REAÇÃO DE *Cucurbita pepo* E *C. moschata* A
INFEÇÃO MISTA DO VÍRUS DO MOSAICO DO
MAMOEIRO-ESTIRPE MELANCIA COM O VÍRUS DO
MOSAICO DA MELANCIA-2 OU COM O VÍRUS DO
MOSAICO AMARELO DA ABOBRINHA.

IEDA MARIA PERLIS LOTZ

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1995

REAÇÃO DE *Cucurbita pepo* E *C. moschata* A
INFEÇÃO MISTA DO VÍRUS DO MOSAICO DO
MAMOEIRO-ESTIRPE MELANCIA COM O VÍRUS DO
MOSAICO DA MELANCIA-2 OU COM O VÍRUS DO
MOSAICO AMARELO DA ABOBRINHA.

IEDA MARIA PERLIS LOTZ
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"
/USP

LOTZ, IEDA MARIA PERLIS

Reação de *Cucurbita pepo* e *C. moschata* a infecção mista do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia com o vírus do mosaico da melancia 2 ou com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha. Piracicaba. 1995.

75 p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Abobrinha - Resistência ao vírus 2. Vírus fitopatogênico 3. Mosaico amarelo da abobrinha 4. Mosaico do mamoeiro 5. Mosaico da melancia em abobrinha
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.8
635.62

REAÇÃO DE *Cucurbita pepo* E *C. moschata* A
INFECÇÃO MISTA DO VÍRUS DO MOSAICO DO
MAMOEIRO-ESTIRPE MELANCIA COM O VÍRUS DO
MOSAICO DA MELANCIA-2 OU COM O VÍRUS DO MOSAICO
AMARELO DA ABOBRINHA.

IEDA MARIA PERLIS LOTZ

Aprovada em: 30/ 08/ 1995

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

Prof. Dr. Jorge A. M. Resende

Prof. Dr. Marcelo Pavan

Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa
Orientador

Aos meus queridos pais , Mário e
Ruiara, ofereço;

ao meu marido, Ruy , dedico este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento às pessoas e às instituições que tornaram possíveis a realização deste trabalho:

. Ao Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa, pela valiosa orientação, que tenho a oportunidade de contar desde a graduação, pela amizade e constante interesse no meu futuro profissional.

. À Dra. Addolorata Colariccio, pelas sugestões, imensa colaboração e atencioso acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

. À Dra. Ailema B. Noronha, pelo grande incentivo e pela permissão de realizar a pesquisa nas dependências da Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia do Instituto Biológico - S.P.

. Ao Engenheiro Agrônomo Marcelo Eiras pela colaboração durante os trabalhos práticos.

. À Bióloga Silvia Galleti, pelo auxílio com as técnicas de microscopia eletrônica e pela amizade.

. Aos professores e colegas do curso, pelos ensinamentos e pelo ótimo relacionamento.

. Aos funcionários de apoio do Instituto Biológico pela ajuda nos trabalhos práticos.

. À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, que tornou possível a realização deste trabalho.

. À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico.

. E a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A autora.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. Caracterização das cultivares	04
3.1.1. Caserta	04
3.1.2. Piramoita	04
3.2. Caracterização dos vírus	05
3.2.1. VMM-Me	05
3.2.2. VMMe-2	06
3.2.3. VMAA	07
3.3. Interação entre vírus	08
3.3.1. Aspecto Geral	08
3.3.2. Interações com os vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA	09
3.4. Controle	10
3.4.1. Método Químico	11
3.4.2. Método Cultural	11
3.4.3. Premunização	11
3.4.4. Resistência Genética	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Cultivares	16
4.2. Isolados	16
4.3. Método de Inoculação	16
4.4. Multiplicação e manutenção dos isolados	16
4.5. Antissoros	16

	Página
4.6. Experimentos	17
4.6.1. Experimento I	17
4.6.2. Experimento II	18
4.6.3. Experimento III	18
4.6.4. Experimento IV	19
4.7. Parâmetros de Avaliação	19
4.7.1. Sintomas	19
4.7.2. Presença e concentração dos vírus	19
4.7.3. Área Foliar	21
4.7.4. Pesos fresco e seco da parte aérea	22
4.8. Análise Estatística	22
5. RESULTADOS	22
5.1. Sintomatologia.....	22
5.1.1. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na cv. Caserta (EXP. I).....	25
5.1.2. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na cv. Caserta (EXP.II).....	27
5.1.3. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na cv. Piramoita (EXP. III).....	29
5.1.4. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na cv. Piramoita (EXP. IV).....	31
5.2. Testes Serológicos.....	33
5.2.1. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMAA nas infecções simples e mistas na cv. Caserta (EXP. I).....	33
5.2.2. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMMe-2 nas infecções simples e mistas na cv. Piramoita (EXP.II).....	35
5.2.3. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMAA nas infecções simples e mistas na cv. Piramoita (EXP III).....	37
5.2.4. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMMe-2 nas infecções simples e mistas na cv. Piramoita (EXP IV).....	39
5.2.5. Microscopia eletrônica	41
5.3. Efeito das infecções simples e mistas do VMM-Me com o VMAA ou o VMMe-2 na área foliar, no peso fresco e seco das cvs. Caserta e Piramoita	43
5.3.1. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na área foliar, no peso fresco e seco, na cv.Caserta(EXP I)	43
5.3.2. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na área foliar, no peso fresco e seco, na cv.Caserta (EXP II)	47

