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

**Caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados
brasileiros do vírus do mosaico amarelo da abobrinha**

David Marques de Almeida Spadotti

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

David Marques de Almeida Spadotti
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados brasileiros do
vírus do mosaico amarelo da abobrinha**

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Spadotti, David Marques de Almeida

Caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados brasileiros do vírus do mosaico amarelo da abobrinha / David Marques de Almeida Spadotti. - Piracicaba, 2012.

66 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Abobrinha 2. ELISA 3. Marcador molecular 4. Mosaico - Doença de planta
5. Potyvirus 6. Sequência do DNA 7. Vírus de plantas I. Título

CDD 635.62
S732c

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mário José Spadotti e Aparecida Marques de Almeida Spadotti, pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, pela orientação, confiança, incentivo e amizade, contribuindo de forma fundamental para minha formação como pesquisador;

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla, pela amizade e ensinamentos;

Ao Sr. Pedro C. Arthuso pelo auxílio na manutenção dos trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso de Mestrado;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos, amizade e contribuição na obtenção deste título;

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, por todo apoio e amizade durante a realização dos estudos, em especial aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal: Ana Paula, Carla, Carol, Débora, Júlio, Pedro, Vanessa e Viviana e aos amigos: Alécio, Thais e Débora;

A todos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em especial aos meus orientadores Prof. Marcelo Agenor Pavan e Prof^a. Renate Krause-Sakate, colegas do Laboratório de Virologia Vegetal e amigos da República M.D.A.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Finalmente, agradeço à minha família em especial aos meus pais, meu irmão Lucas Spadotti, minha avó Zulmira e a minha namorada Aline Campos, por toda paciência, incentivo, compreensão e amor.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.2 Metodologia	20
2.2.1 Isolados do ZYMV	20
2.2.2 Preparo de plantas-teste	20
2.2.3 Transmissão mecânica.....	20
2.2.4 Indexação das plantas-testes.....	21
2.2.5 PTA-ELISA	21
2.2.6 “Western blot”	22
2.2.7 Extração do RNA.....	23
2.2.8 RT – PCR	23
2.2.9 Sequenciamento de nucleotídeos do gene da proteína capsidial	24
2.2.10 Análise de RFLP	25
2.3 Resultados	26
2.3.1 Gama parcial de hospedeiras.....	26
2.3.2 Peso molecular da proteína capsidial dos isolados do ZYMV	35
2.3.3 Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene da proteína capsidial.....	35
2.3.4 Análise de RFLP	41
2.4 Discussão.....	41
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	55

RESUMO

Caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados brasileiros do vírus do mosaico amarelo da abobrinha

O vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) é provavelmente um dos mais dinâmicos e prejudiciais vírus emergentes de plantas. Desde sua primeira detecção na Itália e na França em 1973 e 1979, respectivamente, o ZYMV tem sido reportado em mais de 50 países variando de condições climáticas tropicais a temperadas em todos os continentes, exceto na Antártida. No Brasil esse potyvirus foi constatado primeiramente nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, no início da década de 90 e posteriormente nos Estados do Ceará, da Bahia, do Rio Grande do Norte, do Pará, do Mato Grosso do Sul e do Maranhão. É provável que atualmente ocorra em todos os estados brasileiros onde se cultivam cucurbitáceas. Embora ocorra no Brasil há mais de 20 anos, pouco se conhece sobre as características biológicas, sorológicas e moleculares dos isolados até então encontrados no país. Esse projeto de pesquisa teve por objetivo cobrir parcialmente essa lacuna para fornecer subsídios para programas de melhoramento genético. Foram utilizados 11 isolados coletados em diversos estados brasileiros. A caracterização biológica consistiu no estudo da reação de diversas espécies vegetais inoculadas mecanicamente. A caracterização sorológico consistiu na marcação da proteína capsidial dos isolados com o antissoro policlonal contra o vírus. A caracterização molecular foi feita por meio da análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos isolados. A reação das espécies variou de acordo com o isolado inoculado. Análises de RFLP mostraram que a enzima de restrição *Hpa* II permitiu diferenciar o isolado fraco ZYMV-M da maioria dos isolados severos. O peso molecular da proteína capsidial dos isolados analisados foi em torno de 36 KDa, típico da proteína capsidial desse potyvirus. A identidade de nucleotídeos do gene da proteína capsidial entre os isolados brasileiros do ZYMV variou de 93% a 100% e a de aminoácidos deduzidos variou de 97% a 100%. Comparados com as sequências correspondentes de isolados do ZYMV de diferentes origens geográficas a identidade de nucleotídeos variou de 82% a 99%, enquanto a de aminoácidos deduzidos ficou entre 87% e 99%. Na árvore filogenética os isolados brasileiros do ZYMV pertencem ao grupo A, subdivisões I ou II, indicando uma variação entre os isolados. Nenhum evento de recombinação foi detectado nos isolados brasileiros.

Palavras-chave: *Potyvirus*; Sequência de ácido nucléico; ELISA; RFLP

ABSTRACT

**Biological, serological and molecular characterization of Brazilian isolates of
Zucchini yellow mosaic virus.**

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is probably one of the most dynamics and economically important emerging plant viruses. Since it was first report in Italy and France in 1973 and 1979, respectively, ZYMV has been found in over than 50 countries ranging from tropical to temperate climate conditions in all continents, except in Antartida. In Brazil this potyvirus was first reported in the beginning of 90's in São Paulo and Santa Catarina States, and then in Ceará, Bahia, Rio Grande do Norte, Pará, Mato Grosso do Sul and Maranhão states. Probably it occurs in all Brazilian states which grow cucurbit species. Although ZYMV occurs in Brazil for more than 20 years, there is little information about the biological, serological and molecular characteristics for the isolates found in the country. The purpose of this work was to cover partially this gap to provide subsidies for genetic breeding programs. Eleven isolates collected in several Brazilian states were used. The biological characterization consisted in the study of the reaction of several vegetal species mechanically inoculated with the virus. The serological characterization consisted in the identification of the molecular weight of the coat protein through western blot analysis. The molecular characterization was done by the analyses of nucleotides and deduced amino acids sequences for the coat protein gene. The host reaction showed slight variation according to the virus. RFLP analyses showed that restriction enzyme *Hpa*II allowed differentiate the mild ZYMV-M isolate from the majority of severe isolates. The coat protein molecular weight for all studied isolates was about 36 KDa, typical of the coat protein of this potyvirus. The nucleotide identity of the coat protein gene among the ZYMV Brazilian isolates ranged from 93% to 100%, and the deduced amino acids sequences ranged from 97% to 100%. Compared to corresponding sequences of ZYMV isolates from different geographical locations the nucleotide sequences identity ranged from 82% to 99%, while the deduced amino acids sequences ranged from 87% to 99%. Phylogenetic analysis place the Brazilian isolates of ZYMV into the group A, subdivision I or II, showing some diversity between the isolates. No recombination event was detected in the Brazilian isolates.

Keywords: *Potyvirus*; Nucleic acid sequence; ELISA; RFLP

1 INTRODUÇÃO

A família *Cucurbitaceae* está dividida em 2 sub-famílias – *Zanonioidae* e *Cucurbitoideae* – e compreende cerca de 118 gêneros e 825 espécies. Aproximadamente 26 espécies de cucurbitáceas são cultivadas como hortícolas em diversas regiões do mundo. As espécies dessa família são predominantemente cultivadas pelos seus frutos. As principais espécies cultivadas – melancia, pepino, melão e abóbora – respondem por 20% da produção total de produtos olerícolas no mundo, assumindo uma proporção do total semelhante à das principais Solanáceas (excluída a batata). A melancia é a principal cucurbitácea cultivada no mundo, com cerca de 40% da produção total de cucurbitáceas, seguida do pepino com 27%. Melões e abóboras representam 20% e 12% da produção mundial de membros da família, respectivamente (Almeida, 2002).

Em 2009 o Instituto de Economia Agrícola (IEA) estimou a produção das principais cucurbitáceas no Estado de São Paulo, destacando-se melancia, pepino, abobrinha e melão em 246,3; 65,6; 39,7 e 18,1 mil t, respectivamente. Dentre essas cucurbitáceas, a abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) destaca-se notadamente no Estado de São Paulo onde se encontram as áreas de maior plantio no país (Koch, 1995).

Os problemas fitossanitários, principalmente causados por vírus, reduzem a produtividade e qualidade dos frutos da maioria das espécies de cucurbitáceas. Plantas dessa família podem ser afetadas em todo o mundo por mais de 39 espécies de vírus (Lecoq et al., 2003). Desses, nove foram encontrados no Brasil (Kurozawa et al., 2005). Os vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type watermelon; PRSV-W) e do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) têm sido considerados os mais importantes, pela predominância em diversas regiões produtoras do país e pelos altos prejuízos econômicos causados.

O ZYMV foi constatado primeiramente nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, no início da década de 90 (Caner et al., 1992; Vega et al., 1992) e posteriormente nos Estados do Ceará (Lima et al., 1996), da Bahia (Novaes et al., 1999), do Rio Grande do Norte (Oliveira et al., 2000), do Pará (Poltronieri et al., 2000), do Mato Grosso do Sul (Stangarlin et al., 2001) e do Maranhão (Moura et al., 2001). Desde a sua constatação em diferentes regiões do país, raros têm sido os estudos para melhor

caracterização biológica e molecular dos isolados brasileiros do ZYMV, bem como para o desenvolvimento de alternativas de controle.

Variedades resistentes ou tolerantes são conhecidas na maioria das espécies de cucurbitáceas cultivadas, entre elas, o melão, pepino e abobrinha de moita (DESBIEZ; LECOQ, 1997). A resistência ao ZYMV foi introduzida em abobrinha de moita através de cruzamentos interespecíficos (ROBINSON; PROVVIDENT, 1997). O ZYMV induz somente sintomas atenuadas nos híbridos comerciais “resistentes”, como lesões cloróticas sistêmicas ou mosqueado fraco, ocasionalmente formando manchas com mosaico mais severos em áreas foliares restritas (DESBIEZ et al., 2003). Entretanto multiplicação sistêmica do vírus ocorre, portanto, as variedades resistentes deveriam ser consideradas tolerantes (MATTHEWS, 1991).

