensitive and specific to detect ZLCV. Therefore, RT-PCR can be used for diagnose and epidemic studies of this virus.

Keywords: Tospovirus; Cucurbit; Diagnosis

Introdução

As cucurbitáceas são afetadas por diversas viroses, dentre as quais se destaca a clorose letal da abobrinha de moita, causada por uma espécie do gênero *Tospovirus*, caracterizada como *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (Pozzer et al., 1996; Bezerra et al., 1999, Fauquet et al., 2005). Embora a caracterização dessa nova espécie seja recente, os primeiros relatos da infecção de cucurbitáceas com tospovírus no Brasil foram feitos nas décadas de 70 e 80, quando foi identificado como sendo o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), causador do vira-cabeça do tomateiro (Kitajima & Costa, 1972; Costa et al., 1972; Cupertino et al., 1974; e Silveira Jr. et al., 1985). Como a incidência desse tospovírus em plantios de cucurbitáceas era esporádica, o problema foi considerado sem importância e não recebeu adicional atenção. Essa virose tornou-se importante a partir de 1991, quando se constatou altas incidências em diversos campos experimentais de abobrinha de moita cv. Caserta (*Cucurbita pepo* L.) (Pozzer et al., 1994; Rezende et al., 1997; Yuki et al., 2000). Avaliações mais recentes no Estado de São Paulo constataram incidências da ordem de 20 % a 78 % (Rezende et al., 1997). O ZLCV também foi encontrado no Distrito Federal e no Estado do Mato Grosso do Sul (Pozzer et al., 1994; Nagata et al., 1998; Stangarlin et al., 2000; 2001).

O ZLCV já foi transmitido experimentalmente para espécies das famílias Amaranthaceae, Cucurbitaceae e Solanaceae. Causou sintomas locais e infecção sistêmica em *Capsicum annuum*, *C. chinense* PI 159236, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa* e *Nicotiana benthamiana*. Plantas de *N. occidentalis* e *N. tabacum* 'Turkishi' e 'TNN' reagiram apenas com lesões locais quando inoculadas com esse vírus

(Bezerra et al., 1999; Resende et al., 1996 e Rezende et al., 1997). Diversas espécies de tripes (*Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi*) foram testadas, mas não transmitiram experimentalmente o ZLCV (Bezerra et al., 1999 e Dr. T. Nagata, comunicação pessoal). Até o momento, apenas *F. zucchini* transmitiu o ZLCV, em testes preliminares, para plantas de abobrinha de moita (J. A. M. Rezende, comunicação pessoal).

A diagnose da clorose letal da abobrinha tem sido feita principalmente através de testes biológicos, sorológicos e de microscopia eletrônica. A reação em plantas-teste, embora altamente sensível, parece não ser uma técnica adequada quando se deseja separar espécies de tospovírus, uma vez que pode ocorrer sobreposição do círculo de hospedeiras (Ávila, 1992). Testes sorológicos de DAS-ELISA, utilizando antissoro policlonal específico contra a proteína do nucleocapsídeo do ZLCV, tem se mostrado eficiente para a diagnose (Pozzer et al., 1994; Bezerra et al., 1999). A microscopia eletrônica, embora permita identificar a presença de partículas típicas de tospovírus, as quais se apresentam como partículas esféricas envelopadas no retículo endoplasmático, é uma técnica laboriosa e não possibilita diferenciar as espécies de tospovírus. A técnica molecular "Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) tem sido amplamente empregada na diagnose de tospoviroses e tem-se mostrado altamente sensível para a detecção genérica ou específica de espécies de tospovirus (Mumford et al., 1994; 1996; Dewey et al., 1996; Mitsuru & Hanada, 2001; Uga & Tsuda, 2005). No Brasil, Eiras et al. (2001) avaliaram a eficiência de quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores, sintetizados para regiões conservadas do genoma viral (RNA-S, M e L), na detecção de sete espécies de tospovirus por RT-PCR, entre as quais os ZLCV, e constataram que todas as espécies só foram detectadas quando se usou RNA de vírus purificado. Entretanto, usando-se RNA total de plantas infectadas nenhum dos pares de oligonucleotídeos iniciadores detectou o ZLCV e o *Iris yellow spot virus* (IYSV).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a detecção específica do ZLCV através de RT-PCR usando um par de oligonucleotídeos iniciadores específico ao gene da proteína do nucleocapsídeo.

Material e Métodos

Plantas-teste. Foram utilizadas plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) e *Datura stramonium* L. As plantas de abobrinha de moita foram obtidas em vasos de alumínio contendo uma mistura de terra e esterco, colocando três sementes por vaso, e por ocasião do desbaste, foram deixadas duas plantas. As plantas de *D. stramonium* foram obtidas da sementeira em espuma fenólica para germinação, com posterior transplante para vasos no estágio de plântula, mantendo duas a três plantas por vaso. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação, adubando-as regularmente com sulfato de amônio.

Espécies de vírus e sua manutenção. O isolado do ZLCV usado nesse trabalho foi obtido de abobrinha de moita infectada em campo experimental na ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Também foram incluídas no estudo as seguintes espécies de tospovírus: TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e a espécie putativa Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV). Os isolados desses tospovírus foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Antônio Carlos de Ávila (EMBRAPA-CNPq). Estes vírus foram mantidos, através de inoculação mecânica, em plantas de *D. stramonium*. Também foram utilizados outros vírus que infectam cucurbitáceas: *Papaya ringspot virus* - type W (estirpe fraca PRSV-W-1 e severa PRSV-W-C) (Rezende et al., 1994; Rezende & Pacheco, 1998), *Zucchini yellow mosaic virus* (estirpe fraca ZYMV-M e severa ZYMV-Atibaia) (Rabelo & Rezende, 2004) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). Estes vírus foram mantidos em plantas de abobrinha de moita 'Caserta'.

Extração do RNA total. A extração de RNA total de plantas infectadas com cada um desses vírus e de plantas sadias, separadamente, foi realizada de acordo a metodologia descrita por Gibbs & Mackenzie (1997). Cem miligramas de tecido foliar, coletados de plantas infectadas com os diferentes vírus e de plantas sadias, separadamente, foram macerados em nitrogênio líquido em tubos de eppendorf de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão Wash Buffer [10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05 % BSA (albumina de soro bovino)], agitando vigorosamente no vortex e centrifugando a 14.000 g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma pipeta, ressuspensando o

precipitado em 600 μ L de tampão CTAB [2 % CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio); 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 % mercaptoethanol]. A suspensão foi incubada a 55 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitando vigorosamente no vortex. A mistura foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de eppendorf de 1,5 mL. O RNA foi precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e uma vez o volume de isopropanol 100 %, gelado. A suspensão foi misturada levemente por inversão e armazenada por 20 minutos a -20 °C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado invertendo o tubo cuidadosamente. O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70 % preparado com água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e centrifugando a 14.000 g por 1 minuto. O ethanol foi descartado e o tubo foi centrifugado por mais 1 minuto. O resíduo de ethanol foi retirado com o auxílio de uma pipeta. O precipitado foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, este foi dissolvido em 30 μ L de água Milli-Q estéril tratada com DEPC, a 4 °C por aproximadamente 2 horas e armazenado, em seguida, a -20 °C.

