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

**Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação
de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em meloeiro**

Débora Targino Wassano

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

Débora Targino Wassano
Bacharel em Biotecnologia

Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em meloeiro

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2013

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

Wassano, Débora Targino

Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em meloeiro / Débora Targino Wassano. - - Piracicaba, 2013.
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. *Cucumis melo* 2. Resistência genética 3. Virose 4. Mapeamento genético
5. Marcador molecular I. Título

CDD 635.61
W321i

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

*Aos meus amados pais Gilberto e Maria pelo apoio, incentivo e amor,
ao meu irmão Daniel pelo companheirismo e amizade,
ao Lucas, meu querido namorado, pela confiança, apoio e paciência constantes,*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À ESALQ e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade dada para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação, ensinamentos, conversas, confiança, incentivo, apoio e principalmente pelas palavras certas quando eu mais precisava.

Aos Professores do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos.

À empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA pela coleta de material infectado com ZYMV, principalmente à Dra. Kátia Regina Brunelli; e por estarem com as portas abertas para discussões enriquecedoras para este trabalho, principalmente ao Dr. Paulo Tarcísio Della Vechia, Dr. José Osvaldo de Oliveira Neto e à querida Msci. Olga Satie Suzuki.

Ao Prof. Dr. Jorge Rezende, pelos ensinamentos na área de virologia e conversas esclarecedoras para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao amigo e mestrando Raphael Severo da Cunha, pela imensa ajuda na instalação, avaliação, descarte dos experimentos de campo e ELISA. Obrigada ainda por me dar abrigo durante a etapa final do mestrado e por estar do meu lado nos momentos de estresse, nervoso, comemorações e risadas.

Ao amigo Msci. David Spadotti pela ajuda na avaliação dos experimentos, ensinamentos na área de virologia e companhia em momentos de distração.

Ao graduando Rafael Popin, pela ajuda na polinização das plantas F1, todas as etapas dos experimentos de campo, ELISA, extração de DNA e genotipagem.

À mestranda Maísa Curtolo, pela sua imensa dedicação durante experimentos de campo, ELISA, extração de DNA, e em especial com a genotipagem; sem você eu não teria conseguido, meu muito obrigada!

Ao Doutorando Guilherme Pereira e ao Prof. Dr. Antonio Augusto F. Garcia pela colaboração na construção do mapa de ligação e mapeamento de QTL.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Vegetal, Edvaldo Buriolla, Viviana Camelo, Ana Paula, Pedro, David e Carla Pelizari, por me receberem tão bem e sempre me ajudarem nos ensaios de ELISA quando precisava.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, que sempre estavam à disposição para ajudar sempre que foi necessário.

Aos queridos amigos do LGM, Jerônimo Vieira, Mariana Cicarelli Cia, Thayne Munhoz, Fernanda Rezende, Thaís Egreja, Raphael Severo, Rafael Popin, Maisa Curtolo, Aline Zavaglia e Silvânia Machado, pelo apoio constante, ajuda no dia-a-dia do laboratório em meio a pipocas e refrigerantes, que fizeram que os dias no laboratório fossem muito mais agradáveis.

Às minhas amigas-irmãs da República GAIA – UFSCar Araras que sempre me mandaram forças, acreditaram na minha capacidade de realizar este trabalho e seguir em frente na vida!

Aos meus amigos: Mariana Freitas, Marina Mortatti, Suzana Lóssio, Marina Figueiredo, Daiyane Morimoto, Elayne Uchida, Matheus Benez e Rafael Germani, pela amizade e principalmente por ajudarem, cada um à sua maneira, a me tornar a pessoa que sou hoje.

Às queridas amigas Fernanda Zatti, Bruna Ogata, Maíra Campos e Vânia Garcia, pela convivência harmoniosa em casa, fazendo com que a distância da minha família parecesse menor.

Aos amigos Carla Pelizari, Raphael Severo, Luana Nunes, Fernanda Moreti e Ademar Moreti por me darem abrigo nas horas que mais precisei!

Ao meu namorado, Lucas Amadeo, por compreender minhas ausências, entender minhas escolhas, me apoiar, escutar e nunca me deixar desanimar frente aos novos desafios, sempre me dando forças para dar um novo passo.

Finalmente, à minha família, em especial a meus pais Maria e Gilberto, pelo incentivo constante, amor, confiança, paciência e, sobretudo pela referência moral e profissional, que continuam me guiando em minha carreira e no meu crescimento pessoal.

À Vocês, meu muito obrigada!

“Em um dado dia, uma dada circunstância, você acha que tem um limite. Você então tenta ir para esse limite e você toca esse limite, e você pensa: ‘Ok, este é o limite’. Logo que você toca esse limite, algo acontece e de repente você pode ir um pouco mais longe. Com o poder da sua mente, sua determinação, seu instinto, e a experiência também, você pode voar muito alto.”

Ayrton Senna

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A cultura do meloeiro.....	19
1.2 O mosaico amarelo do meloeiro	19
1.3 Resistência a zymv em melão.....	21
2 DESENVOLVIMENTO.....	25
2.1 Material e métodos.....	25
2.1.1 Material vegetal	25
2.1.2 Obtenção de isolados de ZYMV	25
2.1.3 Escolha do isolado para experimentos de resistência.....	27
2.1.4 Avaliação da resistência das populações segregantes à ZYMV	28
2.1.5 Genotipagem de plantas F ₂ com locos SSR.....	28
2.1.6 Confirmação da ligação do ssr CMAG36 ao gene <i>Zym-1</i>	31
2.1.7 Identificação de marcadores ssrs ligados a <i>Zym-2</i>	31
2.1.8 Localização dos genes <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i> em mapas de ligação por meio de análise de mapeamento por intervalos múltiplos.....	31
2.1.9 Confirmação do mapeamento dos genes <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i> na população LGM3	32
2.2 Resultados.....	33
2.2.1 Obtenção de isolados de ZYMV	33
2.2.2 Seleção de isolado de ZYMV	34
2.2.3 Avaliação da resistência à zymv de indivíduos da população LGM2	36
2.2.4 Confirmação da ligação entre CMAG36 e <i>Zym-1</i>	38
2.2.5 Identificação de marcadores ssrs ligados a <i>Zym-2</i>	40
2.2.6 Localização dos genes <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i> em mapas de ligação por meio de análise de mapeamento por intervalos múltiplos.....	40
2.2.7 Análise de epistasia entre <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i>	44
2.2.9 Confirmação do mapeamento dos genes <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i> na população LGM3	45
2.3 Discussão	47
3 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55

RESUMO

Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em meloeiro

Viroses causam grandes danos às cucurbitáceas, pois além da severidade dos sintomas, não existem métodos curativos de controle. Dentre os vírus que infectam o meloeiro, o ZYMV é um dos mais severos e frequentes. PI414723 é a única fonte de resistência a este patógeno, sendo resistente ao seu patótipo 0. A resistência é conferida por um único gene dominante, *Zym-1*, mas há relatos sobre a existência de outros dois (*Zym-2* e *Zym-3*). Até o momento, apenas *Zym-1* foi localizado em um mapa de ligação, ligado ao marcador microssatélite CMAG36. Entretanto, há evidências que *Zym-2* esteja ligado ao marcador CMCT134b. O objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores ligados a *Zym-2* a partir de análises de ligação entre locos de microssatélites e resistência ao vírus, realizadas em populações F₂ oriundas de PI414723 x 'Védraçais'. O inóculo foi isolado de um campo comercial e caracterizado quanto à sua agressividade, ao patótipo e à transmissibilidade por afídeos. As plantas foram inoculadas de modo mecânico e a resistência avaliada por quantificação do título viral por PTA-ELISA. A distribuição dos valores de título viral não foi normal e apresentou tendência para baixos títulos, indicando a presença de pelo menos um gene dominante de grande efeito. A ligação de *Zym-1* a CMAG36 foi confirmada por meio de regressão linear simples. Plantas homozigóticas para alelos marcadores do genitor 'Védraçais' neste loco foram genotipadas com marcadores microssatélites ligados ao marcador CMCT134b e a ligação destes com *Zym-2* foi testada através de regressão linear simples. As análises indicaram associação significativa entre títulos virais e genótipos em CMBR55 e CMGA172. Regiões dos grupos de ligação II e X foram construídos com cinco marcadores cada para localizar os genes *Zym-1* e *Zym-2* através do mapeamento por múltiplos intervalos (MIM). A ligação entre *Zym-1* e CMAG36 foi novamente confirmada a uma distância estimada de 3,4 cM (LOD = 33,32), enquanto *Zym-2* mostrou-se ligado a CMBR55, a uma distância estimada em 3,9 cM (LOD = 17,45). Foi constatada epistasia entre *Zym-1* e *Zym-2* (LOD = 12,73) de modo que o fenótipo de plantas homozigóticas para o alelo marcador de 'Védraçais' no loco CMAG36 é dependente de seus genótipos em CMBR55. Uma segunda população F₂ derivada do mesmo cruzamento foi fenotipada para resistência a ZYMV e genotipada com os mesmos marcadores para validar os resultados. A ligação de *Zym-1* a CMAG36 foi novamente confirmada, mas o mesmo não ocorreu com *Zym-2*. Tal resultado provavelmente decorreu do fato de *Zym-2* ser de efeito menor e, portanto, mais difícil de ser detectado frente às variações experimentais. O uso de poucos marcadores também pode ter influenciado no poder de detecção dos testes, já que o número de marcadores influencia o poder de detecção de genes quantitativos. Além de fornecer evidências adicionais da existência de um segundo gene de resistência a ZYMV em PI414723, o presente trabalho também apresentou evidências de interação epistática entre eles. Não obstante, conclui-se que variedades resistentes oriundas de PI414623 podem ser obtidas pela seleção assistida unicamente pelo marcador CMAG36.

Palavras-chave: *Cucumis melo*; Resistência genética; Virose; Mapeamento genético; Marcador molecular

ABSTRACT

Identification of makers linked to resistance genes of melon controlling multiplication of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

Viruses cause major damage to cucurbits due to the severity of the symptoms and because there are no curative methods of control. Among the viruses that infect muskmelon, ZYMV is one of the most severe and frequent. PI414723 is the only source of resistance to this pathogen, being resistant to the pathotype 0. Resistance is conferred by a single dominant gene, *Zym-1*, but there are reports on the existence of at least two others (*Zym-2* and *Zym-3*). To date, only *Zym-1* was located on a linkage map but there is evidence that *Zym-2* is linked to the microsatellite marker CMCT134b. The objective of this study was to identify markers linked to *Zym-2* from linkage analysis between microsatellite loci and resistance to the virus in F₂ populations derived from the cross PI414723 x 'Védraçais'. The inoculum was isolated from a commercial field and characterized as to its aggressiveness, pathotype and transmissibility by aphids. Plants were inoculated mechanically and resistance was evaluated by measuring the viral titer by PTA-ELISA. The distribution of viral titers was not normal and showed tendency for low values, indicating the presence of at least one dominant gene of large effect. The linkage of *Zym-1* to CMAG36 was confirmed by linear regression. Plants homozygous for the 'Védraçais' marker allele on this locus were genotyped with microsatellite markers linked to CMCT134b and the linkage of these with *Zym-2* were tested by simple linear regression. The analyses indicated a significant association between viral titers and genotypes at the CMBR55 and CMGA172 marker loci. Regions of linkage groups II and X were constructed with five markers each in order to locate *Zym-1* and *Zym-2* by the Multiple Intervals Mapping approach (MIM). Linkage between *Zym-1* and CMAG36 was confirmed at an estimated distance of 3.4 cM (LOD = 33.32), as expected, while *Zym-2* was found linked to CMBR55 at an estimated distance of 3.9 cM (LOD = 17.45). Epistasis between *Zym-1* and *Zym-2* was found (LOD=12.73), indicating that the phenotype of plants homozygous for 'Védraçais' marker allele in CMAG36 depended on their genotype in CMBR55. A second F₂ population derived from the same cross was phenotyped for resistance to ZYMV and genotyped with the same markers in order to validate the results. The linkage of *Zym-1* to CMAG36 was validated, but the same did not occur with *Zym-2*. This results probably from the fact that *Zym-2* presented minor phenotypic effects which are harder to detect due to environmental variations. In addition, the use of few markers probably contributed to this result as well, since the number of markers influences the power to detect quantitative loci. Besides providing further evidences of the existence of a second resistance gene in PI414723, this study also detected epistatic effects between them. Notwithstanding, it is concluded that resistant cultivars can be developed from PI414723 solely based on the selection assisted with CMAG36.