	Página
5.3.3. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA, na área foliar, no peso fresco e seco, na cv. Piramoita (EXP III)	50
5.3.4. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na área foliar, no peso fresco e seco, na cv. Piramoita (EXP IV)	53
6. DISCUSSÃO	56
6.1. Sintomas causados pelo VMM-Me, VMMe-2 e VMAA nas cultivares estudadas	56
6.2. Efeito da ordem e do intervalo de tempo entre as inoculações, nos sintomas observados	57
6.3. Concentração dos vírus	57
6.4. Heteroencapsidação	59
6.5. Avaliação dos parâmetros: área foliar, peso fresco e seco da parte aérea	60
6.6. Discussão geral com ênfase visando resistência múltipla aos vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA	61
7. CONCLUSÕES	62
7.1. Com relação à cv. Caserta	62
7.2. Com relação à cv. Piramoita	63
7.3. Com relação às duas cultivares	63
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
- Figura 01. Fontes de resistência ao VMM-Me, VMMe-2 e VMAA em algumas espécies do gênero <i>Cucurbita</i> .	16
- Figura 02. Croqui das medidas tomadas das folhas para obtenção da área foliar pelo método indireto (SANTOS, 1990).	21
- Figura 03. Abreviações usadas para os sintomas observados nos experimentos.	23
- Figura 04. A) Sintoma de mosaico amarelo (MA) em <i>C. moschata</i> cv. Piramoita aos 15 DAI. B) Sintoma de "Vein banding" (VB) em <i>C. pepo</i> cv. Caserta aos 15 DAI.	24
- Figura 05. Valores médios de absorbância obtidos para o VMM-Me e o VMAA, através do teste de ELISA-indireto, na cv. Caserta nos tratamentos	34
- Figura 06. Valores médios de absorbância obtidos para o VMM-Me e o VMMe-2, através do teste de ELISA-indireto, na cv. Caserta nos tratamentos.	36
- Figura 07. Valores médios de absorbância obtidos para o VMM-Me e o VMAA, através do teste de ELISA-indireto, na cv. Piramoita nos tratamentos.	38
- Figura 08. Valores médios de absorbância obtidos para o VMM-Me e o VMMe-2, do teste de ELISA-indireto, na cv. Piramoita nos tratamentos	40
- Figura 09. Fotomicrografias A) Partícula viral parcialmente decorada pelo antissoro específico para VMM-Me na infecção simultânea por VMM-Me e VMAA (T3) na cv. Piramoita - Exp III. B) Partícula viral parcialmente decorada pelo antissoro específico para o VMM-Me na infecção simultânea por VMM-Me e VMMe-2 (T3) na cv. Piramoita - Exp IV.	42
- Figura 10. Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Caserta, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA nos tratamentos	46

- Figura 11. Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Caserta, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 nos tratamentos 49
- Figura 12. Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Piramoita, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA nos tratamentos 52
- Figura 13. Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Piramoita, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 nos tratamentos 55

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 01. Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMAA nas primeiras folhas verdadeiras da cv. Caserta.....	26
- Tabela 02. Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMMe-2 nas primeiras folhas verdadeiras do cv. Caserta.....	28
- Tabela 03. Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMAA nas primeiras folhas verdadeiras do cv. Piramoita.....	30
- Tabela 04. Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMMe-2 nas primeiras folhas verdadeiras do cv. Piramoita.....	32
- Tabela 05. Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea do cv. Caserta nas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMAA.....	45
- Tabela 06. Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea do cv. Caserta nas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMMe-2.....	48
- Tabela 07. Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea do cv. Piramoita nas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMAA.....	51
- Tabela 08. Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea do cv. Piramoita nas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMMe-2.....	54

REAÇÃO DE *Cucurbita pepo* E *C. moschata* A
INFECÇÃO MISTA DO VÍRUS DO MOSAICO DO
MAMOEIRO- ESTIRPE MELANCIA COM O VÍRUS DO
MOSAICO DA MELANCIA-2OU COM O VÍRUS DO MOSAICO
AMARELO DA ABOBRINHA

Autora: Ieda Maria Perlis Lotz

Orientador: Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

RESUMO:

Resistência múltipla ao VMM-Me, ao VMMe-2 e ao VMAA é uma prioridade do melhoramento de abóbora e abobrinhas. A presente pesquisa procurou esclarecer o comportamento do VMM-Me em interação com o VMMe-2 e o VMAA fornecendo subsídios para o desenvolvimento destes.

Avaliou-se os efeitos das infecções mistas do VMM-Me com o VMAA ou com o VMMe-2, nas plantas jovens das cultivares de abobrinha Caserta e Piramoita. Foram conduzidos quatro experimentos com plantas jovens, em casa-de-vegetação, sendo que cada experimento contou com 10 tratamentos e 12 repetições. Os tratamentos foram: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA (ou VMMe-2); 3. Inoculação simultânea dos vírus; 4, 5 e 6 .Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA (ou VMMe-2) com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações com o VMAA (ou VMMe-2) seguido pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação. Aos 15 dias após inoculação foram avaliados os parâmetros de sintomatologia, área foliar, peso fresco e peso da parte aérea e concentração de partículas de vírus nas plantas, através de ELISA-indireto.

Os resultados mostraram que o genótipo do hospedeiro, o intervalo de tempo e a ordem das inoculações influenciaram a sintomatologia, reduzindo a área foliar e alterando a concentração de partículas do VMMe-2 e do VMAA nas plantas quando inoculadas em infecções mistas com o VMM-Me. Nas infecções mistas avaliadas a interação do tipo ANTAGONISMO foi a mais freqüente. A infecção simples com o VMAA mostrou-se mais severa do que as infecções simples com o VMM-Me e o VMMe-2. O VMM-Me apresentou concentrações superiores aos outros dois vírus, apresentando maior velocidade na replicação nestes hospedeiros. Foi observado que a severidade dos sintomas foi diretamente proporcional a redução da área foliar em todos os tratamentos, em ambas cultivares. A área foliar foi um excelente parâmetro para avaliar severidade destes vírus nos hospedeiros.

A cv. Piramoita confirmou sua tolerância ao VMM-Me quanto à sintomatologia, porém, a concentração viral nela observada foi maior do que na cv. Caserta, considerada altamente suscetível ao VMM-Me.

Na cv. Caserta em alguns tratamentos foi observado efeito antagônico quanto à concentração viral e à área foliar, quando a inoculação com o VMM-Me precedeu à do VMAA ou a do VMMe-2. Não houve efeito antagônico quando a inoculação com o VMMe-2 ou o VMAA precedeu à de VMM-Me. Na cv. Piramoita na infecção mista, na qual, o VMMe-2 precedeu o VMM-Me com intervalo de 48 h. (T8) verificou-se antagonismo com redução da concentração do VMM-Me.

As duas cultivares exibiram severos sintomas causados pelas infecções mistas do VMM-Me com o VMMe-2 ou o VMAA.

REACTION OF *Cucurbita pepo* E *C. moschata* TO MIXED
INFECTION OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS-W (PRSV-W) WITH
WATERMELON MOSAIC VIRUS-2 (WMV-2) OR WITH ZUCCHINI
YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV)

Author: Ieda Maria Perlis Lotz

Adviser : Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

SUMARY:

Multiple resistance to PRSV-W, WMV-2 and ZYMV is a priority for squash and summer squash breeding. This present research look for an explanation of PRSV-W interations with WMV-2 and ZYMV, in *Cucurbita* sp. to support further squash breeding for virus resistance.