Investigações sobre método alternativo de controle foram feitas por Rabelo (2002) e Rabelo e Rezende (2004) que selecionaram uma estirpe fraca do vírus, denominada ZYMV-M, que protegeu eficientemente plantas de abobrinha-de-moita contra a infecção com as estirpes severas originárias de Atibaia, SP (ZYMV-AT), de Iacri, SP (ZYMV-IA) e de Vargem Paulista, SP (ZYMV-VP) em testes em casa-de-vegetação. Plantas de abobrinha-de-moita premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, ou duplamente premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, esta última selecionada por Rezende et al. (1994), também ficaram protegidas contra a infecção por estirpes severas desses potyvirus no campo (Rabelo, 2002). Mais recentemente verificou-se que plantas de abobrinha de moita cvs. Samira, Novita Plus, AF 2847, e Yasmin infectadas com a estirpe ZYMV-M sob condições de estufa plástica não exibiram sintomas foliares típicos da doença e alterações na quantidade e qualidade dos frutos produzidos (Bonilha et al., 2009).

Diante desses fatos, a caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados brasileiros do ZYMV é oportuna, pois irá proporcionar subsídios especialmente para futuros programas de melhoramento para o desenvolvimento de variedades resistentes.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

O ZYMV é uma espécie do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* com partículas alongadas e flexuosas, de aproximadamente 750 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro. O genoma é monopartido, de RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 9600 nucleotídeos. O ácido nucléico codifica uma poliproteína que é clivada por meio de proteases codificadas pelo genoma viral, originando nove proteínas funcionais e uma estrutural. Esta é a proteína capsidial (CP) com peso molecular de 36 kDa (Lisa e Lecoq, 1984; Van Regenmortel et al., 2000).

Sequências de nucleotídeos da região 3' do genoma viral, que inclui o gene CP, são conhecidas para mais de 200 isolados de diferentes partes do mundo. A identidade entre as sequências de aminoácidos da CP dos diversos isolados é superior a 90%, exceto para isolados da Ásia (Singapura, Taiwan e China) e das Ilhas Reunion, que apresentam significativa divergência dos demais isolados, particularmente em 41 aminoácidos da região N-terminal da CP, que constitui a região mais variável do genoma dos potyvirus (Shukla et al., 1988; Lin et al., 2000; Zhao et al., 2003; Ha et al., 2008; Yakoubi et al., 2008; Bananej et al., 2008).

Variabilidades sorológicas e biológicas também têm sido relatadas para isolados do ZYMV de outros países. Sintomas induzidos por diferentes isolados variam de fraco a severo, sendo que alguns induzem necrose em função da suscetibilidade do hospedeiro (Lisa; Lecoq, 1984; Desbiez; Lecoq, 1997; Lecoq; Purcifull, 1992).

Também têm sido descritos variantes que diferem na habilidade de serem transmitidos por afídeos (ANTIGNUS et al., 1989; Lecoq et al., 1991; Gal-On et al., 1992). O isolado ZYMV-NAT obtido por ANTIGNUS (1989) não é transmissível por afídeos devido a uma mutação na região da proteína capsidial, enquanto o isolado ZYMV-PAT obtido por Lecoq (1991) é transmitido ineficientemente por afídeos, pois apresenta a proteína não estrutural, denominada componente auxiliar ("helper componente proteinase -HCPro") deficiente.

A transmissão do ZYMV na natureza é feita por diversas espécies de afídeos, sendo a relação vírus vetor do tipo não persistente (Lisa; Lecoq, 1984). Duas proteínas virais são requeridas pelos afídeos para a transmissão desse potyvirus: a proteína capsidial (CP) e a proteína componente auxiliar (“helper componente proteinase” - HCPro) (Pirone, 1991). Há relatos também sobre a transmissão do ZYMV pela semente, porém as informações encontradas na literatura são conflitantes (Greber et al., 1988; Schrijnwerkers et al., 1991; Desbiez; Lecoq, 1997; Al-Musa, 1989).

O círculo de hospedeiros experimentais do ZYMV relatado em outros países inclui espécies de 11 famílias de dicotiledôneas, embora a infecção natural com esse vírus tem sido relatada principalmente em espécies da família Cucurbitaceae (Desbiez e Lecoq, 1997). As principais espécies cultivadas dessa família já foram relatadas como sendo suscetíveis ao ZYMV. Na Flórida, E.U.A., o ZYMV foi isolado de *Melothria pendula*, que é uma espécie selvagem perene de cucurbitáceas (Aldlerz et al., 1983). No Brasil, Yuki et al. (1999) relataram a infecção natural desse potyvirus em outra cucurbitácea selvagem, denominada *Cayaponia tibiricae* e Jadão et al. (2005) relataram a infecção por ZYMV em *Trichosanthes cucumerina*, cucurbitácea conhecida popularmente como quiabo de metro. Os hospedeiros que não pertencem à família Cucurbitaceae, quando inoculados com o ZYMV, geralmente exibem sintomas localizados ou latentes (Desbiez e Lecoq, 1997), exceto *Sesamum indicum* que mostrou sintomas severos de mosaico quando inoculado com 22 isolados do ZYMV, no Sudão (Mahgoub et al., 1997). Na Jordania, *Moluccella laevis* (*Lamiaceae*) foi descrita como reservatório natural de ZYMV (Al-Musa, 1989). *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* (*Chenopodiaceae*) são boas indicadoras do ZYMV, pois reagem com lesões locais nas folhas inoculadas (Desbiez e Lecoq, 1997).

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

de 40 a 50% na produção de frutos de melão, numa área de aproximadamente 7.500 ha plantada na primavera de 1984 (Nameth et al., 1985). No Brasil, Pereira et al. (2007) não obtiveram produção de frutos comerciais em plantas de abobrinha de moita cv. Caserta inoculadas com o PRSV-W e com o ZYMV, isoladamente e em conjunto, aos 5, 15 e 20 dias após a emergência das plantas em campo.

As recomendações para o controle do mosaico amarelo causado pelo ZYMV em cucurbitáceas incluem principalmente o uso de variedades resistentes ou tolerantes, quando disponíveis e a eliminação de possíveis hospedeiras do vírus e dos afídeos contidas nas proximidades da plantação e na vegetação espontânea. Pulverizações com inseticidas para reduzir a disseminação do ZYMV dentro da cultura são pouco eficientes, pois esses não são suficientemente rápidos para matarem os afídeos antes da inoculação dos vírus na planta.

Fontes de resistência ao ZYMV já foram identificadas em coleções de germoplasma de Cucurbitaceae. A espécie selvagem *C. ecuadorensis* contém gene de resistência para esse potyvirus e tem sido utilizada em cruzamentos interespecíficos em programas de melhoramento. Plantas transgênicas de meloeiro e de abobrinha de moita resistentes a esse potyvirus também já foram desenvolvidas (Fang and Grumet, 1993; Fuchs and Gonsalves, 1995; Tricoli et al., 1995).

A premunização com estirpes fracas do vírus é outra alternativa atrativa para o controle dessa doença. O uso dessa tecnologia para o controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (ZYMV) foi inicialmente proposto por Lecoq et al. (1991) na França. Resultados experimentais promissores também foram relatados em Taiwan (Wang et al., 1991), na Inglaterra (Walkey et al., 1992), na Califórnia, E.U.A. (Perring et al., 1995) e no Brasil (Rabelo e Rezende, 2004). A premunização para o controle do mosaico amarelo em abobrinha-de-moita já vem sendo utilizado comercialmente no Havaí (Cho et al., 1992) e em Israel (Yarden et al., 2000).

2.2 Metodologia

2.2.1 Isolados do ZYMV

Foram utilizados 11 isolados obtidos da coleção mantida em tecido desidratado no Laboratório de Virologia Vegetal, ESALQ/USP, coletados nos estados do Espírito Santo (ZYMV-ES), Pará (ZYMV-PA), Rio Grande do Norte (ZYMV-RN), Paraná (ZYMV-PR), Rio Grande do Sul (ZYMV-RS), São Paulo (ZYMV-RI e ZYMV-P), Mato Grosso (ZYMV-MT) e do Distrito Federal (ZYMV-DF e ZYMV-Fe) e uma estirpe fraca do ZYMV, denominada ZYMV-M selecionada por Rabelo e Rezende (2004). Os isolados foram mantidos em plantas de abobrinha de moita por meio da transmissão mecânica.

2.2.2 Preparo de plantas-teste

Os testes foram conduzidos em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP. Foram utilizadas plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta, *C. maxima* cv. Exposição, *C. moschata* cv. Menina Brasileira, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Citrullus lanatus* cvs. Crimson Sweet e Fair Fax, *Cucumis sativus* cvs. Safira e Aodai, *C. melo* cvs. Ouro e Caipira, *C. anguria*, *Gomphrena globosa*, *Luffa cylindrica*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Sesamum indicum* L. As plantas foram cultivadas em vasos de alumínio de 1,5L com uma mistura de terra, adubo orgânico e adubo mineral.

2.2.3 Transmissão mecânica

O inóculo viral (ZYMV) foi preparado por meio da maceração de folhas de abobrinha de moita cv. Caserta sintomáticas em tampão de fosfato de potássio 0,02 M pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio 0,02 M na proporção de 1:10 (p/v). A inoculação mecânica das plantas-teste foi feita friccionando o indicador umedecido no inóculo, nas folhas previamente polvilhadas com o abrasivo carborundum.

2.2.4 Indexação das plantas-testes

A confirmação da infecção e da invasão sistêmica do ZYMV nas plantas-testes foi feita por meio de análises de sintomas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, sorológica (PTA-ELISA) e molecular (RT-PCR). Em alguns casos, quando necessário, também foi feita a recuperação biológica do isolado do vírus para plantas de *C. pepo* cv. Caserta. Para o teste de recuperação biológica, extratos de folhas das plantas-teste, previamente inoculadas com os isolados do ZYMV, foram inoculados mecanicamente em plantas de abobrinha de moita. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas por meio de sintomas e por PTA-ELISA.