RT-PCR. Para a detecção do ZLCV por RT-PCR, dois oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos do gene da proteína do nucleocapsídeo do S-RNA do ZLCV depositada no GenBank (AF067069). Esses oligonucleotídeos iniciadores foram denominados de ZLCV-P1 [5'-TCAACCCATAAGCCTGAACC-3'] e ZLCV-P2 [5'-TGTTGCTTTGCTGACTCA -3']. Eles são complementares aos terminais 3'(posição 619 - 638 nt) e 5' (posição 274 - 291 nt) do S-RNA, respectivamente. A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas infectadas com o ZLCV. Três microlitros de suspensão (50 - 250 ng) de RNA total foram misturados a 2 μ L do oligonucleotídeo iniciador ZLCV-P1. Esse oligonucleotídeo iniciador foi diluído em água destilada previamente tratada com DEPC, na concentração de 20 pmoles/ μ L. Essa solução foi aquecida a 70 °C por 5 minutos e posteriormente mantida no gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 4 μ L do tampão 5 X da enzima transcriptase reversa (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ L de

DTT (ditiotretol) 0,1 M, 1 μ L de mistura de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10 mM, 200 unidades da enzima Superscrit Transcriptase Reversa (Invitrogen), 20 unidades de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), misturados num volume final de 50 μ L. Essa solução foi incubada por 90 minutos a 37 °C e posteriormente aquecida a 70 °C por 5 minutos para a degradação da enzima.

O cDNA foi usado em uma reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction" – PCR). Para isso, 0,5 μ L do produto da reação com a enzima Transcriptase Reversa foi misturado com 2,5 μ L de tampão 10 X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 1,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 8 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZLCV, 0,5 μ L de mistura de dNTP's 10 mM, 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega), completando o volume para 25 μ L com água Milli-Q estéril. O regime do termociclador (MJ Research PTC 200) foi de 94 °C por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos de 2,25 minutos, divididos em 0,5 minutos a 94 °C, 0,75 minutos a 62 °C e 1 minuto a 72 °C, finalizando com 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR foram visualizados em gel de agarose a 1 %. A coloração foi feita em solução 0,1 % de brometo de etídeo. O marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega) foi utilizado como padrão.

A especificidade dos oligonucleotídeos ZLCV-P1 e ZLCV-P2 na análise por RT-PCR foi testada usando RNA total extraído de plantas infectadas com os isolados de outros tospovírus (ZLCV, TSWV, TCSV, GRSV e CSNV) e de outros vírus que infectam cucurbitáceas (PRSV-W-1, PRSV-W-C, ZYMV-M, ZYMV-Atibaia e CMV). Os procedimentos para a extração do RNA total e a reação de RT-PCR foram idênticos aos descritos para o ZLCV.

Seqüenciamento direto do produto do RT-PCR. Os fragmentos de três produtos de RT-PCR a partir do RNA do ZLCV, denominados ABOP1, ABOP2 e DATP1, foram purificados do gel de agarose com o kit de extração QIAquick® (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Esses fragmentos foram submetidos a outra reação de PCR utilizando-se o kit Dyenamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech), contendo o par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZLCV, seguindo as instruções do fabricante. A reação de

amplificação foi realizada com 400 - 500 ng de DNA, 5 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 4,0 µL de Dyenamic, num volume final de 10 µL em água Milli-Q estéril. O regime do termociclador foi de 30 ciclos de 1 minuto e 35 segundos, divididos em 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando com 5 minutos a 4 °C. Ao conteúdo dos tubos foram acrescentados 1 µL de solução de acetato de sódio/EDTA ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 1,5 M, pH 8,0, EDTA 250 mM) e 40 µL de etanol 95 %, para a precipitação dos dNTP's não incorporados na reação de amplificação. A mistura foi colocada no escuro por 20 minutos e em seguida centrifugada a 13.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 250 µL de etanol 70 %. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, foi dissolvido em 4 µL de tampão de carregamento. O seqüenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ de acordo com os protocolos descritos nos kits utilizados no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, da ESALQ/USP.

Análise do seqüenciamento. As seqüências de nucleotídeos dos três clones do ZLCV obtidas foram alinhadas pelos programas Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e Clustal W. Multiple Sequence Alignment (www.ebi.ac.uk/clustalw/), de onde foi extraída a seqüência consenso. A comparação da identidade da seqüência consenso com seqüências de nucleotídeos do gene da proteína do nucleocapsídeo do ZLCV depositada no GenBank foi realizada pelo programa BLAST do NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. A seqüência consenso também foi comparada com as seqüências de outros tospovírus depositadas no GenBank.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nas cinco avaliações da especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores ZLCV-P1 e ZLCV-P2 na detecção do tospovirus causador da clorose letal da abobrinha de moita por meio de RT-PCR estão ilustrados na Figura

2.1. Nota-se que apenas RNA totais extraídos de plantas de abobrinha de moita e *D. stramonium* infectadas com o ZLCV (linhas 2 e 3) tiveram fragmentos do genoma viral amplificados por RT-PCR. Esses fragmentos apresentaram tamanho da ordem de 350 pb e foram alinhados perfeitamente a sequência do ZLCV depositada no GenBank (AF067069), como pode ser visto na Figura 2.2. Esse par de oligonucleotídeos iniciadores não amplificou fragmentos do genoma dos outros tospovirus analisados (TSWV, TCSV, GRSV, CSNV), nem de outros vírus que podem ser encontrados infectando cucurbitáceas em campo (PRSV-W-C, ZYMV-A e CMV). Também não foram detectadas por RT-PCR as estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M. O uso de RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos capazes de detectar distintamente as espécies TSWV e INSV foi relatado por Mumford et al. (1996). Mais recentemente Uga & Tsuda (2005) relataram o uso de RT-PCR para a detecção simultânea e identificação dos seguintes tospovirus: WSMV; TSWV; INSV; MYSV e IYSV.

