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

**Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores
microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow
mosaic virus* (ZYMV)**

Líllian Beatriz Januario Bibiano

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

**Piracicaba
2016**

Líllian Beatriz Januario Bibiano
Engenheira Agrônoma

**Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores
microsatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow mosaic
virus* (ZYMV)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Bibiano, Lillian Beatriz Januario

Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) / Lillian Beatriz Januario Bibiano. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

65 p. : il.

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

1. *Cucumis melo* 2. PTA-ELISA quantitativo 3. Virose de plantas 4. Resistência genética
5. Fontes de resistência 6. Melhoramento genético I. Título

CDD 635.61
B581a

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

*Aos meus amados pais João Bosco e Maria Aparecida e a minha irmã Aline pelo
amor, incentivo e apoio.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos recebidas e pela fé que me permite seguir em frente.

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

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

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP, pela ajuda e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Viçosa por contribuir grandemente na minha formação acadêmica.

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

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela valiosa ajuda na dissertação e pelos ensinamentos em Virologia Vegetal.

Ao laboratório de Virologia Vegetal e a todos que me auxiliaram na realização dos ensaios.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, pela contribuição com sementes e amostras. Em especial, ao professor Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes por toda ajuda recebida.

À empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA pelo fornecimento de materiais e equipamentos. Em especial, à pesquisadora Olga Satie Suzuki, pela disposição em ajudar com as análises e pela grande contribuição no meu crescimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular (LGM) pela amizade e pelos momentos de alegria e risadas: Mariana Cicarelli Cia, Fernanda Moretti, Vanessa Macedo, Raphael Severo e Aline Zavaglia.

À Débora Targino Wassano e Maísa Curtolo pelos ensinamentos teóricos e práticos, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos Sarah Galvão e Leonardo Miranda pelo apoio e pela amizade antiga e verdadeira.

A todos os amigos fitopatologistas que me auxiliaram grandemente ao longo desta caminhada e pela amizade sincera, em especial, Mariane Ishizuka, Thays Benites e Victor Hugo Moura.

As amigas de república Thalita Cardoso, Fabiana Moreira e Daiana Bampi, pela boa convivência e amizade.

A todos os amigos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, em especial, Alexandre Magno, Elias Feitosa, Rafael Mauri e Elaine Galvão.

Aos familiares que torcem pelo meu sucesso e se alegram com minhas vitórias. Amo todos vocês!

Ao meu namorado Pedro Confort pelo apoio constante, amor, companheirismo e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais João Bosco Bibiano e Maria Aparecida Bibiano e minha irmã Aline Bibiano, por serem meu porto seguro, por me oferecerem o amor mais puro e por sempre lutarem ao meu lado. Devo essa vitória a vocês!

Obrigada a todos!

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando. Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu. ”

Luis Fernando Veríssimo

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão bibliográfica	19
2.1.1 A cultura do meloeiro.....	19
2.1.2 Doenças causadas por potyvirus.....	20
2.1.3 Resistência de meloeiro ao ZYMV.....	23
2.2 Material e métodos	26
2.2.1 Material vegetal	26
2.2.2 Isolado de ZYMV	26
2.2.3 Avaliação da resistência da população segregante F2	26
2.2.4 Genotipagem da população F2 com marcadores microssatélites	28
2.2.5 Confirmação da ligação dos marcadores SSRs ao gene <i>Zym-2</i>	31
2.2.6 Avaliação de acessos de meloeiro para resistência ao ZYMV	31
2.3 Resultados	32
2.3.1 Avaliação da resistência da população segregante F2	32
2.3.2 Genotipagem da população F2 com marcadores microssatélites	34
2.3.3 Análise de ligação entre marcadores SSRs e o gene <i>Zym-2</i>	36
2.3.4 Avaliação de acessos de meloeiro para resistência ao ZYMV	38
2.4 Discussão.....	40
3 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

As viroses causam perdas significativas na cultura do melão. Dentre essas, o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus*- ZYMV) possui grande importância para a cultura e é encontrado em todos os locais de plantio de cucurbitáceas. O controle desse vírus através da resistência genética é a forma mais eficiente de manejo. O acesso PI414723 é a única fonte de resistência de meloeiro ao ZYMV. Essa resistência é oligogênica e supostamente condicionada por três genes dominantes: *Zym-1*, *Zym-2* e *Zym-3*. A localização cromossômica do gene *Zym-1* já foi confirmada no grupo de ligação 2, próximo ao marcador CMAG36. Entretanto, a localização de *Zym-2* ainda carece de confirmação experimental, muito embora existam evidências de sua localização no grupo de ligação 10 (LGX). Sendo assim, um dos objetivos do presente trabalho foi confirmar a localização do gene *Zym-2* através de análises de ligação com marcadores microssatélites (SSRs). Para tanto, foi utilizada uma população F2 derivada do cruzamento PI414723 x 'Védrantais'. As plantas foram inoculadas mecanicamente com o isolado RN6-F, patótipo 0, duas vezes em um intervalo de 24 h. A confirmação da infecção e a quantificação dos títulos virais nas plantas F2 foram realizadas através do teste PTA-ELISA. O DNA genômico das plantas foi extraído da primeira folha verdadeira e utilizado nas reações de PCR com *primers* específicos para SSRs selecionados pertencentes ao LGX. Observou-se uma distribuição assimétrica de classes de absorvância e maior frequência de indivíduos F2 na classe com menor valor (0,1 a 0,2), sugerindo a existência de um gene de efeito maior. O teste chi-quadrado mostrou que todos os marcadores segregaram na frequência esperada (1:2:1), exceto o marcador CMCT134b. A ligação do *Zym-2* aos marcadores foi confirmada por meio de regressão linear simples. Dos marcadores analisados, a regressão linear foi significativa para MU6549 e CMBR55, com p-valores de 0,011 e 0,0054, respectivamente. As análises de ligação mostraram que as ordens e as distâncias entre os marcadores condizem com os mapas presentes na literatura. Um segundo objetivo do estudo foi o de avaliar a reação ao ZYMV de 42 acessos de meloeiro oriundos da região Nordeste do Brasil, com o intuito de explorar novas fontes de resistência. Foram realizados dois experimentos utilizando a mesma metodologia citada anteriormente. O título viral médio entre os acessos variou de 0,123 a 0,621 no experimento 1 e de 0,019 a 0,368 no experimento 2. Alguns acessos apresentaram consistentemente baixos títulos virais, próximos aos do acesso resistente PI414723 e dos controles negativos (plantas não inoculadas da cultivar 'Védrantais'). Portanto, estes acessos mostram-se como potenciais fontes de resistência ao vírus para o emprego em programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Cucumis melo*; PTA-ELISA; Virose de plantas; Resistência genética; Fontes de resistência, Melhoramento genético

ABSTRACT

Linkage analysis of *Zym-2* resistance gene with microsatellite markers and reaction of melon accessions to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

Viruses cause significant losses in the melon crop. Among these, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) is of great importance and is ubiquitous in cucurbit crops. The control of this virus through genetic resistance is the most efficient management strategy. PI414723 is the only source of resistance to ZYMV in melon. This resistance is oligogenic and is supposed to be conditioned by three dominant genes: *Zym-1*, *Zym-2* and *Zym-3*. While the chromosomal location of *Zym-1* gene has been determined to be close to the CMAG36 marker in linkage group 2, the location of *Zym-2* still lacks experimental confirmation, although there is some preliminary evidence that it is located in the linkage group 10 (LGX). Thus, one objective of this study was to confirm the chromosomal location of *Zym-2* through linkage analysis with microsatellite markers (SSRs). To this, F₂ plants population derived from the cross PI414723 x 'Védrantais' were used as a segregating population. The plants were mechanically inoculated twice with isolate RN6-F, pathotype 0, at an interval of 24h. Confirmation of the infection and the quantification of viral titers in F₂ plants were conducted using the PTA-ELISA technique. Plant genomic DNA was extracted from the first true leaf and used in PCR reactions using specific primers for selected SSRs belonging to LGX. An asymmetric distribution of absorbance classes was observed as well as a higher frequency of F₂ individuals in the classes with lower values (0.1 to 0.2), confirming the presence of the major gene *Zym-1*. The chi-square test showed that all markers segregated according to the expected frequency (1: 2: 1), except for the CMCT134b marker. Linkage analysis among markers showed that the orders and distances between markers were consistent with published linkage maps. Linkage of *Zym-2* to the markers was investigated by simple linear regression. Of the analyzed markers, the linear regression was significant for MU6549 and CMBR55, with p-values of 0.011 and 0.0054, respectively. Thus, the location of *Zym-2* was determined in LGX. A second objective of the study was to evaluate the reaction to ZYMV of 42 melon accessions from the Northeastern Brazil, in order to discover new sources of resistance. For this, two experiments were conducted using the same inoculation and evaluation procedures previously described. The mean viral titer between accessions ranged from 0.123 to 0.621 in experiment 1 and between 0.019 to 0.368 in the experiment 2. Some accessions consistently showed low viral titers, similar to the resistant access PI414723 and the negative controls (non-inoculated plants of the cultivar 'Védrantais'). Therefore, these accessions are potential sources of resistance to be employed in breeding programs.

Keywords *Cucumis melo*; PTA-ELISA; Plant viruses; Genetic resistance; Sources of resistance; Breeding

1 INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma olerícola de grande relevância socioeconômica pertencente à família Cucurbitaceae. A produção mundial de melão atingiu 32 milhões de toneladas em 2012, sendo a China o maior produtor do fruto (FAOStat, 2015). O Brasil é um dos maiores produtores de melão da América do Sul e produziu 575 mil t em 2012, atingindo a nona posição no ranking mundial (FAOStat, 2015). A região Nordeste domina a produção de melão no país (MOURA et al., 2011; DANTAS et al., 2015).

As perdas na cultura do melão podem ser significativas devido a problemas fitossanitários, dentre os quais as viroses têm sido relatadas com frequência nos últimos anos (KUROZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). No Brasil, já foram descritos diversos vírus infectando o meloeiro: o vírus do mosaico do mamoeiro -estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type W - PRSV-W); o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*-CMV); o vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus*- SqMV); o vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus*-WMV); o vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (*Zucchini yellow mosaic virus*-ZYMV); o vírus da clorose letal da abobrinha-de-moita (*Zucchini lethal chlorosis virus*-ZLCV) e o vírus do amarelão do meloeiro, provavelmente um crinivírus da família *Closteroviridae* que é transmitido por mosca-branca (KUROZAWA et al., 2005; LIMA, 2011).

O ZYMV, pertencente ao gênero *Potyvirus*, é encontrado em todos os locais de plantio de cucurbitáceas (LISA et al., 1981; SPADOTTI, 2012). Esse vírus foi encontrado no Brasil nas culturas da melancia em São Paulo e do pepino em Santa Catarina, no início da década de 90 (KUROZAWA et al., 2005). A incidência de ZYMV aumentou no país ao longo dos anos e o vírus provavelmente já está presente em todos os estados brasileiros (YUKI et al., 2000; MOURA et al., 2001; HALFELD-VIEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2009; SPADOTTI, 2012). Plantas infectadas pelo ZYMV apresentam descoloração internerval e um severo mosaico amarelo, além de subdesenvolvimento da planta. Pode ocorrer redução tanto na quantidade quanto na qualidade dos frutos quando estes apresentam rachaduras, tornando-se inviáveis à comercialização (KUROZAWA et al., 2005; LIMA, 2011).

O controle preventivo do ZYMV em meloeiro é o mais recomendado, pois os vírus são parasitas obrigatórios e dificilmente existem medidas para impedir sua

replicação (KUROSZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). Contudo, quando o vírus já está disseminado no local de plantio, o controle através de cultivares resistentes ou tolerantes é sempre a forma mais aconselhável de manejo, devido à alta eficácia, fácil uso e baixo impacto ambiental (DESBIEZ e LECOQ, 1997; MOURA, 2005).