Keywords: *Cucumis melo*; Genetic resistance; Viral disease; Genetic mapping; Molecular marker

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas em plantas de ‘Caserta’ induzidos pela inoculação dos isolados de ZYMV RN1-I (A), RN5-G(B), RN6-F(C) e um exemplar sadio (D). 34
- Figura 2 - Reação de ‘Védrantais’ à inoculação mecânica de RN1-I (A), RN5-G(B), RN6-F(C) e um exemplar sadio (D). 35
- Figura 3 - Valores médios da absorbância em teste ELISA de plantas PI414723, F1, ‘Védrantais’ e ‘Caserta’ em plantas não inoculadas e após inoculação com os isolados RN1-I, RN6-F e RN5-G. 36
- Figura 4 - Reação de PI414723 (A), F1 (C) e Védrantais(E) à inoculação com isolado RN6 de ZYMV. As fotos B, D e F representam folhas de plantas de PI414723, F1 e Védrantais não inoculadas. 37
- Figura 5 - Histograma da frequência de títulos virais observados na população LGM2. As setas indicam os títulos virais médios em plantas das linhagens genitoras. 38
- Figura 6 - Gráfico das médias de titulação viral de acordo com o genótipo no loco CMAG36. 39
- Figura 7 - Mapa de ligação gerado pelo programa Onemap e editado no MapChart (VOORRIPS, 2002) a partir dos dados genotípicos da população LGM2 (LGII e LGX). Os grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). Do lado direito estão discriminados os SSRs e do lado esquerdo a posição que foram mapeados (cM). As setas correlacionam LGII e LGX aos mapas publicados por Harel-Beja et al. (2010) e Diaz et al. (2011). 42
- Figura 8 - Perfil LOD Score para a presença do QTL de resistência à ZYMV nos grupos de ligação LG II e LGX. 43
- Figura 9 - Média de titulação viral segundo os genótipos nos marcadores CMAG36 e CMBR55, ligados aos genes *Zym-1* e *Zym-2*, respectivamente. 45
- Figura 10 - Histograma de frequência de títulos virais observados na população LGM3. As setas indicam os títulos virais médios em plantas das linhagens genitoras. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos marcadores microssatélites utilizados, descrição dos SSRs e indicação da população na qual foi utilizado, de acordo com a etapa do trabalho.....	30
Tabela 2 – Detecção de vírus através de PTA-ELISA em folhas de ‘Caserta’ inoculadas com extrato de amostras foliares sintomáticas coletadas em Baraúna-RN.	33
Tabela 3 – Amostras foliares positivas para ZYMV usadas como inóculo, quantidades de lesões locais geradas em <i>C. quinoa</i> e inoculadas em ‘Caserta’ e de plantas sintomáticas e identificação dos isolados.....	34
Tabela 4 – Frequências esperadas e observadas da genotipagem com o SSR CMAG36 e resultado do teste chi-quadrado para adequação ao modelo 1:2:1 de segregação.	38
Tabela 5 – Número de indivíduos pertencentes a cada classe genotípica para marcadores do grupo de ligação X e P-valor da regressão linear entre genótipo e título viral.....	40
Tabela 6 – Posições dos QTLs e indicação de interação entre eles. Informações de LOD Score, % de variação explicada e P-valor, através de análise MIM.	43
Tabela 7 - Efeito de aditividade e dominância dos QTLs mapeados e interações entre eles...	44
Tabela 8 – Relação dos iniciadores utilizados para genotipagem de LGM3 seguidos pelas quantidades de indivíduos de cada classe genotípica possível para um marcador codominate, adequação ao modelo de segregação 1:2:1 pelo teste chi-quadrado e resultado da análise de variância entre as classes genotípicas em cada iniciador e média de título viral.	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura do meloeiro

Melão (*Cucumis melo* L.) é uma espécie economicamente importante da família das cucurbitáceas, que tem como centro de origem a África e Ásia (KERGE; GRUM, 2000). Trata-se de uma espécie autógama, diploide ($2n=24$) e seus frutos apresentam uma grande variação em formato, tamanho, coloração, textura, composição e sabor (STEPANSKY et al., 1999; MONFORTE et al., 2004). Tal diversidade deriva da alta diversidade genética - segundo informação advinda de estudos com marcadores moleculares (STAUB et. al., 2000; LÓPEZ-SESÉ et al., 2002; NAKATA et al., 2005; SZABÓ, et. al., 2005; ESCRIBANO et. al., 2008).

O cultivo do meloeiro é realizado em regiões de climas tropical e temperado ao redor do mundo (GONZALO et al., 2005). Seu cultivo no Brasil é de grande relevância para os estados do Ceará e Rio Grande do Norte, e está concentrado principalmente no polo agrícola Mossoró-Açu, responsável pela geração de 98,9% das divisas advindas da exportação do fruto no País, as quais contaram US\$128354 milhões em 2011, referente à venda de 169576 toneladas do fruto (FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS, 2013). Estas regiões apresentam condições propícias para a cultura, caracterizadas como sendo de clima muito quente com estação chuvosa no verão atrasando-se para o outono. (MEDEIROS et al., 2006).

De acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio exterior (MDIC), a exportação brasileira de melão no ano de 2012 registrou um valor de US\$134,1 milhões, ocupando o terceiro lugar no ranking de exportação de frutas *in natura* em 2012.

1.2 O mosaico amarelo do meloeiro

Dentre as doenças que acometem cucurbitáceas, as viroses ocorrem em elevada frequência, acarretando perdas em quantidade e qualidade dos frutos. No Brasil, a atenção está focada nos vírus do gênero *Potyvirus*, pois engloba três espécies de relevância econômica para o cultivo do meloeiro e melancia: *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (RAMOS et al., 2003).

O ZYMV é um *Potyvirus* de partículas alongadas e flexuosas e seu genoma é composto por RNA fita simples positiva (HULL, 2004). Sua transmissão se dá por afídeos de

maneira não persistente (LISA et al., 1981) e seu rol de hospedeiros engloba cucurbitáceas como melão, pepino, abóbora e melancia. O ZYMV foi primeiramente relatado em 1972, no nordeste da Itália, de onde rapidamente se espalhou para outros países. Hoje está presente em quase todos os locais onde as cucurbitáceas são cultivadas (DESBIEZ; LECOQ, 1997). O vírus já foi detectado tanto em campo quanto em cultivos protegidos em vários países da Europa, Ásia, África e nas regiões centro-oeste, norte e sul do continente Americano, além da Oceania (DESBIEZ; LECOQ, 1997).

Em território brasileiro, existem relatos da ocorrência de ZYMV em vários estados, dentre eles São Paulo (YUKI et al., 2000), Maranhão (MOURA et al., 2001), Pernambuco, Bahia (SILVEIRA, 2009), Roraima (HALFELD-VIEIRA et al., 2004) e Ceará (SANTOS et al., 2000). Estudos sobre a incidência de viroses em cucurbitáceas no estado de São Paulo mostraram que o ZYMV foi o segundo vírus mais frequente, constatado em 24,5% das amostras, precedido apenas pelo PRSV-W (YUKI et al., 2000). Na região do submédio São Francisco, o ZYMV foi o terceiro mais frequente, após o PRSV-W e o WMV (SILVEIRA et al., 2009). Entretanto, apesar de sua importância, não existem trabalhos que mensurem os danos causados por este vírus na produção brasileira.

O ZYMV causa a doença denominada de mosaico amarelo do meloeiro, caracterizada pelo clareamento das nervuras e mosaico amarelo nas folhas, que posteriormente apresentam-se de tamanho reduzido, deformadas e muitas vezes com bolhas verdes escuras e bordas serrilhadas. Os ramos exibem entrenós curtos e os frutos apresentam descoloração e manchas salientes, ocasionalmente associadas com um marmoreio interno do fruto e endurecimento da polpa. O número de frutos pode ser reduzido em até 94% em plantas infectadas durante a fase vegetativa e em 76% se a infecção ocorrer logo antes do florescimento (BLUA; PERRING, 1989). As sementes normalmente apresentam deformação e baixa taxa de germinação. Alguns isolados de ZYMV induzem, em cultivares que apresentam o gene *Fn* (*Flaccida necrosis*), uma murcha repentina seguida por necrose sistêmica da planta (DESBIEZ; LECOQ, 1997).

Isolados de ZYMV podem ser classificados em três patótipos, diferenciados de acordo com os sintomas que causam quando inoculados em plantas do acesso PI 414723. Segundo Lecoq e Pitrat (1984), isolados que não induzem nenhum sintoma pertencem ao patótipo 0; aqueles que induzem sintomas de necrose sistêmica são classificados como patótipo 1, e os que induzem amarelecimento, murcha, mosaico e deformação das folhas são classificados como patótipo 2.

O controle da doença é focado em esforços preventivos com o objetivo de evitar o contato de afídeos virulentos com a cultura, já que não existe controle curativo para as

viroses. Recomenda-se evitar o escalonamento de plantio, manter o isolamento de lavouras novas, não implantar a cultura próxima a plantios mais antigos infectados e sim em épocas de baixa na população de afídeos (LIMA, 2011). É recomendável também a retirada de fontes de inóculo, aplicação de inseticidas e a utilização de plásticos anti-afídeos na implementação da cultura. Entretanto, tais métodos não são completamente eficientes (LIMA, 2011; DESBIEZ; LECOQ, 1997).

Outro método alternativo para o controle do ZYMV é a proteção cruzada, na qual as plantas são infectadas com uma estirpe fraca do vírus, que não causa sintomas severos, a qual confere proteção contra estirpes mais virulentas. Tal técnica já foi utilizada com sucesso em vários locais (WANG et al., 1991; PERRING et al., 1995), entretanto já foram relatados casos em que esse método não foi eficaz, provavelmente devido à grande divergência molecular entre a estirpe protetora e as virulentas utilizadas (DESBIEZ; LECOQ, 1997). Deste modo, o modo mais eficiente de controle do ZYMV é o plantio de materiais resistentes ou tolerantes. (DESBIEZ; LECOQ, 1997; LIMA, 2011; MOURA et al., 2005; EKBIC et al., 2010).

1.3 Resistência a ZYMV em melão

O acesso PI414723 é a única fonte de resistência conhecida para ZYMV (DANIN-POLEG et al., 2002). Ele deriva da introdução PI371795, de origem indiana. Em uma infestação de afídeos, uma única planta desta introdução que ficou livre de insetos foi autopolinizada de sete a oito vezes, gerando a progênie autogâmica 90234 (algumas vezes denominada LJ90234), a qual se mostrou completamente resistente a afídeos. Sementes de 16 plantas desta progênie foram misturadas, dando origem à PI 414723. Este acesso é de grande interesse, pois além de resistência ao ZYMV e ao pulgão, também é resistente a três raças de *Podosphaera xanthii* (MCCREIGHT et al., 1992; FAZZA et al., 2013).

Pitrat e Lecoq (1984) estudaram o modo de herança a ZYMV no acesso PI414723 utilizando quatro populações distintas: uma população F₁ proveniente do cruzamento entre PI414723 x ‘Charentais’, uma população F₂ proveniente deste mesmo cruzamento, uma população de retrocruzamento (BC₁) com o parental suscetível (F₁ x ‘Védrantais’) e outra população de retrocruzamento (BC₂) com o parental resistente ao ZYMV (F₁ x PI414723). A inoculação foi realizada de modo mecânico com um patótipo 0 do vírus. As plantas F₁ e BC₂ mostraram sintomas de lesão necrótica ou ausência de sintomas e foram consideradas resistentes. Já nas populações F₂ e BC₁ foram identificadas plantas com lesões necróticas, com clorose internerval ou ainda sem sintomas. Por esses resultados, os autores concluíram

que a resistência ao ZYMV é governada por um único gene dominante, denominado *Zym*. Este modo de herança foi posteriormente confirmado por Anagnostou et al. (2000) e por Harel-beja et al. (2010). O primeiro estudo relatou a herança em famílias F₃ provenientes do cruzamento PI414723 x ‘Top Mark’ inoculadas com o isolado ZYMV-CT, enquanto o segundo relatou a herança da resistência à ZYMV em indivíduos F₂ provenientes do cruzamento PI414723 x ‘Dulce’ utilizando uma estirpe do vírus não transmissível por afídeos (ZYMV-NAT). Pitrat (1991) relatou a ligação do gene *Zym* com os genes andromonóico (*a*), “halo clorótico” cotiledonar (*h*) e o gene *Pm-x* que confere resistência à raça 2-francesa de oídio e identificou esse grupo de ligação como grupo 4. Posteriormente, Périn et al. (2002), utilizando uma população F₂ descendente de PI414723 x ‘Védrantais’, construíram um mapa genético baseado em marcadores moleculares AFLP (amplified fragment length polymorphism) e IMA (inter microsatellite amplification) no qual o gene *Zym* foi renomeado para *Zym-1* e alocado ao grupo de ligação II (LG II), proximamente ligado ao marcador microssatélite (SSR) CMGA36, juntamente com os genes *a*, *h* e *Pm-x*. A posição de *Zym-1* foi confirmada por Danin-Poleg et al. (2002) e Harel-Beja et al. (2010) ao analisarem uma população do cruzamento PI414723 x ‘Dulce’.

A possibilidade de existência de outros genes de resistência de menor efeito em PI414723, além de *Zym-1*, foi relatada por Danin-Poleg et al. (1997), ao analisarem dados de outro cruzamento entre PI414723 e ‘Dulce’. Segundo os autores, a herança possivelmente envolve outros dois genes, denominados *Zym-2* e *Zym-3*. O gene *Zym-2* estaria possivelmente ligado ao marcador microssatélite CMCT134b, localizado no grupo de ligação VII de Danin-Poleg et al. (2002), o qual corresponde ao grupo de ligação X (LG X) de Périn et al. (2002). Porém, o posicionamento de *Zym-2* não foi exatamente definido, provavelmente devido à utilização de poucos marcadores. Até o momento, não existem relatos do posicionamento genético do gene *Zym-3*.