A alta especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores ZLCV-P1 e ZLCV-P2 na detecção do ZLCV por RT-PCR é de grande importância, pois pode ser uma ferramenta relevante a correta diagnose e futuros estudos epidemiológicos dessa tospovirose, como a identificação de hospedeiros do vírus em campo, a relação deste com o tripses vetor, entre outros. Mason et al. (2003) estudaram a detecção do TSWV no tripses vetor, *Frankliniella occidentalis*, por meio da técnica de RT-PCR. Os autores detectaram o vírus com sucesso em um único indivíduo infectado, obtendo boa correlação com testes de transmissão em laboratório usando a técnica de discos foliares. A técnica de RT-PCR em tempo real (TaqMan) também tem detectado com sucesso o TSWV em *F. occidentalis*, sendo considerada ainda mais sensível que a anterior (Boonham et al., 2002).

Figura 2.1 - Produto do RT-PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores ZLCV-P1 e ZLCV-P2 em preparações de RNA total extraído de plantas saudáveis e infectadas com diferentes tospovírus e outros vírus que infectam cucurbitáceas

Onde: M) marcador; 1) abobrinha de moita sadia; 2) abobrinha de moita c/ ZLCV; 3) *D. stramonium* c/ ZLCV; 4) TSWV; 5) TCSV; 6) GRSV; 7) CSNV; 8) PRSV-W-C; 9) PRSV-W-1; 10) ZYMV-A; 11) ZYMV-M e 12) CMV.

A sequência de nucleotídeos do fragmento de 350 pb amplificado por RT-PCR apresentou identidade de 98,2% com a do ZLCV depositada no GenBank (Tabela 2.1), confirmando tratar-se de isolado dessa espécie de tospovírus. A identidade com outros tospovírus variou de 78,4% a 45,9 %, sendo que as maiores taxas foram verificadas com TCSV, GRSV, CSNV e TSWV. Enquanto que, as menores taxas foram verificadas com *Watermelon silver mottle virus* (WSMV), *IYSV*, *INSV*, *Groundnut yellow spot virus* (GYSV) e *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) (Quadro 1). Esses resultados são semelhantes aos relatados por Resende et al. (1996) e por Bezerra et al.

(1999), onde a homologia da seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos da proteína do nucleocapsídeo do ZLCV com outros tospovírus variou de 45 a 80 % e de 20 a 80 %, respectivamente. As maiores homologias têm sido observadas com o CSNV (80 %), o GRSV (75 a 78 %), o TCSV (64 a 73 %) e o TSWV (63 a 72 %).

Figura 2.2 - Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos do S-RNA do ZLCV extraído de plantas infectadas de abobrinha de moita (ABP1 e ABP2) e de *Datura stramonium* (DATP1), e da seqüência consenso, com a seqüência do ZLCV depositada no GenBank (AF067069)

Tabela 2.1 - Identidade, em porcentagem, da sequência de nucleotídeos do isolado de ZLCV de Piracicaba/SP com a de outros tospovírus disponíveis no GenBank

Vírus	Acesso	S-RNA
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> – ZLCV	AF067069	98,2
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> – TCSV	AF282982	78,4
<i>Groundnut ringspot virus</i> –GRSV	S54327	77,2
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> – CSNV	AF067068	76,6
<i>Tomato spotted wilt virus</i> – TSWV	AF064474	73,3
<i>Watermelon silver mottle virus</i> – WSMV	NC003843	54,6
<i>Iris yellow spot virus</i> – IYSV	AF067070	54,0
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> – INSV	NC003624	49,2
<i>Groundnut yellow spot virus</i> - GYSV	AF013994	49,2
<i>Groundnut bud necrosis virus</i> - GBNV	NC003619	45,9

Referências

ÁVILA, A.C. **Diversity of Tospoviruses**. 1992. 136p. Ph.D. Thesis - Agricultural Wageningen University, Wageningen, 1992.

BEZERRA, I..C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999.

BOONHAM, N.; SMITH, P.; WALSH, K.; TAME, J.; MORRIS, J.; SPENCE, N.; BENNISON, J.; BARKER, I. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.101, p.37-48, 2002.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista de Olericultura**, Brasília, v.12, p.100-101, 1972. Resumo.

CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; KITAJIMA, E.W.; MATOS, J.K.A.; ARAUJO, M.T. Vírus de cucurbitáceas no Distrito Federal. **Fitopatologia**, Lima, v.9, n.2, p.51, 1974. Resumo.

DEWEY, R.A.; SEMORILE, L.C.; GRAU, O. Detection of *Tospovirus* species by RT-PCR of the N-gene and restriction enzyme digestions of the products. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.56, p.19-26, 1996.

EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; MISSIAGGIA, A.A.; ÁVILA, A.C. RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, n.2, p.170-175, 2001.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**: Classification and Nomenclature of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005. 1259p. (Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Eighth).

GIAMPAN, J.S. **Infectividade e proteção de três estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia**. 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.63, p.9-16, 1997.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Alterações no complexo de Golgi associada a infecção de tecido foliar de plantas infectadas por uma estirpe do vírus do vira-cabeça. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Fortaleza, v.5, p.180-181, 1972. Resumo.

MASON, G.; ROGGERO, P.; TAVELLA, L. Detection of *Tomato spotted wilt virus* in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.109, p.69-73, 2003.

MITSURU, O.; HANADA, K. RT-PCR for detecting five distinct *Tospovirus* species using degenerate primers and dsRNA template. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.96, p.149-156. 2001.

MUMFORD, R.A.; BARKER, I.; WOOD, K.R. The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.46, p.303-311, 1994.

MUMFORD, R.A.; BARKER, I.; WOOD, K.R. An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.57, p.109-115, 1996.

NAGATA, T.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.Z. First report on natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis tospovirus* on cucumber and Chrysanthemum stem necrosis tospovirus on tomato in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.1403, 1998. Abstract.

POZZER, L.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R. DE O.; ÁVILA, A.C. A new tospovirus infecting Cucurbitaceae in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, Suplemento, p.321, 1994. Abstract.

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

RABELO, L.C.; REZENDE, J.A.M. Seleção de uma estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* com potencial para uso na premunização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.340-345, 2004.

RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; GIORDANO, L.B.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n.431, p.78-89, 1996.

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

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

REZENDE, J.A.M.; 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**, Brasília, v.18, n.1, p.55-61, 1994.

SILVEIRA JR., W.G.; ÁVILA, A.C.; MUNOZ, J.O. Chuchu (*Sechium edule* Sw.): nova espécie hospedeira do vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p.661-665, 1985.

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**, Fortaleza, v.26, p.532, 2001. Suplemento. Resumo.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.132, 2000. Resumo.

UGA, H.; TSUDA, S. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infection. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, p.166-171, 2005.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.5, p.516-520, 2000.

3 DANOS CAUSADOS PELO *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) SOBRE A PRODUÇÃO DE FRUTOS COMERCIAIS DE ABOBRINHA DE MOITA 'CASERTA'.