O acesso PI414723 é a única fonte de resistência comercial ao ZYMV (DESBIEZ e LECOQ, 1997, DANIN-POLEG, 2002). Sendo assim, é importante a busca por novas fontes visando selecionar genótipos resistentes com potencial utilização nos programas de melhoramento da cultura. A resistência de PI414723 foi inicialmente descrita por LECOQ e PITRAT (1984) como sendo controlada por um único gene dominante, denominado *Zym*, localizado no grupo de ligação 4 de seu mapa genético (PITRAT, 1991). Esse gene foi posteriormente designado *Zym-1* e realocado ao grupo de ligação 2 (LGII), próximo ao marcador microssatélite CMAG36 (PÉRIN et al., 2002). Estudos posteriores baseados no cruzamento entre PI414723 e a cultivar suscetível 'Dulce' mostraram que a resistência ao ZYMV era, na verdade, oligogênica e possivelmente condicionada por três genes dominantes e de ação aditiva, denominados *Zym-1*, *Zym-2* e *Zym-3* (DANIN-POLEG et al., 1997), indicando que os três são necessários para um alto nível de resistência, já que a falta de um desses resultará na suscetibilidade da planta (DANIN-POLEG et al., 2002).

DANIN-POLEG et al. (2002) confirmaram a ligação próxima entre o marcador microssatélite CMAG36 e o gene *Zym-1*, como já relatado em outros trabalhos (PITRAT, 1991; PÉRIN et al., 2002). Entretanto, os autores mostraram evidências de ligação entre um possível segundo gene, denominado *Zym-2*, e o marcador microssatélite CMCT134b, localizado no grupo de ligação X (LGX) segundo PÉRIN et al. (2002). Sendo assim, os autores relataram a necessidade de uma análise mais precisa utilizando mais marcadores moleculares para determinar a localização exata do *Zym-2* (DANIN-POLEG et al., 2002).

WASSANO (2013) estudou a ligação entre locos de marcadores microssatélites e resistência ao ZYMV em populações F2 do cruzamento PI414723 x 'Védrantais' e reuniu evidências que o gene *Zym-2* provavelmente está de fato localizado no grupo de ligação X (PÉRIN et al., 2002) próximo ao marcador CMBR55. Entretanto, este posicionamento não foi confirmado em um segundo experimento de validação, provavelmente por ser este um gene cujos efeitos fenotípicos não são de grande

magnitude e, portanto, muito influenciáveis pelas condições ambientais (DANIN-POLEG et al., 2002; WASSANO, 2013).

Diante desses fatos, o objetivo do presente trabalho foi confirmar a localização do gene *Zym-2* no grupo de ligação X através da análise quantitativa da resistência por PTA-ELISA, utilizando uma população F2 oriunda do mesmo cruzamento analisado por WASSANO (2013). Ademais, objetivou-se avaliar a reação ao ZYMV de acessos brasileiros de meloeiro oriundos da região Nordeste com o intuito de obter novas fontes de resistência, além de PI414723, que possam contribuir para o controle eficiente do vírus.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A cultura do meloeiro

O meloeiro pertence à família das cucurbitáceas que reúne espécies importantes como a abóbora (*Cucurbita spp.*), a abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo L.*), o pepino (*Cucumis sativus L.*) e a melancia (*Citrullus lanatus Thunb.*). Apesar da discordância entre os historiadores quanto à sua origem, existem relatos de que a Ásia e a África compreendem seus centros de origem (SEBASTIAN et al., 2010). A China é o maior produtor mundial de melão, com produção aproximada de 17 milhões de toneladas no ano de 2012, sendo que o país também possui a maior área cultivada do fruto (FAOStat, 2015). O Brasil é um dos maiores produtores de melão da América do Sul e produziu 575 mil toneladas do fruto no ano de 2012 (FAOStat, 2015). O melão ocupou o primeiro lugar no ranking das exportações brasileiras de frutas em 2014 totalizando 196,8 mil toneladas, mostrando a importância da fruta no total das vendas no Brasil (APEX/BRASIL, 2014). O cultivo dessa olerícola no país representa uma importante atividade do ponto de vista socioeconômico, por ser desenvolvida principalmente por pequenos produtores em áreas tipicamente de agricultura familiar (EMBRAPA, 2014).

No Brasil, a produção é baseada em cultivares híbridas pertencentes aos grupos Inodorus e Cantalupensis, que se incluem na subespécie *melo* (DANTAS et al., 2015). As cultivares do grupo Inodorus, representadas pelos tipos “Amarelo”, polpa alaranjada e Pele de Sapo são as preferidas pelos produtores (NUNES et al., 2005). Sendo o meloeiro uma planta típica de clima quente, a região Nordeste possui as condições ideais ao seu cultivo com temperaturas elevadas, de 24 a 32 °C, associadas à alta radiação solar de 2.000 a 3.000 horas/ano (EMBRAPA, 2014), incluindo principalmente os estados do Ceará-CE e Rio Grande do Norte-RN (NUNES et al., 2005). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, o RN foi o maior produtor de melão em 2014 e a produção chegou a aproximadamente 232 mil toneladas na região, com destaque para a cidade de Mossoró (IBGE, 2014). Devido à forte seca que atingiu a região em 2015, os produtores de melão tiveram sérios problemas e as fazendas reduziram a produção. Neste contexto, o CE passou a ser o maior produtor e exportador de melão do Brasil

atingindo o equivalente a 62% do total exportado no país em 2015 (ADECE, 2014). O estado do CE se destaca por exportar cerca de seis variedades da fruta e por ter regiões propícias ao cultivo. Na safra 2015/16, provavelmente, haverá diminuição da área plantada por falta de água para irrigação nesses estados (CEPEA, 2016).

2.1.2 Doenças causadas por potyvirus

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, abrangendo mais de 140 espécies (HULL, 2002). Esses vírus são amplamente distribuídos no mundo e infectam uma ampla gama de hospedeiros. Todos os potyvirus formam inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, conhecidas como “cataventos”, sendo essa uma característica relevante para a diagnose (LISA, 1981; DESBIEZ e LECOQ, 1997; ZERBINI et al., 2006).

Os vírus PRSV-W, WMV e ZYMV, pertencentes ao gênero *Potyvirus*, causam os danos mais severos ao meloeiro (LIMA, 2011). De maneira geral, as plantas infectadas apresentam um severo mosaico amarelo, bolhas, redução do limbo foliar e do desenvolvimento da planta. A qualidade dos frutos também é severamente afetada e esses podem ser malformados ou apresentar mudança de coloração (KUROSZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). Em meloeiro, as sementes ficam deformadas e apresentam baixa taxa de germinação (DESBIEZ e LECOQ, 1997). LIMA e ALVES (2011) realizaram um levantamento das principais viroses que infectam as cucurbitáceas em áreas produtoras de sete estados do Brasil entre 2008 a 2010. Dentre os potyvirus, o ZYMV foi o segundo vírus mais frequente assim como o WMV, correspondendo a 27,7% das amostras analisadas, sendo que o PSRV-W foi o de maior incidência (LIMA e ALVES, 2011). Sendo assim, o ZYMV é considerado economicamente importante nas cucurbitáceas de uma maneira geral, já que todas são suscetíveis e sofrem severos danos (LIMA, 2011). Perdas na produção podem ser significativas devido aos danos causados por viroses, principalmente pela frequente ocorrência destas enfermidades em lavouras nos últimos anos (KUROSZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). Na Califórnia, região de clima quente, o ZYMV causou uma redução de até 50% na produção de frutos de melão numa área de 7.500 ha (NAMETH et al., 1985). No Brasil, PEREIRA et al. (2007) mostraram que a perda na produção de frutos de abobrinha-de-moita cv. Caserta pode chegar a 100% quando as plantas são inoculadas com ZYMV. BLUA et al. (1989) relataram que, caso a infecção com o ZYMV ocorra durante a fase vegetativa

ou antes do florescimento, a redução na produtividade pode chegar a 94% e 76%, respectivamente.

A transmissão dos potyvirus é feita com maior eficácia pelos afídeos *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* de maneira não persistente, ou seja, a aquisição das partículas virais pelo vetor em plantas infectadas e a transmissão para plantas saudáveis ocorre durante as picadas de prova do inseto. Esses insetos possuem aparelho bucal do tipo sugador e adquirem os vírus ao se alimentar de plantas infectadas introduzindo os estiletes nas células do mesófilo. Dessa forma, o inseto pode transmitir o vírus logo após a sua aquisição e por isso são eficientemente transmitidos para outras plantas que o inseto não coloniza (KUROZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). Esse relacionamento inseto-vetor do tipo não persistente permite a transmissão do vírus em inoculações mecânicas através de extrato foliar tamponado para fins experimentais (ZERBINI et al., 2006). Por outro lado, o controle do inseto-vetor por meio de inseticidas não é eficiente neste caso, já que a transmissão ocorre em poucos segundos; é provável ainda que o inseticida até aumente a incidência do vírus devido à excitação no inseto provocada pelo produto (KUROZAWA et al., 2005; ZERBINI et al., 2006).

Com o intuito de reduzir a incidência de viroses, o controle preventivo é o mais recomendado, pois não existe forma eficaz para impedir a replicação dos vírus (KUROZAWA et al., 2005; LIMA, 2011). Algumas medidas que visam destruir potenciais hospedeiros ou restos de cultura podem, em tese, até ser eficientes. Por exemplo, o PRSV-W pode sobreviver em cucurbitáceas infectadas que permanecem do plantio anterior e o ZYMV possui plantas daninhas e ornamentais como potenciais hospedeiras, incluindo a begônia (LIMA, 2011; LECOQ et al., 2014). No entanto, essas práticas culturais não são adotadas em plantios comerciais devido aos custos. Sendo assim, o controle de doenças causadas por vírus utilizando cultivares resistentes é a forma mais viável de manejo (DESBIEZ e LECOQ, 1997; MOURA, 2005).

O ZYMV apresenta partículas alongadas e flexuosas com cerca de 680-730 nm de comprimento por 11-13 nm de diâmetro e possui o genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples de sentido positivo (DESBIEZ e LECOQ, 1997). Seu genoma está ligado a uma proteína de origem viral, a VPg, na extremidade 5' e à uma cauda poli-A na extremidade 3' (BRUNT et al., 1996; HULL, 2002). O RNA contém uma única ORF que codifica uma poliproteína de mais de 340

kDa, que é clivada pelas proteases do próprio vírus (LISA, 1981; DESBIEZ e LECOQ, 1997). As proteínas do ZYMV são multifuncionais e atuam em quase todas as etapas do ciclo de infecção viral, envolvendo a replicação, o movimento célula-a-célula, o movimento sistêmico e a transmissão pelo inseto-vetor (ZERBINI et al., 2006).

O primeiro relato da ocorrência do ZYMV foi feito na Itália em 1973, causando amarelecimento, deformação de folhas e frutos em abobrinha (LISA, 1981; DESBIEZ e LECOQ, 1997). Esse vírus foi detectado no Brasil no início da década de 90, nas culturas da melancia em São Paulo e do pepino em Santa Catarina (KUROSAWA et al., 2005). O ZYMV aumentou sua disseminação no país ao longo dos anos e já foi identificado em cucurbitáceas em vários estados, incluindo Ceará, Bahia, Rio Grande do Norte, Pará, Mato Grosso do Sul e Maranhão (YUKI et al., 2000; MOURA et al., 2001; HALFELD-VIEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2009; SPADOTTI, 2012). Atualmente, é provável que esse vírus ocorra em todos os estados brasileiros que cultivam cucurbitáceas (SPADOTTI, 2012).