Segundo Anagnostou et al. (2000), a discrepância nas estimativas do número de genes de resistência neste acesso poderia ser explicada pela diferença na virulência dos isolados utilizados para avaliar a resistência, uma vez que Pitrat e Lecoq (1984) e Anagnostou et al. (2000) utilizaram isolados de patogenicidade moderada do patótipo 0, enquanto Danin-Poleg et al. (1997) utilizaram um isolado altamente virulento, também o patótipo 0, porém, não transmissível por afídeos (ZYMV-NAT). Outro fator poderia ser ainda a diferença no background genético das linhagens suscetíveis utilizadas nos cruzamentos, já que os trabalhos foram realizados com cruzamentos entre PI414723 x ‘Dulce’ (DANIN-POLEG et al., 1997, 2002; HAREL-BEJA et al., 2010), PI414723 x ‘Védrantais’ (PITRAT; LECOQ, 1984;

PÉRIN et al., 2002) ou PI414723 x ‘Top Mark’ (ANAGNOSTOU et al., 2000). Ainda, dado que *Zym-2* e *Zym-3* são genes que provavelmente contribuem em menor grau para a resistência à ZYMV, a identificação de seu posicionamento genético exige uma análise fenotípica qualitativa. No entanto, em todos os trabalhos de mapeamento discutidos até então, os fenótipos foram classificados em plantas resistentes e suscetíveis, não sendo utilizadas escalas de sintomas ou outra característica qualitativa.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente a resistência a ZYMV em plantas F₂ do cruzamento PI414723 x ‘Védrantais’, através da quantificação dos títulos virais por meio do teste PTA – ELISA (Plate trapped antigen enzyme linked immunosorbent assay).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Material vegetal

Foram utilizadas duas populações F₂, nomeadas de LGM2 e LGM3, derivadas do cruzamento PI414723 x ‘Védrantais’. PI414723 é um acesso pertencente ao grupo *Momordica* (melão amargo) e é resistente ao patótipo 0 de ZYMV (LECOQ; PITRAT, 1984), ao passo que ‘Védrantais’ é uma variedade pertencente ao grupo *Cantaloupensis* e altamente suscetível a esse vírus (PITRAT; LECOQ, 1984). A população LGM2 consistiu de 193 plantas e foi utilizada para mapear genes de resistência a ZYMV, ao passo que a população LGM3, composta por 210 plantas, foi usada para validar os resultados do mapeamento. Os indivíduos de ambas as populações foram originários de um único fruto F1.

2.1.2 Obtenção de isolados de ZYMV

Doze amostras de folhas de diferentes híbridos de melão com sintomas de mosaico e distorção foliar foram coletadas em agosto de 2011 no município de Baraúna – RN. Essas amostras foram nomeadas de RN-1 a 12 e foram utilizadas para inocular plantas de abobrinha ‘Caserta’ em casa de vegetação por meio mecânico a fim de determinar quais os vírus presentes nas mesmas. Para tanto, 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) e o homogenato foi friccionado em cotilédones das plantas de abobrinha na presença de carborundum. Como controle negativo foram usadas plantas de ‘Caserta’ não inoculadas, e para o controle positivo, plantas desta mesma variedade inoculadas com as viroses mais comuns da região nordeste: *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), ZYMV, PRSV-W e WMV. O teste PTA-ELISA foi utilizado para identificar os vírus nestas plantas segundo metodologia de Mowat e Dawson, 1987, usando antissoros específicos para os vírus citados acima. Para tanto, tecido foliar foi coletado dos ponteiros das plantas e macerado em almofariz em presença de tampão carbonato, pH 9,6, na 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 à 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, pH 7,4) . Em

seguida, foram adicionados 100 µL de antissoro diluído em tampão PBS-TPB (1:1000) e as placas foram incubadas à 37 °C por duas horas. Após, 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 uma incubação de 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 min a absorbância foi medida em leitor ELISA Metertech Σ 960 na faixa de 405 nm. Os valores de absorbância foram comparados com o controle negativo, sendo que uma amostra foi considerada positiva se apresentou um valor de absorbância maior que três vezes o observado no controle. O controle positivo foi usado para verificar a eficácia do método.

As amostras com infecção mista de ZYMV e outros vírus foram inoculadas separadamente em plantas de *Chenopodium quinoa* a fim de isolar uma única partícula viral a partir de lesões locais (HULL, 2002). *C. quinoa* é uma boa indicadora para ZYMV já que o vírus induz lesões locais quando inoculadas mecanicamente, causadas por uma única partícula viral (HULL, 2002; BRUNT et al., 1996), entretanto, algumas estirpes de PRSV e WMV também causam lesões locais em *C. quinoa*. As Lesões em *C. quinoa* foram individualmente coletadas utilizando-se um vazador de 2 mm e usadas como fonte de inóculo para inocular plantas de ‘Caserta’. Cada lesão local foi inoculada separadamente em uma única planta de ‘Caserta’ para replicação viral e foram identificadas com o número da amostra de campo adicionado por uma letra que identificasse a sequencia em que as lesões foram isoladas, por ordem alfabética; assim, a primeira lesão local isolada da amostra RN3 foi nomeada RN3-A, e assim por diante.

Aos 14 dias da inoculação, as plantas de ‘Caserta’ que apresentaram sintomas foram analisadas por PTA-ELISA usando antissoros para os mesmos vírus citados anteriormente, uma vez que algumas estirpes de PRSV e WMV também induzem lesões locais em *C. quinoa* (YEH et al., 1984; BRUNT et al., 1996). Folhas das plantas que testaram positivas apenas para o ZYMV foram dessecadas em cloreto de cálcio e guardadas em sílica gel à -20 °C a fim de preservar os isolados.

2.1.3 Escolha do isolado para experimentos de resistência

O isolado utilizado na avaliação da resistência nas populações segregantes foi escolhido de modo que induzisse sintomas severos e apresentasse altos títulos virais na cultivar ‘Védrantais’, que não induzisse sintomas em PI414723 (patótipo 0) e, por fim, que fosse transmissível por afídeos. Após cada teste os isolados foram selecionados e apenas os que apresentaram resultados satisfatórios foram utilizados no experimento seguinte.

Entre os isolados purificados de ZYMV na etapa anterior, apenas os que induziram sintomas mais severos nas plantas de ‘Caserta’ foram selecionados para dar continuidade aos experimentos.

Para a classificação dos isolados em patótipos segundo Lecoq e Pitrat (1984), estes foram inoculados mecanicamente em cinco plantas de PI414723 e em duas plantas de ‘Védrantais’ ainda em fase cotiledonar e a avaliação dos sintomas foi realizada 21 dias após.

Para o experimento visando avaliação dos sintomas induzidos pelos vírus e avaliação dos títulos virais na cultivar ‘Védrantais’, os isolados foram inoculados mecanicamente em PI414723, ‘Védrantais’ e F1, sendo utilizadas cinco plantas de cada material para cada isolado estudado, foram inoculadas ainda plantas de abobrinha ‘Caserta’ para certificar-se de sua virulência do inóculo. No experimento também foram utilizadas três plantas de cada material que não foram inoculadas para serem utilizadas como controle negativo. Após 21 dias da inoculação os sintomas foram avaliados visualmente para presença de clorose internerval, deformação de folhas com formação de bolhas ou diminuição da área foliar, e subdesenvolvimento da planta. O teste PTA-ELISA foi realizado em folhas apicais das plantas inoculadas e de plantas controle como descrito anteriormente. A absorbância média das duas leituras foi utilizada para comparar o título viral entre os isolados.

O teste de transmissão por afídeos foi realizado inoculando-se cada isolado em dez plantas de melão da cultivar ‘Védrantais’ e quatro plantas de ‘Caserta’ como controle. Afídeos (*Myzus persicae*) livres de vírus foram coletados de plantas de gergelim, livres de vírus, com ajuda de um pincel e mantidos em jejum, numa caixa plástica, por aproximadamente 30 min. Para a aquisição do vírus, os afídeos foram transferidos para folhas sintomáticas de ‘Caserta’, que foram anteriormente inoculadas com o vírus e mantidas em casa de vegetação por 15 dias. Após um período de aquisição de 20 min 15 afídeos foram transferidos para cada planta. Após uma hora, as plantas foram pulverizadas com inseticida piretróide (DECIS 25 EC, Bayer CropScience LTDA.) para eliminar os afídeos. As plantas

foram mantidas em casa de vegetação e a avaliação dos sintomas foi realizada visualmente após 14 dias.

2.1.4 Avaliação da resistência das populações segregantes à ZYMV

Indivíduos das populações LGM2 e LGM3 foram avaliados para resistência ao ZYMV em casa-de-vegetação em ensaios distintos. A população LGM2 foi avaliada em 01 de março de 2012 e a LGM3 em outubro de 2012. Cada ensaio contou também com três plantas de cada genitor e cinco plantas F1, utilizadas como controle positivo. As plantas foram cultivadas em vasos de 2 L com solo autoclavado, cada qual contendo duas plantas. As plantas foram inoculadas na fase cotiledonar conforme descrito anteriormente. Como inóculo, usou-se uma folha de uma planta de 'Caserta' infectada com ZYMV e preparada conforme descrito anteriormente. As plantas foram inoculadas duas vezes, em um intervalo de 24h. Como controle negativo foram utilizadas uma planta de cada parental e da geração F1, as quais não foram inoculadas.

O título viral foi avaliado por PTA-ELISA, anotando-se o valor de absorbância de cada indivíduo. Duas amostras foliares foram coletadas de cada planta (repetições biológicas), as quais foram analisadas em duplicatas (repetições técnicas), totalizando quatro leituras de absorbância. A média das quatro leituras foi considerada o valor quantitativo referente à resistência da planta à multiplicação do vírus. Tal valor será referido como título viral e quanto maior, maior a suscetibilidade da planta ao ZYMV.

2.1.5 Genotipagem de plantas F₂ com locos SSR

O DNA genômico de cada planta foi extraído da primeira folha verdadeira, coletadas aos 15 dias após a germinação e mantidas em ultrafreezer -80 °C. As folhas maceradas em nitrogênio líquido foram 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 à 65 °C. Após este 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). O DNA foi precipitado por centrifugação após adição de 500 µL de isopropanol absoluto a -20 °C por 30 minutos. Para a limpeza do DNA, o *pellet* foi dissolvido em 500 µL de NaCl 1 M e incubado em banho seco à 65 °C por 10 minutos. O RNA foi digerido pela adição de 20 mg de Pure Link RNaseA (Invitrogen), seguido de

incubação à 37 °C por 30 minutos e a 4 °C por 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi adicionado de 350 µL de isopropanol. Os *pellets* foram lavados três vezes consecutivas com 1 mL de álcool 75, 90 e 100%, respectivamente, secos a temperatura ambiente, ressuspensos em tampão Tris-EDTA pH8,0 contendo 10 µg/ml de RNase e incubados a 37 °C por 30 minutos. Por fim o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e sua qualidade verificada em gel de agarose 1%.

Para as reações de amplificação de locos microssatélites (Tabela 1) por PCR foram utilizados 20 ng de DNA, 0,6 µM de cada iniciador, 1X PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega) em uma reação de volume final de 12 µL, completados com água deionizada autoclavada. As condições de amplificação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, 30 segundos em temperatura de anelamento específica para cada primer, extensão a 72 °C por 1 minuto e por fim, uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Ao produto do PCR foram adicionados 6 µL de tampão de carregamento (10 ml de formamida, 200 µl de EDTA 0,5M pH 8,0, 10 mg de azul de bromofenol e 10 mg de xilene cianol) e posteriormente submetidos à desnaturação durante 5 minutos à 94 °C seguida de choque térmico em gelo, imediatamente antes da eletroforese. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5%. Para os géis de poliacrilamida foi preparada uma solução estoque de acrilamida:bisacrilamida 19:1 (% p/v) à uma concentração de 40% em água de osmose reversa e armazenada a 4 °C, a qual foi utilizada para a elaboração das soluções trabalho na concentração desejada, 7,5%, juntamente com 42% de uréia (% p/v) em tampão 1X TBE (Tris base, ácido bórico e EDTA). O gel foi preparado a partir de 160 ml da solução de trabalho, 160 µL de TEMED (Promega) e 1100 µL de persulfato de amônio 10% (Promega). Os géis foram preparados utilizando o sistema “Sequi-Gen GT” (BioRad) de 38x50 cm com 0,5 mm de espessura. Após 20 minutos de polimerização, o gel foi submetido a uma eletroforese de aquecimento em tampão TBE a 80 w de potência e temperatura máxima de 50 °C, até que o sistema atingisse 40 °C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese durante duas horas e meia e como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular 25 pb (Promega) à 1,34 µg/µl com 32% de tampão de carregamento (% v/v) e água milliq para completar o volume. Após este processo o gel foi corado em solução de nitrato de prata, de acordo com o protocolo de Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001).