2.2.5 PTA-ELISA

Foi utilizado o teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (Mowat e Dawson, 1987), com algumas modificações. Para este teste foi utilizado o antissoro policlonal contra o ZYMV disponível no laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP.

As amostras foram maceradas individualmente, em almofariz, em presença de tampão de carbonato, pH 9,6 na diluição 1:50. Foram colocados 100 µl de cada extrato por cavidade na placa de ELISA e em seguida incubado por 15 minutos a 37 °C. A placa foi então lavada três vezes consecutivas. Colocaram-se 100 µl de antissoro diluído em tampão PBS-TPB (Diluição 1:1000) por cavidade e incubou-se por 2 horas a 37°C. Lavou-se novamente a placa com PBS-Tween. Em seguida, foram colocados 100 µl de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025), diluída em tampão PBS-TPB, em cada cavidade e incubou-se por 2 horas a 37°C. Novamente a placa foi lavada com PBS-Tween. Em seguida, foram colocados 100 µl de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105) diluído em dietanolamina (0,6 mg/ml), em cada cavidade. Incubou-se a temperatura ambiente e esperou-se a reação ocorrer. A reação foi avaliada medindo a absorbância a 405 nm no leitor de ELISA Metertech Σ 960. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância foi pelo menos três vezes superior ao da absorbância do controle sadio.

2.2.6 “Western blot”

As proteínas totais das plantas infectadas com os diferentes isolados do ZYMV foram extraídas através da maceração dos tecidos de folhas novas infectadas em tampão TRIS 0,5 M, pH 6,8 na proporção de 0,25 g de tecido para 500 µL de tampão em tubos de eppendorf. Em seguida foi adicionado igual volume de tampão de dissociação (TRIS 0,5 M, pH 6,8, SDS 3,8%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 19%). As proteínas foram desnaturadas através de incubação em água fervente durante 5 minutos, seguida de centrifugação a 5000 g durante 5 minutos. A separação das proteínas foi realizada com a inserção das amostras (10 µL) em um gel de poliacrilamida contendo SDS com duas concentrações distintas. Para análise do peso molecular das proteínas foi aplicado o marcador SeeBlue® Plus2. Inicialmente a voltagem utilizada na corrida foi de 95 volts por 20 minutos para a saída das amostras do gel de empilhamento (Poliacrilamida 4%) para o gel de separação (Poliacrilamida 12,5%), onde empregou-se 125 volts na corrida até as amostras alcançarem o fim do gel e serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose, empregando-se tampão de transferência (TRIS 0,3 %; glicine 1,5 %; metanol 20 %). A transferência foi feita em um aparelho “Bio Rad Mini Trans-blot Cell”, por 90 minutos a 0,25 mA. A membrana contendo as proteínas foi submetida a uma reação sorológica com antissoro policlonal contra a proteína capsidial do ZYMV. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 minutos com TBS (0,002 M TRIS, pH 7,4, contendo 0,15 M NaCl e Tween 20 0,05%). Em seguida foi incubada em TBS-Tween contendo 7,5% de leite em pó desnatado, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A membrana foi transferida para uma suspensão de anticorpo policlonal específico contra o vírus, diluído 1:1000 em TBS-Tween, contendo leite em pó desnatado 7,5% e incubada sob agitação constante, durante 3 a 4 horas, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 2 a 3 minutos, 3 vezes consecutivas, com TBS-tween. A seguir foi incubada por 2 a 3 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32000 em TBS-Tween + leite em pó desnatado 7,5%. Depois desse período a membrana foi lavada 2 a 3 vezes em TBS-Tween, durante 2 a 3 minutos cada vez. Finalmente foi adicionado o substrato

5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitro blue tetrazolium, pH 9,5 (NBT/BCIP – SIGMA B-5655). A reação foi interrompida lavando-se a membrana com água destilada.

2.2.7 Extração do RNA

Utilizando-se o protocolo proposto por Bertheau (1998), tecidos foliares foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS – Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na- DIECA 20 mM. Posteriormente os extratos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 g a 4°C. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µL de SDS 10%. A mistura foi incubada a 55 °C por 15 minutos em banho-maria. Em seguida adicionaram-se 100 µL de solução de acetato de potássio a 3M, agitando-se bem. Seguiu-se incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13.000 g (4°C), transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionaram-se 700 µL de NaI 6 M e 5 µL de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspendido. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5.000 g. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado duas vezes com 500 µL de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 g para cada lavagem. Posteriormente secou-se o precipitado a vácuo e ressuspendeu-se o RNA em 400 µL de água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), seguido de incubação por 5 minutos a 55 °C em banho-maria. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos a 13.000 g. O sobrenadante (300 µL) foi transferido para um novo tubo e armazenado a –20 °C.

2.2.8 RT – PCR

A detecção do ZYMV por meio de RT-PCR foi feita a partir do RNA total. Esse foi amplificado por RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ZY2 [5'-GCTCCATACATAGCTGAGACAGC-3'] derivado do gene da NIb e ZY3 [5'-TAGGCTTGCAAACGGAGTCTAATC-3'] complementar a região terminal 3' não traduzida (Thonson, 1995) que amplificam um fragmento de 1186 pb. Utilizando-se os reagentes do kit PCR Master Mix (Fermentas) adicionaram-se: 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade da transcriptase reversa

AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega a 15 unidades/ μ L), 5,0 μ L de RNA e água livre de RNAses para completar o volume de 25 μ L. O ciclo do termociclador para a RT-PCR em uma única etapa consistiu em 30 minutos a 42°C, seguido de 2 minutos à 94°C, 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 65°C/30 segundos e 72°C/60 segundos, finalizando com 72°C/10 minutos. O resultado da RT-PCR foi visualizado em gel de agarose 0,8%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) diluído 1:10000 em tampão de TBE (Tris-Borato 100 mM, EDTA 2 mM), tendo como padrão o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Promega).

2.2.9 Sequenciamento de nucleotídeos do gene da proteína capsial

O produto da RT-PCR foi purificado através do uso do kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega) e enviado para sequenciamento de nucleotídeos na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). As sequências obtidas foram avaliadas no programa Electropherogram quality analysis da Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as demais sequências disponíveis no Genbank utilizando o programa BLASTn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As traduções das sequências de nucleotídeos para os aminoácidos deduzidos foram realizadas com o programa ExPASy proteomics server (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). Foram obtidas as identidades de nucleotídeos e aminoácidos entre as sequências através do programa ClustalW – EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). A partir dos alinhamentos foi obtida uma árvore filogenética utilizando-se o software “MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (Disponível em: <www.megasoftware.net>), utilizando-se o método de *neighbour-joining*, modelo maximum composite likelihood. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

Na análise de recombinação entre as sequências foram utilizados os métodos RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN E 3SEQ presentes no programa RDP3 (Martin et al., 2010).

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos desses isolados foram comparadas com as sequências correspondentes de outros isolados do ZYMV de diferentes origens, listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de isolados do ZYMV obtidas no GenBank e utilizadas na análise filogenética e de recombinação

Isolados	Nº de acesso GenBank	Isolados	Nº de acesso GenBank
China	JN559383	Áustria	AJ420017
Austrália	JF797207	Itália	AJ420020
Irã	FJ705269	Slovenia	AJ420018
Turquia	JF317297	Hungria	AJ459954
Índia	HQ529776	Singapura	X62662
Taiwan	AF127931	Paquistão	AB127936
Coréia	AF062518	Alemanha	AJ420019
Sérvia	JF308189	Espanha	DQ645729
USA	HM768196	Coréia do Sul	AB369279
Polônia	EF178505	Nova Zelândia	AY995216
Brasil	GU586790	Reunion Island	L29569
Israel	M35095	Vietnã	DQ925448
Síria	AB458595	Japão	AB063251

2.2.10 Análise de RFLP

Para diferenciação dos isolados foi realizada análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphisms” - RFLP), através da digestão com a enzima de restrição *Hpa*II.

Para realizar a digestão enzimática, 3 µL do produto da RT-PCR foram diluídos em uma mistura contendo 1,5 µL de tampão 10X (específico para a enzima), 0,5 µL da enzima *Hpa*II e 10 µL de água Mili-Q estéril. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 12 horas.

Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com SyberSafe em tampão de TBE (Tris-Borato 100 mM, EDTA 2 mM) e observado em equipamento de luz ultravioleta, tendo como padrão o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

As sequências de nucleotídeos reconhecida pela enzima de restrição estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências de nucleotídeos reconhecidas pela enzima de restrição

ENZIMA	SEQUÊNCIA ALVO
<i>HpaII</i>	5' C C ↓ G G 3' 3' G G ↑ C C 5'

2.3 Resultados

2.3.1 Gama parcial de hospedeiras

Na tabela 3 estão apresentadas as reações de dezenove espécies vegetais pertencentes às famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Pedaliaceae e Solanaceae inoculadas mecanicamente com dez isolados severos e um isolado fraco (ZYMV-M) desse potyvirus.

As espécies de cucurbitáceas inoculadas apresentaram sintoma de mosaico, variando de fraco a severo, exibindo em alguns casos, estreitamento foliar e formação de bolhas. O isolado ZYMV-M causou sintoma fraco, conforme esperado. O isolado ZYMV-DF também causou sintoma atenuado em *C. pepo* cv. Caserta. A maioria dos isolados de ZYMV induziu a formação de bolhas e estreitamento foliar nas plantas de *C. lanatus* cv. Fair Fax. A infecção em plantas de *C. melo* cv. Caipira foi muito severa para todos os isolados, ocasionando em alguns casos, murcha, necrose e morte da planta após 14 dias da inoculação.

Os isolados ZYMV-PA e DF induziram a formação de lesões locais necróticas nas folhas inoculadas de *C. pepo* cv. Caserta. ZYMV-PA e CF induziram as mesmas lesões em folhas de *C. sativus* cv. Safira. Em plantas de *C. melo* cv. Caipira ocorreu a formação de lesões locais necróticas quando inoculadas com os isolados ZYMV-RS, MT, RN e Fe. O isolado ZYMV-RN induziu as mesmas lesões em *C. melo* cv. Ouro e lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas de *L. cylindrica*.