Resumo

O ZLCV é um tospovirus encontrado com frequência causando severos danos em cucurbitáceas. Nesse trabalho avaliaram-se os danos causados pelo ZLCV em abobrinha de moita 'Caserta', em campo na ESALQ/USP, Piracicaba-SP, onde esse vírus é freqüente. Plantas obtidas pela semeadura direta foram monitoradas semanalmente quanto à infecção pelo ZLCV por meio dos sintomas e por PTA-ELISA. Monitorou-se ainda a contaminação com *Papaya ringspot virus* – type W e *Zucchini yellow mosaic virus*, desconsiderando a produção dessas plantas. As plantas foram agrupadas em função da época de aparecimento dos sintomas do ZLCV, avaliando a produção de frutos comerciais (FC) e não comerciais (FNC) de cada grupo e comparando com a de plantas que permaneceram sem sintomas até o final do experimento. As plantas que apresentaram sintomas até os 23 dias após a emergência (DAE) não produziram qualquer tipo de frutos. FC foram colhidos de plantas que apresentaram sintomas a partir dos 42 DAE. Mesmo assim, houve redução de 78,5 % na produção de FC. Plantas que mostraram sintomas por ocasião da última colheita (55 DAE) apresentaram redução na produção de FC de 9,6 %. A infecção com o ZLCV até o início da frutificação inviabiliza a produção de FC de abobrinha de moita 'Caserta'.

Palavras-chave: Tospovirus; *Cucurbita pepo*; Cucurbitaceae

Abstract

Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) is a tospovirus frequently associated with severe yield loss on cucurbit crops. The purpose of this work was to evaluate the damage caused by this virus on zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) under field condition. The experiment was carried out at the Campus of the College of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil, where ZLCV is prevalent. After germination, zucchini squash plants were weekly monitored for the presence of characteristic symptoms induced by ZLCV and PTA-ELISA for virus indexing. Infection by *Papaya ringspot virus* – type W and *Zucchini yellow mosaic virus* were also monitored by PTA-ELISA and plants infected by these viruses were disregarded for yield evaluation. Plants were grouped based on the time the symptoms were first seen. Fruits harvested from each plant within each group were classified as marketable (M) and non-marketable (NM) based on the phenotype. Plants that did not show symptoms by the end of the crop were considered still healthy and their yield was used as control. Zucchini squash plants that showed symptoms of ZLCV infection up to 23 after emergency did not yield any fruit. Marketable fruits were first harvested only from plants that showed symptoms 42 days after emergency. However, the yield of marketable fruits was reduced by 78.5 %, as compared to that from asymptomatic plants. Plants that

showed symptoms 55 days after emergency showed a reduction on the yield of marketable fruit of 9.6%.

Keywords: Tospovirus; *Cucurbita pepo*; Cucurbitaceae

Introdução

A abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) é uma das cucurbitáceas de grande expressão econômica no Estado de São Paulo. Em algumas regiões do Estado, o cultivo dessa cucurbitácea vem sendo severamente afetado por uma virose denominada de clorose letal da abobrinha de moita, causada pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), espécie pertencente ao gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* (Pozzer et al., 1996; Bezerra et al., 1999). A transmissão desse vírus tem sido associada a uma espécie de tripes, *Frankliniella zucchini*, descrita por Nakahara & Monteiro (1999), a qual foi considerada predominante em folhas e flores de plantas de abobrinha de moita infectadas em Piracicaba e que, em testes de transmissão preliminares, foi considerada vetora desse vírus (J.A.M. Rezende, comunicação pessoal).

Esse vírus tem sido encontrado, nos últimos anos, com alta frequência em plantios de diferentes espécies de cucurbitáceas, estando em alguns casos, associado a severos danos na produção. Estudos realizados no Estado de São Paulo mostraram que o ZLCV foi constatado em 7,8 % das amostras de diversas espécies de cucurbitáceas analisadas (Yuki et al., 2000). Rezende et al. (1997) já haviam relatado a ocorrência do ZLCV em campos experimentais de abobrinha de moita e de abóbora rasteira, localizados na região de Campinas, de 1991 a 1994, com incidências de 20 % a 78 %, alcançando uma média de 50,6 %. Em um experimento de premunização de melancia com estirpes fracas do PRSV-W, em Anhembi-SP, Giampan (2002) também observou alta incidência do ZLCV, atingindo 63,5 % das plantas em campo. No Estado do Mato Grosso do Sul, Stangarlin et al. (2001), avaliando a incidência de viroses em ensaios de genótipos de abóboras e pepino, verificaram a ocorrência do ZLCV em 56,1 % das amostras analisadas.

Em abobrinha de moita, os sintomas causados pelo ZLCV no campo começam com uma coloração verde clara em todas as folhas. Em seguida, as folhas mais novas

tornam-se cloróticas, com bordos encurvados para cima. Folhas de plantas doentes são mais espessas do que aquelas de plantas saudas. Algumas folhas basais normalmente mostram necroses sistêmicas. Plantas infectadas definham e morrem em pouco tempo, especialmente quando a infecção ocorre antes do florescimento. Plantas infectadas após o florescimento exibem quase os mesmos sintomas, mas não morrem. Elas se tornam atrofiadas e têm sua produção drasticamente reduzida (Rezende et al., 1997).

A recomendação de controle dessa virose tem sido dificultada devido a pouca informação sobre aspectos epidemiológicos e plantas hospedeiras da vegetação espontânea. Não há conhecimento sobre variedades resistentes ou quanto à reação das diferentes espécies/cultivares a infecção com esse tospovirus. Também não se conhecem a eficácia de práticas culturais ou do controle químico do vetor no manejo dessa fitovirose.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os danos causados pelo ZLCV em plantas de abobrinha de moita em campo.

Material e Métodos

Ensaio em campo. Esse ensaio foi conduzido no segundo semestre de 2004 no campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, onde tem havido uma constatação permanente de alta incidência de tripses e do ZLCV nos últimos cinco anos. Foram utilizadas 329 plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) cultivar Caserta, obtidas através da semeadura direta em covas previamente preparadas com adubo mineral 04-14-08 (250 g/cova) e esterco de curral curtido (5 kg/cova), aplicados 15 dias antes do plantio. O espaçamento foi de um metro entre plantas e entre linhas. O plantio foi realizado em 14 de setembro semeando duas sementes por cova e após a germinação fez-se o desbaste deixando-se apenas uma planta na cova. As plantas foram manejadas de acordo com os tratos culturais recomendados para a cultura, fazendo adubações e pulverizações sempre que necessárias.