A existência de variabilidade genética entre estirpes do ZYMV já foi relatada (LECOQ et al., 1991; SPADOTTI, 2012; WASSANO, 2013). Sintomas induzidos por diferentes isolados variam de fraco a severo e alguns isolados podem induzir rápida murcha e necrose da planta em cultivares de melão que possuem o gene Fn (DESBIEZ e LECOQ, 1997). Em relação à transmissão por insetos, algumas estirpes de ZYMV são menos eficientemente transmitidas pelos seus vetores (DESBIEZ e LECOQ, 1997; WASSANO, 2013). Isso ocorre devido a uma mutação na região da proteína capsidial ou quando o vírus possui a proteína *helper component*-HC-Pro deficiente (DESBIEZ e LECOQ, 1997). Entretanto, uma análise de 11 isolados de ZYMV oriundos de diferentes regiões do Brasil não revelou variabilidade genética entre eles, pois os isolados eram estirpes do mesmo vírus de acordo com os critérios estabelecidos pelo relatório do *International Committee on Taxonomy of Virus* -ICTV (SPADOTTI, 2012). Essa caracterização molecular baseou-se na análise de sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene da proteína capsidial. Entre os isolados, a identidade observada foi de 93 a 100% e de 97 a 100%, para a sequência de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (SPADOTTI, 2012).

O ZYMV é de fácil transmissão mecânica, mas sua transmissão por sementes ainda não foi confirmada devido aos resultados conflitantes na literatura (KUROSAWA et al., 2005; LECOQ et al., 2014). SIMMONS et al. (2013) relataram

que o vírus foi transmitido por sementes de *Cucurbita pepo* ssp. *texana* numa frequência de 1,6%. De qualquer forma, esse estudo mostrou que a probabilidade de uma epidemia ser iniciada através da transmissão por sementes é muito baixa. A principal forma de manutenção do vírus se dá em espécies de cucurbitáceas, plantas daninhas e algumas ornamentais (LECOQ et al., 2014).

O ciclo da doença causada pelo ZYMV, denominada mosaico amarelo do meloeiro, inicia-se com a transmissão eficiente do vírus por afídeos durante as picadas de prova do inseto (HULL, 2002). Após a inoculação, a partícula viral é replicada e translocada célula-a-célula através dos plasmodesmas até atingir os vasos do floema, dando início à infecção sistêmica. ZELLNIG et al. (2014) propuseram um modelo que mostra a colonização do ZYMV em folhas de *Cucurbita pepo* L. Após a inoculação dos cotilédones, o ZYMV pode ser detectado primeiramente nas raízes aos 3 dias após a inoculação (dai), na haste principal aos 5 dai e na primeira folha verdadeira aos 7 dai, podendo ser detectado por microscopia eletrônica de transmissão em todas as partes da planta aos 9 dai (ZELLNIG et al., 2014).

Devido ao aumento na incidência do ZYMV nos últimos anos em plantios de melão no Brasil, o desenvolvimento de cultivares resistentes tem se tornado um objetivo em programas de melhoramento de cucurbitáceas (LIMA, 2011).

2.1.3 Resistência de meloeiro ao ZYMV

O acesso PI414723 é a única fonte de resistência ao ZYMV comercialmente utilizada (DESBIEZ e LECOQ, 1997; DANIN-POLEG, 2002). É derivado de uma planta do acesso indiano PI371795 que ficou livre de insetos durante uma infestação de afídeos. Essa planta foi autopolinizada e deu origem à progênie 90234, também denominada LJ 90234, que era resistente a afídeos. Sementes de 16 plantas resistentes desta progênie foram inter cruzadas, dando origem ao acesso PI414723 (McCREIGHT; BOHN; KISHABA, 1992). Além de PI414723, alguns autores confirmaram a resistência ao ZYMV de outros três acessos indianos de meloeiro (*landraces*): IC 274007, IC 274014 (DHILLON et al., 2007) e AM 87 (FERGANY et al., 2011), os quais ainda não são utilizados em programas de melhoramento.

Os isolados de ZYMV são classificados em três patótipos de acordo com os sintomas que causam no acesso PI414723 (DESBIEZ e LECOQ, 1997; DANIN-POLEG, 2002). O patótipo 0 representa isolados que não induzem sintomas, o

patótipo 1 são isolados que induzem sintomas de necrose sistêmica e o patótipo 2 são aqueles que induzem sintomas de amarelecimento, murcha, mosaico e deformação das folhas (DESBIEZ e LECOQ, 1997). Mesmo ocorrendo sintomas na PI414723, esses são diferentes dos sintomas observados em variedades muito suscetíveis ao ZYMV, como ‘Védrantais’ (LECOQ e PITRAT, 1984). Alguns sintomas severos em PI414723 podem indicar uma reação de hipersensibilidade ao vírus (HAREL-BEJA et al., 2010).

PI414723 é um acesso importante quanto à resistência múltipla a doenças e pragas. Além de resistente ao ZYMV, também o é ao WMV, ao PRSV-W, ao pulgão *A. gossypii*, a oito raças de *Podosphaera xanthii* que causam oídio e ao fungo *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (LECOQ e PITRAT, 1984; McCREIGHT et al., 1992; ANAGNOSTOU et al., 2000; FAZZA et al., 2011). Contudo, no caso de ZYMV, ainda não se sabe se PI414723 resiste à infecção ou à multiplicação do vírus. WASSANO (2013) relatou que, provavelmente, a resistência afeta a multiplicação do vírus, pois observou uma distribuição contínua de valores de títulos virais em populações F2 oriundas do cruzamento PI414723 x ‘Védrantais’.

A resistência em PI414723 ao ZYMV foi inicialmente descrita por PITRAT e LECOQ (1984) sendo controlada por um único gene dominante, denominado *Zym*. Os autores conduziram testes inoculando mecanicamente o patótipo 0 do ZYMV em populações F1, F2, BC1 e BC2 desenvolvidas a partir do cruzamento entre ‘Charentais’ (parental 1) x PI414723 (parental 2). Concluíram que, de acordo com a segregação observada, um único gene dominante-*Zym* controlava a resistência pois plantas das populações F1 e BC2 foram resistentes à inoculação com o vírus, ao passo que plantas das populações F2 e BC1 apresentaram lesões necróticas, clorose ou mesmo ausência de sintomas (PITRAT e LECOQ, 1984). O gene *Zym* foi confirmado em estudos posteriores (ANAGNOSTOU et al., 2000; DANIN-POLEG et al., 2000; DANIN-POLEG et al., 2002; HAREL-BEJA et al., 2010; WASSANO, 2013).

A identificação de marcadores moleculares associados ao gene *Zym-1* acelerou o melhoramento de variedades resistentes de meloeiro (PITRAT, 1991; DANIN-POLEG et al., 1997; DANIN-POLEG et al., 2001; HAREL-BEJA et al., 2010; DIAZ et al., 2011). PITRAT (1991) produziu o primeiro mapa genético de meloeiro com oito grupos de ligação e relatou a ligação entre os genes *Zym*, *Pm-x* que confere resistência às raças 0 e 2 de *Podosphaera xanthii*, o gene andromonóico “a” que controla a presença ou ausência de estames nas flores femininas e o gene halo

clorótico cotiledonar “*h*”. Esse grupo de ligação foi denominado grupo 4 (PITRAT, 1991). O gene *Zym* foi posteriormente designado *Zym-1* e incluído no grupo de ligação 2 (LGII) próximo ao marcador microssatélite CMAG36, também ligado aos genes *a*, *Pm-x* e *h*, com base em estudo de herança em uma população F2 oriunda do cruzamento PI414723 x ‘Védrantais’ (PÉRIN, 2002). Outros trabalhos envolvendo populações do cruzamento PI414723 x ‘Dulce’ confirmaram que o gene *Zym-1* estava proximamente ligado ao marcador CMAG36 (DANIN-POLEG et al., 2002; HAREL-BEJA et al., 2010).

Estudos posteriores no cruzamento PI414723 x ‘Dulce’ indicaram a provável existência de outros dois genes de resistência, além de *Zym-1*, denominados *Zym-2* e *Zym-3* (DANIN-POLEG et al., 1997). Esse estudo vai de encontro ao estudo anterior, que relatou resistência monogênica (PITRAT e LECOQ, 1984). Contudo, isto pode ser explicado em função das diferentes cultivares suscetíveis usadas nos cruzamentos e também a possíveis diferenças genéticas entre os isolados do vírus utilizados nos estudos (ANAGNOSTOU et al., 2000), já que em um foi utilizado o patótipo 0 (DANIN-POLEG et al. 1997) e no outro uma estirpe de patogenicidade moderada não classificada em patótipo (PITRAT e LECOQ, 1984).

DANIN-POLEG et al. (2002) identificaram o marcador microssatélite CMCT134b fracamente associado ao gene *Zym-2* a uma distância de 28 cM, localizado no grupo de ligação VII, que atualmente corresponde ao grupo de ligação X de PÉRIN et al. (2002). Nesse trabalho, enfatizou-se a necessidade de uma análise mais precisa quanto a localização exata do gene *Zym-2* através do uso de mais marcadores moleculares. Até o momento, não existem evidências do posicionamento do gene *Zym-3* (WASSANO, 2013).

WASSANO et al. (2013), analisando a ligação entre locos de microssatélites e resistência ao ZYMV em populações F2 oriundas do cruzamento PI414723 x ‘Védrantais’, também relatou evidências da existência do gene *Zym-2*, posicionado no grupo de ligação X próximo ao marcador CMBR55. Entretanto, a validação de *Zym-2* não foi confirmada em um segundo experimento nesse estudo provavelmente por ser um gene de pequeno efeito fenotípico, passível de ser muito influenciado pelo ambiente, e também pelo fato de que foram usados poucos marcadores moleculares (DANIN-POLEG et al., 2002; WASSANO, 2013). A ocorrência de um possível efeito epistático entre os genes *Zym-1* e *Zym-2* também pode ter

contribuído para a não validação (WASSANO, 2013). Desta forma, a existência e o posicionamento de *Zym-2* ainda necessita ser confirmada experimentalmente.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Foi utilizada uma população F₂ derivada do cruzamento PI414723 x 'Védrantais' a partir de sementes colhidas de um único fruto. PI414723 é um acesso pertencente ao grupo *Momordica* (melão amargo) e é resistente ao patótipo 0 de ZYMV, enquanto que 'Védrantais' é uma variedade pertencente ao grupo *Cantaloupensis* e altamente suscetível a esse vírus (PITRAT; LECOQ, 1984).

2.2.2 Isolado de ZYMV

Amostras de folhas de diferentes híbridos de meloeiro com sintomas de mosaico e distorção foliar foram coletadas em regiões produtoras de melão do RN em 2011. A partir dessas amostras, foi obtido o isolado (RN6-F) utilizado neste trabalho (WASSANO, 2013). Esse isolado, que é transmissível por afídeos, foi escolhido para a avaliação da resistência nas populações segregantes, pois induz sintomas severos e apresenta altos títulos virais na cultivar 'Védrantais', mas não induz sintomas em PI414723, o que o caracteriza como sendo do patótipo 0. Além disto, se multiplica e induz sintomas severos nas plantas de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta', que assim foi usada para manutenção do vírus.

2.2.3 Avaliação da resistência da população segregante F2

Duzentos e cinquenta indivíduos F₂ foram avaliados para resistência ao ZYMV em um experimento conduzido em casa-de-vegetação em 21 de dezembro de 2014. As plantas F₂ foram cultivadas em vasos de 2 L com solo autoclavado, cada qual contendo duas plantas, e foram inoculadas na fase cotiledonar, em torno de 12 dias após a semeadura. Como controles, foram incluídas cinco plantas inoculadas e cinco não-inoculadas de cada genitor e da geração F₁. Como inóculo, foram utilizadas folhas de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta' infectadas com o isolado RN6-F de ZYMV. As folhas foram maceradas em almofariz de porcelana com 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). Posteriormente, o abrasivo carborundum foi pulverizado nas folhas para a obtenção de microferimentos e o homogenato do inóculo foi friccionado sob os cotilédones. As plantas foram inoculadas duas vezes em um intervalo de 24 h.