Tabela 1 – Relação dos marcadores microssatélites utilizados, descrição dos SSRs e indicação da população na qual foi utilizado, de acordo com a etapa do trabalho

Grupo de Ligação	SSRs*	Sequencias	Ta (°C)	Referência do posicionamento do SSR no Grupo de ligação
II	CMAG36 ²	F - TACATTATGGGTAAGGTAAG R - CCATCTCTTAACCTTCTCTC	51	Périn et al. (2002)
II	CMBR120 ¹	F - CTGGCCCCCTCCTAAACTAA R - CAAAAAGCATCAAAATGGTTG	54	Ritshel et al (2004)
II	CMAGN39 ²	F - GGGCCATTTTCTTTTACAT R - TCTCTTAACCTTCTCTCTCC	55	Harel-beja et al (2010)
II	DE1135 ⁵	F - TTCAGCAAAAGAACCGAAC R - TTGCTCTTTAGGTTTCATCG	59	Diaz et al (2011)
II	CMBR41 ¹	F - GTACCGCCTAGGGTTTCTCC R - CGAGGAAGAGAGAGAAGGGG	55	Diaz et al (2011)
X	CMGA172 ²	F - CAATCGCAGATACTTCCACG R - TGCTTGTCCTCAACGGTGTCAT	51	Yuste-Lisbona et al (2011)
X	CMCT134b ²	F - GCTCCTCCTTAACCTCTATAC R - GCATTATTACCCATGTACGAG	58	Yuste-Lisbona et al (2011)
X	CMBR55 ¹	F - GAGGCCTTTGTGGTTCGTAA R - AAAGAAATGGATAAAGGAAACAGA	50	Ritchel et al (2004)
X	CMTCN71 ³	F - TCAATTTTGGCCAAACAAGC R - CAAGGACACAGATTTAATAC	54	Harel-beja et al (2010)
X	MU6549 ⁵	F - CTGTCATTCCATCTCCTCCG R - AACGCATACCGACTTTACCG	64	Diaz et al (2011)
X	CMN04_09 ⁴	F - TCTTAACAACCTCCCACGCCT R - ATAGGATCTGCCATTGGGC	63	Diaz et al (2011)

*Referências: 1 = Ritchel et al. (2004); 2 = Danin-Poleg et al. (2001); 3 = Gonzalo et al. (2005); 4= Fukino et al. (2007); 5= Diaz et al. (2011)

2.1.6 Confirmação da ligação do SSR CMAG36 ao gene *Zym-1*

Após a genotipagem com o marcador CMAG36 o genótipo de cada indivíduo foi anotado utilizando-se “A” para indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental PI414723, “B” para indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de ‘Vedrantais’ e “H” para os indivíduos heterozigóticos. 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. A confirmação da ligação entre o marcador CMAG36 e o gene *Zym-1* relatada anteriormente (PÉRIN et al., 2002) foi realizada por meio de regressão linear simples, em que o genótipo do indivíduo F₂ no *locus* CMAG36 foi considerado a variável independente e o título viral, como variável dependente (SOLLER et al., 1976; BROMAN; SEN, 2009).

2.1.7 Identificação de marcadores SSRs ligados a *Zym-2*

Todos os indivíduos da população LGM2 que se apresentaram homozigóticos para o alelo marcador do parental ‘Védrantais’ no locus CMAG36 foram genotipados com o SSR CMCT134b, localizado no LG X (PÉRIN et al., 2002). O objetivo foi excluir o efeito de *Zym-1* a fim de detectar os efeitos de *Zym-2*, supostamente ligado a CMCT134b o qual foi escolhido devido a alguma evidência de ligação, embora distantemente, a *Zym-2* (DANIN-POLEG et al., 1997) .

Outros marcadores deste mesmo grupo (CMBR55, CMGA172 e CMTCN71), também foram selecionados com base em mapa de ligação de Fazza et al. (2013) e utilizados para genotipar indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do parental ‘Védrantais’ no locus CMAG36 da população LGM2. A possível ligação entre estes marcadores e gene que confere resistência ao ZYMV foi testada através da regressão linear simples, como descrito na seção 2.1.6.

2.1.8 Localização dos genes *Zym-1* e *Zym-2* em mapas de ligação por meio de análise de mapeamento por intervalos múltiplos

Dez marcadores SSRs foram utilizados para genotipar os 193 indivíduos da população LGM2 a fim de construir fragmentos dos grupos de ligação II e X (PÉRIN et al., 2002), sendo cinco marcadores para cada grupo. Para o grupo II foram escolhidos SSRs próximos ao

CMGA36: DE1135, CMAGN39, CMBR120 e CMBR41, e para o X, os marcadores próximos aos que se mostraram ligados a *Zym-2* conforme resultados da etapa anterior. Os marcadores escolhidos estão apresentados na Tabela 1; para a seleção foram utilizados como base para a escolhas dos SSRs os mapas genéticos publicados por Harel Beja et al. (2010) e Diaz et al. (2011).

A anotação dos genótipos foi realizada como descrita anteriormente (seção 2.1.6) e as análises de ligação foram realizadas com o programa Onemap, versão 2.0-3 (MARGARIDO et al., 2007) do programa R versão 2.15.2. Primeiramente foi realizado o teste de dois-pontos para estimar a fração de recombinação entre o 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 marcadores foi a de Kosambi (KOSAMBI, 1944) e as ordens dos marcadores foram estimadas a partir da função *compare*. O mapa de ligação foi exportado para o R/qtl versão 1.27-10 (BROMAM et al., 2003). O método de mapeamento utilizado foi o Multiple Interval Mapping (MIM), de Kao e Zeng, 1997 e Kao et al. (1999). Primeiramente foi realizado um procedimento *stepwise* para a seleção de modelos de múltiplos QTLs utilizando o método de regressão *haley-knott* (HK) (HALEY; KNOOT, 1992). Os efeitos dos QTLs, porcentagem de variação e LODs foram estimados e utilizados para elaborar um modelo de localização de QTLs a ser testado com as funções *makeqtl* e *fitqtl*. Após comprovar a existência dos QTLs, tanto os efeitos dos QTLs bem como as possíveis interações entre eles foram estimados. A função *refineqtl* foi aplicada para refinar a posição dos mesmos e um intervalo de suporte a 95% de probabilidade foi estimado com através da função *lodint*.

2.1.9 Confirmação do mapeamento dos genes *Zym-1* e *Zym-2* na população LGM3

Os indivíduos da população LGM3 foram genotipados com os SSRs CMAG36 e DE1135, próximos aos gene *Zym-1*, e com dois marcadores SSR próximos ao *Zym-2*, de acordo com o mapa gerado a partir da análise de segregação da população LGM2. A análise de ligação os marcadores SSRs e os genes *Zym-1* e *Zym-2* foi realizada como descrito anteriormente (seção 2.1.6).

2.2 Resultados

2.2.1 Obtenção de isolados de ZYMV

Das doze amostras processadas, 11 testaram positivas para ZYMV através do teste ELISA (Tabela 2). Oito amostras estavam infectadas com PRSV-W e três com WMV. Nenhuma das amostras foi positiva para o ZLCV ou para o CMV. Foram constatados sete casos de infecção dupla por ZYMV e PRSV-W e três por ZYMV e WMV. Em uma única amostra foi detectada infecção tripla por ZYMV, WMV e PRSV-W.

Tabela 2 – Detecção de vírus através de PTA-ELISA em folhas de ‘Caserta’ inoculadas com extrato de amostras foliares sintomáticas coletadas em Baraúna-RN

<i>Amostras Coletadas</i>	<i>ZYMV</i>	<i>ZLCV</i>	<i>PRSV-W</i>	<i>WMV</i>	<i>CMV</i>
RN1	+	-	-	+	-
RN2	+	-	-	-	-
RN3	+	-	+	-	-
RN4	-	-	+	-	-
RN5	+	-	-	-	-
RN6	+	-	+	-	-
RN7	+	-	+	-	-
RN8	+	-	+	-	-
RN9	+	-	+	+	-
RN10	+	-	-	+	-
RN11	+	-	+	-	-
RN12	+	-	+	-	-

(+) = ELISA positivo para a virose em questão; (-) = ELISA negativo para a virose em questão

Os extratos foliares preparados a partir das amostras infectadas por ZYMV foram inoculados em plantas de *C. quinoa* para isolar uma única lesão local. Os resultados da eficiência da inoculação das lesões locais geradas em *C. quinoa* inoculadas em ‘Caserta’ (Tabela 3) indicaram uma eficiência de infecção de 11,2%. Todas estas plantas testaram positivas para o ZYMV e negativas para as outras viroses, constituindo, portanto, isolados puros de ZYMV, cada um oriundo de uma única partícula viral.

Tabela 3 – Amostras foliares positivas para ZYMV usadas como inóculo, quantidades de lesões locais geradas em *C. quinoa* e inoculadas em ‘Caserta’ e de plantas sintomáticas e identificação dos isolados

Amostras	Lesões inoculadas em ‘Caserta’	Quantidade de plantas ‘Caserta’ sintomática	Isolados
RN1	11	3	RN1-J, RN1-I, RN1-H
RN2	11	2	RN2-C, RN2-G
RN3	13	1	RN3-I
RN5	10	4	RN5-B, RN5-C, RN5-G
RN6	12	2	RN6-C, RN6-F
RN7	6	0	-
RN8	7	0	-
RN9	10	1	RN9-D
RN10	10	1	RN10-H
RN11	15	1	RN11-C
RN12	11	0	-
TOTAL	116	13	11,2%

2.2.2 Seleção de isolado de ZYMV

Os sintomas foram observados primeiramente nas plantas de ‘Caserta’ onde foram feitas a purificação e multiplicação do vírus. Foram selecionados os isolados RN1-I, RN5-G, RN6-F, pois induziram sintomas severos de mosaico e deformações no limbo foliar (Figura 1).

Figura 1 - Sintomas em plantas de ‘Caserta’ induzidos pela inoculação dos isolados de ZYMV RN1-I (A), RN5-G (B), RN6-F (C) e um exemplar sadio (D)

O ensaio de classificação em patótipos mostrou que os isolados RN1-I, RN5-G e RN6-F pertenceram ao patótipo 0, pois nenhum provocou sintomas em PI414723. Em contrapartida, as plantas de ‘Caserta’ e ‘Védrantais’ mostraram-se sintomáticas para todos os isolados,

confirmando a patogenicidade dos mesmos. Comparando a reação provocada pelos diferentes isolados em plantas ‘Védrantais’, observou-se que RN6-F é o mais severo, incitando mosaico e deformação foliar com bolhas, o isolado RN1-A resultou em uma clorose internerval e um início de deformação foliar, enquanto que RN 5-G causou clorose nas folhas (Figura 2).

Figura 2 - Reação de ‘Védrantais’ à inoculação mecânica de RN1-I (A), RN5-G(B), RN6-F(C) e um exemplar sadio (D)

Para o teste de título viral todas as plantas não inoculadas resultaram em valores de absorbância baixos no teste ELISA, como esperado. (Figura 3) Ainda, resultou em uma concentração baixa de ZYMV em todas as plantas de PI414723, independente do isolado utilizado para a inoculação. Todas as plantas ‘Védrantais’ e ‘Caserta’ foram suscetíveis à virose, evidenciado pela exibição de sintomas típicos e a detecção de um alto nível viral nos testes ELISA. Já em plantas F1, embora todas tenham sido visualmente resistentes à infecção, observou-se uma diferença em título de acordo com o isolado. Para dar continuidade ao estudo foi escolhido apenas o isolado RN6-F, pois foi o que melhor diferenciou os genitores em relação aos títulos virais e o que causou sintomas mais severos em ‘Védrantais’.

Figura 3 – Valores médios da absorbância em teste ELISA de plantas PI414723, F1, ‘Vêdrantais’ e ‘Caserta’ em plantas não inoculadas e após inoculação com os isolados RN1-I, RN6-F e RN5-G

No teste de transmissão por afídeos, o isolado RN6-F mostrou-se eficaz, já que das dez plantas de ‘Vêdrantais’ testadas, sete foram devidamente infectadas. As plantas de abobrinha ‘Caserta’ também foram infectadas por meio do agente transmissor. Deste modo o isolado RN6-F foi selecionado para os testes de avaliação da resistência das populações LGM2 e LGM3.

2.2.3 Avaliação da resistência à ZYMV de indivíduos da população LGM2

Os 193 indivíduos F₂ foram avaliados para a resistência à ZYMV com base no título viral. As folhas para o teste ELISA foram coletadas quando os sintomas de infecção de ZYMV já eram bem evidentes em plantas de ‘Vêdrantais’. Em contrapartida, as plantas de PI414723 e indivíduos F1 não evidenciaram deformação foliar e nem a presença de mosaico (figura 4). As repetições biológicas foram consistentes entre si, evidenciado pelo teste de correlação de postos de Spearman ($\rho=0,723$). Desta forma, a média das leituras de título viral foi utilizada como medida quantitativa da resistência ao ZYMV (Apêndice A).

Figura 4 – Reação de PI414723 (A), F1 (C) e Védrantais(E) à inoculação com isolado RN6 de ZYMV. As fotos B, D e F representam folhas de plantas de PI414723, F1 e Védrantais não inoculadas

Os controles negativos, representados por plantas não inoculadas de PI414723, F1 e ‘Védrantais’, apresentaram valores baixos de absorbância (0,149, 0,135 e 0,125, respectivamente). Os títulos em plantas inoculadas de PI414723 e de F1 também foram baixos (0,137 e 0,148, respectivamente), ao passo que em ‘Védrantais’, as concentrações foram em média dez vezes mais altas que em PI414273 (1,496). Aproximadamente 59% dos indivíduos F_2 apresentou valores baixos de títulos virais iguais ou inferiores a 0,2 (FIGURA 5) e apenas 11 indivíduos apresentaram valores iguais ou superiores aos do parental ‘Védrantais’.