The effects of mixed infections by PRSV-W with ZYMV or with WMV-2, was elaluated on young plants of cv. Caserta (*Cucurbita pepo*) and cv. Piramoita (*Cucurbita moschata*). Four experiments were carried out in greenhouses and each experiment cosisted of 10 treatments and 12 repetitions. The treatments were: 1. Single inoculation with PRSV-W; 2. Single inoculation with WMV-2 (or ZYMV); 3. Simultaneous inoculation with PRSV-W and WMV-2 (or ZYMV); 4, 5 and 6. Mixed inoculations of PRSV-W before WMV-2 (or ZYMV) with 24, 48 and 72 h. of the intervals between inoculations (respectively); 7, 8 and 9. Mixed inoculations of WMV-2 (or ZYMV) before PRVS-W with 24, 48 and 72 h. of the intervals between inoculations (respectively); 10. Health control. It was evalueted symptoms, foliar area,

fresh and dry weight of leaves and viral concentration through indirect-ELISA fifteen days after inoculation.

The results showed that genotype, time interval and inoculations sequence influence symptoms, reduction foliar area and viral concentration of WMV-2 and ZYMV in mixed inoculated plants with PRSV-W. The antagonism was the most frequent effect observed in the double inoculations. The ZYMV was more severe than PRSV-W or WMV-2. PRSV-W showed higher viral concentration than the ZYMV or WMV-2, with faster replication. Symptoms severity were directly proportional to reduction of foliar area in all treatments in both cultivars. Foliar area reduction was an excellent parameter to evaluate severity degree in the infected host.

Cv. Piramoita tolerance to PRSV-W, was confirmed, although viral concentration was higher than in cv. Caserta, considered to be highly sensitive to PRSV-W.

The antagonism effect on cv. Caserta concerning viral concentration and foliar area was observed when PRSV-W inoculations preceded ZYMV or WMV-2 inoculations. No antagonism was observed when WMV-2 or ZYMV inoculations preceded PRSV-W. Mixed infections of WMV-2 inoculations preceded by PRSV-W at 48 h. (T8) intervals inoculation on cv. Piramoita showed antagonism with PRSV-W viral concentration reduction.

Both cultivars showed severe symptoms when double infected by PRSV-W with WMV-2 or with ZYMV.

1. INTRODUÇÃO

A família botânica das Cucurbitáceas engloba várias espécies de grande importância econômica na horticultura mundial. Essa família é formada por cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies, das quais são expressivas economicamente no Brasil: abóboras, abobrinhas verdes, chuchu, melão, melancia, morangas e pepino. Pela CEAGESP-SP foram comercializadas no ano de 1991, 34.503 toneladas de abobrinhas entre as espécies *C. moschata* e *C. pepo*, provindas dos Estados: BA, MG, ES, RJ, SP, GO e SC. O Estado de São Paulo, em setembro de 1993, comercializou 98 toneladas de abobrinhas brasileiras (*C. moschata*) e 37,6 ton. de abobrinha italiana (*C. pepo*), sendo os municípios de Campinas, Sorocaba, Bragança Paulista, Jundiaí e Paranapiacaba os maiores produtores (CEAGESP-SP, 1993). O cultivo das cucurbitáceas possui ainda importância social pois demanda um grande número de mão-de-obra, constituindo-se de uma atividade geradora de empregos diretos e indiretos (LOPES, 1991).

O gênero *Cucurbita* que compreende as abóboras, abobrinhas e morangas, possui grande importância econômica no país, principalmente pelo seu valor alimentício e versatilidade na culinária dos frutos. A cultura de abobrinhas é significativamente afetada por viroses que chegam a inviabilizar o cultivo nas épocas mais quentes do ano, época onde a reprodução dos vetores é acelerada. Os afídeos são os principais vetores do vírus causadores das viroses que afetam as cucurbitáceas. As viroses podem provocar deformações nos frutos e morte de plantas, resultando em perdas na quantidade e na qualidade dos frutos comerciais.

No Brasil, os vírus de maior distribuição geográfica que afetam as cucurbitáceas são: "Papaya Ringspot Virus- type Watermelon" (PRSV-W ou Vírus do mosaico do mamoeiro- estirpe melancia - VMM-Me) e "Cucumber Mosaic Virus" (CMV). Porém nos últimos anos, foi relatada a ocorrência do "Watermelon Mosaic Virus -2", ou vírus do mosaico da melancia- 2 (VMM-2), na região de Campinas (SÁ et al., 1988) e no nordeste do Brasil (DUSI et al., 1991), e do "Zucchini Yellow Mosaic Virus", denominado em português de vírus do mosaico amarelo da

abobrinha (VMAA) que foi identificado nos Estados de São Paulo (VEGA et al., 1992) e Santa Catarina (CANER et al., 1992), até então ausentes no País. O VMAA e o VMMe-2 possuem grande potencial epidemiológico nas nossas condições, podendo tornar-se fatores limitantes no cultivo das cucurbitáceas, já que são conhecidas 75 espécies hospedeiras e 34 espécies de afideos vetores do VMMe-2, e 31 espécies hospedeiras e 10 espécies de afideos vetores para o VMAA (PERRING et al., 1992). Um ano após a detecção do VMMe-2 em Pernambuco, a expansão deste vírus foi alarmante nas regiões produtoras, uma vez que as cultivares de cucurbitáceas utilizadas no Brasil não são resistentes a esta virose (DUSI et al., 1991). De maneira semelhante, PERRING et al. (1992), após pesquisarem a ocorrência de viroses no gênero *Cucurbita* em 432 campos da Califórnia e Arizona, constataram que 87% e 75% dos campos estavam infectados com VMMe-2 e VMAA respectivamente ou com uma combinação destes dois vírus. CMV e VMM-Me raramente foram encontrados.

O VMM-Me, VMMe-2 e VMAA pertencem ao grupo dos potyvírus e são transmitidos por afideos. Em muitos países são a principal causa da quebra de produção de cucurbitáceas (PERRING et al., 1992), sendo freqüentemente encontrados em infecções mistas. Em tais infecções podem ocorrer efeitos sinérgicos, antagônicos ou simplesmente aditivos, causando respectivamente: aumento, decréscimo ou somatória dos sintomas normalmente causados pelos vírus em infecções simples.