Aos 21 dias após a inoculação, os sintomas foram avaliados visualmente para presença de clorose internerval, deformação de folhas com formação de bolhas ou diminuição de área foliar e subdesenvolvimento da planta (DANIN-POLEG et al., 2002). O patógeno também foi quantificado por PTA-ELISA segundo metodologia de MOWAT e DAWSON (1987) utilizando antissoros específicos para o ZYMV. Duas amostras de tecido foliar dos ponteiros foram coletadas de cada planta (repetições biológicas), as quais foram analisadas em duplicatas (repetições técnicas), totalizando quatro leituras de absorbância por planta. A média das quatro leituras de absorbância foi denominada de título viral e quanto maior esse valor, maior a quantidade de vírus presente na amostra. A absorbância das plantas inoculadas foi ajustada subtraindo-se o valor médio de absorbância das plantas dos controles não inoculados.

O tecido foliar foi pesado (0,06 g) e macerado em almofariz e adicionado de 600 µL de tampão carbonato, pH 9,6, seguindo a proporção de 1:10 (p/v). Cem microlitros de cada extrato foram transferidos para placas de ELISA em duplicata (repetição técnica). As placas foram incubadas a 37 °C por 15 minutos e lavadas três vezes consecutivas com PBS-T (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, 0,05% Tween 20, p H 7,4). Em seguida, foram adicionados 100 µL de antissoro diluído em tampão PBS-TPB (1:1000) e as placas foram incubadas a 37 °C por duas horas. Juntamente à etapa de adição do antissoro, foi realizada a fase de pré-adsorção, acrescentando-se tecido não inoculado ao extrato obtido para eliminar a interferência de proteínas da planta no processo. Após duas horas, as placas foram triplamente lavadas com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µL de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025) diluída em tampão PBS-TPB de acordo com a recomendação do fabricante. Foi então realizada a incubação por duas horas a 37°C e em seguida realizada outra lavagem tripla com PBS-T. Depois, foram adicionados 100 µL de p- fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105) diluído em tampão de dietanolamina, pH 9,8, na concentração de 0,6 mg/mL. Foi realizada a incubação em

temperatura ambiente na ausência de luz e após 30 minutos a absorbância foi medida em leitor ELISA Metertech Σ960 na faixa de 405 nm.

2.2.4 Genotipagem da população F2 com marcadores microssatélites

O DNA genômico das plantas foi extraído da primeira folha verdadeira, coletada aos 15 dias após a germinação e mantida em ultrafreezer -80°C. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionadas de tampão de extração (1% CTAB; 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl; 0,1 %β-2- mercaptoetanol) e incubadas por 45 minutos em banho-maria a 65 °C. Após esse período, as amostras foram adicionadas de 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e a suspensão resultante adicionada de 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A precipitação do DNA ocorreu por centrifugação após a adição de 500 µL de etanol absoluto a -20°C por 30 minutos. Para a limpeza do *pellet*, em cada tubo foram adicionados 500 µL de NaCl 1 M, o mesmo foi incubado a 65°C por 10 minutos em banho seco. O RNA foi digerido pela adição de 20 mg de Pure Link RNaseA (Invitrogen), seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos e a 4 °C por 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados 350 µL de isopropanol. Os *pellets* foram lavados três vezes consecutivas com 1 mL de álcool 75, 90 e 100% respectivamente e depois secos a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de tampão Tris-EDTA pH 8,0 com RNase (10 µg/ mL) e incubado a 37°C por 30 minutos para digestão do RNA. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e sua qualidade verificada em gel de agarose a 2%.

Marcadores microssatélites (SSR- *simple sequence repeats*) foram escolhidos de acordo com os resultados de FAZZA (2011) e WASSANO (2013) (tabela 1). O critério de seleção dos marcadores foi o posicionamento dos mesmos no grupo de ligação 10 (LGX) de PÉRIN et al. (2002) segundo o mapa de ligação de DIAZ et al. (2011). Marcadores adicionais deste grupo (CMCTN65, MU7351-2, CMTCN67, CMMS34_10 e CMTCN8) também foram selecionados e testados quanto ao polimorfismo entre os genitores.

As reações de amplificação dos microssatélites por PCR consistiram de 40 ng de DNA, 0,6 µM de cada iniciador, 1X PCR GoTaq® Master Mix (Promega) e água

MiliQ autoclavada suficiente para completar um volume final de 12 μ L. As condições de amplificação consistiram de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 30 segundos para temperatura de anelamento específica de cada par de iniciadores e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final, procedeu-se um ciclo de extensão por 5 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram separados em aparelho *Fragment Analyzer Automated CE System* (Advanced Analytical Technologies [AATI], Ames, Iowa, USA) usando o Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent Kit, 35–500 bp (Invitrogen) que permitiu a separação de fragmentos de 35 a 500 pares de bases com uma resolução de 2 pb. O programa PROSize versão 2.0 *software AATI* foi utilizado para a leitura dos cromatogramas e estimativa de número de alelos por loco.

Tabela 1- Nomenclatura, sequências de iniciadores, temperatura de anelamento (Ta) e referência dos marcadores SSR do grupo de ligação 10 (LGX)

Nomenclatura	Sequências	Ta (°C)	Referência
CMN_0409	F- TCTTAACAACCTCCCACGCCT R- ATAGGATCTGCCATTGGGC	63	Diaz et al. (2011)
MU6549	F- CTGTCATTCCATCTCCTCCG R- AACGCATACCGACTTTACCG	64	Diaz et al. (2011)
ECM49	F- TCACACCCTTTAACTTTTCTCTCC R- TCGATGAAGCTGAATGGAAG	59	Fernandez-Silva et al. (2008)
CMCTN71	F- TCAATTTTTGCCAAACAAGC R- CAAGGACACAGATTTAATAC	54	Harel-beja et al. (2010)
CMBR55	F- GAGGCCTTTGTGGTTCGTAA R- AAAGAAATGGATAAAGGAAACAGA	50	Ritchel et al. (2004)
CMCT134b	F- GCTCCTCCTTAACTCTATAC R- GCATTATTACCCATGTACGAG	58	Yuste-Lisbona et al. (2011)
CMCTN65	F- TTAGGTGTATTTGATCTC R- AATTTTATGGCTCAAGGTTC	45	Gonzalo et al. (2005)
MU7351-2	F- GATAAGATTCGGCGGAACAA R- AGGAGCAGTGAAGAATCCCA	52	Cucurbit Genomics Database (2015)
CMTCN67	F- TCTCTTACAACCTCTTTGTCTG R- GGTTCAAGGATTCATCGTTG	50	Gonzalo et al. (2005)
CMMS34_10	F- GGGGTGTGAAGCTGAAGGCAAAGTC R- AAAGGAAGAAGAAGAAAAAGGAGAA	56	Chiba et al. (2003)
CMTCN8	F- CCTCCGCCACATATTACAAT R- TTCATCTTGACACGTAAGAG	50	Gonzalo et al. (2005)
CMAG172	F- CAATCGCAGATACTTCCACG R- TGCTTGTCCCAACGGTGTCAT	51	Yuste-Lisbona et al. (2011)

2.2.5 Confirmação da ligação dos marcadores SSRs ao gene *Zym-2*

O genótipo de cada indivíduo em cada loco marcador foi anotado utilizando-se “A” para indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental PI414723, “H” para os indivíduos heterozigóticos e “B” para indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de ‘Védrantais’. As frequências das classes genotípicas de cada loco marcador foram analisadas pelo teste de χ^2 para as proporções esperadas de 1:2:1 (homozigoto A: heterozigoto H: homozigoto B) no caso de segregação de marcador co-dominante. Os testes de ligação entre os marcadores e o gene *Zym-2* foram realizados por meio de regressão linear, onde o genótipo do indivíduo F2 no loco marcador foi considerado a variável independente e o título viral, como a variável dependente.

Os marcadores SSRs (tabela 1) foram utilizados para genotipar os indivíduos da população F2 com a finalidade de construir fragmentos do grupo de ligação X (PÉRIN et al., 2002). A anotação dos genótipos foi realizada como descrito acima e as análises de ligação foram realizadas no programa Onemap, versão 2.0-3 (MARGARIDO et al., 2007) do programa R versão 2.15.2 (R Core Team, 2015). Primeiramente, foi realizado o teste de dois-pontos para estimar a fração de recombinação entre os marcadores por meio da função *rf.2pts* usando os parâmetros de LOD Score=3 e máxima fração de recombinação=0,5. Os marcadores foram associados em grupos de ligação através do comando *group* adotando-se um valor de LOD=3. A função utilizada para estimar as distâncias genéticas entre os marcadores foi Kosambi (KOSAMBI, 1944) e as ordens dos marcadores foram estimadas a partir da função *compare* (WASSANO, 2013).

2.2.6 Avaliação de acessos de meloeiro para resistência ao ZYMV

Avaliou-se a resistência ao ZYMV em casa-de-vegetação de 42 acessos de meloeiro (Apêndice A) oriundos da região Nordeste do Brasil, fornecidos pelo Prof. Glauber Nunes – UFERSA. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro de março a abril de 2015 e o segundo de julho a agosto de 2015. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

As plantas foram cultivadas em vasos de 2 L com solo autoclavado. Em cada experimento foram incluídos cinco vasos de cada acesso contendo duas plantas por vaso cada, e cinco vasos da cultivar ‘Védrantais’ com duas plantas por vaso, que

foram inoculadas e utilizadas como controles positivos. Como controle negativo, foram utilizadas cinco plantas não inoculadas de 'Védrantais'. As plantas foram inoculadas na fase cotiledonar conforme descrito anteriormente na seção 2.2.3. Como inóculo, foram utilizadas folhas de abobrinha cv. 'Caserta' infectadas com o isolado RN6-F. A confirmação da infecção, a quantificação do inóculo do vírus através do teste PTA-ELISA e a correção dos valores de título viral foram realizados conforme explicado na seção 2.2.3. As médias dos acessos foram comparadas entre si pelo teste Scott-Knott em cada experimento utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2015).

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação da resistência da população segregante F2

A média das leituras de absorbância foi utilizada como medida quantitativa de título viral e como consequência do grau de resistência das plantas. Do total de 250 plantas, 246 foram efetivamente fenotipadas para resistência ao vírus pelo teste PTA-ELISA. As plantas de 'Védrantais' não inoculadas, utilizadas como controles negativos, não apresentaram sintomas, ao passo que plantas de PI414723 e da população F1, tanto inoculadas como não inoculadas, também não apresentaram sintomas (figuras 1-A, 1-B, 1-C, 1-D e 1-F).

Plantas não inoculadas dos genitores 'Védrantais', PI414723 e da população F1 apresentaram baixos valores de absorbâncias que correspondem a reações inespecíficas de antissoros com proteínas da planta sadia. Sendo assim, os títulos virais para essas plantas foram 0,047, 0,046, 0,051, respectivamente. Plantas inoculadas de PI414723 e F1 também apresentaram baixos títulos virais, como esperado (0,046 e 0,050, respectivamente). Já para plantas inoculadas de 'Védrantais', foram registrados altos valores (0,903), além dos intensos sintomas de infecção viral, como bolhas e mosaicos foliares (figura 1-E; figura 2).

Pelo histograma da frequência de classes de absorbância (figura 3), observou-se distribuição assimétrica, com maior frequência de indivíduos F2 nas classes com menor absorbância, uma vez que 71,54% dos indivíduos foram incluídos na classe 0,1 a 0,2; 19,92% na classe 0,2 a 0,4; 5,69% na classe 0,4 a 0,5; 0,82% na classe 0,5 a 0,9 e 2,03% na classe 0,9 ou mais.