Figura 5 – Histograma da frequência de títulos virais observados na população LGM2. As setas indicam os títulos virais médios em plantas das linhagens genitoras

2.2.4 Confirmação da ligação entre CMAG36 e *Zym-1*

Das 193 plantas F₂, 188 foram efetivamente genotipadas com o marcador CMAG36. O teste de χ^2 mostrou que o marcador não apresentou distorção de segregação, uma vez que as frequências observadas de indivíduos homozigóticos para o parental PI414723 (A), heterozigóticos (H) e homozigóticos para o parental ‘Védrantais’ foram de 51, 97 e 40 indivíduos respectivamente, não diferindo das frequências esperadas no caso da segregação de marcador co-dominante (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequências esperadas e observadas da genotipagem com o SSR CMAG36 e resultado do teste chi-quadrado para adequação ao modelo 1:2:1 de segregação

<i>Genótipos no loco CMAG36</i>	<i>Frequência esperada</i>	<i>Frequência observada</i>	<i>χ^2 calculado</i>	<i>χ^2 tabelado</i>
A	47	51	1,479	5,99
H	94	97		
B	47	40		
TOTAL	188	188		

*A – Indivíduos homozigotos para o alelo marcador de PI414723

*H – Indivíduos heterozigóticos

*B – Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de ‘Védrantais’

A regressão linear entre os valores médios de título viral de cada planta F₂ e seus genótipos marcadores no loco CMAG36 foi significativa ($p = 2,85e^{-15}$) e apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8362, o que implica que da variância total, 83,62% é explicada pelo genótipo no loco CMAG36. Os títulos virais médios das classes genotípicas homozigóticas para os alelos marcadores de PI414723 (A), heterozigóticas (H) e homozigóticas para alelos marcadores de ‘Védrantais’ (B) observadas foram 0,172, 0,245 e 0,793, respectivamente.

Os desvios padrões das médias variaram de acordo com a classe genotípica. A classe que demonstrou o menor desvio padrão foi composta por indivíduos homozigóticos para os alelos marcadores do parental PI414723, com um desvio padrão de $\pm 0,05$. Os heterozigotos apresentaram um desvio padrão de $\pm 0,24$, enquanto que os homozigotos para o alelo marcador do parental ‘Védrantais’ apresentaram um desvio padrão de $\pm 0,67$. (Figura 6)

Figura 6 – Gráfico das médias de titulação viral de acordo com o genótipo no loco CMAG36

2.2.5 Identificação de marcadores SSRs ligados a *Zym-2*

Os 40 indivíduos homozigóticos para alelos marcadores de ‘Védrantais’ no locus CMAG36 foram genotipados com o SSR CMCT134b. O número de indivíduos em cada classe genotípica e os resultados observados a partir da análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre a média de título viral entre as classes genotípicas dos locos CMCT134b (P-valor = 0,210) e CMCTN 71 (P-valor = 0,630), evidenciando que estes SSR não estão ligados à resistência ao ZYMV ou que estão, mas a uma distância superior ao limite detectável neste ensaio. Em contrapartida, as classes genotípicas dos marcadores CMGA172 e CMBR55 diferiram estatisticamente quanto ao título viral (P-valor = 0,010 em ambos), indicando provável ligação destes locos com gene de resistência ao vírus.

Tabela 5 – Número de indivíduos pertencentes a cada classe genotípica para marcadores do grupo de ligação X e P-valor da regressão linear entre genótipo e título viral

Iniciadores	Genotipagem*			Regressão linear
	A	H	B	<i>P-valor</i>
CMCT134b	7	18	14	0,210
CMCTN 71	12	14	12	0,630
CMGA 172	6	22	12	0,010
CMBR55	9	19	12	0,010

*A – Indivíduos homozigotos para o alelo marcador de PI414723

*H – Indivíduos heterozigóticos

*B – Indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de ‘Védrantais’

2.2.6 Localização dos genes *Zym-1* e *Zym-2* em mapas de ligação por meio de análise de mapeamento por intervalos múltiplos

Todos os locos genotipados apresentaram segregação esperada de 1:2:1 (A: H: B), sendo que apenas 2,38% dos dados foram considerados perdidos (dados não apresentados). Os pesos moleculares dos dez locos genotipados estão de acordo com a literatura. As análises de ligação resultaram em dois grupos de ligação, cada um com cinco microssatélites, como esperado. Entretanto, as distâncias e as ordens entre os marcadores não foram as mesmas. No grupo de ligação LGII, por exemplo, ocorreu uma inversão de posição do marcador CMBR120 se comparado ao mapa de Harel-Beja et al. (2010) (Figura 7) e a distância entre os marcadores DE1135 e CMBR41 foi bem maior do que a relatada por Diaz et al. (2011). O

mapeamento do LGX também mostrou uma inversão na ordem dos SSRs mapeados se comparado ao mapa de Harel-Beja et al. (2010), como pode ser observado na Figura 7, com a alteração da posição de CMBR55. A distância entre os marcadores foi maior que a esperada entre os SSRs segundo os mapas de Diaz et al. (2011) e Harel-Beja et al. (2010).

Figura 7 – Mapa de ligação gerado pelo programa Onemap e editado no MapChart (VOORRIPS, 2002) a partir dos dados genotípicos da população LGM2 (LGII e LGX). Os grupos de ligação estão de acordo com Périn et al. (2002). Do lado direito estão discriminados os SSRs e do lado esquerdo a posição que foram mapeados (cM). As setas correlacionam LGII e LGX aos mapas publicados por Harel-Beja et al. (2010) e Diaz et al. (2011)

Foram identificados dois QTLs de resistência à ZYMV pelo método MIM. O QTL de maior efeito foi localizado no LG II, na posição 29 cM, correspondendo ao posicionamento de *Zym-1* e o segundo no LG X em 38cM, correspondendo a *Zym-2*. Os valores de LOD foram de 33,32 e 17,45, respectivamente (Figura 8) e o modelo explica 57% da variação fenotípica. As informações referentes ao grupo de ligação, marcadores flanqueadores, intervalo de confiança, variância explicada, LOD Score e P-valor estão apresentados na Tabela 6, enquanto valores referentes ao efeito do QTL de maneira aditiva ou dominante estão na tabela 7. Observou-se que efeitos dominantes e aditivos de dois QTLs contribuem para a resistência ao ZYMV, bem como as interações epistáticas entre os locus.

Figura 8 – Perfil LOD Score para a presença do QTL de resistência à ZYMV nos grupos de ligação LG II e LGX

Tabela 6 – Posições dos QTLs e indicação de interação entre eles. Informações de LOD Score, % de variação explicada e P-valor, através de análise MIM

QTL	Grupo de Ligação	SSRs Flanqueadores	Intervalo de confiança (95%) (cM)	LOD	% variância	P-valor
<i>Zym-1</i>	LG II	CMAG36 – CMAGN39	27-30	33,32	51,52	$<2e^{-16}$
<i>Zym-2</i>	LG X	CMBR55 – CMN04_09	34-44	17,45	15,84	$1,22e^{-14}$
Interação entre <i>Zym-1</i> e <i>Zym-2</i>				12,73	16,32	$1,85e^{-11}$

Tabela 7 - Efeito de aditividade e dominância dos QTLs mapeados e interações entre eles

QTL*	Efeito Estimado (est)	Erro Padrão (SE)	t (est/SE)
<i>Zym-1a</i>	0,32383	0,03556	9,108
<i>Zym-1d</i>	-0,27045	0,04688	-5,768
<i>Zym-2a</i>	0,16401	0,03160	5,190
<i>Zym-2d</i>	-0,08613	0,04772	-1,805
<i>Zym-1a:Zym-2a</i>	0,24988	0,04737	5,275
<i>Zym-1d:Zym-2a</i>	-0,15814	0,06489	-2,437
<i>Zym-1a:Zym-2d</i>	-0,07853	0,07094	-1,107
<i>Zym-1d:Zym-2d</i>	-0,03009	0,09641	-0,312

*Efeito aditivo (a) e efeito de dominância (d) dos QTLs *Zym-1* e *Zym-2*.

2.2.7 Análise de epistasia entre *Zym-1* e *Zym-2*

O Multiple Interval Mapping apresenta como vantagem sobre os outros métodos de mapeamento a possibilidade da análise da interação entre os locus de QTL significativos através do teste F. Foi observada a existência de epistasia entre os dois QTLs mapeados, responsável por 16% dos resultados observados no título viral (Tabela 6), com um P-valor de $1.85e^{-11}$. Através do gráfico apresentado na figura 9 é possível observar que indivíduos homozigóticos para o alelo marcador de PI414723 no loco CMAG36 apresentam baixo título viral, independente do genótipo em CMBR55, ligado ao *Zym-2*. Indivíduos heterozigóticos para CMAG36 apresentam título viral baixo, mas nota-se uma variação de médias dependendo do genótipo no segundo loco. Ao analisar os indivíduos que são homozigóticos para os alelos do parental ‘Védrantais’ em CMAG36, observa-se uma variação de fenótipo, dependente da interação com o loco CMBR55. Indivíduos com a presença de alelos de resistência *Zym-2* apresentam titulação viral menor (média = 0,35) se comparado com a titulação viral média na presença de apenas um alelo de resistência (0,73) e, indivíduos que não possuem nenhum alelo de resistência (média = 1,39).

A interação entre esses locus se dá entre os efeitos dominância de *Zym-1* e *Zym-2*, entre dominância de *Zym-1* e aditividade de *Zym-2* e entre aditividade de *Zym-1* e dominância de *Zym-2*, sendo que a interação entre efeitos de dominância de *Zym-1* e *Zym-2* não foi significativa, uma vez que o valor de t aproxima-se de zero (tabela 7). Apenas a interação entre dominância de *Zym-1* e aditividade de *Zym-2* e entre aditividade de *Zym-1* e dominância de *Zym-2* são interações que favorecem a resistência ao ZYMV, já que influenciam na diminuição do título viral.

Figura 9 – Média de titulação viral segundo os genótipos nos marcadores CMAG36 e CMBR55, ligados aos genes *Zym-1* e *Zym-2*, respectivamente

2.2.8 Confirmação do mapeamento dos genes *Zym-1* e *Zym-2* na população LGM3

Dos 210 indivíduos inoculados da população LGM3, dois morreram em função da severidade dos sintomas. Assim como em LGM2, as plantas de ‘Védrantais’ inoculadas apresentaram sintomas típicos de infecção do ZYMV, e já as plantas de PI414723 e da geração F1 mostraram-se sadias (dados não apresentados). A média entre as repetições biológicas foram coerentes entre si, e o teste de correlação de postos de Spearman foi de $\rho = 0,692$ e, portanto a média das leituras da absorbância a partir do teste ELISA foi utilizada como título viral, uma medida quantitativa de resistência ao ZYMV.

As médias do título viral em plantas não inoculadas de PI414723, F1 e ‘Védrantais’ foram 0,149, 0,129 e 1,25, respectivamente. Já em plantas inoculadas destes genótipos as médias foram de 0,154, 0,153 e 1,30, respectivamente. A maior parte da população LGM3 apresentou baixo título, sendo que 40,8% obtiveram resultados menores que 0,2. (Apêndice B) A distribuição das frequências dos títulos virais na população LGM3 pode ser observada na figura 10.

Figura 10 – Histograma de frequência de títulos virais observados na população LGM3. As setas indicam os títulos virais médios em plantas das linhagens genitoras

A genotipagem de todos os indivíduos da população foi possível em 90,99% dos locus, contabilizando os quatro microssatélites, sendo que houve falhas de no máximo 24 indivíduos por marcador. Nenhum dos SSRs mostrou distorção de segregação, sendo que as frequências observadas estão de acordo com a segregação 1:2:1 (A:H:B) (Tabela 8). A regressão linear simples entre as classes genotípicas para título viral mostrou um valor significativo para os marcadores do LG II, CMAG36 e DE1135, com P-valores $2,92e^{-33}$ e $3,36e^{-09}$, respectivamente. Já os SSRs do grupo de ligação X, CMBR55 e CMCT134b, não mostraram um resultado significativo para a regressão linear generalizada entre as classes genotípicas A, H e B e a média dos títulos virais, com P-valores 0,356 e 0,34, respectivamente.

Tabela 8 – Relação dos iniciadores utilizados para genotipagem de LGM3 seguidos pelas quantidades de indivíduos de cada classe genotípica possível para um marcador codominante, adequação ao modelo de segregação 1:2:1 pelo teste chi-quadrado e resultado da análise de variância entre as classes genotípicas em cada iniciador e média de título viral

Iniciadores	Genotipagem*					ANOVA		
	A	H	B	χ^2_{calc}	χ^2_{tab}	P-valor	F calculado	F crítico
CMAG 36	61	93	49	3,151	5,99	$2,92e^{-33}$	111,52	3,04
DE1135	55	89	44	2,042		$3,36e^{-09}$	21,72	
CMBR 55	47	110	44	2,348		0,356	1,03	
CMCT134b	54	101	47	0,448		0,34	1,08	

2.3 Discussão

A análise das 12 amostras foliares coletadas em região produtora de melão acusou a presença de ZYMV, WMV e PRSV-W, o que confirma a predominância destes patógenos virais em regiões do nordeste brasileiro como no sub-médio São Francisco e no Maranhão (MOURA et al., 2001 SILVEIRA et al., 2009). Lima (2011) ainda ressalta a importância destes três *potyvirus* não apenas pela sua elevada frequência, mas também pelas perdas de produtividade que acarretam, podendo, portanto, serem considerados os três vírus mais importantes de cucurbitáceas no Brasil. Ainda, foi constatada infecção mista em 73% das amostras foliares estudadas, todas com o ZYMV acompanhado por outro *potyvirus*. Sabe-se que infecções mistas entre *potyvirus* são frequentes em condições naturais, o que pode ser explicado pela forma de transmissão desses vírus, que é não-persistente e pode ser dar por várias espécies de afídeos (SILVEIRA et al., 2009). A presença de infecções mistas é um problema para a diagnose de viroses com base em sintomas visuais, já que é comum ocorrer sinergismo entre os vírus infectantes que levam a alterações nos sintomas (RAMOS et al., 2003).