Os programas de melhoramento de cucurbitáceas no Brasil têm-se dedicado principalmente a desenvolver resistência ao VMM-Me, que é a principal virose que ocorre nessa cultura no país, devido a sua abrangência geográfica já detectada. Estes programas devem ser alertados sobre a ocorrência do VMMe-2 e do VMAA nas regiões produtoras, de maneira isolada e também, em infecções mistas.

Elucidar os efeitos das interações entre o VMM-Me e o VMMe-2 ou o VMAA nas espécies *C. pepo* e *C. moschata*, e fornecer subsídios aos programas de melhoramento que visem obter resistência múltipla a esses vírus, são as metas da presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho de pesquisa teve por objetivos:

A) Determinar o efeito das interações entre os potyvírus: VMM-Me X VMMe-2 e VMM-Me X VMAA em *Cucurbita pepo* (cv. Caserta - hospedeiro suscetível ao VMM-Me) e em *Cucurbita moschata* (cv. Piramoita- hospedeiro tolerante ao VMM-Me). Avaliar o efeito do intervalo de tempo e da ordem na qual os vírus são inoculados nos diferentes tratamentos..

B) Determinar os efeitos de sinergismo ou antagonismo em *C. pepo* (cv. Caserta) nas interações entre VMM-Me X VMMe-2 e VMM-Me X VMAA.

C) Avaliar o nível de tolerância da *C. moschata* (cv. Piramoita) nas interações entre VMM-Me com VMMe-2 ou com VMAA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTIVARES

3.1.1. Caserta

Conhecida também como "abobrinha de moita", "de árvore", "abobrinha de 40 dias" ou "italiana" é uma cucurbitácea (*Cucurbita pepo* L.) de hábito de crescimento caracteristicamente ereto, apesar de seu caule herbáceo. Possui ramas curtas, grossas sem ramificações. É de origem americana, goza da preferência do consumidor, na região Sudeste e Sul do Brasil. Combina produtividade e precocidade. Os frutos são cilíndricos estreitando-se nas extremidades, são caracteristicamente de coloração verde clara com estrias verdes escuras. Os pedúnculos são pentacnados, não se achatando no ponto de inserção com o fruto. Requer temperaturas amenas, portanto é cultivada no outono e na primavera. No verão quando as temperaturas favorecem a reprodução de vetores, a incidência de viroses limita o cultivo da abobrinha Caserta (FILGUEIRA, 1981). A susceptibilidade de *C. pepo* está relacionada com a origem da espécie. Originou-se de uma região árida do oeste dos EUA, ao norte do México. Nestas condições a ocorrência de afídeos, transmissores de viroses, é muito baixa não havendo uma seleção natural para as populações resistentes ou tolerantes à viroses (WHITAKER & DAVIS, 1962).

3.1.2. Piramoita

A cv. Piramoita (*C. moschata* Duchesne), originou-se de um cruzamento interespecífico de plantas tipo moita F2 *C. pepo* cv. Yankee Hybrid X *C. moschata* cv. Butternut com *C. moschata* cv. Menina Brasileira e posteriores retrocruzamentos com a cv. Menina Brasileira (COSTA, 1974). Essa cultivar caracteriza-se por possuir hábito de crescimento tipo moita (gene braquítico), ou seja, apresenta internódios curtos. A compacidade da cv. Piramoita possibilita seu cultivo na densidade de 5.000 pl/ha, população cerca de 10 vezes maior do que a

normalmente usada para a cv. Menina Brasileira. Os retrocruzamentos com a cv. Menina Brasileira, transferiram e incorporaram a tolerância ao VMM-Me na cv. Piramoita que não a afeta economicamente (KUABARA & COSTA, 1987). A espécie *C. moschata* originou-se na região tropical entre América Central e América do Sul (WHITAKER & DAVIS, 1962). Caracteriza-se por ser uma das espécies de *Curcubita* mais sensíveis às baixas temperaturas. Possui excelente fonte de resistência às doenças, porém, normalmente apresenta o hábito de crescimento rasteiro, que torna os tratos culturais da abobrinha mais difícil.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS:

3.2.1. Vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia

Inicialmente descrito como uma estirpe do Watermelon Mosaic Virus (WMV-1) (DE BOKX, 1965; WEBB & SCOTT, 1965), após estudos comparativos do círculo de hospedeiras e serologia dos vírus WMV-1 e Papaya Ringspot virus (PRV), o WMV-1 foi reclassificado e chamado de PRSV-W (Papaya Ringspot Virus- type Watermelon), ou em português de Vírus do Mosaico do mamoeiro- estirpe melancia (VMM-Me) (YEH et al., 1984; YEH & GONSALVES, 1984; QUIOT-DOUINE et al., 1986).

O VMM-Me é um potyvírus, possui RNA de fita simples, partículas flexuosas e alongadas de 780 nm de comprimento, induz a formação de inclusões citoplasmáticas do tipo "catavento" e amorfas no citoplasma das células do hospedeiro. É transmitido por 21 espécies de afídeos em 11 gêneros diferentes, de maneira não-persistente, e também mecanicamente. O VMM-Me é restrito às cucurbitáceas e encontra-se largamente distribuído no mundo afetando economicamente culturas de abóboras, abobrinhas, melões, melancias e pepinos (PURCIFULL et

al.,1984). Causa sintomas de mosaico, deformação de folhas e frutos, que variam com a patogenicidade do isolado e com a suscetibilidade do hospedeiro. No Brasil ainda é considerado o vírus de cucurbitáceas endêmico em todas as área produtoras de cucurbitáceas. Por esta razão vem merecendo destaque no desenvolvimento de cultivares tolerantes para serem empregados em programas de melhoramento (GARCIA DE SALCEDO, 1984; PAVAN, 1985; LIMA, 1986).