Figura 1- Fenótipo de plantas não inoculadas de PI414723 (A), 'Védrantais' (B) e F1 (C); e de plantas inoculadas de PI414723 (D), 'Védrantais' (E) e F1 (F)

Figura 2- Reação ao ZYMV do parental resistente PI414723 (esquerda) e do parental suscetível 'Védrantais' (direita)

Figura 3- Histograma da frequência de classes de absorvância observadas na população F2. As setas indicam o título viral médio em plantas das linhagens genitoras e da população F1

2.3.2 Genotipagem da população F2 com marcadores microssatélites

Do total de 250 plantas, 243 foram efetivamente genotipadas com os marcadores CMN_0409, MU6549, ECM49, CMCTN71, CMBR55, CMCT134b e CMCTN65, sendo que o total de indivíduos genotipados variou para cada marcador (tabela 2). Os marcadores CMAG172, MU7351-2, CMTCN67, CMMS34_10 e CMTCN8 foram monomórficos entre os genitores e, portanto, não foram utilizados para genotipar a população F2. A análise de fragmentos, necessária para determinar os genótipos dos indivíduos da população segregante, foi realizada conforme a representação gráfica da figura 4.

O teste chi-quadrado (χ^2 tabelado=5,991, com dois graus de liberdade) mostrou que todos os marcadores apresentaram as frequências de classes genotípicas esperadas no caso de segregação de marcador co-dominante (tabela 2), exceto o marcador CMCT134b, que apresentou distorção de segregação esperada de 1:2:1, já que o χ^2 calculado foi maior que o χ^2 tabelado ($19,47 > 5,991$) a 5 % de probabilidade.

Tabela 2- Número de indivíduos de cada classe genotípica para cada marcador e valor de chi-quadrado para teste entre frequência observada e esperada de indivíduos segundo segregação 1:2:1

Marcadores	Classe genotípica			Total de indivíduos genotipados por marcador	χ^2 calculado
	A*	H*	B*		
CMN04_09	66	123	53	242	1,43
MU6549	62	129	52	243	1,75
ECM49	68	121	47	236	3,89
CMCTN71	48	119	69	236	3,75
CMBR55	56	110	50	216	0,40
CMCT134b	70	73	35	178	19,47**
CMTCN65	68	108	45	221	4,89

*A-Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental PI414723.

*H- Indivíduos heterozigóticos.

*B- Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de 'Védrantais'.

** - indica distorção de segregação ($P < 0,05$)

Figura 4- Representação eletrônica de gel para o marcador MU6549 obtido pelo *Fragment Analyzer*. 1- Parental resistente PI414723, 250 pb; 2- Parental suscetível 'Védrantais', 262 pb; 3- Indivíduo F1 heterozigoto; 250 e 262 pb; 4-Indivíduo F2 heterozigoto; 250 e 262 pb

2.3.3 Análise de ligação entre marcadores SSRs e o gene *Zym-2*

As análises de ligação através do programa Onemap mostraram que as ordens e as distâncias entre os marcadores condizem com os resultados da literatura (HAREL-BEJA et al., 2010; DIAZ et al., 2011; WASSANO, 2013). Entretanto, comparado ao mapa de DIAZ et al. (2011) houve uma inversão de posição do marcador MU6549 e também foi observada uma distância maior entre os SSRs (figura 5).

Figura 5- Representação do mapa de ligação (LGX) gerado pelo programa Onemap contendo a distância dos microssatélites em centimorgans(cM)

Figura 6- Médias de título viral (eixo y) de cada genótipo nos locos marcadores (eixo x). AA- Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental PI414723, H- Indivíduos heterozigóticos, BB- Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de 'Védrantais'

A regressão linear simples entre os valores médios de título viral e os genótipos marcadores nos locos MU6549 e CMBR55 foi significativa ($P= 0,011$ e $0,0054$, respectivamente). Esse resultado indicou ligação destes marcadores ao gene *Zym-2*. O coeficiente de determinação (R^2) mostrou que 16 e 19 % da variação observada no título viral entre as classes genotípicas foi explicada pela ligação entre os marcadores e o gene de resistência (tabela 3). Por outro lado, as regressões lineares entre o título viral e os genótipos nos marcadores CMN04_09, ECM49, CMCTN71, CMCT134b e CMTCN65 não foram significativas ($P= 0,05$), evidenciando que esses marcadores estão distantes do gene *Zym-2* (tabela 3, figura 6).

Tabela 3- Título viral médio para cada classe genotípica no loco marcador seguido do p-valor e do coeficiente de determinação R^2 da análise de regressão

	Título viral médio			Regressão linear	
	Classes genotípicas			p-valor	R^2 (%)
Marcadores	A*	H*	B*		
CMN04_09	0,051	0,062	0,088	0,065	12
MU6549	0,042	0,067	0,092	0,011*	16
ECM49	0,050	0,063	0,079	0,134	10
CMCTN71	0,054	0,068	0,073	0,374	6
CMBR55	0,045	0,059	0,105	0,0054**	19
CMCT134b	0,056	0,074	0,081	0,261	8,5
CMTCN65	0,047	0,068	0,085	0,061	12,6

*A-Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental PI414723.

*H- Indivíduos heterozigóticos.

*B- Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de 'Védrantais'.

*/**-Significativo a 5% de probabilidade

2.3.4 Avaliação de acessos de meloeiro para resistência ao ZYMV

Acessos muito suscetíveis apresentaram os sintomas típicos de infecção viral, como mosaico foliar e bolhas, assim como citado para a cultivar 'Védrantais'. Houve uma correlação entre alto valor de título viral e grande presença de sintomas nos acessos avaliados. Nos dois experimentos, plantas inoculadas de 'Védrantais',

usadas como controle positivo, apresentaram altos valores de título viral médio (0,595 e 0,339, nos experimentos 1 e 2, respectivamente). Plantas não inoculadas dessa cultivar apresentaram baixo título viral médio (0,0246 e 0,016, nos experimentos 1 e 2) devido a reações inespecíficas de antissoro, como já foi explicitado para plantas não inoculadas na seção 2.3.1. O título viral médio dos acessos variou de 0,123 a 0,621 no experimento 1 e de 0,019 a 0,368 no experimento 2 (Apêndice C). Sementes de alguns acessos não germinaram no experimento 1 e, portanto, foram avaliados somente no segundo experimento.

A análise de variância mostrou que existe diferença quanto à resistência ao ZYMV entre os acessos avaliados, a 5% de probabilidade (tabela 4). O teste de médias Scott-Knott separou os acessos em três grupos no experimento 1 e em dois grupos no experimento 2 (figura 7). Em ambos os experimentos, alguns acessos foram incluídos nos grupos de menor título viral, os quais também incluem o acesso resistente PI414723 e os controles negativos (plantas não inoculadas da cultivar suscetível 'Védrantais'). Entretanto, nenhum dos acessos avaliados apresentou título viral menor comparado a PI414723 (Apêndice C, figura 7).

Tabela 4- Análise de Variância dos experimentos 1 e 2 da avaliação de resistência dos acessos ao ZYMV

ANOVA						
	Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	Fcalculado	p-valor
Experimento 1	Tratamento	33	5,396	0,16321	3,356	2,58 e-08
	Resíduo	263	12,788	0,04863		
	Total	296				
Experimento 2	Tratamento	43	3,083	0,07170	2,882	4,57 e-08
	Resíduo	348	8,657	0,02488		
	Total	391

Figura 7- Título viral médio para cada acesso avaliado nos experimentos 1 e 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste Scott-Knott

2.4 Discussão

O isolado RN6-F, escolhido para avaliar a resistência da população segregante, causou os sintomas típicos de infecção pelo ZYMV como clorose, mosaico e formação de bolhas, tanto nos indivíduos suscetíveis da população F2

quanto em plantas de 'Védrantais' inoculadas (controle positivo). Portanto, a inoculação mecânica foi eficiente nesse experimento. Já plantas inoculadas da geração F1 e da parental PI414723 não apresentaram sintomas, mostrando o alto grau de resistência deste genótipo ao patótipo 0 do ZYMV.

O presente trabalho utilizou uma abordagem quantitativa para avaliar a resistência ao ZYMV através da técnica de PTA-ELISA. Com isso, obteve-se uma medida direta e quantitativa da resistência, sem necessidade de uma escala diagramática baseada em sintomas, que é mais subjetiva. Por outro lado, a avaliação da resistência por este método mostrou-se eficiente e com boa reprodutibilidade. É importante ressaltar que os trabalhos anteriores basearam-se somente na avaliação qualitativa da resistência através de escala de sintomas e, com isso, provavelmente não tiveram poder para discriminar pequenas diferenças em níveis de resistência entre plantas. Por exemplo, a análise visual de sintomas pode ter dificultado a seleção de plantas resistentes, acontecendo o chamado efeito Vertifolia (VAN DER PLANK, 1963), no qual o melhoramento para resistência vertical leva à perda de resistência horizontal no processo de retrocruzamentos sucessivos para o parental recorrente (suscetível). Portanto os genes de efeito menor, *Zym-2* e *Zym-3*, provavelmente, não foram selecionados em variedades melhoradas ao longo dos anos.

Plantas não inoculadas dos genitores 'Védrantais', PI414723 e da população F1 apresentaram baixos valores de absorbâncias que correspondem a reações inespecíficas de antissoro no teste PTA-ELISA com proteínas da planta sadia. Por isso houve a necessidade de corrigir os valores de absorbância das amostras conforme mencionado anteriormente. Em plantas inoculadas, o título viral das plantas do genitor resistente PI414723 e da população F1 foi cerca de 18 vezes menor em comparação às plantas inoculadas do genitor suscetível 'Védrantais', evidenciando a natureza fortemente dominante dos genes de resistência do genitor resistente.

Na população F2, observou-se maior frequência de indivíduos nas classes mais resistentes, com menores títulos virais. Isso confirma a natureza dominante da resistência de PI414723 e também evidencia a segregação de um gene de grande efeito fenotípico, no caso *Zym-1*. Entretanto, a natureza contínua da distribuição de valores de títulos virais sugere a existência de ao menos um gene adicional, conforme já mencionado anteriormente (DANIN-POLEG et al., 2002 ; WASSANO,

2013). Sendo assim, enfatiza-se a importância do presente trabalho que confirmou a localização do gene *Zym-2* no grupo de ligação X (LGX).

Os marcadores foram utilizados para genotipar a população F2 e construir uma porção do LGX. As análises confirmaram a ligação dos mesmos em um único grupo, apesar de ter ocorrido inversões na posição dos marcadores em comparação a mapas relatados anteriormente. Essas diferenças podem ser explicadas devido aos diferentes cruzamentos utilizados e a variações no número de indivíduos entre trabalhos (WASSANO, 2013). Segundo o mapa de DIAZ et al. (2011), o marcador MU6549 foi mapeado a 30 cM em relação ao marcador CMCTN71, sendo esse resultado próximo ao encontrado nesse trabalho e por WASSANO (2013) de 43,59 cM e 66,9 cM respectivamente. Entretanto, houve uma inversão na posição dos marcadores MU6549 e CMBR55 em comparação ao mapa de DIAZ et al. (2011), apesar de que o mapa apresentado no presente trabalho corrobora os dados de WASSANO (2013). Além dos marcadores microssatélites CMBR55 e MU6549, utilizados por WASSANO (2013), outros marcadores foram selecionados baseados em mapas da literatura (PÉRIN et al., 2002; DIAZ et al., 2011). A escolha baseou-se no posicionamento dos marcadores próximos ao CMBR55. Entretanto, o marcador CMAG172 foi monomórfico entre os genitores da população, divergindo do resultado de WASSANO (2013), onde este marcador foi polimórfico. Isto impossibilitou o uso deste marcador nas análises de ligação. A discrepância pode ter resultado de diferenças nas técnicas de genotipagem utilizadas nos dois trabalhos, já que WASSANO (2013) valeu-se de géis de poliacrilamida e no presente trabalho as genotipagens foram realizadas em aparelho de eletroforese capilar.