A fim de manter algumas plantas saudas para comparações, uma cobertura com tela foi instalada de forma aleatória em três pontos do experimento, proporcionando

cobertura a 6 linhas (90 plantas), conforme ilustram as Figuras 3.1A e 3.1B. Esta proteção foi mantida até o início do florescimento das plantas (Figura 3.1C). As plantas ficaram expostas à infecção natural com o ZLCV. A incidência de plantas infectadas foi avaliada semanalmente através da observação dos sintomas típicos da doença. A confirmação da infecção de todas as plantas do ensaio foi feita por PTA-ELISA. Todas as plantas também foram indexadas por PTA-ELISA para a presença do *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), que são os vírus mais freqüentes em plantios de cucurbitáceas em São Paulo. Por ocasião da colheita as plantas foram agrupadas de acordo com a época em que foram infectadas, baseando-se no aparecimento de sintomas, resultando em 10 grupos ou épocas em que as plantas manifestaram sintomas. Um outro grupo de plantas que não manifestaram sintomas de infecção até o final das avaliações foi usado como controle (Tabela 3.1). Todas as plantas, exceto aquelas infectadas com o PRSV-W e o ZYMV, tiveram as suas produções avaliadas quantitativa e qualitativamente. Foram realizadas 11 colheitas, iniciando em 27 de outubro e finalizando em 15 de novembro de 2004. Os frutos colhidos eram identificados de acordo com o número da planta no croqui do campo e pesados individualmente. Os frutos deformados e de coloração escura foram qualificados como frutos não comerciais (FNC). No término do experimento, foram contabilizados o número e peso dos frutos comerciais (FC) e FNC por planta, obtendo o número médio de frutos e a produção média das plantas de cada grupo. As produções das plantas infectadas nas diferentes épocas de infecção foram comparadas com a das plantas que permaneceram sem expressão de sintomas de infecção até o final das avaliações. Os dados foram analisados estatisticamente usando a transformação logarítmica $[\log(x+1)]$ com o auxílio do programa GLM (“General Linear Model”) do sistema estatístico SAS (“Statistical Analysis System”), tendo considerado o delineamento como inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

PTA-ELISA. A detecção de infecção viral foi feita por meio do teste sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (Mowat & Dawson, 1987), com algumas modificações. Em cada placa foram utilizados um controle positivo e um negativo, que correspondem a plantas infectadas com o vírus

desejado e plantas saudáveis, respectivamente. A absorbância de cada um dos pocinhos foi medida no leitor de ELISA, da marca Metertech Σ 960, utilizando-se filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedeu em duas a três vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta saudável. O teste de PTA-ELISA foi utilizado para confirmar a infecção por ZLCV, em casos duvidosos, e a contaminação das plantas por vírus importantes em cucurbitáceas (PRSV-W e ZYMV), utilizando-se antissoro policlonal específico para cada vírus. O antissoro específico para o ZLCV foi gentilmente cedido pelo Dr. A.C. de Ávila, Embrapa, CNPH, Brasília, DF. Enquanto que os antissoros específicos para o PRSV-W e o ZYMV foram produzidos no Laboratório de Virologia do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP.

Resultados e Discussão

Os resultados do experimento de avaliação de danos do ZLCV na produção de plantas de abobrinha 'Caserta', estão apresentados na tabela 3.1. As plantas iniciaram o florescimento aos 28 dias após a emergência (DAE), que se prolongou até os 42 DAE, com pico aos 32 DAE. A colheita teve início aos 37 DAE, finalizando aos 56 DAE. De acordo com os dados obtidos, plantas de abobrinha que apresentaram sintomas até 39 DAE, logo após o início do florescimento, não produziram FC. Sendo que, plantas que mostraram-se infectadas até 23 DAE sequer produziram frutos. A produção de FC foi notada apenas em plantas que apresentaram sintomas depois de 42 DAE, porém neste caso notou-se uma redução de 78,5 % na produção desse tipo de frutos, quando comparada com a das plantas sem sintomas. Infecções ocorridas no final do ciclo ainda causam danos, mas não tão significativos. Plantas que exibiram os primeiros sintomas aos 52 DAE e 55 DAE tiveram redução na produção de FC da ordem de 14,7 % e 9,6 %, respectivamente, quando comparada com a produção das plantas sem sintomas. Portanto, a doença é extremamente danosa se atingir a cultura antes do florescimento, embora danos com menor intensidade também fossem constatados em plantas infectadas durante o processo de frutificação.

Rezende et al. (1997) já haviam relatado o efeito danoso dessa virose em plantas de abobrinha de moita 'Caserta'. De acordo com os autores, plantas infectadas antes do

Figura 3.1 – Campo de abobrinha de moita ‘Caserta’, onde: A) com cobertura de tela, logo após o plantio, em 6 linhas; B) cobertura de tela nas 90 plantas; C) após a retirada da cobertura de tela por ocasião do florescimento

florescimento morrem em poucos dias. Sendo que plantas infectadas após o florescimento apresentam desenvolvimento e produção bastante afetados e os poucos frutos obtidos não apresentam valor comercial.

Tabela 3.1 - Produção de plantas de abobrinha de moita 'Caserta' infectadas em diferentes épocas com o *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) em condições de campo

Época do aparecimento dos sintomas	Número de plantas	Número médio de frutos/planta		Produção média (gr/planta)	
		Comerciais	Não comerciais	Comerciais	Não comerciais
15 DAE*	3	0 d***	0 c	0 c	0 c
23 DAE	14	0 d	0 c	0 c	0 c
28 DAE	10	0 d	0,3 bc	0 c	69,0 bc
32 DAE	9	0 d	0,89 bc	0 c	218,9 bc
37 DAE	9	0 d	0,78 bc	0 c	178,9 bc
39 DAE	4	0 d	2,75 a	0 c	782,5 a
42 DAE	5	1,00 c	1,20 bc	450,0 b	490,0 ab
47 DAE	17	2,50 b	1,40 ab	1088,8 a	349,4 ab
52 DAE	41	4,20 ab	1,30 bc	1783,7 a	304,6 ab
55 DAE	14	4,60 a	1,30 bc	1890,0 a	265,0 ab
SS**	62	4,80 a	0,70 bc	2090,7 a	119,0 bc
C.V.%	-	26,14	93,37	13,67	81,27

* DAE = dias após a emergência

** Sem sintomas

*** Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As tospoviroses são relatadas, de modo geral, como causadoras de danos severos em muitas culturas de importância econômica, acarretando perdas na produção. No Brasil existem vários exemplos de perdas relacionadas a tospoviroses.

Fajardo et al. (1997) verificaram a redução na produção de tomateiro industrial infectado por TSWV no Distrito Federal. De acordo com os autores, plantas com sintomas severos apresentaram uma redução de 84,4% na produção total por planta e de 96,3% na produção comercial por planta. Moraes et al. (1986) relataram, no Estado de Pernambuco, perdas na cultura da alface de até 100 %, devido à infecção por TSWV. Cupertino et al. (1984) relataram que o pimentão sofre perdas de 49 a 69 % quando infectado por TSWV.