Os isolados causaram sintomas típicos de infecção por ZYMV, como mosaico, clorose internerval e deformação foliar com a formação de bolhas. No entanto, discretas diferenças foram observadas entre isolados, tanto em plantas de ‘Caserta’, como em ‘Védrantais’. Estas se caracterizaram principalmente pela severidade dos sintomas de mosaico e clorose, bem como a presença ou não de deformação foliar. Tal observação pode se dever ao fato de ZYMV englobar estirpes com variável grau de agressividade, indo de extremamente agressivas até estirpes fracas, que não causam sintomas ou apenas sintomas atenuados em meloeiro (LECOQ et al., 1991).

Os títulos virais das plantas de PI414723 foram aproximadamente sete vezes mais baixos do que os observados em plantas ‘Védrantais’, sendo que os valores de título viral obtidos com os três isolados são próximos do valor de absorbância das plantas não inoculadas. Desta forma, não é possível concluir se os baixos títulos são fruto de resistência à infecção pelo vírus ou à sua multiplicação, após a infecção. No entanto, a distribuição contínua de valores de títulos virais na população F₂ indica que a resistência provavelmente se dá durante a multiplicação. As plantas de F₁ variaram quanto ao título viral em função do isolado, muito embora em nenhuma das plantas tenham sido encontrados sintomas de infecção viral. Casos que ocorrem replicação viral e não explicitam sintomas ocorrem com estirpes fracas do ZYMV, como já mencionado anteriormente. Por fim, as plantas de ‘Védrantais’ e ‘Caserta’

inoculadas mostraram títulos virais altos, evidenciando assim a sua susceptibilidade ao ZYMV.

O experimento mostrou que o isolado RN6-F é transmissível por afídeos. Tal estudo foi realizado, pois existem relatos de variação entre as estirpes quanto à sua transmissibilidade por afídeos. A estirpe ZYMV-PAT, por exemplo, é transmitida de forma ineficiente por afídeos pois apresenta uma proteína não estrutural, HC-Pro (*Helper component proteinase*) deficiente (LECOQ et al., 1991). Já a estirpe ZYMV-NAT não é transmitida por afídeos devido à uma mutação em sua proteína capsidial (ANTIGNUS et al., 1989).

Todos os quatro isolados foram classificados como patótipo 0. Este resultado corrobora com uma amostragem mais ampla de 11 isolados advindos de 8 estados brasileiros, na qual todos foram classificados neste mesmo patótipo (WASSANO et al., 2011), sugerindo que este patótipo seja predominante no país. No entanto, um número maior de isolados deve ser testado para confirmar esta observação. Tal informação é de importância para programas de melhoramento genético, pois indica que a resistência advinda de PI414723 é eficaz no Brasil.

A fenotipagem de populações segregantes visando o mapeamento da resistência ao ZYMV é comumente realizada por meio de avaliações visuais qualitativas, que classificam as plantas em suscetíveis ou resistentes apenas, sem considerar diferenças quantitativas que possam existir na sintomatologia (PITRAT; LECOQ, 1984; DANIN-POLEG et al., 1997, 2002; ANAGNOSTOU et al., 2000; HAREL-BEJA et al., 2010). Desta forma, diferente dos trabalhos anteriores, o presente abordou a resistência ao vírus de modo quantitativo, utilizando para tanto estimativas de títulos virais obtidas por meio de PTA-ELISA. Tal metodologia já foi utilizada com sucesso em outros trabalhos para o mapeamento de genes de resistência ao *Rice Yellow mottle virus* (RYMV) em arroz (ALBAR et al., 1998) e ao *Beet necrotic yellow vein virus* em beterraba (ASHER et al., 2002). Aos 21 dias após a inoculação, os sintomas de ‘Védrantais’ eram visíveis e as plantas apresentavam título viral alto, confirmando a infectividade do inóculo utilizado na fenotipagem das populações. As plantas inoculadas de PI414723, em contrapartida, mostraram baixos títulos. A distribuição dos valores do título viral na população LGM2 não foi normal, ocorrendo uma predominância de indivíduos com baixos títulos, o que é indicativo da segregação de um gene dominante de grande efeito. Por outro lado, a natureza dominante também pode ser inferida pelos baixos títulos também verificados em plantas F1.

A ligação de *Zym-1* com o marcador CMAG36 foi confirmada em ambas as populações, confirmando o relatado por outros autores (PITRAT; LECOQ, 1984; DANIN-

POLEG et al., 1997, 2002; ANAGNOSTOU et al., 2000; HAREL-BEJA et al., 2010). As plantas homozigóticas para o alelo marcador de PI414723 apresentaram um título viral baixo em ambos os casos. As heterozigóticas em sua maioria apresentaram título viral baixo, sendo que apenas 8 plantas de 97 indivíduos heterozigóticos apresentaram título viral maior que 0,5. As plantas homozigóticas para alelos do parental suscetível apresentaram títulos aproximadamente 5 vezes mais altos que plantas homozigóticas para o alelo marcador de PI414723. Tal resultado mostra que a presença de *Zym-1* em homozigose é suficiente para conferir resistência ao ZYMV ao meloeiro. No entanto, apesar da alta significância da correlação entre genótipo neste loco e título viral, notou-se variações na magnitude dos desvios padrões entre as classes genótípicas, sendo que entre os homozigóticos para o alelo marcador de PI414723 o desvio padrão foi baixo comparado com os desvios observados entre indivíduos heterozigóticos e homozigotos para o alelo marcador de ‘Védrantais’. Nesta última classe, os indivíduos podem ser resistentes ou suscetíveis, independente de *Zym-1*. Tal variação aponta para a existência de um segundo gene, de menor efeito, mas que tenha efeito epistático com *Zym-1* quanto este se encontra em heterozigose ou homozigose recessiva. Presume-se que este segundo gene seja o *Zym-2*.

Para identificar marcadores ligados à *Zym-2* apenas os indivíduos homozigóticos para o alelo do ‘Védrantais’ (B) foram genotipados, com o objetivo de isolar o efeito de *Zym-1*. Esta estratégia permitiu identificar dois marcadores possivelmente ligados a este gene: CMAG172 e CMBR55 pertencentes ao grupo de ligação (LG) II. Desta forma, marcadores próximos a estes foram utilizados para genotipar toda a população LGM2, o que resultou na construção de um fragmento do LG X e permitiu fazer uma análise de ligação entre estes e *Zym-2* por meio da técnica de MIM. Para mapear *Zym-1* por meio desta técnica, seguiu-se abordagem semelhante, através da construção de um fragmento do LGII utilizando marcadores próximos a CMAG36.

No mapa de ligação, todos os microssatélites foram agrupados nos grupos de ligação esperados de acordo com a literatura, muito embora as distâncias e as ordens entre os marcadores não tenham sido necessariamente as mesmas. Estas discrepâncias são esperadas em vista de diferenças no tipo de população utilizada para o mapeamento, o número de indivíduos mapeados e quantidade e tipo de marcadores envolvidos no estudo. (COELHO, 2000 por CARNEIRO; VIEIRA, 2002; DOERGE, 2002). Os mapas de Harel-beja et al. (2010) e de Diaz et al. (2011) são derivados de populações diferentes das que utilizamos neste trabalho. Os primeiros utilizaram uma população de 99 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) originárias do cruzamento entre PI414723 x ‘Dulce’ que foi genotipada

com 700 marcadores moleculares, sendo um terço deles, codominantes. Já Diaz et al. (2011) utilizaram oito populações distintas, que somaram 718 indivíduos, provenientes de diversos cruzamentos e populações distintas, como RILs, linhagens duplo haploides (DHL) e uma população F_2 , as quais foram genotipadas com 1592 marcadores moleculares, dentre eles 640 SSRs. Embora a população F_2 utilizada neste trabalho seja constituída por 193 indivíduos, a quantidade de marcadores moleculares foi bem reduzida, o que reduz o poder estatístico nas estimativas de recombinação, influenciando as distâncias genéticas apresentadas. Outra justificativa pode estar nos diferentes programas de mapeamento utilizados, sendo que Diaz et al. (2011) e Harel-Beja et al. (2010) utilizaram JoinMap 3.0, enquanto neste trabalho foi utilizado o OneMap, sabe-se que mapas do JoinMap apresentam grupos de ligação um pouco menores comparados com os do programa MAPMAKER, mesmo utilizando os mesmos dados e definições (LIEBHARD et al., 2003). Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças nos algoritmos utilizados para cada software (GONZALO et al., 2005).

O MIM permite testar um modelo com múltiplos QTLs e ainda verificar relações epistáticas entre eles. Assim, a posição mais provável de *Zym-1* foi definida na posição 29 cM do LG II, apenas a 3,45 cM do CMAG36 segundo o valor máximo de LOD (33,3), entretanto está mais próximo do marcador CMAGN39, distante apenas 2,3 cM. De acordo com o modelo proposto, este loco foi responsável por 51% da variação fenotípica observada entre as plantas F_2 . Este valor de LOD significa que a chance da existência de um QTL nessa posição (hipótese alternativa) é $10^{33,32}$ maior de a não existir. O segundo loco de resistência, que corresponde a *Zym-2*, foi localizado na posição de 38cM no LG X, estando localizado apenas à 3,94 cM de CMBR55 e a 5,1 cM de CMN04_09, segundo LOD de 17,45, sendo responsável por 21,9% da variação fenotípica.

A análise de MIM confirmou a existência de epistasia entre *Zym-1* e *Zym-2*, sendo a interação entre os efeitos de dominância entre os dois QTLs significativa para o efeito de dominância de *Zym-1* e aditividade de *Zym-2* ou entre aditividade de *Zym-1* e dominância de *Zym-2*. A presença de epistasia é muito comum em melão em QTLs que influenciam em qualidade de fruto e produtividade (HAREL-BEJA et al., 2010), mas não há muitos trabalhos que relatam a existência de locus epistáticos para resistência a doenças viróticas nesta espécie.

O experimento de validação indicou que a população F_2 também apresentou uma distribuição não normal para os dados de título viral, e confirmou novamente a ligação de *Zym-1* ao marcador CMAG36, como era esperado. O marcador DE1135 também foi considerado ligado ao *Zym-1*, embora com um P-valor maior, já que está mais distante deste gene. Entretanto, a validação da posição de *Zym-2* não foi confirmada. Tal resultado pode ser

dever ao fato que *Zym-2* tem um menor efeito genético e é mais influenciado pelo ambiente. Muito embora o experimento tenha sido realizado em estufa, a população LGM2 foi fenotipada durante o verão, enquanto LGM3 durante a primavera. Tal interferência também foi observada por Palomares-Rius et al. (2011) ao buscar QTLs ligados à resistência de WMV em melão utilizando populações de RILs originárias do cruzamento entre o genótipo resistente TGR-1551 e a cultivar suscetível ‘Bola de Oro’.

O resultado mostra que pode existir um segundo gene, *Zym-2*, atuando na resistência ao ZYMV em melão, e provavelmente existam outros, já que o modelo proposto explica apenas 57% da variação fenotípica. Entretanto, para fins de desenvolvimento de marcadores para a utilização em programas de melhoramento eles não são tão relevantes, já que a seleção através do CMAG36 é suficiente e eficaz para predizer a resistência do meloeiro ao ZYMV. Todavia, deve-se levar em consideração a necessidade de realizar a seleção de plantas resistentes utilizando a técnica de marcadores moleculares, uma vez que plantas heterozigóticas para *Zym-1* podem ser confundidas com plantas resistentes, dependendo do genótipo em *Zym-2*.

3 CONCLUSÃO

- Dados de título viral são eficientes para o mapeamento de ZYMV em meloeiro.
- A ligação de *Zym-1* a CMGA36 foi confirmada.
- Este gene tem efeito dominante e de grande efeito na resistência ao ZYMV em meloeiro.
- Há evidências de que *Zym-2* esteja posicionado no grupo de ligação X, próximo ao CMBR55.
- Um nível satisfatório de resistência ao patótipo 0 de ZYMV pode ser realizada através da seleção assistida pelo marcador CMAG36, uma vez que indivíduos homozigotos nesse loco são resistentes ao ZYMV. Em caso de heterozigotos, a menor replicação viral é observada em indivíduos que apresentam *Zym-2*.

REFERÊNCIAS

- ALBAR, L.; LORIEUX, M.; AHMADI, N.; RIMBAULT, I.; PINEL, A.; SY, A.A.; FARGETTE, D.; GHESQUIÈRE, A. Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 97, p. 1145-1154, 1998.
- 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.
- ANTIGNOUS, Y.; RACCAH, B.; GAL-ON, A.; COHEN, S. Biological and serological characterization of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus-2 isolates in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 17, p. 289-298, 1989.
- ASHER, M.J.C.; CHWARSZCZYNSKA, D.M.; LEAMAN, M. The evaluation of rhizomania resistant sugar beet for the UK. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 141, p. 101-109, 2002.
- 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.
- BROMAM, K.W.; SEN, S. **A guide to QTL mapping with R/qtl**. New York: Springer, 2009. 396 p.
- BROMAN, K.W.; WU H., SEN S.; CHURCHILL, G.A. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 889-890, 2003.
- 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: 20th**. Oxford: Oxford University Press, 1996. 1488 p.
- CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, p. 299-306, 2001.
- 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.; KARCHI, Z. 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.