Esse trabalho confirmou a hipótese (DANIN-POLEG et al., 2002; WASSANO, 2013) de que o gene *Zym-2* está posicionado no LGX, evidenciado pela forte associação dos marcadores CMBR55 e MU6549 com variações em valores de títulos virais segundo análise de regressão. Os coeficientes de determinação (R^2) para estes marcadores indicam um efeito fenotípico menor de *Zym-2* comparado ao *Zym-1*, já que para este gene foi relatado um valor acima de 82% (WASSANO, 2013). O marcador CMCT134b já foi relatado como possivelmente ligado ao *Zym-2* (PÉRIN et al., 2002), o que não foi confirmado neste trabalho. Para os marcadores CMN04_09 e CMTCN65, a ligação ao gene também não foi confirmada, muito embora o valor de significância da regressão tenha ficado pouco acima de 5%.

O uso de genótipos resistentes é uma estratégia eficaz para controlar viroses na cultura do melão e, por isso, a busca de novos genótipos resistentes além do acesso PI414723 torna-se essencial. Geralmente, as fontes de resistência a patógenos são encontradas nos centros de origem ou de diversidade da espécie hospedeira (KHETARPAL et al., 1998). Isso porque nesses locais as plantas são expostas a pressões seletivas de patógenos ao longo dos anos e assim desenvolvem a resistência no decorrer deste longo processo co-evolutivo. No Brasil, a introdução do melão foi feita por europeus e seu cultivo comercial iniciou-se a partir década de 60 nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (CEAGESP, 2004). Os fatores climáticos dessas regiões não favoreceram o cultivo de melão e por isso a produção do fruto migrou para a região Nordeste na década de 80, principalmente para o Rio Grande do Norte e Ceará, onde o cultivo é favorecido devido à baixa ocorrência de chuvas e alta radiação solar (EMBRAPA, 2014). Com isso, justifica-se a busca de novos genótipos resistentes através de raças locais (*landraces*) na região Nordeste, a qual é conhecida pela alta produção de melão, pois o fruto adaptou-se bem nesses locais e o problema com viroses é extremamente importante (DANTAS et al., 2015).

Para que a resistência seja satisfatória, é importante o conhecimento prévio da estirpe (patótipo) do vírus utilizada na inoculação, já que isso interfere nas respostas da planta. No caso do ZYMV, em que a resistência é patótipo-específica, a escolha do isolado RN6-F, patótipo 0, justificou-se, já que esse patótipo é o predominante no país (SPADOTTI, 2015). De uma forma geral, o título viral dos acessos no experimento 2 foi menor em comparação ao experimento 1 e isso pode ser explicado pelas diferentes épocas em que esses foram realizados. Ambos os experimentos foram conduzidos em estufa não climatizada que constantemente sofre influência da temperatura do ambiente, mostrando o efeito dessa variável na avaliação da resistência. O experimento 1 foi realizado em março/abril de 2015 onde a temperatura média mensal foi de 23,6 a 25 °C e o experimento 2 em julho/agosto de 2015 em que essa foi de 19,7 a 20,9 °C, segundo a “Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP”.

A maioria dos acessos avaliados nesse trabalho são monóicos (DANTAS et al., 2015), favorecendo a alogamia e, portanto, a polinização cruzada. Com isso ocorre maior variabilidade entre as plantas, explicando a heterogeneidade da resposta à resistência observada entre os acessos. Portanto, dentro do mesmo

acesso, algumas repetições apresentaram ausência de sintomas e outras tiveram alguns sintomas de infecção viral como mosaico e bolhas, em maior ou menor grau. É importante enfatizar que nenhum acesso avaliado apresentou título viral menor que PI414723. Entretanto, alguns acessos foram incluídos no mesmo grupo deste genótipo pelo teste de médias Scott-Knott e, por isso, são potenciais fontes de resistência ao ZYMV como por exemplo: A5, A12, A41, A50 e Itapuã. Destaca-se o acesso A5, o qual apresentou poucos sintomas e estava visualmente semelhante ao acesso PI414723, além do baixo título viral médio obtido (0,153 e 0,138 nos experimentos 1 e 2, respectivamente).

Alguns dos acessos avaliados neste estudo são resistentes a outros patógenos que também causam perdas significativas à cultura do meloeiro. Entretanto, o presente trabalho foi pioneiro ao avaliar a resistência ao ZYMV. Por exemplo, os acessos A-24, A-39, A-8, A-33 e A-28 (códigos C-RN2, C-CE2, C-PE2, C-PI-1, C-BA-2, respectivamente) são resistentes ao míldio *Pseudoperonospora cubensis* (ALBUQUERQUE et al., 2015) e os acessos A-9 e A-26 são altamente resistentes a *Macrophomina phaseolina*, e A-13, A-16, A-27, A-31, A-12, A-24 e A-25 são moderadamente resistentes a esse fungo (AMBROSIO et al., 2015). Portanto, esses acessos brasileiros possuem grande potencial de uso no melhoramento.

As informações geradas nesse trabalho irão auxiliar no melhoramento assistido para resistência ao ZYMV, pois uma planta contendo mais de um gene de resistência, mesmo que esse seja de efeito menor, terá um maior nível de resistência, como citado por DANIN-POLEG et al. (2002). Esses autores afirmaram que os três genes (*Zym-1*, *Zym-2* e *Zym-3*) são necessários em uma variedade de meloeiro para um alto nível de resistência, já que a falta de um resultará na suscetibilidade da planta. WASSANO (2013) observou a menor replicação viral em indivíduos heterozigotos para o alelo marcador de PI414723 que apresentavam o gene *Zym-2*, demonstrando sua importância para conferir um bom nível de resistência (DANIN-POLEG et al., 2002). Até o momento, não foi comercializado um híbrido de meloeiro com boa resistência ao ZYMV no Brasil devido a essas implicações relacionadas ao envolvimento dos três genes na resistência. Além disso, torna-se essencial estudar novas fontes e outros genes envolvidos na resistência, pois a variação genética que leva ao surgimento de novas estirpes do vírus pode levar à quebra da resistência e assim um gene de efeito menor pode tornar-se importante.

3 CONCLUSÕES

- A ligação dos marcadores MU6549 e CMBR55 ao gene *Zym-2* foi confirmada no grupo de ligação 10 (LGX) através de regressão linear.
- O gene *Zym-2* é de efeito menor, confirmado pelos coeficientes de determinação.
- A seleção assistida utilizando os marcadores MU6549 e CMBR55 irá auxiliar no melhoramento de meloeiro para resistência ao ZYMV.
- Alguns acessos brasileiros apresentaram baixos títulos virais, sendo potenciais fontes de resistência ao ZYMV.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.B.; ANTONIO, R.P.; NUNES, G.H.S.; MEDEIROS, R.V.; SILVA FILHO, A.J.R. Caracterização morfológica de fontes de resistência de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.28, p.100-107, 2015.
- AMBROSIO, M.M.Q.; DANTAS, A.C.A.; MARTÍNEZ-PEREZ, E.; MEDEIROS, A.C.; NUNES, G.H.S.; PICÓ, M.B. Screening a variable germplasm collection of *Cucumis melo* L. for seedling resistance to *Macrophomina phaseolina*. **Euphytica**, Heidelberg, v. 206, p.287-300, 2015.
- ANAGNOSTOU, K.; JAHN, M.; PERL-TREVES, R. Inheritance and linkage analysis of resistance to zucchini yellow mosaic virus, watermelon mosaic virus, papaya ringspot virus and powdery mildew in melon. **Euphytica**, Heidelberg, v.116, p.-265-270, 2000.
- BLUA, M.; PERRING, T.M. Effect of *Zucchini yellow mosaic virus* on development and yield of cantaloupe (*Cucumis melo*). **Plant disease**, Saint Paul, v.73, p. 317-320, Apr. 1989.
- BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZURCHER, E.J. (Ed). **Plant viruses online**: descriptions and lists from the VIDE database; versão: 20 th. Oxford: Oxford University Press, 1996. 1488 p.
- BURGER, Y.; PARIS, H.S.; COHEN, R.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LEWINSOHN, E. Genetic diversity of *Cucumis melo*. **Horticultural Reviews**, USA, v.36, p.165-198, 2010.
- CHIBA, N.; SUWABE, K.; NUNOME, T.; HIRAI, M. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. **Breeding Science**, Tokyo, v.53, p.21-27, 2003.
- DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.102, p.61-72, 2001.
- DANIN-POLEG, Y.; PARIS, H.S.; COHEN, S. ; RABINOWITCH H.D.; KARCHIZ. Oligogenic inheritance of resistance to *zucchini yellow mosaic virus* in melons. **Euphytica**, Heidelberg, v. 93, p. 331–337, 1997.
- DANIN-POLEG, Y.; TADMOR, Y. ;TZURI, G.;REIS, N. ;HIRSCHBERG, J. ;KATZIR, N. Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits , and localization of genes associated with ZYMV resistance. **Euphytica**, Heidelberg, v. 125, p. 373-384, 2002.
- DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; BAUDRACCO-ARNAS, S.; PITRAT, M.; STAUB, J.E.; OLIVER, M.; ARUS, P.; De VICENTE, C.M.; KATZIR, N. Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. **Genome**, Ottawa, v.43, p.963-974, 2000.
- DANTAS, A.C.A.; HOLANDA, I.S.A.; ESTERAS, C.; NUNES, G.H.S.; PICÓ, M.B. Diversity of melon accessions from Northeastern Brazil and their relationships with

germplasms of diverse origins. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.5, p.504-517, 2015.

DESBIEZ, C.; LECOQ, H. *Zucchini* yellow mosaic virus. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 46, p. 809-829, 1997.

DIAZ, A.; FERGANY, M.; FORMISANO, G.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; FEI, Z.; STAUB, J.; ZALAPA, J.; CUEVAS, H.; DACE, G.; OLIVER, M.; BOISSOT, N.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; HOFSTEDE, R.; KOERT, P.V.; HAREL-BEJA, R.; TZURI, G.; PORTNOY, V.; COHEN, S.; SCHAFFER, A.; KATZIR, N.; XU, Y.; ZHANG, H.; FUKINO, N.; MATSUMOTO, S.; GARCIA-MAS, J.; MONFORTE, A.J. A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, London, v.11, p.111-124, 2011.

DHILLON, N.P.S.; RANJANA, R.; SINGH, K.; EDUARDO, I.; MONFORTE, A.J.; PITRAT, M.; DHILLON, N.K. SINGH, P.P Diversity among landraces of Indian snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). **Genetics Resources Crop Evolution**, Netherlands, v.54, p. 1267-1283 p, 2007.

Exportação de frutas brasileiras 2014. In: _____. **APEX/BRASIL**- Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos. Disponível em: <http://www.apexbrasil.com.br/Noticia/APEX-BRASIL-E-ABRAFRUTAS-ASSINAM-CONVENIO-PARA-EXPORTACAO-DE-FRUTAS-BRASILEIRAS> . Acesso em: 28/01/2015.

FAZZA, A.C. **Mapeamento de genes de resistência a três raças de *Podosphaera xanthii* em meloeiro (*Cucumis melo* L.)**. 2011. 70 f. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FERNANDEZ-SILVA, I.; EDUARDO, I.; BLANCA, J.; ESTERAS, C.; PICO, B.; NUEZ, F.; ARUS, P.; GARCIA-MAS, J.; MONFORTE, A.J. Bin mapping of genomic and EST-derived SSRs in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.118, p.139-150, 2008.

FERGANY, M.; KAUR, B.; MONFORTE, A.J.; PITRAT, M.; RYS, C.; LECOQ, H.; DHILLON, N.P.S.; DHALIWAL, S.S. Variation in melon (*Cucumis melo*) landraces adapted to the humid tropics of southern India. **Genetics Resources Crop Evolution**, Netherlands, v.58, p.225-243, 2011.

GONZALO, M.J.; OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; MONFORT, A.; DOLCET-SANJUAN, R.; KATZIR, N.; ARUS, P.; MONFORTE, A.J. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.110, p.802-811, 2005.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; RAMOS, N.F.; RABELO FILHO, F.A.C.; GONÇALVES, M.F.B.; NECHET, K.L.; PEREIRA, P.R.V.S.; LIMA, J.A.A. Identificação sorológica de espécies de potyvirus em melancia, no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.687-689, 2004.