Cho et al. (1987) relataram que o TSWV afetou a produção de pimentão, alface e tomate no Havaí, resultando em perdas na cultura da alface de 50 a 90 %, independente da época do ano. Segundo Cho et al. (1986), os prejuízos devido à infecção por tospovírus podem variar de 50 a 90 %, considerando as altas taxas de infecção.

Em 1985, o TSWV causou aproximadamente 50 % de perdas na cultura do amendoim no sul do Texas, com perdas próximas de 100 % em alguns campos individuais (Black et al., 1986; Black et al., 1987).

Referências

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999.

BLACK, M.C.; LUMMUS, P.F.; SMITH, D.H.; DEMSKI, J.W. An epidemic of spotted wilt disease in south Texas peanuts in 1985. **Proceedings of the American Peanut Research and Education Society**, Oklahoma City, v.18, p.66, 1986. Abstract.

BLACK, M.C.; STEWART, J.W.; KEARNEY, N.S.; GASCH, C.L.; LUMMUS, P.F., et al. **Tomato spotted wilt virus in Texas peanuts**. Yoakum: Texas Agricultural Experiment Station and Extension Service Reporter. 1987. 15p.

CHO, J.J.; MITCHELL, W.C.; MAU, R.F.L.; SAKIMURA, K. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.505-508, 1987.

CHO, J.J.; MAU, R.F.L.; GONSALVES, D.; MITCHELL, W.C. Reservoir weed hosts of tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, p.1014-1017, 1986.

CUPERTINO, F.P.; LIN, M.T.; MUÑOZ, J.O. Perdas na produção de pimentão induzidas pelo vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p.379. 1984. Resumo.

FAJARDO, T.V.M.; LOPES, C.A.; E SILVA, W.L.C.; DE ÁVILA, A.C. Dispersão da doença e redução da produção em tomateiro industrial infectado por tospovírus no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.413-418, 1997.

GIAMPAN, J.S. **Infectividade e proteção de três estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia**. 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

JONES, R.A.C. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. **Virus Research**, Amsterdam, v.100, p.5-30, 2004.

MORAES, G.J.; WANDERLEY, L.J.; COSTA, A.S. Surto de vira-cabeça na cultura da alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.6, p.24-25, 1986. Resumo.

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

NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R.C. *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of tospovirus in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington D.C., v.101, n.2, p.290-294, 1999.

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

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

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**, Fortaleza, v.26, p.532, 2001. Suplemento. Resumo.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.5, p.516-520, 2000.

4 REAÇÃO DE ESPÉCIES DE CUCURBITÁCEAS À INFECÇÃO COM O *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV)

Resumo

O ZLCV é um tospovirus que infecta diversas espécies de cucurbitáceas e sua ocorrência tem aumentado significativamente nos últimos anos. Com a finalidade de avaliar a reação de sete espécies de cucurbitáceas à infecção com o ZLCV, foram instalados experimentos em campo e em casa de vegetação no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. No experimento em campo, a infecção das plantas ocorreu naturalmente. Em casa de vegetação, as plantas foram inoculadas mecanicamente com o ZLCV no estágio cotiledonar. A avaliação foi feita com base no monitoramento dos sintomas e por PTA-ELISA. A abobrinha de moita 'Caserta' e a abóbora híbrida 'Takaiaima' apresentaram alta suscetibilidade em todos os testes. O pepino 'Safira' apresentou baixa infecção em campo e intermediária em casa de vegetação. Enquanto que melancia 'Crimson Sweet', maxixe do Norte, abóbora rasteira 'Menina Brasileira' e moranga 'Alice' apresentaram valores menores de infecção. A moranga 'Exposição' não foi infectada tanto em campo como em casa de vegetação, sugerindo ser altamente resistente a esse tospovírus.

Palavras-chave: *Cucurbita* spp.; *Citrullus lanatus*; *Cucumis* spp.; Resistência; Tospovirus

Abstract

ZLCV is a tospovirus that infects species of cucurbits and its occurrence has increased significantly in the last years. The purpose of the present work was to evaluate the reaction of seven species of cucurbits to infection with ZLCV under field and greenhouse conditions at the Plant Pathology Section of ESALQ/USP. In the field experiment, ZLCV infection occurred naturally. In the greenhouse, plants were mechanically inoculated with ZLCV at the cotyledonal stage. Evaluations were based on symptoms expression and PTA-ELISA. Zucchini squash 'Caserta' and hybrid squash 'Takaiaima' were highly susceptible in all trials. The cucumber 'Safira' presented low percentage of infected plants in the field and intermediate in the greenhouse. Watermelon 'Crimson Sweet', northern gherkin, long neck squash 'Menina Brasileira' and winter squash 'Alice' presented lower values of infected plants. Winter squash 'Exposição' was highly resistant to infection under field and greenhouse conditions.

Keywords: *Cucurbita* spp.; *Citrullus lanatus*; *Cucumis* spp.; Resistance; Tospovirus

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 mundial. No Brasil, as espécies com maior expressão econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). A produção mundial das principais cucurbitáceas, no ano de 2005, estimada pela FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO (2006), foi acima de 187 milhões de toneladas, sendo que a melancia é a principal espécie dessa família, com cerca de 96,4 milhões de toneladas, seguida pelo pepino (41,8 mi t), melão (28,9 mi t) e abóboras e abobrinhas (19,8 mi t). Para o Brasil, este mesmo órgão estimou, no mesmo ano, a produção apenas de melancia (1,85 mi t) e melão (190 mil t). O INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA (2006) estimou que a produção das principais cucurbitáceas no Estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2005, foi ao redor de 569,8 mil t, sendo que desta, as produções de melancia, abóbora, chuchu, pepino, abobrinha e melão foram de 300,5; 93; 86,9; 55,4; 33,2 e 0,6 mil t, respectivamente.

Essas culturas são afetadas por inúmeras pragas e doenças, sendo que ultimamente a clorose letal da abobrinha de moita, causada pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), tem chamado a atenção de produtores de diversas regiões do Brasil por sua alta incidência e severidade dos danos. Avaliação experimental em campo mostraram que plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* 'Caserta') infectadas com o ZLCV até o início da frutificação não produziram frutos comerciais (ver Capítulo 3). O ZLCV pertencente ao gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* (Pozzer et al., 1996; Bezerra et al., 1999). Diversas espécies de tripes (*Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi*) foram testadas, mas não transmitiram experimentalmente o ZLCV (Bezerra et al., 1999 e Dr. T. Nagata, comunicação pessoal). Até o momento, apenas *F. zucchini* transmitiu o ZLCV, em testes preliminares, para plantas de abobrinha de moita (J. A. M. Rezende, comunicação pessoal).