3.2.2. Vírus do mosaico da melancia - 2

Este vírus foi descrito por WEBB & SCOTT (1965) e por PURCIFULL & HIEBERT (1979) como sendo uma estirpe do antigo WMV-1 "Watermelon Mosaic Virus-1" agora reclassificado como PRSV-W. Como este vírus é serologicamente distinto do PRV, foi mantida sua identidade como "Watermelos Mosaic Virus-2" ou em português Vírus do Mosaico da melancia -2 (VMMe-2). Possui RNA de fita simples, partículas alongadas e flexuosas de 760 nm de comprimento, induzindo a formação de inclusões citoplasmática do tipo catavento que é peculiar do grupo dos potyvírus (PURCIFULL et al., 1984). Pode ser rapidamente transmitido mecanicamente sendo conhecidas 38 espécies de afídeos em 19 gêneros diferentes que transmitem estes vírus através da picada de prova, de maneira não-persistente (ADLERZ, 1974; SAKO et al., 1977; YAMAMOTO et al., 1982; YAMAMOTO & ISHII, 1983). Não foi constatada transmissão do vírus por sementes (GREBER, 1969). O VMMe-2 causa sintomas sistêmicos em vários membros de três grandes famílias botânicas: cucurbitáceas, malváceas, e fabáceas (leguminosas) (FISCHER & LOCKHART, 1974). Foi relatado também ocorrência natural deste vírus na espécie *Phytolacca americana*, somando portanto mais uma família: Phytolaccaceae (WEBB, 1971). É um vírus cosmopolita.

Nos EUA, em muitos Estados, o VMMe-2 é o vírus mais frequente, com até 100 % de infecção (SAMMOS & BARNETT, 1989; DAVIS & MIZUKI, 1987). No Brasil foi detectada pela primeira vez em 1988, em abobrinhas, na região de Campinas- S.P. (Sá et al., 1988). Em 1990 foi detectado na cultura de melão no nordeste (Pernambuco) e em 1991, e posteriormente confirmada sua expressão em outras regiões do Brasil (DUSI et al., 1991).

A planta indicadora *Nicotiana benthamiana* é infectada de modo sistêmico pelo VMMe-2 sendo portanto, hospedeira diferencial do VMM-Me que não causa sintomas nesta indicadora (PURCIFULL et al., 1984). Enquanto a espécie *Luffa acutangula* produz manchas cloróticas quando inoculada com VMM-Me e não manifesta sintomas quando inoculada com VMMe-2 sendo outra hospedeira diferencial (WEBB, 1971; PURCIFULL et al., 1984).

O VMMe-2 também causa sintomas de mosaico e deformação foliar, porém não causa sintomas severos nos frutos das cucurbitáceas infectadas (PERRING et al., 1992).

3.2.3. Vírus do mosaico amarelo da abobrinha

Descrito por LISA et al. (1981) o VMAA ou em inglês Zucchini Yellow Mosaic Virus - (ZYMV) tem como sinônimo "Muskmelon Yellow Stunt Virus". É um potyvírus com RNA de fita simples tendo partículas alongadas e flexuosas de comprimento médio de 750 nm. É facilmente transmitido mecanicamente e são conhecidas 10 espécies de afídeos vetores em 6 gêneros diferentes (PERRING et al., 1992). A transmissão por semente foi detectada em *C. pepo* (DAVIS & MIZUKI, 1986). Estudos exaustivos realizados com a mesma espécie, constataram a presença do VMAA no tegumento e no clorênquima* das sementes de frutos de plantas inoculadas com VMAA, mas não no embrião. Exames ao microscópio eletrônico confirmaram a presença do vírus no tegumento e no clorênquima das sementes e a ausência nos cotilédones e no embrião. Essa constatação permite aceitar uma transmissão do VMAA por semente em níveis muito baixos, causada pelo desenvolvimento do embrião ou dos cotilédones durante a germinação (WALKEY, 1992).

Os sintomas do VMAA em cucurbitáceas são tipicamente mosaico amarelo, "Vein banding" e deformações nas folhas, além de nanismo e morte de plantas, nas flores provoca o

* Clorênquima: tecido delgado, que nas sementes secas, em geral, separa-se do tegumento como uma delgada membrana verde e, junto com a epiderme, envolve completamente o embrião e os restos do nucelo e do endosperma (ESAU, 1976).

abortamento, nos frutos causa deformação, formação de bolhas nas folhas e sementes defeituosas (PERING et al., 1992; LISA & LECOQ, 1984).

O VMAA é considerado o vírus mais destrutivo das cucurbitáceas, ocorrendo tanto nos trópicos como nas regiões temperadas (LESEMANN et al., 1983; NAMETH, 1985; DAVIS, 1986; McLEOD et al., 1986; PROVVIDENTI, 1986; LECOQ & LEMAIRE, 1991). O círculo de hospedeiras abrange 11 famílias botânicas dentre elas: Solanáceas, Cucurbitáceas, Compositae e Amaranthaceae (LECOQ et al., 1981; LISA & LECOQ, 1984). Tem como hospedeira diferencial a espécie *Ramunculus sardous* que é infectada somente pelo VMAA não sendo afetada pelo VMM-Me e VMMe-2 (LISA & LECOQ, 1984). No Brasil o VMAA foi descrito pela primeira vez no ano de 1992 (VEGA et al., 1992; CANER et al., 1992) em cucurbitáceas severamente afetadas por um mosaico amarelo. Em *Cucurbita moschata* na cv. Menina brasileira, tolerante ao VMM-Me, o vírus VMAA pode causar a depreciação dos frutos para o mercado, pela formação de bolhas e mosaicos nos frutos (Dados ainda não publicados, obtidos durante os trabalhos práticos desta dissertação). Em *C. pepo* cv. Caserta causa sintoma inicial de murcha e necrose das margens das folhas jovens e mosaico amarelo entre as nervuras ou "vein-banding" (VEGA et al., 1995).

3.3. INTERAÇÕES ENTRE VÍRUS

3.3.1. Aspecto geral

Doenças virais em plantas causadas por infecções mistas por 2 ou mais vírus, têm sido descritas desde 1923 (DICKSON, 1925). Nas infecções mistas de vírus, podem ocorrer fenômenos de: sinergismo, quando o efeito resultante da interação é maior do que a adição dos efeitos isolados de cada vírus (LIMA et al., 1989; ALMEIDA & LISTER, 1990; 1991; COLARICCIO, et al., 1991) ou antagonismo, quando ocorre uma diminuição na intensidade dos sintomas que seriam causados pela somatória dos mesmos (FULTON, 1975). As interações que geram antagonismo são de grande importância podendo ser usadas no controle de algumas viroses, são também denominadas de premunização quando são usadas estirpes de um mesmo vírus.

Experimentos realizados, a nível celular, mostraram que vírus não relacionados podem coexistir dentro de uma mesma célula, sem que obrigatoriamente a interação seja de antagonismo (MCWORTER & PRICE, 1949; HONDA et al., 1968; LEE & ROSS, 1972).