HAREL-BEJA, R.; TZURI, G.; PORTNOY, V.; LOTAN-POMPAN, M.; LEV, S.; COHEN, S.; DAI, N.; YESELSON, L.; MEIR, A.; LIBHABER, S.E.; AVISAR, E.; MELAME, T.; VAN KOERT, P.; VERBAKEL, H.; HOFSTEDE, R.; VOLPIN, H.; OLIVER, M.; FOUGEDOIRE, A.; STALH, C.; FAUVE, J.; COPE, B.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J.; ORI, N.; LEWINSOHN, E.; SHERMAN, A.; BURGER, J.; TADMOR, Y.; SCHAUER, A.A.; KATZIR, N. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism gene. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 121, p. 511-533, 2010.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. London: Academic Press, 2002. 1000 p.

KHETARPAL, R.K.; MAISONNEUVE, B.; MAURY, Y.; CHALHOUB, B.; DINANT, S.; LECOQ, H.; VARMA, A. Breeding for resistance to plant viruses. In: HADID, A.; KHETARPAL, R.K.; KOGANEZAWA, H. (Eds.). **Plant virus disease control**. Saint Paul, MN, USA: APS Press, p. 14-32, 1998.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Hoboken, v.12,n.3, p.172-175, 1944.

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. **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, 4. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 293-310.

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

LECOQ, H.; PITRAT, M. Strains of *Zucchini yellow mosaic virus* in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Phytopathologische Zeitschrift: Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 111, p. 165-173, 1984.

LECOQ, H.; WIPF-SCHEIBEL, C.; NOZERAN, K.; MILLOT, P.; DESBIEZ, C. Comparative molecular epidemiology provides new insights into *Zucchini yellow mosaic virus* occurrence in France. **Virus Research**, Amsterdam, v. 186, p. 135–143, 2014.

LIMA, M.F. **Viroses de cucurbitáceas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. 8 p. (Circular Técnica, 95).

LIMA, M.F.; ALVES, R.C. **Levantamento de vírus em cucurbitáceas no Brasil, no período 2008-2010**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 76).

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

MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v.144, p.78-79, 2007.

MCCREIGHT, J.D.; BOHN G. W.; KISHABA A.N. 'Pedigree' of PI 414723 melon. **Cucurbit Genetics Cooperative**, Raleigh, v.15,p.51-52, 1992.

Melon SSR. In:_____. **Cucurbits Genomics Database 2015** . Disponível em: <<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/EST/SSR.cgi?organism=melon>> . Acesso em: 17/12/2015.

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

MOURA, M. C. C. L.; ZERBINI, F. M.; SILVA, D. J. H.; QUEIROZ, M. A. Reação de acessos de *Cucurbita* sp. ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.206-210, 2005.

MOURA, M. C. F.; OLIVEIRA, L. C. S. ; SILVA, S. G. A. A cultura do melão: uma abordagem acerca da cadeia produtiva no agropólio Mossoró-Assú/ RN. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, São Paulo, v. 07, p. 1068-1084, 2011.

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

NAMETH, S.T.; DODDS, J.A.; PAULUS, A.O.; KISHBA, A. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in Southeastern California desert valleys. **Plant Disease**, v.69, n.9, p.785-788, 1985.

NUNES, G.H.S.; SANTOS JÚNIOR, J.J.; ANDRADE, F.V.; BEZERRA NETO, F.; MENEZES, J.B.; PEREIRA, E.W.L. Desempenho de híbridos de melão do grupo inodorus em Mossoró. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, p.90-93, 2005.

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**, v.33, n.2, p.192-194, 2007.

PÉRIN, C.; HAGEN, L.S.; DE CONTO, V.; KATZIR, N.; DANIN-PLEG, Y.; PORTNOY, V.; BAUDRACCO-ARNAS, S.; CHADOEUF, J.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred lines population. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.104, p.1017-1034, 2002.

Perfil da produção de frutas Brasil Ceará 2013. In:_____. **ADECE**- Agência de desenvolvimento do estado do Ceará. Ceará, 2013. p. 1-31.

Perspectivas Cepea; hoje, acompanhe FRUTAS e HORTALIÇAS 2016.

In:_____. **CEPEA**- Centro de estudos avançados em economia aplicada- ESALQ/USP. Disponível em:< www.cepea.esalq.usp.br/imprensa> Acesso em: 3/05/2016.

PITRAT, M. Linkage groups in *Cucumis melo* L. **Journal of Heredity**, Hoboken, v. 82, p. 406-411, 1991.

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

Produção de melão 2014. In:_____. **IBGE**- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf> . Acesso em: 6/11/2015.

Production of melons, others (in.cantaloupes) 2012. In:_____. **FAOSTAT**- Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistic. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 16/12/2015.

PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA. Normas de Classificação de Melão. **São Paulo: CEAGESP**, Centro de Qualidade em Horticultura, 2004. 6p (CQH. Documentos, 27)

R Core Team (2015). R: A **language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RITCHEL, P.S.; LINS, T.C.; TRISTAN, L.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, London, v.4, p.9, 2004.

SEBASTIAN, P.; SCHAEFER, H.; TELFORD, I.R.H.; RENNER, S. S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.107, p. 14269-14273, 2010.

SILVEIRA, L.M.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA NETO, I.S. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submedio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, n.2, p.123-126, 2009.

SIMMONS , H. E. ; DUNHAM, J.P.; ZINN, K.E. ; MUNKVOLD, G.P.; HOLMES, E.C. ;STEPHENSON, A.G. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) : Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. **Virus Research**, Ames, v.176, p. 259-264, 2013.

Sistema de produção de melão. In:_____. **EMBRAPA**- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária . Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/>>. Acesso em: 14 abril 2014.

SPADOTTI, D.M.A. **Caracterização biológica, sorológica, e molecular de isolados brasileiros do vírus do mosaico amarelo da abobrinha**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SPADOTTI, D.M.A.; WASSANO, D.T.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A.; INOUE-NAGATA, A.K. Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.72, p.187-191, 2015.

Van der Plank, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

WASSANO, D.T. **Identificação de marcadores ligados a genes de resistência a multiplicação de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em meloeiro**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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 five viroses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p.516-520, 2000.

YUSTE-LISBONA, F.J.; CAPEL, C; SARRIA, E.; TORREBLANCA, R.; GOMEZ-GUILLAMON, M.L.; CAPEL, J.; LOZANO, R; LOPEZ-SESE, A.I.; Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of major QTL for powdery mildew resistance. **Mol Breeding**, Heidelberg, v.27, p.181-192, 2011.

ZELLNIG, G.; POCKL M.H.; MOSTL, S.; ZECHMANN, B. Two and three dimensional characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* induced structural alterations in *Cucurbita pepo* L. plants. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 186, p. 245–252, 2014.

ZERBINI, F. M; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à Virologia Vegetal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 145 p. (Caderno didático, 87).

APÊNDICES

Apêndice A- Informações dos acessos quanto sua origem, multiplicação e sistema reprodutivo

Acesso	Origem*	Multiplicação	Sistema reprodutivo
A-01	MA	Quinta	Monóica
A-02	BA	Quinta	Monóica
A-04	PE	Terceira	Monóica
A-05	RN	Quarta	Monóica
A-06	BA	Terceira	Monóica
A-08	PE	Quinta	Monóica
A-09	PB	Quinta	Monóica
A-10	CE	Quinta	Monóica
A-11	SE	Quinta	Monóica
A-12	MA	Quinta	Monóica
A-13	RN	Quarta	Monóica
A-14	AL	Quinta	Monóica
A-15	RN	Quinta	Monóica
A-16	RN	Sexta	Monóica
A-17	RN	Quinta	Monóica
A-18	RN	Quinta	Monóica
A-19	PB	Quinta	Monóica
A-22	AL	Quinta	Monóica
A-23	PI	Quarta	Monóica
A-24	RN	Quinta	Monóica
A-25	RN	Quinta	Monóica
A-26	PE	Quinta	Monóica
A-28	BA	Quarta	Monóica
A-29	MA	Quinta	Monóica
A-30	BA	Quinta	Monóica
A-32	RN	Quinta	Monóica
A-33	PI	Quinta	Monóica
A-34	ni	ni	Monóica
A-36	MA	Quinta	Monóica
A-37	MA	Quinta	Monóica
A-39	CE	Quinta	Monóica
A-41	PB	Quinta	Monóica
A-42	CE	Quinta	Monóica
A-43	PI	Quarta	Monóica
A-44	MA	Quinta	Monóica
A-45	PB	Quinta	Monóica
A-50	RN	Segunda	Monóica
A-51	RN	ni	Monóica
A-52	RN	ni	Monóica
PI414723	RN	-	Monóica
Itapuã	RN	Segunda	Monóica

* Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Maranhão (MA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio Grande do Norte (RN), Sergipe (SE), ni- não informado.

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continua)

Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
1	0,309	0,846	0,577	0,380
2	0,260	0,203	0,231	0,041
3	0,168	0,096	0,132	0,051
4	0,173	0,080	0,126	0,065
5	0,150	0,065	0,107	0,060
6	0,139	0,057	0,098	0,058
7	0,095	0,048	0,072	0,033
8	0,097	0,051	0,074	0,033
9	0,130	0,066	0,098	0,046
10	0,146	0,050	0,098	0,068
11	0,162	0,055	0,108	0,076
12	0,126	0,046	0,086	0,057
13	0,135	0,072	0,104	0,045
14	0,201	0,059	0,130	0,100
15	0,187	0,052	0,119	0,095
16	0,106	0,050	0,078	0,040
17	0,172	0,070	0,121	0,072
18	0,138	0,055	0,097	0,059
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	0,301	0,087	0,194	0,151
22	0,388	0,288	0,338	0,071
23	0,170	0,049	0,109	0,085
24	0,343	0,266	0,305	0,054
25	0,264	0,087	0,175	0,125
26	0,190	0,059	0,125	0,093
27	0,270	0,077	0,173	0,137
28	0,445	0,631	0,538	0,132
29	0,476	0,213	0,345	0,186
30	0,280	0,061	0,170	0,155
31	0,257	0,054	0,155	0,144
32	0,153	0,042	0,098	0,078
33	0,193	0,068	0,130	0,089
34	0,324	0,052	0,188	0,192
35	0,469	0,050	0,260	0,296
36	0,529	0,049	0,289	0,339

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)				
Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
37	0,213	0,060	0,136	0,108
38	0,241	0,051	0,146	0,134
39	0,232	0,081	0,156	0,107
40	0,268	0,305	0,286	0,026
41	0,145	0,142	0,143	0,002
42	0,117	0,114	0,115	0,002
43	0,085	0,129	0,107	0,031
44	0,104	0,131	0,117	0,019
45	0,105	0,106	0,105	0,001
46	0,232	0,375	0,304	0,101
47	0,384	0,363	0,374	0,015
48	0,065	0,090	0,077	0,018
49	0,084	0,116	0,100	0,022
50	0,068	0,084	0,076	0,011
51	0,062	0,089	0,076	0,019
52	0,059	0,092	0,075	0,023
53	0,101	0,235	0,168	0,095
54	0,062	0,081	0,071	0,013
55	0,243	0,319	0,281	0,054
56	0,076	0,128	0,102	0,036
57	0,065	0,085	0,075	0,014
58	0,073	0,070	0,071	0,002
59	0,812	0,208	0,510	0,427
60	0,057	0,080	0,068	0,016
61	0,275	0,281	0,278	0,004
62	0,069	0,073	0,071	0,002
63	0,066	0,082	0,074	0,011
64	0,057	0,078	0,068	0,015
65	0,072	0,097	0,084	0,017
66	0,076	0,089	0,082	0,009
67	0,576	0,352	0,464	0,158
68	0,070	0,152	0,111	0,058
69	0,071	0,097	0,084	0,019
70	0,064	0,083	0,073	0,013
71	0,056	0,074	0,065	0,012
72	0,058	0,093	0,075	0,025
73	0,076	0,089	0,083	0,009
74	0,086	0,084	0,085	0,002