O círculo de hospedeiros do ZLCV foi estudado por alguns autores em condições experimentais de casa de vegetação, tendo verificado que este infecta apenas espécies das famílias Amaranthaceae, Cucurbitaceae e Solanaceae. Dentre as cucurbitáceas, o

vírus infectou abóbora rasteira 'Menina Brasileira', abobrinha de moita, melancia, melão e pepino (Rezende et al., 1997; Bezerra et al., 1999).

Até o momento não há medidas eficientes de controle dessa virose em campo. A resistência genética, seja da forma tradicional ou por meio da transgenia, é considerada a melhor e mais eficiente forma de controle de viroses em geral. No entanto, não são conhecidas fontes de resistência ou tolerância ao ZLCV e nem variedades transgênicas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a reação de diferentes espécies de cucurbitáceas à infecção com o ZLCV em campo e em casa de vegetação para fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento genético.

Material e Métodos

Plantas-teste. As espécies/variedades testadas em campo e em casa de vegetação foram: abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* 'Caserta'), abóbora rasteira (*C. moschata* 'Menina Brasileira'), moranga (*C. maxima* 'Alice' e 'Exposição'), abóbora híbrida (*C. maxima* x *C. moschata* 'Takaiama'), melancia (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet'), pepino (*Cucumis sativus* 'Safira') e maxixe do Norte (*C. anguria*).

Avaliação em campo. A reação das diferentes espécies/variedades de cucurbitáceas à infecção natural com o ZLCV foi avaliada no campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba, Estado de São Paulo, onde é freqüente a alta incidência desse vírus. Foram realizados dois experimentos; no primeiro semestre de 2002 e no segundo semestre de 2004, respectivamente. Foi usado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo que cada parcela foi constituída por 5 plantas. As plantas foram obtidas através da semeadura direta em covas previamente preparadas com adubo mineral e esterco curtido. A bordadura foi constituída por abobrinha de moita 'Caserta'. A avaliação da infecção foi feita com base no aparecimento dos sintomas típicos da virose. A confirmação da infecção foi feita por meio do teste PTA-ELISA (Mowat e Dawson, 1987) usando antissoro policlonal específico para o ZLCV (gentilmente cedido pelo Dr. A.C. de Ávila, Embrapa, CNPH, Brasília, DF, Brasil).

Avaliação em casa de vegetação. As plantas-teste das mesmas espécies/variedades foram obtidas em vasos de alumínio contendo uma mistura de terra e esterco. A semeadura foi realizada colocando três sementes por vaso, e por ocasião do desbaste foram deixadas duas plantas. A inoculação foi realizada com um isolado do ZLCV mantido em abobrinha de moita em casa de vegetação. Extratos foliares diluídos 1:20 em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M, foram inoculados mecanicamente em folhas cotiledonares previamente polvilhadas com carborundum, por meio de fricção com o indicador umedecido com o inóculo. Em seguida, as folhas foram lavadas com água para remover o excesso de inóculo e de abrasivo. Todas as plantas foram reinoculadas um dia após a primeira inoculação para diminuir o efeito da baixa eficiência da inoculação mecânica desse vírus. As avaliações foram feitas com base nas observações dos sintomas da doença a partir de 10 dias da inoculação. A confirmação da infecção foi feita por PTA-ELISA.

Resultados e discussão

Os resultados da reação das espécies de cucurbitáceas à infecção natural com o ZLCV em campo estão apresentados na Tabela 4.1. A abóbora híbrida 'Takaiama' e a abobrinha de moita 'Caserta' foram as mais suscetíveis a infecção natural com o ZLCV. A abóbora 'Menina Brasileira', a melancia 'Crimson Sweet' e o maxixe do Norte, apresentam índices de infecção variando de 21,4% a 29,2%. A moranga 'Alice' e o pepino 'Safira' mostraram bom nível de resistência a infecção natural, com 16% e 14,3% de plantas infectadas, respectivamente. A moranga 'Exposição' foi altamente resistente a infecção natural, uma vez que nenhuma das 46 plantas avaliadas foi infectada. A moranga 'Exposição' é uma variedade comercial amplamente cultivada no Brasil. A Figura 4.1A-F ilustra os sintomas induzidos pelo ZLCV em algumas das espécies/variedades suscetíveis avaliadas.

Tabela 4.1 - Reação de sete espécies/variedades de cucurbitáceas à infecção natural com o ZLCV em campo

Espécie	Nº plantas infectadas / nº plantas avaliadas			Plantas infectadas (%)
	1º Exper.	2º Exper.	Total	
Abobrinha de moita 'Caserta'	23/24	12/24	35/48	72,9
Abóbora híbrida 'Takaiama'	12/25	33/46	45/71	63,4
Abóbora 'Menina Brasileira'	13/25	8/47	21/72	29,2
Maxixe do Norte	12/25	5/31	12/56	21,4
Melancia 'Crimson Sweet'	10/24	2/24	12/48	25
Moranga 'Alice'	4/25	NT*	4/25	16
Moranga 'Exposição'	NT	0/46	0/46	0
Pepino 'Safira'	2/17	6/39	8/56	14,3

*NT = não testado

Os resultados de dois testes realizados em casa de vegetação estão apresentados na Tabela 4.2 e corroboram aqueles obtidos em campo, exceto para o pepino 'Safira' que mostrou-se mais suscetível a infecção com o ZLCV (41,2%) por meio da inoculação mecânica. Nenhuma das 89 plantas de moranga 'Exposição' inoculadas mecanicamente com o ZLCV foi infectada, confirmando o alto nível de resistência dessa variedade a esse tospovirus. As menores porcentagens de infecção de algumas espécies, quando comparadas com os índices de infecção em campo (Tabela 4.1) se devem provavelmente a menor eficiência de transmissão mecânica desse vírus, quando comparada com outros vírus que infectam cucurbitáceas, como o *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), que pertencem ao gênero *Potyvirus*.

Figura 4.1 – Sintomas induzidos pelo ZLCV em: A) Abobrinha de moita ‘Caserta’; B) Abóbora híbrida ‘Takaiama’; C) Abóbora ‘Menina Brasileira’; D) Maxixe do Norte; E) Melancia ‘Crimson Sweet’ Campo de abobrinha de moita ‘Caserta’; F) Pepino ‘Safira’

Tabela 4.2 - Infectividade do ZLCV em sete espécies/variedades de cucurbitáceas inoculadas mecanicamente em casa de vegetação

Espécie	Nº plantas infectadas / nº plantas avaliadas			Plantas infectadas (%)
	1º Teste	2º Teste	Total	
Abobrinha de moita 'Caserta'	13/23	40/52	53/75	70,7
Abóbora híbrida 'Takaiama'	14/37	24/52	38/89	42,7
Abóbora 'Menina Brasileira'	3/14	5/30	8/44	18,2
Maxixe do Norte	4/18	6/26	10/44	22,7
Melancia 'Crimson Sweet'	3/17	8/27	11/44	25,0
Moranga 'Alice'	2/24	3/24	5/48	10,4
Moranga 'Exposição'	0/38	0/51	0/89	0,0
Pepino 'Safira'	5/12	9/22	14/34	41,2