Foram identificados sinergismos em: soja, onde o “Soybean Mosaic Virus” (SMV) em associação com o “Bean Pod Mottle Virus” (BPMV) provocam sintoma de topo necrótico, sintoma este inexistente em infecções simples (LEE & ROSS, 1972); em caupi verificou-se sintoma de nanismo severo, típico da infecção mista pelos vírus “Cucumber Mosaic Virus” (CMV) e “Blackeye Cowpea Mosaic Virus” (BICMV) (PIO-RIBEIRO et al., 1978). Em casa-de-vegetação o CMV causou uma redução de 14,2% na produção enquanto o BICMV reduziu 2,5%, porém na interação a redução foi de 86,4%. Neste caso, o sinergismo é grave pois ambos os vírus são transmitidos por semente e via vetor, pelas mesmas espécies de afideos (WYATT et al., 1976; PIO-RIBEIRO et al., 1978). E num cv. de fumo, que apresentava suscetibilidade aos vírus “Tobacco Mosaic Virus” (TMV) e “Potato Virus Y”(PVY) foi detectado sinergismo na infecção mista onde o TMV reduzia o peso das plantas em 14% e o PVY em 21%, já na interação houve redução de até 75%. Em dois outros cvs. de fumo (*Nicotiana tabacco*), que possuíam resistência tipo hipersensibilidade, houve apenas efeito aditivo (SIEVERT, 1973). Em tomate, cv. Sta Cruz, foi observada reação sinérgica entre os vírus TMV e “Tomato White Necrosis Virus” (TWNV) na inoculação simultânea dos vírus e com o mesmo hospedeiro, ocorreu um antagonismo ou efeito protetor quando foi inoculado o TWNV seguido pelo “Tomato Spot Wilt Virus” -TSWV(Vírus do vira-cabeça do tomateiro) (COLARICCIO et al.,1991).

3.3.2. Interações entre os vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA

Os relatos da ocorrência de infecções mistas entre os vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA são muitos: na Califórnia (EUA) a infecção combinada destes vírus em melão resulta em sintomas de clorose severa, nanismo, abortamento de flores, frutos deformados e rachados (NAMETH et al., 1985); em New Jersey (EUA) os vírus CMV (Cucumber Mosaic Virus), VMMe-2 e VMM-Me foram mais frequentemente encontrados em infecções mistas com o VMAA do que entre eles ou sozinhos. Das amostras de cucurbitáceas coletadas 97% continham vírus, sendo que destas,

87% estavam infectadas com o VMAA (DAVIS & MIZUKI, 1986; WEBB, 1971). Nos Estados da Califórnia e Arizona em 215 campos de melão foram encontrados 87% dos campos infectados por VMMe-2 ou VMAA e 75% pela combinação desses dois vírus, enquanto o CMV e o VMM-Me raramente foram encontrados (PERRING, et al., 1992). No Brasil há relatos de infecções mistas em cucurbitáceas pelos vírus VMM-Me e Squash Mosaic Virus (SqMV) causando efeito de sinergismo (ÁVILA et al., 1977; LIMA et al., 1980; ZAMBOLIM et al., 1989); e pelos vírus VMMe-2 e SqMV nas quais foram constatados agregados cristalinos constituídos de partículas alongadas e isométricas, interpretadas como sendo respectivamente dos vírus VMMe-2 e SqMV. Tais agregados são sinais da infecção mista por esses dois vírus (KITAJIMA, 1986).

As causas dos fenômenos de antagonismo e/ou sinergismos não estão esclarecidos, devido aos poucos estudos realizados a esse respeito, porém LECOQ & PITRAT (1985) estudando o efeito das infecções mistas dos potyvírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA, na razão de transmissão por vetores (afideos), notaram a importância dos componente "helper" (HC) de cada vírus na transmissão em infecções mistas, sendo os HC necessários na transmissão dos vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA por afideos. Pouco se conhece sobre a natureza e o relacionamento dos HC em infecções mistas, mas há uma teoria de que a competição (antagonismo) e/ ou o sinergismo, ao nível de transmissão pelos vetores, deva-se a presença ou não de HC compatíveis (LECOQ & PITRAT, 1985).

3.4. CONTROLE

Como medidas de controle destas viroses causadoras de mosaico em cucurbitáceas, podem ser empregados vários métodos, incluindo o controle químico dos vetores, métodos culturais, uso da premunização e a resistência genética.

****HC:** Proteína que é codificada pelo genoma viral e que está envolvida na transmissão do vírus pelo vetor.

3.4.1. Método químico

Os métodos químicos como a utilização de inseticidas carbamatos e organofosforados têm-se mostrado ineficientes no controle dos vetores desses fitovírus (BROADBENT, 1957; ÁVILA, 1982 ; RACCAH, 1986; YUKI, 1990). Os inseticidas não são suficientemente rápidos para matar os vetores (afídeos) antes da inoculação dos vírus. Tal fato deve-se a excitação provocada pelos inseticidas nos vetores durante as picadas de prova (YUKI, 1990).

3.4.2. Método Cultural

O controle através dos tratamentos culturais tem sido bastante pesquisado e tem mostrado uma significativa redução dos mosaicos em abobrinhas. O uso de casca de arroz, aplicada em faixas nas linhas de plantio, funciona como superfície reflexiva, não atraindo os vetores alados, além disso esta técnica proporciona ainda um aumento da produção pelo efeito benéfico da cobertura morta (COSTA & COSTA, 1971; YUKI, 1990). Experimentos semelhantes com outras substâncias reflectivas como as purpurinas e a água de cal pulverizadas nas folhas, ao contrário da casca de arroz não surtem nenhum efeito na redução da incidência dos vírus (YUKI, 1990).

3.4.3. Premunização

Descoberta em 1929 por Mckinney, vem sendo usada para vírus cuja distribuição é generalizada e nas culturas onde esta prática é economicamente viável. Por definição, o sucesso da defesa contra o vírus desafiante (estirpe severa), deve resultar em limitações de alguns aspectos do ciclo infectivo, provocados pelo vírus indutor (estirpe fraca) (HAMILTON, 1980). Estas limitações podem ser: decréscimo no nº de lesões, no tamanho das lesões e na concentração dos vírus desafiante e também atenuação dos sintomas. A premunização pode gerar uma imunidade ao vírus desafiante pela sua não-replicação ou uma interferência quando vírus desafiante tem sua concentração diminuída (HAMILTON, 1980). Na literatura existem pelo menos 6 hipóteses para os mecanismos de defesa envolvidos na premunização:

. O vírus indutor ocuparia os sítios das células necessários à replicação do vírus desafiante - teoria da exaustão (MATTHEWS, in Shalla & Petersen, 1978).