A maioria dos isolados induziu lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, exceto o isolado o ZYMV-M. Os isolados ZYMV-ES, PA, RN, RI, P e MT infectaram *P. sativum*, porém a infecção ficou localizada nas folhas

inoculadas, e somente alguns isolados induziram o aparecimento de lesões locais cloróticas. Lesões locais cloróticas e necróticas foram encontradas em *G. globosa*, porém variaram em função dos isolados. As folhas inoculadas com os isolados ZYMV-M e MT ficaram assintomáticas, porém o vírus foi detectado por PTA-ELISA e recuperação biológica.

A maioria das plantas de *S. indicum* inoculadas com os diferentes isolados não exibiu sintoma, exceto aquelas inoculadas com o isolado ZYMV-MT. A infecção dessas plantas, no entanto foi confirmada por PTA-ELISA e recuperação biológica. Os isolados ZYMV-M, P, DF e Fe não infectaram *S. indicum*.

Em *N. benthamiana* os isolados ZYMV-RS e RI causaram infecção sistêmica e os isolados ZYMV-RN e P causaram infecções locais assintomáticas.

Diversas espécies de plantas analisadas para o isolado ZYMV-M não exibiram sintomas, porém a infecção foi confirmada através de PTA-ELISA.

P. vulgaris e *N. glutinosa* não foram infectadas por nenhum dos isolados do ZYMV.

Na figura 1 são apresentadas folhas de abobrinha de moita exibindo diferentes tipos de mosaico quando infectadas com alguns isolados do ZYMV. Na figura 2 são apresentadas lesões locais cloróticas ou necróticas induzidas por isolados do ZYMV em diferentes espécies vegetais. Na figura 3 são apresentados sintomas em folhas de *C. maxima* cv. Exposição, *C. sativus* cvs. Aodai e Safira, *L. cylindrica* e *C. anguria* infectadas com isolados do ZYMV. Na figura 4 são apresentados sintomas em *C. melo* cvs. Caipira e Ouro infectados com isolados do ZYMV. Na figura 5 são apresentados sintomas em *C. lanatus* cvs. Crimsom Sweet e Fair fax infectadas com isolados do ZYMV e sintoma atenuado do ZYMV-MT em *S. indicum*.

Tabela 3 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com onze isolados do ZYMV e detecção do vírus por PTA-ELISA

Plantas-teste	Isolados do ZYMV											
	ES	ELISA	PA	ELISA	RN	ELISA	PR	ELISA	RS	ELISA	RI	ELISA
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. moschata</i> cv. Menina Brasileira	M	Nt	M	nt	M	Nt	M	nt	M	nt	M	nt
<i>C. maxima</i> cv. Exposição	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Cucumis sativus</i> cv. Safira	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. sativus</i> cv. Aodai	M	+	M	+	M	+	M	-	M	+	M	+
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Crimson Sweet	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. lanatus</i> cv. Fair fax	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Cucumis melo</i> cv. Ouro	A	-	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. melo</i> cv. Caipira	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. anguria</i>	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Luffa cylindrica</i>	M	+	M	+	M	+	A	-	M	+	M	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLC	Nt	LLC	nt	LLC	Nt	LLC	nt	LLC	nt	LLC	nt
<i>C. quinoa</i>	LLC	Nt	LLC	Nt	LLC	Nt	LLC	nt	LLC	nt	LLC	nt
<i>Gomphrena globosa</i>	A	-	LLN	fi +	LLC	fi +	A	-	A	-	LLC	fi +
<i>Pisum sativum</i>	A	fi +	LLC	fi +	A	fi +	A	-	A	-	A	fi +
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nt	Nt	A	-	nt	-	A	-	A	-	A	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	A	-	A	-	A	fi +	M	-	M	+	A	fi +
<i>N. glutinosa</i>	A	-	X	nt	A	-	A	-	A	-	A	-
<i>Sesamum indicum</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

M: mosaico; LLC: lesão local clorótica; LLN: lesão local necrótica; A: ausência de sintomas; nt: não testado; -:ELISA negativo; +:ELISA positivo; X: planta morta; fi::folha inoculada.

Tabela 3 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com onze isolados do ZYMV e detecção do vírus por PTA-ELISA
(Conclusão)

Plantas-teste	Isolados do ZYMV									
	P	ELISA	DF	ELISA	M	ELISA	MT	ELISA	Fe	ELISA
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta	M	+	M	+	A	+	M	+	M	+
<i>C. moschata</i> cv. Menina Brasileira	M	Nt	M	nt	M	Nt	Nt	nt	nt	nt
<i>C. maxima</i> cv. Exposição	M	+	M	+	M	+	M	+	nt	nt
<i>Cucumis sativus</i> cv. Safira	M	+	M	+	nt	Nt	M	+	nt	nt
<i>C. sativus</i> cv. Aodai	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Crimson Sweet	M	+	M	+	M	+	M	+	nt	nt
<i>C. lanatus</i> cv. Fair fax	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Cucumis melo</i> cv. Ouro	M	+	M	+	A	+	M	+	M	+
<i>C. melo</i> cv. Caipira	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>C. anguria</i>	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Luffa cylindrica</i>	M	+	M	+	M	+	M	+	M	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLC	Nt	-	nt	-	Nt	Nt	nt	nt	nt
<i>C. quinoa</i>	LLC	Nt	A	+	A	Nt	Nt	nt	nt	nt
<i>Gomphrena globosa</i>	A	-	A	-	A	fi +	A	fi +	nt	nt
<i>Pisum sativum</i>	LLC	fi +	A	-	A	-	A	fi +	nt	nt
<i>Phaseolus vulgaris</i>	A	-	A	-	nt	Nt	Nt	nt	nt	nt
<i>Nicotiana benthamiana</i>	A	+	A	-	A	-	X	nt	nt	nt
<i>N. glutinosa</i>	A	-	A	-	A	-	A	-	nt	nt
<i>Sesamum indicum</i>	-	-	-	-	-	-	M	+	A	-

M: mosaico; LLC: lesão local clorótica; LLN: lesão local necrótica; A: ausência de sintomas; nt: não testado; -:ELISA negativo; +:ELISA positivo; X: planta morta; fi::folha inoculada

Figura 1 - Sintomas em folhas de *C. pepo* cv. Caserta infectadas com os seguintes isolados: A) ZYMV- ES; B) ZYMV- MT; C) ZYMV- Fe; D) ZYMV- PA; E) ZYMV- M; F) ZYMV-PR ; G) ZYMV- P; H) ZYMV- RI ; I) ZYMV- RN; J) ZYMV- DF; L) ZYMV- RS

Figura 2 - Lesões locais cloróticas ou necróticas induzidas por isolados do ZYMV em diferentes espécies vegetais. A) ZYMV- MT em *C. melo* cv. Caipira; B) ZYMV- RN em *C. melo* cv. Ouro; C) ZYMV- RN em *L. cylindrica*; D) ZYMV- P em *P. sativum*; E) ZYMV- PA em *C. sativus* cv. Safira; F) ZYMV-PA em *G. globosa*; G) ZYMV-PA em *G. globosa*; H) ZYMV- P em *C. quinoa*; I) ZYMV- RN em *C. amaranticolor*; J) ZYMV- DF em *C. pepo*; L) ZYMV- PA em *C. amaranticolor*

Figura 3 - Sintomas em folhas de *C. maxima* cv. Exposição (A, B), *C. sativus* cvs. Aodai (C, D, E, F, H) e Safira (G), *L. cylindrica* (I, J, L, M, N), *C. anguria* (O, P) infectadas com isolados do ZYMV

Figura 4 - Sintomas em *C. melo* cvs. Caipira (A, B, C, D, F, G, H, I, O) e Ouro (E, J, L, M, N, P, Q) infectadas com isolados do ZYMV

Figura 5 - Sintomas em *C. lanatus* cvs. Crimsom Sweet (A, H, I) e Fair Fax (B, C, D, E, F, G) infectadas com isolados do ZYMV. Sintoma atenuado do ZYMV-MT em *S. indicum* (L)

2.3.2 Peso molecular da proteína capsidial dos isolados do ZYMV

A proteína capsidial dos isolados do ZYMV foi marcada com antissoro policlonal contra o vírus, em teste de “Western blot” (Figura 6). O peso molecular da proteína capsidial dos isolados analisados foi em torno de 36 KDa, típico da proteína capsidial desse potyvirus.

Figura 6 - Reação de “Western Blot”. Amostras: (M) Marcador Seed Blue; (1) ZYMV-RI; (2) ZYMV- ES; (3) ZYMV- RN; (4) ZYMV- PR; (5) ZYMV- RS; (6) ZYMV- P; (7) ZYMV- PA; (8) ZYMV- DF; (9) ZYMV-M

2.3.3 Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene da proteína capsidial

RNAs totais extraídos de plantas de abobrinha de moita infectadas com os diferentes isolados permitiram a amplificação de um fragmento de 1186 pb, contendo o gene completo da proteína capsidial do vírus (Figura 3).

As sequências de nucleotídeos obtidas dos produtos de RT-PCR dos isolados foram alinhadas e após remoção de alguns nucleotídeos das extremidades 3' e 5' obtiveram-se sequências de 837 nucleotídeos para todos os isolados, referentes ao gene completo da proteína capsidial.

A identidade de nucleotídeos do gene da proteína capsidial entre os isolados brasileiros do ZYMV variou de 93% a 100% e a de aminoácidos deduzidos variou de 97% a 100%. Comparados com as sequências correspondentes de isolados do ZYMV das diferentes origens geográficas a identidade de nucleotídeos variou de 82% a 99%, enquanto a de aminoácidos deduzidos ficou entre 87% e 99% (tabela 4). Nenhum

evento de recombinação foi detectado nos isolados brasileiros através de 7 métodos independentes do programa RDP3.