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.; PTRAT, 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.

DOERGE, R. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, p. 43-52, 2002.

ECKBIC, E.; FIDAN, H.; YILDIZ, M.; ABAK, K. Screening of Turkish accessions for resistance to ZYMV, WMV and CMV. **Notulae Scientia Biologicae**, Cruj-Napoca, v. 2, n. 1, p.55-57, 2010.

ESCRIBANO, S.; LÁZARO, A.; STAUB, J.E. Genetic diversity of Spanish melos (*Cucumis melo*) of the Madrid provance. In: EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CURCUBITACEAE, 9., 2008, Avignon. **Proceedings...** Avignon: INRA, 2008. p. 301-305.

FAZZA, A.C; DALLAGNOL, L.J; FAZZA, A.C; MONTEIRO, C.C, de LIMA, B.M; WASSANO, D.T; CAMARGO, L.E.A. Mapping of resistance to races 1,3 and 5 of *Podosphaera xanthii* in melon PI414723. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 13, p. 349-355, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FNP CONSULTORIA E AGROINFORMATIVOS. Melão. In: _____. **AGRIANUAL 2013**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2013. p. 357-360.

FUKINO, N.; SAKATA, Y.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO, S. Characterisation of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Leuven, v. 82, n. 2, p. 330-334, 2007.

GONZALO, M.J.; OLIVER, M.; GARCIA-MAS, J.; MONFORT, A.; DOLCET-SANJUAN, R.; KATZIR, N.; ARÚS, 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.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, London, v. 69, n. 4, p. 315-324, 1992.

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.; HOFSTEDER, R.; VOLPIN, H.; OLIVER, M.; FOUGEDOIRE, A.; STALH, C.; FAUVE, J.; COPEL, 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.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B. General formulas for obtaining the MLEs and the asymptotic variance-covariance matrix in mapping quantitative trait loci when using the EM Algorithm. **Biometrics**, Washington, v. 53, p. 653-665, 1997.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 152, p. 1203-1216, 1999.

KERJE, T.; GRUM, M. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 510, p. 37-44, 2000.

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

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.

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

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

LÓPEZ-SESÉ, A.I.; STAUB, J.; KATZIR, N.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L. Estimation of between and within accession variation in the selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. **Euphytica**, Heidelberg, v. 127, p. 41-51, 2002.

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

MEDEIROS, J.F. de; SILVA, M.C.C.; CÂMARA NETO, F.G.; ALMEIDA, A.H.B.; SOUZA, J.O.; NEGREIROS, M.Z.; SOARES, S.P.F. Crescimento e produção do melão cultivado sob cobertura de solo e diferentes frequências de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, p. 792-796, 2006.

MONFORTE, A.J.; OLIVER, M.; GONZALO, M.L.; ALVAREZ, J.M.; DOLCET-SANJUAN, R.; ARÚS, P. Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melo (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 108, p. 750-758, 2004.

MOURA, M.C.C.L.; LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, V.B.; GONÇALVES, M.F.B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam 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.

NAKATA, E; STAUB, J; LÓPEZ-SESÉ, A.I.; KATZIR, N. Genetic diversity of japanese melon cultivars (*Cucumis melo* L.) as assessed by Random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Heidelberg, v. 52, p. 405-419, 2005.

PALOMARES-RIUS, F.J; VIRUEL, M.A.; YUSTE-LISBONA, F.J; LÓPEZ-SESÉ, A.I.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, L. Simple sequence repeat markers linked to QTL for resistance to Watermelon mosaic virus in melon. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 123, p. 1207-1214, 2011.

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

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

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.

RAMOS, N.F., LIMA, J.A.A.; GONÇALVES, M.F.B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 199-203, 2003.

RITSCHER, 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.

SANTOS, A.A. dos; FREIRE, F.C.O.; LIMA, J.A.A.; CARDOSO, J.E. **Doenças do meloeiro em áreas irrigadas no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 11 p. (Boletim de Pesquisa, 35).

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 submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2009.

SOLLER, M.; BRODY, T. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 47, p. 35-39, 1976.

STAUB, J.E.; DANI-POLEG, Y.; FAZIO, G.; HOREJSI, T.; REIS, N.; KATZIR, N. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. **Euphytica**, Heidelberg, v. 11, p. 225-441, 2000.

STEPANSKY, A.; KOVALSKI, I.; PERL-TREVES, R. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. **Plant Systematics & Evolution**, New York, v. 217, p. 313-333, June 1999.

SZABÓ, Z.; GYULAI, G.; HUMPHREYS, M.; HORVÁTH, L.; BITTSÁNSZKY, A.; LÁGER, R.; HESZKY, L. Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the middle ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. **Euphytica**, Heidelberg, v. 146, p. 87-94, 2005.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Hoboken, v. 93, p. 77-78, 2002.

WANG, Y.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 95, p. 791-798, 1997.

WASSANO, D.T.; SPADOTTI, D.M.A.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. Identificação de patótipos do vírus do mosaico do amarelo da abobrinha em isolados brasileiros. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 35. **Summa Phytopathologica**, Botucatu: editor: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. CD-ROM.

YEH, S.D.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R. Comparative studies on host range and serology of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus 1*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1081-1085, 1984.

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

YUSTE-LISBONA, F.J.; CAPEL, C; SARRIA, E.; TORREBLANCA, R.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L.; CAPEL, J.; LOZANO, R; LÓPEZ-SESÉ, 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.

APÊNDICES

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continua)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
PI414723 – sadia	0,138	0,1605	0,149	0,0115
F1-sadia	0,109	0,161	0,135	0,026
Védrantais – sadia	0,104	0,1455	0,125	0,02075
Pi (1)	0,154	0,138		0,008
Pi (2)	0,186	0,125	0,147	0,03075
Pi (3)	0,102	0,123		0,01075
F1 (1)	0,121	0,122		0,00025
F1 (2)	0,188	0,199	0,148	0,0055
F1 (3)	0,129	0,133		0,002
Véd (1)	1,451	1,435		0,00775
Véd (2)	1,439	1,868	1,496	0,2145
Véd (3)	1,192	1,593		0,20025
1	1,762	0,831	1,296	0,46575
2	0,251	0,250	0,250	0,00025
3	0,194	0,267	0,231	0,0365
4	0,142	0,234	0,188	0,046
5	0,233	0,184	0,208	0,02425
6	1,834	1,029	1,431	0,40225
7	1,819	0,755	1,287	0,532
8	0,157	0,231	0,194	0,037
9	0,429	0,213	0,321	0,108
10	0,154	0,117	0,135	0,01875
11	2,199	1,021	1,610	0,589
12	0,133	0,116	0,125	0,0085
13	0,683	0,301	0,492	0,19125
14	0,533	0,256	0,395	0,1385
15	0,320	0,247	0,283	0,03625
16	0,556	0,563	0,559	0,0035
17	0,181	0,155	0,168	0,01275
18	0,185	0,206	0,195	0,01025
19	0,235	0,215	0,225	0,00975
20	0,139	0,198	0,168	0,02925
21	0,621	0,416	0,519	0,1025
22	0,215	0,195	0,205	0,01
23	0,262	0,241	0,251	0,01075
24	0,333	0,288	0,310	0,0225
25	0,197	0,194	0,195	0,00125
26	0,225	0,192	0,208	0,0165

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
27	0,153	0,127	0,140	0,01325
28	1,312	0,780	1,046	0,266
29	0,269	0,249	0,259	0,01
30	0,334	0,260	0,297	0,037
31	1,646	1,076	1,361	0,28475
32	0,253	0,250	0,251	0,0015
33	0,136	0,233	0,184	0,04825
34	0,406	0,228	0,317	0,089
35	0,151	0,193	0,172	0,02075
36	0,230	0,236	0,233	0,00275
37	0,209	0,212	0,210	0,00125
38	0,220	0,188	0,204	0,016
39	0,158	0,192	0,175	0,017
40	0,158	0,207	0,183	0,0245
41	0,184	0,197	0,190	0,0065
42	1,233	1,496	1,365	0,1315
43	0,139	0,179	0,159	0,02
44	0,208	0,265	0,237	0,0285
45	0,256	0,169	0,213	0,0435
46	0,296	0,228	0,262	0,03375
47	0,186	0,288	0,237	0,05125
48	0,162	0,284	0,223	0,06125
49	0,138	0,236	0,187	0,049
50	0,221	0,316	0,268	0,0475
51	0,154	0,340	0,247	0,09275
52	1,778	1,913	1,846	0,0675
53	0,120	0,254	0,187	0,067
54	0,157	0,321	0,239	0,082
55	0,164	0,246	0,205	0,04125
56	0,181	0,281	0,231	0,04975
57	0,129	0,289	0,209	0,08
58	0,151	0,274	0,212	0,0615
59	0,157	0,317	0,237	0,08
60	0,176	0,223	0,199	0,02375
61	0,655	0,850	0,752	0,0975
62	0,137	0,263	0,200	0,063
63	0,192	0,336	0,264	0,072
64	0,173	0,213	0,193	0,02025
65	0,211	0,231	0,221	0,01

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
66	0,282	0,431	0,356	0,07475
67	0,222	0,466	0,344	0,12175
68	0,167	0,228	0,198	0,0305
69	0,157	0,303	0,230	0,07325
70	0,145	0,266	0,205	0,06075
71	0,181	0,203	0,192	0,011
72	0,156	0,216	0,186	0,03025
73	0,165	0,276	0,220	0,0555
74	2,217	2,686	2,451	0,2345
75	0,185	0,283	0,234	0,04875
76	0,188	0,245	0,216	0,02875
77	0,160	0,224	0,192	0,032
78	0,139	0,269	0,204	0,065
79	0,142	0,230	0,186	0,04375
80	0,149	0,203	0,176	0,02725
81	0,167	0,212	0,190	0,0225
82	0,242	0,179	0,210	0,0315
83	0,207	0,187	0,197	0,01
84	0,112	0,182	0,147	0,03475
85	0,149	0,238	0,193	0,0445
86	0,158	0,349	0,253	0,0955
87	0,109	0,207	0,158	0,049
88	0,103	0,181	0,142	0,039
89	0,596	0,801	0,698	0,10275
90	0,149	0,279	0,214	0,065
91	0,084	0,181	0,133	0,0485
92	0,693	1,242	0,967	0,27425
93	0,068	0,162	0,115	0,04675
94	0,139	0,248	0,193	0,05425
95	0,116	0,176	0,146	0,03025
96	0,071	0,121	0,096	0,025
97	0,135	0,142	0,139	0,0035
98	2,178	2,443	2,311	0,1325
99	0,127	0,216	0,172	0,0445
100	0,091	0,134	0,112	0,0215
101	0,106	0,159	0,132	0,02675
102	0,205	0,319	0,262	0,05725
103	0,153	0,227	0,190	0,037
104	0,088	0,165	0,126	0,0385

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
105	0,069	0,118	0,094	0,0245
106	0,171	0,292	0,231	0,0605
107	0,110	0,238	0,174	0,064
108	0,096	0,146	0,121	0,02475
109	0,077	0,114	0,095	0,01875
110	0,147	0,223	0,185	0,03775
111	0,133	0,192	0,162	0,0295
112	0,503	0,555	0,529	0,02625
113	0,234	0,283	0,258	0,02425
114	1,940	1,485	1,713	0,2275
115	0,128	0,229	0,178	0,05075
116	0,087	0,159	0,123	0,036
117	0,093	0,139	0,116	0,023
118	1,759	1,598	1,679	0,0805
119	0,106	0,206	0,156	0,05
120	1,335	1,552	1,443	0,10875
121	0,084	0,118	0,101	0,01725
122	1,464	1,656	1,560	0,09625
123	0,119	0,212	0,165	0,04675
124	0,152	0,210	0,181	0,029
125	0,122	0,158	0,140	0,01825
126	0,169	0,257	0,213	0,04425
127	0,116	0,194	0,155	0,03875
128	0,214	0,159	0,186	0,02725
129	0,174	0,122	0,148	0,026
130	0,125	0,074	0,100	0,0255
131	0,111	0,078	0,094	0,01675
132	0,203	0,158	0,180	0,02225
133	0,180	0,118	0,149	0,031
134	0,141	0,058	0,099	0,04175
135	0,597	0,297	0,447	0,15025
136	0,208	0,164	0,186	0,022
137	0,177	0,112	0,145	0,0325
138	0,127	0,065	0,096	0,03075
139	0,122	0,059	0,091	0,0315
140	0,179	0,157	0,168	0,01075
141	0,980	0,568	0,774	0,20625
142	0,369	0,228	0,298	0,07025
143	0,099	0,052	0,076	0,0235