O RNA do desafiante seria sequestrado e encapsidado pela capa protéica do indutor não podendo mais se replicar (DE ZOETEN & FULTON, 1975). Este fenômeno ficou conhecido como "mascaramento genotípico" (DODDS & HAMILTON, 1976).

O RNA desafiante seria sequestrado pela replicase do RNA indutor, onde a replicase do indutor mobilizaria o RNA do desafiante, que não conseguiria realizar a replicação. Tal fenômeno ocorreria somente entre vírus serologicamente próximos (GIBBS, 1969).

O vírus indutor codificaria inibidores específicos contra a replicação do RNA do desafiante, essa hipótese sustenta a idéia que 1 gene do indutor (RNA) produza repressores para a replicação e/ou transcrição do RNA do desafiante (MOHIER et al, 1975; MAYO, et al., 1976).

Metabólitos de Stress produzidos pela planta em resposta à infecção pelo vírus indutor, seriam fatores de limitação na replicação do vírus desafiante (ROSS, 1974).

A produção de inibidores pelas plantas infectadas pelo vírus indutor, causariam uma diminuição na concentração das partículas virais do vírus desafiante, tais inibidores são denominados FATORES ANTIVIRAIS (AVFs) (LOEBENSTEIN, 1972).

WANG et al. (1991) estudaram a eficiência do uso da premunização por estirpes fracas de VMAA da França, em pepino, melão e abóbora contra as estirpes severas de Connecticut, Flórida, França e Taiwan. A proteção foi mais eficiente contra a estirpe severa da França promovendo um aumento do número de frutos comerciais de 2,2 a 40 vezes superior ao das plantas não protegidas com a estirpe fraca. Em estudos de proteção de *C. pepo* ao vírus VMAA observou-se proteção significativa quando a estirpe fraca foi inoculada 16 a 22 dias antes da severa, porém foi observada quebra dessa proteção em estágios avançados no campo, onde uma explicação seria a transmissão por semente das estirpes severas de VMAA (WALKEY, 1992).

Resultados preliminares mostraram uma certa proteção no controle do PRSV-P (Papaya ringspot virus - estirpe papaya) em mamoeiros (REZENDE et al., 1982, 1987; WANG et al., 1987; YEH ET AL., 1988; GONSALVES & GARNSEY, 1989). No Brasil, estudos de proteção com estirpes fracas para o controle do VMM-Me em cucurbitáceas estão sendo realizados e indicam uma alternativa viável para o controle desta virose (REZENDE et al., 1994).

3.4.4. Resistência genética

A resistência genética é o método mais eficiente no controle de viroses. O desenvolvimento de cultivares resistentes exige boas fontes de resistência aos vírus e também vírus que sejam estáveis, ou seja que tenham baixa frequência de mutação. Quanto mais estáveis os vírus maior será o sucesso do uso da resistência genética. A resistência genética pode ser: resistência aos vetores ou resistência à infecção viral por meio de mecanismos como: diminuir a replicação e a distribuição dos vírus na planta.

O caráter "Folha Prateada" em abóboras é um método auxiliar no controle dos vírus transmitidos por afídeos pois diminui a visitação dos vetores, devido a reflexão da luz pela superfície prateada da folha. Esse fenótipo é devido a uma modificação do gene M (SHIFRIS, 1981; 1982).

A resistência genética das plantas aos vírus pode ser considerada como IMUNIDADE quando não há replicação do vírus e TOLERÂNCIA quando apesar de não haver danos e sintomas macroscópicos, os vírus replicam-se nas células do hospedeiro. O quadro 01 resume resultados de pesquisas sobre fontes de resistência aos potyvírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA e ao tipo de herança determinada em *Cucurbita* sp.

As fontes de resistência de *Cucurbita* aos vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA possuem herança qualitativa e específica a estirpes, com exceção da espécie *C. ecuadorensis* que mostrou possuir uma resistência do tipo Tolerância (HERRINGTON et al., 1988a), de herança quantitativa aos 3 vírus (HERRINGTON et al., 1989). O mecanismo de tolerância da espécie *C. ecuadorensis* pode ser explicado pela presença de inibidores da infecção viral, presentes no extrato desta espécie. HERRINGTON(1988a) conseguiu infectar *C. pepo* e *Cucumis sativus*, após diluir o suco de *C. ecuadorensis* previamente inoculada com VMM-Me, na proporção de 1:10 (g/ml) em tampão fosfato, pH 7,4 provando que a espécie *C. ecuadorensis* é tolerante ao vírus e não imune. A técnica de cultura de embriões permite obter híbridos de *C. ecuadorensis* X *C. máxima* e entre *C. ecuadorensis* X *C. moschata*, para posteriormente populações segregantes para resistência ao VMM-Me. Devido ao fato dos genes terem herança quantitativa e efeito aditivo, foi verificado que o alto nível de resistência original de *C. ecuadorensis* não foi recuperado nas

gerações posteriores (HERRINGTON, et al., 1988b; HERRINGTON et al., 1988c; HERRINGTON et al., 1989).

Cruzamentos interespecíficos visando a transferência de genes de resistência geralmente apresentam barreiras cromossômicas, podendo resultar em sementes híbridas defeituosas como: má formação do endosperma, paternocárpicas ou com embriões fracos. O uso de culturas de embriões para a germinação destas sementes uma alternativa para obtenção de plantas híbridas e populações segregantes. Tal procedimento obteve sucesso para as espécies *C. máxima* X *C. moschata* (ROBINSON et al., 1978), *C. ecuadorensis* X *C. pepo* (VAULX & PITRAT, 1980) e *C. pepo* X *C. moschata* (NAGAI, 1973). Técnicas de diversidade gamética e cultura de embriões auxiliam a superar as incompatibilidades interespecíficas no gênero *Cucurbita* sendo, ferramentas importantes em programas de melhoramento visando a resistência à viroses (GARDINGO, 1986).

Figura 01: Fontes de resistência ao VMM-Me, VMMe-2 e ao VMAA em algumas espécies do gênero *Cucurbita*.