A figura 8 apresenta uma árvore filogenética construída à partir das sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial dos isolados listados na tabela 4.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos de RT-PCR amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores ZY2 e ZY3 de 9 isolados do ZYMV. (M) Marcador 1KB; (1) ZYMV- RI; (2) ZYMV-ES; (3) ZYMV- RN; (4) ZYMV-PR; (5) ZYMV-RS; (6) ZYMV- P; (7) ZYMV-PA; (8) ZYMV-DF (9) ZYMV-M

Tabela 4 - Porcentagens de identidade de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre isolados do ZYMV
(Continua)

Isolados	ES	PA	RN	PR	RS	RI	P	DF	M	Fe	MT	China	Austrália	Irã	Turquia	Índia	Taiwan	Coréia
ES	-	99	99	99	99	98	97	98	98	99	99	98	92	99	97	98	97	92
PA	96	-	99	99	100	98	98	99	99	99	100	98	92	100	98	99	97	92
RN	97	98	-	98	99	98	97	98	98	99	99	98	92	99	97	98	97	92
PR	97	98	98	-	99	97	97	98	98	98	99	98	92	99	97	98	96	92
RS	96	98	98	98	-	98	98	99	99	99	100	98	92	100	98	99	97	92
RI	95	93	93	93	93	-	99	98	98	98	98	97	91	98	96	97	96	92
P	95	93	93	93	93	99	-	98	98	97	98	97	90	98	96	97	96	91
DF	95	93	93	93	93	98	98	-	100	98	99	98	91	99	97	98	97	92
M	95	93	93	93	93	98	98	100	-	98	99	98	91	99	97	98	97	92
Fe	97	98	99	99	98	94	93	94	94	-	99	98	92	99	97	98	97	92
MT	97	98	98	98	98	93	93	94	94	98	-	98	92	100	98	99	97	92
China	94	92	92	93	92	95	94	96	96	93	93	-	92	98	97	98	97	92
Austrália	85	86	85	86	85	85	85	85	85	85	86	86	-	92	91	91	91	88
Irã	96	97	97	97	97	93	93	93	93	97	97	92	86	-	98	99	97	92
Turquia	95	97	97	97	96	93	93	93	93	97	97	92	85	97	-	97	95	91
Índia	97	97	97	98	97	94	93	94	94	98	97	93	86	98	97	-	96	92
Taiwan	93	93	93	93	92	92	92	92	92	93	93	92	86	92	92	93	-	92
Coréia	92	91	91	91	91	91	91	91	91	92	92	91	83	91	91	92	91	-
Sérvia	96	97	97	98	97	93	93	93	93	98	97	93	85	98	97	98	93	91
USA	94	94	94	94	94	95	94	95	95	94	94	94	85	93	93	94	92	91
Polônia	84	84	84	84	83	83	83	83	83	84	84	84	82	84	84	84	84	81

Tabela 4 - Porcentagens de identidade de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre isolados do ZYMV
.....(Continuação)

Isolados	ES	PA	RN	PR	RS	RI	P	DF	M	Fe	MT	Brasil	Israel	Síria	Japão	Alemanha	Austria	Itália	Slovenia	Hungria
ES	-	99	99	99	99	98	97	98	98	99	99	99	98	99	99	99	98	99	98	97
PA	96	-	99	99	100	98	98	99	99	99	100	100	99	100	100	100	98	100	98	98
RN	97	98	-	98	99	98	97	98	98	99	99	99	98	99	99	99	98	99	98	97
PR	97	98	98	-	99	97	97	98	98	98	99	99	98	99	99	99	97	99	97	97
RS	96	98	98	98	-	98	98	99	99	99	100	100	99	100	100	100	98	100	98	98
RI	95	93	93	93	93	-	99	98	98	98	98	98	97	98	98	98	97	98	97	96
P	95	93	93	93	93	99	-	98	98	97	98	98	97	98	98	98	96	98	96	96
DF	95	93	93	93	93	98	98	-	100	98	99	99	98	99	99	99	97	99	97	97
M	95	93	93	93	93	98	98	100	-	98	99	99	98	99	99	99	97	99	97	97
Fe	97	98	99	99	98	94	93	94	94	-	99	99	98	99	99	99	98	99	98	97
MT	97	98	98	98	98	93	93	94	94	98	-	100	99	100	100	100	98	100	98	98
Brasil	97	98	98	99	98	93	93	94	94	99	99	-	99	100	100	100	98	100	98	98
Israel	97	97	98	98	97	94	93	94	94	98	98	98	-	99	99	99	97	99	97	97
Síria	96	98	98	98	98	93	93	93	93	98	98	98	99	-	100	100	98	100	98	98
Japão	97	97	98	98	98	94	94	94	94	98	98	98	98	98	-	100	98	100	98	98
Alemanha	97	98	98	98	98	94	94	94	94	98	98	98	99	99	98	-	98	100	98	98
Austria	96	97	97	98	97	93	93	93	93	98	97	97	98	98	97	99	-	98	100	99
Itália	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	96	95	-	98	98
Slovenia	96	97	97	97	97	93	93	93	93	98	97	97	98	98	97	98	99	95	-	99
Hungria	96	97	97	97	97	93	93	93	93	98	97	97	98	98	97	98	99	95	99	-

Tabela 4 - Porcentagens de identidade de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre isolados do ZYMV
.....(Conclusão)

Isolados	ES	PA	RN	PR	RS	RI	P	DF	M	Fe	MT	Singapura	França	Paquistão	Espanha	Coréia do Sul	Nova Zelândia	Reunion Island
ES	-	99	99	99	99	98	97	98	98	99	99	92	98	98	96	95	96	91
PA	96	-	99	99	100	98	98	99	99	99	100	92	98	99	97	96	97	90
RN	97	98	-	98	99	98	97	98	98	99	99	92	98	98	96	95	96	90
PR	97	98	98	-	99	97	97	98	98	98	99	92	98	98	96	95	96	90
RS	96	98	98	98	-	98	98	99	99	99	100	92	98	99	97	96	97	90
RI	95	93	93	93	93	-	99	98	98	98	98	91	97	97	95	94	96	89
P	95	93	93	93	93	99	-	98	98	97	98	90	97	97	95	94	96	88
DF	95	93	93	93	93	98	98	-	100	98	99	91	98	98	96	95	96	89
M	95	93	93	93	93	98	98	100	-	98	99	91	98	98	96	95	96	89
Fe	97	98	99	99	98	94	93	94	94	-	99	92	98	98	96	95	96	90
MT	97	98	98	98	98	93	93	94	94	98	-	92	98	99	97	96	97	90
Singapura	87	86	86	87	86	87	87	87	87	87	87	-	92	92	90	90	91	94
França	91	93	84	82	96	97	97	98	97	93	93	87	-	98	96	94	96	90
Paquistão	96	97	98	98	97	93	93	94	94	98	98	86	98	-	97	95	96	91
Espanha	94	92	93	93	92	95	95	96	96	93	93	87	93	93	-	93	96	89
Coréia do Sul	92	91	91	91	91	91	90	91	91	91	91	86	91	91	91	-	93	89
Nova Zelândia	93	93	93	93	92	92	91	92	92	93	93	86	93	93	93	90	-	90
Reunion island	84	85	85	85	85	84	84	84	84	85	86	89	84	85	85	84	84	-
Vietnã	82	83	82	82	82	82	82	82	82	82	83	81	82	83	83	84	82	81

Figura 8 - Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsial dos isolados do ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 4, correção maximum composite likelihood, bootstrap de 1000 replicações

2.3.4 Análise de RFLP

Através da técnica RFLP utilizando a enzima de restrição *HpaII* foi obtido o perfil de digestão de cada isolado brasileiro do ZYMV (Figura 9).

Nota-se que a digestão com essa enzima permite a diferenciação do isolado fraco ZYMV-M da maioria dos isolados severos analisados nesse trabalho.

Figura 9 – Perfil de digestão da enzima *HPAII* em eletroforese de gel de agarose a 0,8% dos produtos de RT-PCR amplificados pelos oligonucleotídeos ZY2 e ZY3 dos 11 isolados do ZYMV. (M) Marcador 1KB plus; (1) ZYMV-DF; (2) ZYMV-RN; (3) ZYMV-PA; (4) ZYMV-P; (5) ZYMV-RI; (6) ZYMV-RS; (7) ZYMV-PR; (8) ZYMV-ES; (9) ZYMV-M; (10) ZYMV-Fe; (11) ZYMV-MT

2.4 Discussão

As reações das espécies estudadas variaram de acordo com os isolados do ZYMV utilizados. Não foi possível agrupar os isolados e diferenciá-los biologicamente. Todas as espécies de cucurbitáceas inoculadas foram infectadas e exibiram sintomas de mosaico. O mosaico variou de fraco a severo, com presença de bolhas e estreitamento do limbo foliar. Esse mesmo comportamento foi relatado para isolados desse potyvirus em outros países. Isolados do ZYMV do sudoeste da França induziam sintomas mais atenuados do que isolados do sudeste e foram diferentes de uma estirpe proveniente da Itália (Lisa & Lecoq, 1984). Nos E.U.A., variabilidade similar aos isolados

da França foi encontrada em relação a isolados de diversas regiões (Provvidenti et al., 1984).

As espécies infectadas com a estirpe fraca ZYMV-M não exibiram sintomas ou estes foram muito fracos. Estirpes fracas do ZYMV são conhecidas na literatura, como a estirpe ZYMV-WK, isolada de meloeiro na França no ano de 1986 (Lecoq et al., 1991; Lecoq e Purcifull, 1992). Gal-On (2000) construiu um clone infeccioso (ZYMV-AG) expressando uma mutação na região da HC-Pro (Helper Component-Proteinase), que alterou a expressão de sintomas severos para atenuados ou ausentes.