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
75	0,081	0,077	0,079	0,002
76	0,061	0,088	0,074	0,019
77	0,071	0,088	0,079	0,012
78	0,069	0,080	0,074	0,008
79	0,067	0,080	0,074	0,009
80	0,068	0,097	0,082	0,021
81	0,088	0,084	0,086	0,003
82	0,094	0,080	0,087	0,010
83	0,176	0,173	0,174	0,002
84	0,169	0,119	0,144	0,035
85	0,158	0,152	0,155	0,004
86	0,167	0,259	0,213	0,065
87	0,108	0,116	0,112	0,006
88	0,107	0,084	0,096	0,016
89	0,109	0,087	0,098	0,015
90	0,170	0,123	0,146	0,033
91	0,123	0,156	0,140	0,023
92	0,087	0,097	0,092	0,007
93	0,088	0,081	0,084	0,005
94	0,088	0,080	0,084	0,006
95	0,099	0,112	0,105	0,009
96	0,088	0,083	0,086	0,004
97	0,090	0,092	0,091	0,001
98	0,088	0,085	0,087	0,002
99	0,110	0,095	0,102	0,010
100	0,108	0,089	0,098	0,014
101	0,124	0,094	0,109	0,021
102	0,104	0,085	0,095	0,013
103	0,114	0,096	0,105	0,013
104	0,099	0,088	0,093	0,008
105	0,096	0,081	0,088	0,011
106	0,079	0,080	0,079	0,001
107	0,109	0,088	0,099	0,015
108	0,105	0,091	0,098	0,010
109	0,088	0,077	0,082	0,007
110	0,087	0,072	0,079	0,010
111	0,103	0,100	0,101	0,002

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
112	0,098	0,083	0,090	0,011
113	0,091	0,101	0,096	0,007
114	0,084	0,086	0,085	0,002
115	0,111	0,094	0,102	0,012
116	0,110	0,083	0,096	0,019
117	0,085	0,091	0,088	0,005
118	0,097	0,104	0,100	0,005
119	0,101	0,093	0,097	0,005
120	0,091	0,075	0,083	0,011
121	0,085	0,081	0,083	0,003
122	0,098	0,095	0,096	0,002
123	0,239	0,138	0,188	0,071
124	0,096	0,083	0,089	0,010
125	0,152	0,128	0,140	0,017
126	0,091	0,125	0,108	0,024
127	0,080	0,102	0,091	0,016
128	0,070	0,078	0,074	0,006
129	0,077	0,085	0,081	0,005
130	0,047	0,060	0,053	0,010
131	0,044	0,067	0,055	0,017
132	0,054	0,086	0,070	0,022
133	0,060	0,085	0,073	0,018
134	0,365	0,595	0,480	0,163
135	0,048	0,072	0,060	0,017
136	0,051	0,059	0,055	0,006
137	0,065	0,081	0,073	0,012
138	0,056	0,066	0,061	0,007
139	0,060	0,145	0,102	0,060
140	0,077	0,109	0,093	0,022
141	0,072	0,081	0,077	0,006
142	0,052	0,075	0,064	0,016
143	0,045	0,069	0,057	0,017
144	0,044	0,058	0,051	0,010
145	0,065	0,096	0,080	0,022
146	0,054	0,114	0,084	0,042
147	0,045	0,065	0,055	0,014
148	0,049	0,059	0,054	0,007

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
149	0,056	0,084	0,070	0,020
150	0,057	0,076	0,066	0,014
151	0,049	0,063	0,056	0,010
152	0,058	0,056	0,057	0,001
153	0,063	0,078	0,071	0,011
154	0,056	0,083	0,069	0,019
155	0,053	0,064	0,059	0,008
156	0,046	0,065	0,055	0,013
157	0,064	0,080	0,072	0,011
158	0,059	0,065	0,062	0,004
159	0,051	0,060	0,056	0,006
160	0,055	0,066	0,061	0,008
161	0,068	0,072	0,070	0,003
162	0,056	0,068	0,062	0,008
163	0,059	0,064	0,061	0,004
164	0,055	0,067	0,061	0,008
165	0,075	0,082	0,078	0,005
166	0,175	0,510	0,342	0,237
167	0,121	0,084	0,103	0,026
168	0,124	0,078	0,101	0,033
169	0,155	0,108	0,131	0,034
170	0,124	0,069	0,096	0,039
171	0,089	0,086	0,087	0,002
172	0,072	0,053	0,062	0,013
173	0,061	0,056	0,058	0,004
174	0,062	0,059	0,060	0,002
175	0,089	0,072	0,080	0,012
176	0,061	0,051	0,056	0,007
177	0,062	0,049	0,055	0,009
178	0,067	0,050	0,058	0,012
179	0,104	0,074	0,089	0,021
180	0,072	0,056	0,064	0,012
181	0,792	0,648	0,720	0,102
182	1,033	0,981	1,007	0,036
183	0,084	0,074	0,079	0,007
184	0,070	0,059	0,065	0,008
185	0,074	0,054	0,064	0,014

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
186	0,065	0,053	0,059	0,008
187	0,091	0,070	0,081	0,015
188	0,077	0,062	0,069	0,011
189	0,072	0,049	0,061	0,016
190	0,066	0,045	0,055	0,015
191	0,092	0,061	0,077	0,022
192	0,234	0,172	0,203	0,044
193	0,066	0,056	0,061	0,007
194	0,063	0,056	0,060	0,005
195	0,078	0,057	0,068	0,015
196	0,076	0,060	0,068	0,011
197	0,066	0,046	0,056	0,014
198	0,070	0,045	0,057	0,017
199	0,086	0,067	0,076	0,013
200	0,081	0,052	0,066	0,020
201	0,074	0,062	0,068	0,008
202	0,083	0,051	0,067	0,023
203	-	-	-	-
204	0,079	0,051	0,065	0,019
205	0,386	0,099	0,242	0,203
206	0,093	0,059	0,076	0,024
207	-	-	-	-
208	0,097	0,059	0,078	0,027
209	0,108	0,117	0,112	0,007
210	0,089	0,068	0,078	0,015
211	0,086	0,070	0,078	0,011
212	0,125	0,119	0,122	0,004
213	0,097	0,062	0,080	0,025
214	0,160	0,047	0,103	0,080
215	0,075	0,036	0,055	0,027
216	0,076	0,038	0,057	0,027
217	0,087	0,062	0,074	0,018
218	0,081	0,043	0,062	0,027
219	0,123	0,039	0,081	0,059
220	0,089	0,037	0,063	0,037
221	0,100	0,057	0,078	0,031
222	0,115	0,049	0,082	0,046

Apêndice B- Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população segregante F2 através dos dados de absorbância de ELISA

(conclusão)				
Indivíduos	Repetição biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições (Título viral)	Desvio padrão
223	0,075	0,038	0,056	0,026
224	0,073	0,039	0,056	0,024
225	0,077	0,054	0,066	0,016
226	0,089	0,043	0,066	0,032
227	0,087	0,043	0,065	0,031
228	0,079	0,049	0,064	0,021
229	0,099	0,057	0,078	0,030
230	0,084	0,046	0,065	0,027
231	0,093	0,043	0,068	0,036
232	0,133	0,040	0,086	0,066
233	0,078	0,065	0,071	0,010
234	0,104	0,042	0,073	0,044
235	0,099	0,046	0,072	0,037
236	0,113	0,042	0,077	0,050
237	0,122	0,055	0,088	0,047
238	0,120	0,056	0,088	0,046
239	0,078	0,042	0,060	0,026
240	0,088	0,040	0,064	0,034
241	0,106	0,060	0,083	0,033
242	0,088	0,046	0,067	0,030
243	0,575	0,223	0,399	0,249
244	0,116	0,044	0,080	0,051
245	0,103	0,051	0,077	0,036
246	0,113	0,048	0,080	0,046
247	0,152	0,046	0,099	0,075
248	0,183	0,041	0,112	0,100
249	0,109	0,060	0,085	0,035
250	0,164	0,049	0,106	0,082
VED +*	0,896	0,910	0,903	0,010
VED -*	0,052	0,041	0,047	0,008
PI +*	0,044	0,049	0,046	0,004
PI -*	0,049	0,042	0,046	0,005
F1 +*	0,051	0,050	0,050	0,001
F1 -*	0,055	0,048	0,051	0,005

*VED+ = Controle positivo, plantas de 'Védrantais' inoculadas ; VED- = Controle negativo, plantas de 'Védrantais' não inoculadas com o vírus (*mock inoculation*); PI + = Plantas de PI414723 inoculadas; PI - = Plantas de PI414723 não inoculadas; F1+= Plantas da população F1 inoculadas; F1- = Plantas da população F1 não inoculadas.

Apêndice C -Título viral médio dos acessos avaliados seguido do desvio padrão nos experimentos 1 e 2

(continua)				
Experimento 1			Experimento 2	
Acessos	Título viral médio	Desvio padrão	Título viral médio	Desvio padrão
A-01	0,1838	0,1751	0,161	0,096
A-02	0,2138	0,1774	0,200	0,146
A-04	0,2814	0,2558	0,019	0,009
A-05	0,1534	0,1963	0,138	0,160
A-06	0,3413	0,2263	0,137	0,166
A-08	-	-	0,240	0,229
A-09	0,3071	0,1809	0,123	0,095
A-10	-	-	0,228	0,188
A-11	0,2967	0,2252	0,034	0,022
A-12	0,2401	0,1165	0,022	0,018
A-13	-	-	0,109	0,152
A-14	0,1225	0,1700	0,180	0,165
A-15	0,2825	0,2186	0,163	0,169
A-16	0,5547	0,2745	0,259	0,203
A-17	0,4960	0,1762	0,217	0,162
A-18	0,3547	0,1702	0,095	0,148
A-19	0,6201	0,4021	0,073	0,113
A-22	0,2070	0,1871	0,231	0,180

Apêndice C -Título viral médio dos acessos avaliados seguido do desvio padrão nos experimentos 1 e 2

(continuação)

Experimento 1			Experimento 2	
Acessos	Título viral médio	Desvio padrão	Título viral médio	Desvio padrão
A-23	-	-	0,060	0,083
A-24	-	-	0,368	0,329
A-25	0,3677	0,3346	0,089	0,132
A-26	-	-	0,266	0,135
A-28	-	-	0,165	0,190
A-29	0,3506	0,1996	0,147	0,145
A-30	0,2362	0,2715	0,175	0,092
A-32	0,3638	0,2683	0,125	0,116
A-33	-		0,197	0,202
A-34	0,3014	0,1738	0,109	0,222
A-35	0,3319	0,2270	0,049	0,070
A-36	-	-	0,130	0,143
A-37	0,3656	0,2917	0,076	0,087
A-39	0,3705	0,2195	0,208	0,185
A-41	0,2105	0,2454	0,081	0,072
A-42	0,3502	0,2529	0,186	0,142
A-43	0,2251	0,1781	0,184	0,198
A-44	-	-	0,213	0,243

Apêndice C - Título viral médio dos acessos avaliados seguido do desvio padrão nos experimentos 1 e 2

(conclusão)

Acessos	Experimento 1		Experimento 2	
	Título viral médio	Desvio padrão	Título viral médio	Desvio padrão
A-45	0,4283	0,2538	0,361	0,256
A-50	0,1763	0,2338	0,077	0,088
A-51	0,3488	0,3038	0,072	0,103
A-52	0,3168	0,2383	0,221	0,235
Itapuã	0,1610	0,2100	0,014	0,009
PI414723	0,0225	0,0054	0,008	0,003
VED + *	0,5954	0,1729	0,339	0,273
VED - **	0,0246	0,0136	0,016	0,011

*VED+ = Controle positivo, plantas de 'Védrantais' inoculadas

**VED- = Controle negativo, plantas de 'Védrantais' não inoculadas com o vírus (*mock inoculation*)