A resistência de plantas de moranga a outros vírus que infectam cucurbitáceas tem sido bem estudada com resultados promissores. Provvidenti (1982) parece ter sido o primeiro a relatar a tolerância de um acesso de moranga, 'Zapallito Redondo' (ZR-1), ao PRSV-W. O mesmo autor verificou também resistência dos acessos de moranga PI 419081 (cv. Pai Yu / White Jade da China) e PI 234608 (cv. Queensland Blue de Johannesburg, África do Sul) ao *Watermelon mosaic virus* - WMV (sin. *Watermelon mosaic virus* 2) e *Cucumber mosaic virus* - CMV, respectivamente. Garcia-de-Salcedo (1984) descreveu 7 acessos brasileiros de moranga também resistentes ao PRSV-W. Maluf et al. (1986) também relataram a existência de diversas fontes de resistência ao PRSV-W entre acessos brasileiros de moranga e de abóbora rasteira. Posteriormente Maluf et al. (1997) estudaram a herança da resistência de dois acessos de moranga, ABL-010 (ABL) e Redlands Trailblazer (RT), ao PRSV-W, tendo constatado que a resistência é poligênica, sendo que a conferida por ABL é explicada pela ação de três genes com dominância parcial, enquanto que a conferida por RT é controlada por no mínimo dois genes com efeitos aditivos.

A resistência e/ou tolerância a diversos vírus, especialmente aos potyvírus PRSV-W, WMV e ZYMV, também tem sido encontrada em outras espécies de cucurbitáceas. Munger et al. (1984) relataram resistência e tolerância ao PRSV-W em algumas introduções de *Citrullus lanatus* provenientes da Índia (PI 179662 e PI 179878) e da África do Sul (PI 295848). A resistência ao WMV em *C. lanatus* e *C. colocynthis* foi também relatada, porém com grau de resistência variável de acordo com a estirpe do vírus testada (Gillaspie & Wright, 1993). Provvidenti (1986) identificou fontes de resistência às estirpes ZYMV-FL e ZYMV-CT em dois acessos de *C. colocynthis* (PI 494529 e PI 494532) provenientes da Nigéria. No entanto, essa resistência era melhor expressada em temperaturas elevadas. Em trabalho posterior, Provvidenti (1991) verificou um alto nível de resistência ao ZYMV em quatro variedades locais de *C. lanatus* (PI 482322, PI 482299, PI 482261 e PI 482308) coletadas no Zimbábue, conferida por um único gene recessivo (*Zym*), no entanto, específica para a estirpe ZYMV-FL. Oliveira et al. (2002) avaliaram 50 acessos de *C. lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* e *C. colocynthis* quanto a resistência ao PRSV-W, WMV e ZYMV. Dentre os acessos testados, 5 mostraram-se resistentes aos três vírus, 13 apresentaram resistência múltipla ao ZYMV e WMV, 6 ao PRSV-W e ZYMV e um ao PRSV-W e WMV. Vinte e um acessos foram resistentes apenas ao ZYMV e um ao PRSV-W. A herança da resistência da melancia ao ZYMV foi identificada por Provvidenti (1991) como sendo monogênica e recessiva. Por outro lado, Sittolin (1998) identificou a resistência a PRSV-W, ZYMV e WMV como sendo digênica e recessiva.

No caso de abóbora rasteira, Provvidenti et al. (1978) relataram a resistência de alguns acessos ao PRSV-W, ZYMV e CMV. Brown et al. (2003) estudaram a herança dessa resistência e constataram que ela é monogênica dominante para o ZYMV e CMV e monogênica recessiva para o PRSV-W.

Como o ZLCV foi relatado até o momento somente no Brasil, este parece ser o primeiro estudo sobre a reação de diferentes espécies/variedades de cucurbitáceas a infecção com esse tospovírus. O alto nível de resistência à infecção com o ZLCV observado em plantas de moranga 'Exposição' sob condições de infecção natural, em campo, e inoculação mecânica, em casa de vegetação, sinaliza sua possível utilização em programas de melhoramento genético que visam a obtenção de cultivares

resistentes a essa fitovirose. Para tal, estudos são necessários para a caracterização da base genética dessa resistência.

Referências

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999.

BROWN, R.N.; BOLANOS-HERRERA, A.; MYERS, J.R.; JAHN, M.M. Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. **Euphytica**, Dordrecht, v.129, p.253–258, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Faostat (classic): Production/crops primary**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 20 out. 2006.

GARCIA-DE-SALCEDO, M.J. **Resistência ao mosaico da melancia raça 1 e sua herança em moranga *Cucurbita maxima* Duch.** 1984. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

GILLASPIE, A.G.Jr.; WRIGHT, J.M. Evaluation of *Citrullus* spp. germplasm for resistance to Watermelon mosaic virus 2. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.4, p.352-354, 1993.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Banco de dados IEA**. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 20 out. 2006.

MALUF, W.R.; MOURA, W.M.; SILVA, I.S.; CASTELO-BRANCO, M. Screening of *Cucurbita* spp. accessions for resistance to watermelon mosaic virus-1. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.9, n.1, p.161-167, 1986.

MALUF, W.R.; PEREIRA, J.J.; A.R. FIGUEIRA. Inheritance of resistance to the *Papaya ringspot virus*-watermelon strain from two different accessions of winter squash *Cucurbita maxima* Duch. **Euphytica**, Dordrecht, v.94, p.163–168, 1997.

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

MUNGER, H.M.; MORE, T.A.; AWNI, S. A preliminary report on screening watermelon for resistance to Watermelon mosaic virus 1 e 2. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, (Raleigh), n.7, p.61-62, 1984.

OLIVEIRA, V.B.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, A.A. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvírus isolados de cucurbitáceas no nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.589-592, 2002.

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

PROVVIDENTI, R. Sources of resistance or tolerance to viruses in accessions of *Cucurbita maxima*. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v.5, p.46-47, 1982.

PROVVIDENTI, R. Reaction of accessions of *Citrullus colocynthis* from Nigéria to *Zucchini yellow mosaic virus* and other cucurbit viruses. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, n.9, p.82-83, 1986.

PROVVIDENTI, R. Inheritance of resistance to the Florida strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon. **HortScience**, Alexandria, v.26, p.407-408, 1991.

PROVVIDENTI, R.; ROBINSON, R.W.; MUNGER, H.M.. Multiple virus resistance in *Cucurbita* species. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, Raleigh, v.1, p.26-27, 1978.

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

SITTOLIN, I.M. **Tolerância de melancia aos vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita e do mosaico da melancia-2**. 1998. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia (Proteção de Plantas)) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 1998.