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
144	0,168	0,124	0,146	0,022
145	0,148	0,105	0,126	0,02175
146	0,131	0,063	0,097	0,034
147	0,215	0,043	0,129	0,086
148	1,788	1,588	1,688	0,10025
149	0,327	0,170	0,248	0,0785
150	0,139	0,080	0,109	0,02925
151	0,126	0,048	0,087	0,039
152	0,213	0,168	0,190	0,02225
153	0,145	0,109	0,127	0,018
154	0,138	0,064	0,101	0,03675
155	0,115	0,053	0,084	0,031
156	0,167	0,131	0,149	0,01775
157	0,138	0,095	0,116	0,0215
158	0,418	0,584	0,501	0,083
159	0,112	0,079	0,095	0,01675
160	0,195	0,127	0,161	0,034
161	0,144	0,101	0,122	0,02125
162	0,139	0,079	0,109	0,02975
163	0,725	0,426	0,575	0,14975
164	0,971	0,335	0,653	0,31825
165	0,165	0,131	0,148	0,017
166	0,137	0,068	0,102	0,03475
167	0,121	0,074	0,097	0,02375
168	0,224	0,170	0,197	0,027
169	0,209	0,060	0,135	0,07435
170	0,194	0,151	0,172	0,02175
171	0,170	0,132	0,151	0,01875
172	0,109	0,105	0,107	0,002
173	0,085	0,063	0,074	0,01075
174	0,723	0,574	0,649	0,0745
175	0,176	0,146	0,161	0,015
176	0,079	0,064	0,071	0,00725
177	0,097	0,072	0,084	0,01225
178	0,205	0,163	0,184	0,021
179	2,080	1,034	1,557	0,52325
180	0,114	0,061	0,087	0,02675
181	0,100	0,079	0,089	0,01025
182	0,263	0,183	0,223	0,03975

Apêndice A - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA (conclusão)

Indivíduos	ELISA			Desvio padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (título viral)	
183	0,166	0,150	0,158	0,008
184	0,128	0,089	0,108	0,01975
185	0,101	0,063	0,082	0,019
186	0,205	0,159	0,182	0,02275
187	0,561	0,824	0,692	0,13125
188	0,111	0,100	0,105	0,00575
189	0,635	0,782	0,709	0,0735
190	0,206	0,144	0,175	0,031
191	0,388	0,695	0,542	0,1535
192	1,176	1,239	1,208	0,0315
193	0,103	0,077	0,090	0,013

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continua)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
PI414723 - sadio	0,1545	0,145	0,1498	0,00475
F1 - sadio	0,1405	0,119	0,1298	0,01075
Védrantais - sadio	0,1555	0,095	0,1253	0,03025
Pi	0,134	0,1455		0,00575
Pi	0,1775	0,1625	0,154	0,0075
Pi	0,16	0,1465		0,00675
F1	0,17	0,1825		0,00625
F1	0,1425	0,141	0,153	0,00075
F1	0,1375	0,149		0,00575
Védrantais	1,5965	0,991		0,30275
Védrantais	1,806	0,8515	1,301	0,47725
Védrantais	1,7355	0,8305		0,4525
1	0,501	0,838	0,6695	0,1685
2	0,611	1,5545	1,08275	0,47175
3	0,3	0,159	0,2295	0,0705
4	0,2755	0,134	0,20475	0,07075
5	0,2695	0,143	0,20625	0,06325

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA (continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
6	0,57	1,4535	1,01175	0,44175
7	0,255	0,101	0,178	0,077
8	0,2435	0,119	0,18125	0,06225
9	0,293	0,159	0,226	0,067
10	0,783	1,6435	1,21325	0,43025
11	0,4635	1,0985	0,781	0,3175
12	0,2965	0,187	0,24175	0,05475
13	0,2225	0,139	0,18075	0,04175
14	0,2155	0,1325	0,174	0,0415
15	0,2615	0,1455	0,2035	0,058
16	0,3265	0,2915	0,309	0,0175
17	0,234	0,126	0,18	0,054
18	0,212	0,116	0,164	0,048
19	0,203	0,1225	0,16275	0,04025
20	0,7515	1,408	1,07975	0,32825
21	0,231	0,1405	0,18575	0,04525
22	0,2325	0,12	0,17625	0,05625
23	0,2295	0,1165	0,173	0,0565
24	0,2175	0,1055	0,1615	0,056
25	0,2985	0,7845	0,5415	0,243
26	0,254	0,121	0,1875	0,0665
27	0,1865	0,111	0,14875	0,03775
28	0,192	0,0735	0,13275	0,05925
29	0,2165	0,1155	0,166	0,0505
30	0,2975	0,1205	0,209	0,0885
31	0,547	1,455	1,001	0,454
32	0,216	0,0905	0,15325	0,06275
33	0,3835	1,072	0,72775	0,34425
34	0,2295	0,138	0,18375	0,04575
35	0,196	0,136	0,166	0,03
36	0,285	0,0925	0,18875	0,09625
37	0,7705	1,9395	1,355	0,5845
38	0,2265	0,1165	0,1715	0,055
39	0,3295	0,1565	0,243	0,0865
40	0,4115	1,614	1,01275	0,60125
41	0,2485	0,128	0,18825	0,06025
42	0,5625	1,9455	1,254	0,6915
43	0,4145	0,209	0,31175	0,10275
44	0,751	1,7305	1,24075	0,48975

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
45	0,242	0,1145	0,17825	0,06375
46	0,355	0,326	0,3405	0,0145
47	0,722	1,611	1,1665	0,4445
48	0,639	1,4785	1,05875	0,41975
49	0,2345	0,1005	0,1675	0,067
50	0,4445	1,4315	0,938	0,4935
51	0,271	0,137	0,204	0,067
52	0,2675	0,1225	0,195	0,0725
53	0,527	1,3245	0,92575	0,39875
54	0,2605	0,1405	0,2005	0,06
55	0,297	0,134	0,2155	0,0815
56	0,281	0,141	0,211	0,07
57	0,24	0,158	0,199	0,041
58	0,2665	0,1405	0,2035	0,063
59	0,303	0,156	0,2295	0,0735
60	0,2125	0,122	0,16725	0,04525
61	0,2035	0,0885	0,146	0,0575
62	0,21	0,108	0,159	0,051
63	0,451	0,742	0,5965	0,1455
64	0,241	0,115	0,178	0,063
65	0,576	1,363	0,9695	0,3935
66	0,263	0,127	0,195	0,068
67	0,225	0,136	0,1805	0,0445
68	0,248	0,1235	0,18575	0,06225
69	0,4435	0,375	0,40925	0,03425
70	0,272	0,128	0,2	0,072
71	0,555	1,1915	0,87325	0,31825
72	0,2275	0,127	0,17725	0,05025
73	0,317	0,187	0,252	0,065
74	0,2355	0,116	0,17575	0,05975
75	0,393	0,3495	0,37125	0,02175
76	0,509	0,6025	0,55575	0,04675
77	0,24	0,13	0,185	0,055
78	0,1915	0,127	0,15925	0,03225
79	0,2975	0,178	0,23775	0,05975
80	0,3165	0,15	0,23325	0,08325
81	0,2675	0,118	0,19275	0,07475
82	0,293	0,1435	0,21825	0,07475
83	0,2385	0,1645	0,2015	0,037

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA (continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
84	0,291	0,2705	0,28075	0,01025
85	0,3045	0,2115	0,258	0,0465
86	0,2415	0,165	0,20325	0,03825
87	0,2545	0,148	0,20125	0,05325
88	0,29	0,19	0,24	0,05
89	0,256	0,1715	0,21375	0,04225
90	0,3235	1,091	0,70725	0,38375
91	0,2775	0,1355	0,2065	0,071
92	0,3595	1,3685	0,864	0,5045
93	0,2305	0,1855	0,208	0,0225
94	0,5405	1,2445	0,8925	0,352
95	0,202	0,1575	0,17975	0,02225
96	0,226	0,128	0,177	0,049
97	0,2475	0,1715	0,2095	0,038
98	0,1945	0,207	0,20075	0,00625
99	0,178	0,139	0,1585	0,0195
100	0,1815	0,1335	0,1575	0,024
101	0,265	0,1445	0,20475	0,06025
102	0,315	0,416	0,3655	0,0505
103	0,7015	0,973	0,83725	0,13575
104	0,247	0,132	0,1895	0,0575
105	0,464	1,3965	0,93025	0,46625
106	0,2125	0,165	0,18875	0,02375
107	0,2155	0,1165	0,166	0,0495
108	0,292	0,1715	0,23175	0,06025
109	0,2365	0,1515	0,194	0,0425
110	0,4465	0,935	0,69075	0,24425
111	0,5965	0,9865	0,7915	0,195
112	0,1945	0,169	0,18175	0,01275
113	0,222	0,164	0,193	0,029
114	0,603	0,589	0,596	0,007
115	0,2035	0,133	0,16825	0,03525
116	0,2145	0,157	0,18575	0,02875
117	1,1475	2,081	1,61425	0,46675
118	0,223	0,1615	0,19225	0,03075
119	0,496	0,765	0,6305	0,1345
120	0,2435	0,134	0,18875	0,05475
121	0,615	1,2695	0,94225	0,32725
122	0,3335	0,4215	0,3775	0,044

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
123	0,234	0,0985	0,16625	0,06775
124	0,63	1,35	0,99	0,36
125	0,3025	0,1695	0,236	0,0665
126	0,4145	0,7555	0,585	0,1705
128	0,2485	0,1765	0,2125	0,036
129	0,3185	0,252	0,28525	0,03325
130	0,2485	0,22	0,23425	0,01425
131	0,7305	1,117	0,92375	0,19325
133	0,324	0,141	0,2325	0,0915
134	0,3005	0,1645	0,2325	0,068
135	0,2415	0,1955	0,2185	0,023
136	0,234	0,181	0,2075	0,0265
137	0,7595	1,068	0,91375	0,15425
138	0,208	0,1465	0,17725	0,03075
139	0,63	0,9005	0,76525	0,13525
140	0,215	0,1375	0,17625	0,03875
141	0,2395	0,134	0,18675	0,05275
142	0,6255	0,7555	0,6905	0,065
143	1,0645	1,321	1,19275	0,12825
144	0,242	0,16	0,201	0,041
145	0,4895	0,3225	0,406	0,0835
146	0,25	0,1465	0,19825	0,05175
147	0,3465	0,174	0,26025	0,08625
148	0,2645	0,1775	0,221	0,0435
149	0,877	1,037	0,957	0,08
150	0,1935	0,12	0,15675	0,03675
151	0,248	0,1715	0,20975	0,03825
152	0,2545	0,137	0,19575	0,05875
153	0,2615	0,1575	0,2095	0,052
154	0,2465	0,141	0,19375	0,05275
155	0,5085	0,3725	0,4405	0,068
156	0,2305	0,127	0,17875	0,05175
157	0,2195	0,12	0,16975	0,04975
158	0,258	0,123	0,1905	0,0675
159	0,226	0,193	0,2095	0,0165
160	0,266	0,1825	0,22425	0,04175
161	0,7885	0,806	0,79725	0,00875
162	0,2515	0,1175	0,1845	0,067
163	0,2615	0,1755	0,2185	0,043

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA

(continuação)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
164	0,537	0,7205	0,62875	0,09175
165	0,253	0,172	0,2125	0,0405
166	0,3215	0,1195	0,2205	0,101
167	1,218	1,49	1,354	0,136
168	0,7865	1,2495	1,018	0,2315
169	0,2435	0,197	0,22025	0,02325
170	0,356	0,9375	0,64675	0,29075
171	0,2415	0,1655	0,2035	0,038
172	0,197	0,1815	0,18925	0,00775
173	0,458	0,55	0,504	0,046
174	0,2215	0,1645	0,193	0,0285
175	0,261	0,1575	0,20925	0,05175
176	0,211	0,143	0,177	0,034
177	0,2525	0,1605	0,2065	0,046
178	0,2145	0,1645	0,1895	0,025
179	0,3095	0,492	0,40075	0,09125
180	0,2245	0,1485	0,1865	0,038
181	0,2765	0,1795	0,228	0,0485
182	0,2585	0,1685	0,2135	0,045
183	0,267	0,165	0,216	0,051
184	0,2235	0,1935	0,2085	0,015
185	0,232	0,1675	0,19975	0,03225
186	0,2095	0,1735	0,1915	0,018
187	0,2415	0,1715	0,2065	0,035
188	0,2845	0,3355	0,31	0,0255
189	0,263	0,1645	0,21375	0,04925
190	0,273	0,1905	0,23175	0,04125
191	0,2305	0,19	0,21025	0,02025
192	0,205	0,159	0,182	0,023
193	0,436	0,964	0,7	0,264
194	0,1825	0,1545	0,1685	0,014
195	0,2125	0,1825	0,1975	0,015
196	0,1735	0,1685	0,171	0,0025
197	0,604	0,9745	0,78925	0,18525
198	0,2005	0,1715	0,186	0,0145
199	0,299	0,1805	0,23975	0,05925
200	0,2035	0,1375	0,1705	0,033
201	0,369	0,609	0,489	0,12
202	0,201	0,1675	0,18425	0,01675

Apêndice B - Médias das repetições técnicas, repetições biológicas, título viral e desvio padrão da fenotipagem da população LGM2 através dos dados de absorbância de ELISA (conclusão)

Indivíduos	ELISA			Desvio Padrão
	Repetição Biológica 1 (Média das repetições técnicas)	Repetição Biológica 2 (Média das repetições técnicas)	Média das repetições biológicas (Título viral)	
203	0,1975	0,1805	0,189	0,0085
204	0,2325	0,2235	0,228	0,0045
205	0,2125	0,165	0,18875	0,02375
206	0,1965	0,1285	0,1625	0,034
207	0,284	0,233	0,2585	0,0255
208	0,1785	0,1585	0,1685	0,01
209	0,201	0,2085	0,20475	0,00375
210	0,2085	0,1325	0,1705	0,038