Sintoma de lesões locais nas folhas inoculadas variou em função da espécie/variedade e do isolado do ZYMV (Tabela 1), semelhante ao relatado em outros países. Alguns isolados do ZYMV do estudo induziram a formação de lesões locais necróticas nas folhas inoculadas de *C. pepo* cv. Caserta, *C. sativus* cv. Safira, *C. melo* cvs. Caipira e Ouro, além de lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas de *L. cylindrica*. Nos E.U.A, Sudão e Irã foram encontradas lesões locais necróticas ou cloróticas em folhas inoculadas com algumas estirpes do ZYMV em *C. melo* cvs. Rocky Ford, Saticoty, PD 23, PI414723, Agrestis, Conomon, Inodorus, Flexuosus, *C. sativus* cvs. Marketer, Lemon, Chain e Taichung Mou Gua e *C. pepo* cvs. Zucchini Elite, President, Khoy, Pepo, Maragheh (Wang et al., 1992; Mahgoub et al., 1997; Massumi et al., 2011).

A maioria dos isolados induziu lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, exceto o isolado ZYMV-M. Na Tunísia, Sudão, E.U.A e Irã foram observadas lesões locais cloróticas ou necróticas em *C. amaranticolor* e *C. quinoa* dependendo do isolado do ZYMV inoculado (Wang et al., 1992; Mahgoub et al., 1997; Yakoubi et al., 2008; Bananej et al., 2008; Massumi et al., 2011). Lecoq et al. (1991) constataram lesões locais nas folhas inoculadas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* e ocasionalmente infecção sistêmica em *C. quinoa*. Alguns isolados do ZYMV da Austrália induziram manchas cloróticas locais e pequenas lesões cloróticas nas folhas inoculadas de *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, respectivamente. Porém um dos isolados causou infecção latente em *C. quinoa* e induziu poucas lesões cloróticas com halos vermelhos nas folhas inoculadas de *C. amaranticolor* (Coutts et al., 2011).

Em *P. sativum* a infecção foi localizada, representada por lesões locais cloróticas ou ausência de sintomas, em função dos isolados (Tabela 1). No Líbano e Israel isolados do ZYMV foram descritos infectando sistemicamente alguns cultivares de *P. sativum* sem ocasionar sintomas visíveis (Lesemann et al., 1983; Antignus et al., 1989). Há relatos de infecção local para isolados do ZYMV dos E.U.A. e Sudão (Provvidenti et al., 1984; Mahgoub et al., 1997). Em *G. globosa* alguns isolados do estudo induziram infecções locais, latentes ou na forma de lesões locais (Tabela 1). Lecoq et al. (1991) observaram lesões locais em *G. globosa* e em alguns casos, infecção sintomática sistêmica. Quatro isolados do ZYMV do Irã induziram lesões locais necróticas em folhas inoculadas de *G. globosa*, enquanto outros 8 isolados não a infectaram (Bananej et al., 2008).

Entre as não cucurbitáceas, *S. indicum* foi infectada sistemicamente por diferentes isolados do ZYMV, sem expressão de sintomas, exceto para o isolado ZYMV-MT, que induziu sintoma de mosaico atenuado (Tabela 1). Este é o primeiro relato no Brasil de *S. indicum* infectado pelo ZYMV, sob condições experimentais. Mahgoub et al. (1997) no Sudão já haviam observado mosaico severo e deformações foliares em *S. indicum* quando inoculado mecanicamente com o isolado ZYMV-Su.

Os isolados do ZYMV em estudo não infectaram *N. glutinosa*. Massumi et al. (2011) utilizando 21 isolados do ZYMV do Irã também não observaram infecção em *N. glutinosa*. Ocorreu infecção latente sistêmica e local em *N. benthamiana* para alguns isolados do ZYMV estudados (Tabela 1). Infecções latentes sistêmicas ou limitadas à área inoculada em *N. benthamiana* já foram descritas no Líbano e E.U.A. (Lesemann et al., 1983; Wang et al., 1992). Mahgoub & Lecoq (1997) relataram um isolado do ZYMV do Sudão que induzia mosaico severo e deformação foliar em *N. benthamiana*.

P. vulgaris não foi infectada por nenhum dos isolados do ZYMV estudado (Tabela 1). *P. vulgaris* cv. Pinto foi sistemicamente infectado por uma estirpe do ZYMV do Líbano (Lesemann et al., 1983), mas não foi infectada por estirpes da França, E.U.A. e Sudão, as quais ficaram limitadas as folhas inoculadas, que exibiram ou não lesões locais (Lecoq et al., 1981; Provvidenti et al., 1984; Mahgoub et al., 1997). Nos E.U.A, plantas de *P. vulgaris* cvs. Black Turtle e Red kidney inoculadas com isolados do

ZYMV exibiram lesões locais necróticas e cloróticas, respectivamente (Wang et al., 1992). No Sudão um isolado do ZYMV não infectou *P. vulgaris* cv. BTS1, enquanto *P. vulgaris* cv. BTS2 exibiu lesão local clorótica na folha inoculada (Mahgoub et al., 1997). No Irã Bananej et al. (2008) e Massumi et al. (2011) não conseguiram infecção de *P. vulgaris* com nenhum isolado do ZYMV.

O peso molecular da proteína capsidial dos isolados analisados foi em torno de 36 KDa, conforme já descrito por Lisa (1981) e Desbiez & Lecoq (1997) para outros isolados do ZYMV.

Ward et al. (1992) e Shukla et al. (1994) utilizaram como um dos critérios para identificar estirpes/espécies de potyvirus e estabelecer relações filogenéticas a porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial. Segundo Ward et al. (1992) espécies distintas de potyvirus apresentam de 38 a 71% de identidade nas sequências completas de nucleotídeos do gene da proteína capsidial, enquanto estirpes de um mesmo potyvirus têm de 90 a 99% de identidade. O sétimo relatório do International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) (Van Regenmortel et al., 2000) estabeleceu os seguintes critérios moleculares para diferenciação de espécies de potyvirus: identidade da sequência de nucleotídeos da região 3' NTR menor que 75% e identidade da sequência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial menor do que 85%. Em adição devem ser consideradas características da morfologia das partículas, efeitos citopáticos, transmissão, gama de hospedeiros e teste de proteção. O relatório seguinte do ICTV (Fauquet et al., 2005) alterou o critério de identidade da sequência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial para 80% e exclui a sequência de nucleotídeos da região 3' NTR. Adams et al. (2005) sugeriram identidades nas sequências de nucleotídeos do gene CP da ordem de 76 a 77% como valores ótimos de delimitação de espécies. O nono relatório do ICTV estabeleceu os seguintes critérios de diferenciação de espécies: identidade da sequência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial menores que 80% e identidade da sequência de nucleotídeos inferior a 76% na proteína capsidial ou sequência completa do genoma; diferenças nos sítios de clivagem da poliproteína; gama de hospedeiros e hospedeiros diferenciais; ausência

de proteção cruzada; diferenças na morfologia dos corpos de inclusão e propriedades sorológicas. Considerando-se os critérios moleculares propostos por Fauquet et al. (2005), Adams et al. (2005) e o último relatório do ICTV os 11 isolados brasileiros são estirpes do ZYMV.

A árvore filogenética foi gerada a partir de 38 sequências completas de nucleotídeos do gene da proteína capsial formando 3 grupos distintos denominados A, B e C, sendo o grupo A dividido em 4 subgrupos, conforme proposto por Coutts et al. (2011). Desbiez et al. (2002) propuseram 2 grupos filogenéticos, denominados grupo A, dividido em 3 subgrupos abrangendo isolados da Europa, América do Norte e Ásia Oriental e grupo B, limitado a um isolado de Reunion Island. Os grupos A, B, e C correspondem aos grupos I (mundial), II (Vietnã, Reunion Island e Singapura) e III (Vietnã e China) de Ha et al. (2008). Todos os isolados brasileiros do ZYMV pertencem ao grupo A, subdivisões I ou II, indicando uma variação entre os isolados.

Estirpes do ZYMV podem ser classificadas em três patótipos (0,1 ou 2) de acordo com a reação provocada na linhagem PI414723 de meloeiro (Pitrat & Lecoq, 1984). Em estudo realizado por Wassano et al. (2012) os nove isolados severos do ZYMV deste trabalho foram classificados como pertencentes ao patótipo 0, pois não infectaram essa planta. Esse é um forte indicativo de que a PI414723 pode ser utilizada como fonte de resistência em programas de melhoramento genético visando resistência ao ZYMV no Brasil. Variedades obtidas nesse cruzamento têm grande chance de serem resistentes nas diferentes regiões do país onde se cultiva o meloeiro.

A análise de RFLP com a enzima *HpaII* pode ser útil para estudos de proteção envolvendo o isolado fraco ZYMV-M.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 3, p. 459-479, Mar 2005.
- ALDLERRZ, W.C.; PURCIFULL, D.E.; SIMONE, G.W.; HIEBERT, E. Zucchini yellow mosaic virus: a pathogen of squash and other cucurbits in Florida. **Proceedings of the Florida state Horticultural Society**, Tallahassee, v. 96, p.72-74, 1983.
- ALMEIDA, D.P.F. **Cucurbitáceas hortícolas**. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2002.
- AL-MUSA, A.M. Oversummering hosts for some cucurbit viruses in the Jordan valley. **Journal of Phytopathology**, Berlin , v. 127, p. 49–54, 1989.
- ANTIGNUS, Y.; RACCAH, B.; GAL-ON, A.; COHEN, S. Biological and serological characterization of zucchini yellow mosaic and watermelon mosaic virus - 2 isolates in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 17, n. 4, p. 289-298, 1989.
- BALINT, R.; PLOOY, I.; STEELE, C. The nucleotide sequence of zucchini yellow mosaic potyvirus. **International Congress Virology**, Berlin, v. 8.p. 84–107, 1990.
- BANANEJ, K.; KESHAVARZ, T.; VAHDAT, A.; SALEKDEH, G.; GLASA, M. Biological and Molecular Variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 11/12, p. 654-659, Dec 2008. ISSN 0931-1785.
- BERTHEAU, Y.D.; FRECHON, I.K.; TOTH, L.J.; HYMAN. DNA Amplification By Polymerase Chain Reaction (PCR). IN: PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLFF, J.M. **Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on potatoes**. Local:Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.
- BONILHA E.; GIORIA R.; KOBORI R.F.; VECCHIA P.T.D.;, PIEDADE S.M.S, REZENDE J.A.M. Yield of varieties of cucurbita pepo preimmunized with mild strains of papaya ringspot virus – type w and zucchini yellow mosaic virus. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 419-424, 2009.
- CANER, J.; GALLET, S.R.; LOTZ, I.P.M.; OLIVEIRA, J.M. Natural infection of cucumber (*Cucumis sativus*) by zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in Santa Catarina, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 6., 1992. São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1992. p.180.

CHO, J.J.; ULLMAN, D.E.; WHEATLEY, E.; HOLLY, J.; GONSALVES, D.
Commercialization of ZYMV cross protection for zucchini production in Hawai.
Phytopathology, Saint Paul, v.82, p.1073, 1992.

COUTTS, B.A.; KEHOE, M.A.; WEBSTER, C.G.; WYLIE, S.J.; JONES, R.A.C. Zucchini yellow mosaic virus: biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. **Archives of Virology**, New York, v. 156, n. 12, p. 2119-2131, Dec 2011.

DESBIEZ, C.; GAL-ON, A.; GIRARD, C.; WIPF-SCHEIBEL, C. Increase in Zucchini yellow mosaic virus symptom severity in tolerant Zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1478-1484, 2003.

DESBIEZ, C.; LECOQ, H. Zucchini yellow mosaic virus. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 46, n. 6, p. 809-829, Dec 1997.

DESBIEZ, C.; WIPF-SCHEIBEL, C.; LECOQ, H. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus) with special reference to Caribbean islands. **Virus Research**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 5-16, 2002.

FANG, G.; GRUMET, R. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from Zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Philadelphia, v.6, p.358-367, 1993.

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

FROISSART, R. ; MICHALAKIS, Y. ; BLANC, E .Helper component-trans complementation in the vector transmission of plant viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.92, p. 576-579, 2002.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of Zucchini yellow mosaic virus and Watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyvirus. **Bio/Technology**, New York, v.13, p.1466-1473, 1995.

GAL-ON, A. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 467-473, May 2000. ISSN 0031-949X.

GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. **Journal of General Virology**, London, v.73, p. 2183-2187, 1992.

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

HA, C.; REVILL, P.; HARDING, R.M.; VU, M.; DALE, J.L. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 45-60, Jan 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Banco de dados IEA**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>. Acesso em: 05 ago. 2010.

KOCH, P.S. **Análise genética de um cruzamento dialélico em abobrinha (Cucurbita pepo L.)**. 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

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.

LECOQ, H. Cucurbits. In: LOEBENSTEIN, G.; THOTTAPILLY, G. (Ed.). **Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries**. Local: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 665–687.

LECOQ, H.; BOURDIN, D.; RACCAH, B.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D.E. Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1087-1091, 1991.

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

LECOQ, H.; PURCIFULL, D.E. Biological variability of potyviruses, an example - Zucchini yellow mosaic-virus. **Archives of Virology**, New York, p. 229-234, 1992.

LECOQ, H.; PITRAT, M.; CLE´MENT, M. Identification et caracté´risation d’un potyvirus provoquant la aladie du rabougrissement jaune du melon. **Agronomie**, Paris, v.1, p.827–834, 1981.

LESEMANN, D.E.;MAKKOUK, K.M.; KOENIG, R.; NATAFJI SAMMAN, E. Natural infection of cucumbers by zucchini yellow mosaic virus in Lebanon.

Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, v.108, p.304–313, 1983.

LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, V.B.; VALE, C.C. Purification and serology of Zucchini yellow mosaic virus isolated from *Cucumis melo* 'AF-522'. In:ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8.,1996. São Lourenço, MG.**Anais...** São Lourenço, MG.:Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1996. p.278.

LIN, S.S.; HOU, R.F.; YEH, S.D. Heteroduplex mobility and sequence analysis for assessment of variability of Zucchini yellow mosaic virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, p. 228-235, 2000.

LISA, V.; BOCCARDO, G.; D'AGOSTINO, G.; DELLAVALLE,; G,D'AQUILIO, M. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p.667–672, 1981.

LISA, V.; LECOQ H. **Zucchini yellow mosaic virus CMI/AAB**. Kew surrey, 1984. (**Descriptions of plants viruses**, 282).

MAHGOUB, H.A.; DESBIEZ, C.; WIPFSCHIEBEL, C.; DAFALLA, G.; LECOQ, H. Characterization and occurrence of zucchini yellow mosaic virus in Sudan. **Plant Pathology**, Farnhan Royal, v. 46, n. 5, p. 800-805, 1997.

MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, London, v.26,p. 2462-2463, 2010.

MASSUMI, H.; SHAABANIAN, M.; HEYDARNEJAD, J.; POUR, A.H.; RAHIMIAN, H. Host range and phylogenetic analysis of iranian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 93, n. 1, p. 187-193, Mar 2011.

MATTHEWS, R.E.F. Plant virology, 3rd ed. San Diego, CA.:Academic Press, p. 336-342 1991.

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.

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

NAMETH S.T.; DODDS, J.A.; PAULUS, A.O.; KISHABA A. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in southeastern California desert valleys. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, p.785-788, 1985.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência dos vírus do mosaico amarelo e da clorose letal em cucurbitáceas no estado da Bahia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 37, 1999. (Resumo).

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

PEREIRA, M.J.Z.; SUSSEL, A.A.B.; SILVA, R.F.; KUHN, O.J.; DOMINGUES, F.; REZENDE, J.A.M. Danos na produção da abobrinha de moita causados pelo Papaya ringspot virus - type W e Zucchini yellow mosaic virus. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p. 192-194, 2007.

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

PIRONE, T.P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, London, v. 2, p.81-87, 1991.

PITRAT, M.; LECOQ, H. Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 33, p.57-61, 1984.

POLTRONIERI, L.S.; NOVAES, Q.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M.; TRINDADE, D.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; KITAJIMA, E.W. Constatação do Zucchini yellow mosaic virus em cucurbitáceas no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p.669, 2000.

PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; HUMAYDAN, H.S. Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, p.443-446, 1984.

RABELO, L.C. **Seleção de estirpe fraca do Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (Papaya ringspot virus) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita**. 2002. 62p. Dissertação (Mestrado na área de Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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, p. 340-345, 2004.

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, p.55-61, 1994.

ROBINSON, R.W.; PROVVIDENTI, R. Differential response of C. pepo cultivars to strains of ZYMV. **Cucurbit Genetics Cooperative**, Raleigh Rep. v.20,p.58-59,1997.

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

SHUKLA, D.D.;STRIKE, P.M.; TRACY, S.L.; GOUGH,K.H.; WARD,C.W. The N and C termini of the coat protein of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. **Journal of General Virology**, London, v.69, p. 1497-1508, 1988.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.;BRUNT, A.A. **The Potyviridae. Centre for Agriculture and Biosciences International**. Cambridge:Cambridge University Press. 1994. p. 360-371.

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. (Resumo).

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Introduction to the species concept in virus taxonomy. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.;LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. ;WICKNER, R.B. 2000. (Ed.) Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego:Academic Press., 2000. p. 3–16.

VEGA, J.;REZENDE, J.A.M.; VUKI, V.A.; NAGAI, H. Constatação do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita (“zucchini yellow mosaic virus”) no Brasil, através de MEIAD e ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília,v. 17, p. 118, 1992. (Resumo).

ZHAO, M.F.; CHEN, J.; ZHENG, H.Y.; ADAMS, M.J.; CHEN, J.P. Molecular analysis of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Hangzhou, China. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 307-311, 2003.

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

WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; ZITTER, T.A. Comparative biological and serological properties of four strains of zucchini yellow mosaic virus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 5, p. 530-535, 1992.

WARD, C.W.; MCKERN, N.M.; FRENKEL, M.J.; SHUKLA, D.D. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. **Archives of Virology**, New York, p. 283-297, 1992.

WASSANO, D.T.; SPADOTTI, D.M.A.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. Identificação de patótipos do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de isolados brasileiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, 2012. (Resumo).

YAKOUBI, S.; DESBIEZ, C.; FAKHFAKH, H.; WIPF-SCHEIBEL, C.; FABRE, F.; PITRAT, M.; LECOQ, H. Molecular, biological and serological variability of Zucchini yellow mosaic virus in Tunisia. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 57, n. 6, p. 1146-1154, Dec 2008.

YARDEN, G.; HEMO, R.; LIBEN, H.; MAOZ, E.; LEV, E.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Cross- protection of Cucurbitaceae from Zucchini yellow mosaic virus potyvirus. **Acta-Horticulturae**, The Hague, v.510, p.349-356, 2000.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos 11 isolados do ZYMV

>ZYMV-DF

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCTACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTAACAGGCTCCGGCTCAGGTGAGAAAACGGT
AGCAGCTGTCACGAAGGATAAGGATGTGAATGCTGGTTCCCATGGGAAGATTGTG
CCGCGTCTTTCAAAGATCACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGT
GATACTCGATATCGATCATTTGCTAGAATATAAGCCGGATCAAATTGAGTTATATAA
CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTTGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTCAAACAGAATA
CGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTGATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGTA
TTGAAAATGGCACCTCACCCGACATTAATGGAGTGTGGGTTATGATGGACGGAAAT
GAACAAGTTGAGTATCCTTTGAAACCGATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCG
GCAAATAATGCACCATTTTTTCAGATGCAGCAGAGGCATATATAGAGATGAGAAATG
CAGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACCTACGGGATAGGAG
CTTAGCACGATACGCTTTTCGATTTCTATGAAGTCACTTCTAAACTCCTGAAAGAGC
CCGTGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGT
TGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACT
GCACGTGATGTTAATAGAAACATGCACACCTTACTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-DF

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AV
TKDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL E
YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVQTEYDLNEQQMGVVM
NGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS

LARYAFDFYEVTSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGL
 DGNVATTSEDTERHTARDVNRRNMHTLLGVNTMQ
 >ZYMV-RN

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
 ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTCACGGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGT
 GGCAGCTGTCACGAAGGACAAGGACGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTG
 CCGCGTCTTTTGAAGATAACAAAGAAGATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGT
 GATACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTATAA
 CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTAAACAGAATA
 TGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCA
 TTGAAAATGGCACGTCACCCGACATTACCGGAATATGGGTTATGATGGACGGGAAT
 GAGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCG
 ACAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGC
 AGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAACTTACGGGATAGGAGTT
 TGGCACGATATGCTTTTCTGACTTTTACGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCC
 CGCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTT
 GTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTG
 CACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-RN

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAV
 TKDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL
 YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQQMGVVM
 NGFMVWCIENGTS PDINGIWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
 PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
 LARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGL
 DGNVATTSEDTERHTARDVNRRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-PA

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTTACAGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGTG
GCAGCTGTCACGAAGGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTGCC
GCGTCTTTCGAAGATAACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTGA
TACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTACAACA
CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAATCAAGTTAAAACAGAATATG
ATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCATT
GAAAATGGCACGTCACCCGACATTAATGGAGTATGGGTTATGATGGACGGGAATGA
GCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTCGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGAC
AAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAG
AGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTTG
GCACGATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTCAATTCGAAAACCTCCGGAAAGAGCCCG
CGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTCAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGT
TCGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGC
ACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGTTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-PA

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA
TKDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDH
LLEYKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQQMG
VVMNGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPI
VENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGL
LRNLRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAAL
SNVSSRLFGLDGNVATTSEDTERHTARDVNRNMHTLLG
VNTMQ

>ZYMV-P

TCAGGCATTTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCTACAAAGAAAGACAAAGAAG
 ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTAACAGGCTCCGGCTCAGGTGAGAAAACAGT
 AGCAGCTGTACGAAGGATAAGGATGTAAAAGCTGGTTCCCATGGAAAGATCGTGC
 CGCGTCTTTCAAAGATCACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTG
 ATACTTGATATCGATCATTTGCTAGAATATAAGCCGGATCAAATTGAGTTATACAACA
 CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCATCTTGGTTCAACCAAGTTCGAACAGAATAC
 GATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTATGATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGTATT
 GAAAATGGCACCTCACCCGACATTAATGGAGTGTGGGTTATGATGGACGGAAATGA
 ACAAGTTGAGTATCCTTTGAAACCGATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGGC
 AAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCAGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAG
 AGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACCTACGGGATAGGAGTTTA
 GCACGATATGCTTTTCGATTTCTATGAAGTCACTTCTAAAACTCCTGAAAGAGCCCGT
 GAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTT
 TGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCA
 CGTGATGTTAATAGAAACATGCACACCTTACTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-P

SGIQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AVT
 KDKDVKAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL EY
 KPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVRTEYDLNEQQMGVMMN
 GFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKP
 TLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRSL
 ARYAFDFYEVTSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGLD
 GNVATTSEDTERHTARDVNRMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-RI

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCTACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTAACAGGCTCCGGCTCAGGTGAGAAAACAGT
AGCAGCTGTCACGAAGGATAAGGATGTAAAAGCTGGTTCCCATGGAAAGATCGTGC
CGCGTCTTTCAAAGATCACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTG
ATACTTGATATCGATCATTTGCTAGAATATAAGCCGGATCAAATTGAGTTATACAACA
CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCATCTTGGTTCAACCAAGTTCGAACAGAATAC
GATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTATGATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGTATT
GAAAATGGCACCTCACCCGACATTAATGGAGTGTGGGTTATGATGGACGGAAATGA
ACAAGTTGAGTATCCTTTGAAACCGATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGGC
AAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCAGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAG
AGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACCTACGGGATAGGAGTTTA
GCACGATATGCTTTTCGATTTCTATGAAGTCACTTCTAAACTCCTGAAAGAGCCCGT
GAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTT
TGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCA
CGTGATGTTAATAGAAACATGCACACCTTACTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-RI

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AV
TKDKDVKAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL E
YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVRTEYDLNEQQMGVMM
NGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
LARYAFDFYEVT SKTPERAREAVAQMKA AALS NVSSRLFGL
DGNVATTSEDTERHTARDVN RNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-RS

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
 ATGATAAAGGGAAAAACAAGGATGTTACAGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGTG
 GCAGCTGTCACGAAGGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTGCC
 GCGTCTTTCGAAGATAACAAAGAAGATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTGA
 TACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATCGAGTTGTACAACA
 CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAGGTTAAACAGAATAT
 GATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCAT
 TGAAGATGGCACGTCACCCGACATTAACGGAGTATGGGTTATGATGGACGGGAATG
 AGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTACGA
 CAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCA
 GAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAACTTACGGGATAGGAGTTT
 GGCACGATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTTAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCC
 GTGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTG
 TTCGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGC
 ACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-RS

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAHV
 TKDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL
 YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQQMGVVM
 NGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
 PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
 LARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGL
 DGNVATTSEDTERHTARDVNRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-PR

TCAAACACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTTACAGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGTG
GCAGCTGTCACGAAGGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTGCC
GCGTCTTTCGAAGATAACAAAGAAGATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTGA
TACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTACAACA
CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTAAACAGAATATG
ATCTGAATGAGCAACAGGTGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCAATT
GAAAATGGCACGTCACCCGACATTAAACGGAGTATGGGTTATGATGGACGGGAATG
AGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGA
CAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCA
GAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTT
GGCACGATATGCTTTCGACTTCTACGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCC
GCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTG
TTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGGCACACTGC
ACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-PR

SNTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AVT
KDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL E
YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQQVGVVM
NGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
LARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAAALSNVSSRLFGL
DGNVATTSEDTERHTARDVNRMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-ES

TCAGACACTCAACCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCTACAAAGAAAGACAAAGAAGA
TGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTAACAGGCTCCGGCTCAGGTGAGAAAACGGTA
GCAGCTGTCACGAAGGATAAGGATGTGAATGCTGGTTCCCATGGGAAGATTGTGC
CGCGTCTTTCAAAGATCACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTG
ATACTCGATATCGATCATTTGCTAGAATATAAGCCGGATCAAATTGAGTTATACAAC
ACACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTAAACAGAATAT
GATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCAT
TGAAAATGGCACGTCACCCGACATTAACGGAGTATGGGTTATGATGGACGGGAATG
AGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGA
CAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCA
GAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTT
GGCACGATATGCTTTGACTTTTACGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCC
GCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTG
TTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGGCACACTGC
ACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTCGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-ES

SDTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AVT
KDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLL E
YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQQMGVVM
NGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
LARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGL
DGNVATTSEDTERHTARDVNRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-M

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCTACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTAACAGGCTCCGGCTCAGGTGAGAAAACGGT
AGCAGCTGTCACGAAGGATAAGGATGTGAATGCTGGTTCCCATGGGAAGATTGTG
CCGCGTCTTTCAAAGATCACAAAGAAAATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGT
GATACTCGATATCGATCATTTGCTAGAATATAAGCCGGATCAAATTGAGTTATATAA
CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTTGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTCAAACAGAATA
CGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTGATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGTA
TTGAAAATGGCACCTCACCCGACATTAATGGAGTGTGGGTTATGATGGACGGAAAT
GAACAAGTTGAGTATCCTTTGAAACCGATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCG
GCAAATAATGCACCATTTTTTCAGATGCAGCAGAGGCATATATAGAGATGAGAAATG
CAGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACCTACGGGATAGGAG
CTTAGCACGATACGCTTTTCGATTTCTATGAAGTCACTTCTAAAACTCCTGAAAGAGC
CCGTGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGT
TGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGGCACACT
GCACGTGATGTTAATAGAAACATGCACACCTTACTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-M

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVA AV
TKDKDVNAGSHGKIVPRLSKITKKMSLPRVKGNVILDIDH LLE
YKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVQTEYDLNEQQMGVVM
NGFMVWCIENG TSPDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK
PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRS
LARYAFDFYEVT SKTPERAREAVAQMKA AALS NVSSRLFGL
DGNVATTSE DTERHTARDVN RNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-MT

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCCGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTTACAGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGTG
GCAGCTGTCACGAAGGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTGCC
GCGTCTTTCGAAGATAACAAAGAAGATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTGA
TACTCGATATTGATCACTTGTTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTACAACA
CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTAAACAGAAATATG
ATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCATT
GAAAATGGCACGTCACCCGACATTAATGGAGTATGGGTTATGATGGACGGAAATGA
GCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGAC
AAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAG
AGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTTG
GCACGATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCCG
CGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAACGTTTCTTCAAGGTTGT
TTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCA
CGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-MT

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGSGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPR
LSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLLLEYKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQ
QMGVVMNGFMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHF
SDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMK
AAALSNVSSRLFGLDGNVATTSEDTERHTARDVNRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV-Fe

TCAGGCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAGAAAGACAAAGAAG
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTTACAGGCTTTGGTTCAGGTGAGAAAACAGTG
GCAGCTGTCACGAAGGACAAGGATGTGAATGCTGGTTCTCATGGGAAAATTGTGCC
GCGTCTTTCGAAGATAACAAAGAAGATGTCACTGCCACGCGTGAAAGGAAATGTGA
TACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTACAACA
CACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTTCAACCAAGTTAAACAGAATATG
ATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCATT
GAAAATGGCACGTCACCCGACATTAACGGAGTATGGGTTATGATGGACGGGAATG
AGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGA
CAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCA
GAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAACTTACGGGATAGGAGTTT
GGCACGATATGCTTTGCACTTCTATGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCC
GCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTG
TTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGC
ACGTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAG

>ZYMV-Fe

SGTQPTVADAGATKKDKEDDKGKNKDVTGFGSGEKTVAAVTKDKDVNAGSHGKIVPR
LSKITKKMSLPRVKGNVILDIDHLLLEYKPDQIELYNTRASHQQFASWFNQVKTEYDLNEQ
QMGVVMNGFMVWCIENGTSPDINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHF
SDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRNLRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMK
AAALSNVSSRLFGLDGNVATTSEDTERHTARDVNRMHTLLGVNTMQ