ESPÉCIE	CULTIVAR/ IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM	RESISTÊNCIA AO VÍRUS:	TIPO DE HERANÇA	FONTE
<i>Cucurbita. ecuadorensis</i>	-----	Equador	VMM-Me VMMe-2 VMAA	Poligênica, e aditiva.	Provvidenti et al., 1978. Lecoq et al, 1981. Herrington et al, 1989.
<i>Cucurbita ficifolia</i>	-----	Equador Portugal	VMM-Me VMMe-2 VMAA	----- Monogênica e dominante	Provvidenti et al., 1978 Paris et al., 1988
<i>Cucurbita foetidissima</i>	-----	-----	VMM-Me VMMe-2	-----	Provvidenti et al., 1978
<i>Cucurbita pedatifolia</i>	-----	-----	VMMe-2	-----	Provvidenti et al., 1978
<i>Cucurbita graciolor</i>	-----	-----	VMMe-2	-----	Provvidenti et al., 1978
<i>Cucurbita maxima</i>	----- ----- BGH-947 e BGH- 4140 CMAX -001	Uruguai China ----- ----- -----	VMM-Me VMMe-2 VMM-Me VMM-Me	----- ----- Monegênicas e dominantes Monegênica e dominante	Provvidenti , 1982 Garcia de Salcedo, 1984 4 Maluf & Sousa, 1984
<i>Cucurbita moschata</i>	-----	Nigeria	VMM-Me VMMe-2 VMAA	-----	Provvidenti et al., 1978
<i>Cucurbita moschata</i>	cv. Piramoita	Brasil	VMM-Me	-----	Kuabara & Costa, 1987
<i>Cucurbita moschata</i>	cvs. Menina , Bolina	Portugal	VMAA	Monogênica e dominante	Paris et al., 1988

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTIVARES

Cucurbita pepo cv. Caserta

Cucurbita moschata cv. Piramoita

4.2. ISOLADOS

. isolado de VMMe-2 coletado em Petrolina (cedido pela Agroflore).

. isolado de VMM-Me coletado em Campinas

. isolado de VMAA coletado em Santa Catarina (cedido pelo Inst. Biológico de São Paulo).

4.3. MÉTODO DE INOCULAÇÃO

As inoculações foram feitas mecanicamente onde foi mantida a proporção de 1 parte de folhas com vírus para 5 partes de solução de sulfito de sódio 0,5% (1:5 g/ml). Após pesagem das folhas, adiciona-se 5 vezes o peso em volume de antioxidante. Após maceração em almofariz o extrato obtido foi inoculado sobre as folhas cotiledonares por fricção do dedo indicador envolto em gaze, para provocar ferimentos, em plantas com 8 - 10 dias após emergência. Para as inoculações simultâneas dos dois vírus, misturam-se volumes iguais dos inóculos e procedeu-se a inoculação mecânica da forma já descrita

4.4. MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

A multiplicação dos três isolados foi feita em *Cucurbita pepo* e os vírus foram mantidos em diferentes casas-de-vegetação, para evitar mistura de isolados.

As inoculações foram realizadas em plantas com 10 DAE (dias após emergência) nas folhas cotiledonares e o inóculo foi preparado na concentração 1:5, ou seja, uma parte de folha com vírus para cinco partes de solução de Sulfito de sódio 0,5%.

4.5. ANTISSOROS

O Instituto Biológico de São Paulo dispõem dos antissoros para estes três vírus e doaram as quantidades necessárias para realização dos testes de ELISA.

4.6. EXPERIMENTOS:

Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, nos meses de outubro a dezembro dos anos de 1992 e 1993. Foram feitos experimentos com 10 tratamentos tendo 6 vasos por tratamento. Em cada vaso foram conduzidas 2 plantas perfazendo um total de 12 repetições. Para melhor acompanhamento dos experimentos, estes foram realizados por etapas, 1º foram realizadas as interações de VMM-Me com VMAA e com VMMe-2 em *Cucurbita pepo* (cv. Caserta), depois estas interações foram em *C. moschata* (cv. Piramoita), formando um total de quatro experimentos.

4.6.1) Experimento I (Interação entre VMAA e VMM-Me em *C. pepo*)

Tratamentos:

- T1- Inoculação com VMM-Me
- T2- Inoculação com VMAA
- T3- Inoculação com VMM-Me e VMAA simultaneamente
- T4- Inoculação com VMM-Me e após 24 hs VMAA
- T5- Inoculação com VMM-Me e após 48 hs VMAA
- T6- Inoculação com VMM-Me e após 72 hs VMAA
- T7- Inoculação com VMAA e após 24 hs VMM-Me
- T8- Inoculação com VMAA e após 48 hs VMM-Me
- T9- Inoculação com VMAA e após 72 hs VMM-Me
- T10- Testemunha (plantas sadias)

4.6.2) Experimento II (Interação entre VMM-Me e VMMe-2 em *C. pepo*)

Tratamentos:

- T1 Inoculação com VMM-Me
- T2- Inoculação com VMMe-2
- T3-Inoculação com VMM-Me e VMMe-2 simultaneamente
- T4- Inoculação com VMM-Me e após 24 hs VMMe-2
- T5- Inoculação com VMM-Me e após 48 hs VMMe-2
- T6- Inoculação com VMM-Me e após 72 hs VMMe-2
- T7- Inoculação com VMMe-2 e após 24 hs VMM-Me
- T8- Inoculação com VMMe-2 e após 48 hs VMM-Me
- T9- Inoculação com VMMe-2 e após 72 hs VMM-Me
- T10- Testemunha (plantas saudáveis)

4.6.3) Experimento III (Interação entre VMAA e VMM-Me em *C. moschata*)

Tratamentos:

- T1- Inoculação com VMM-Me
- T2- Inoculação com VMAA
- T3-Inoculação com VMM-Me e VMAA simultaneamente
- T4- Inoculação com VMM-Me e após 24 hs VMAA
- T5- Inoculação com VMM-Me e após 48 hs VMAA
- T6- Inoculação com VMM-Me e após 72 hs VMAA
- T7- Inoculação com VMAA e após 24 hs VMM-Me
- T8- Inoculação com VMAA e após 48 hs VMM-Me
- T9- Inoculação com VMAA e após 72 hs VMM-Me
- T10- Testemunha (plantas saudáveis)

4.6.4) Experimento IV (Interação entre VMM-Me e VMMe-2 em *C. moschata*)

Tratamentos:

- T1 Inoculação com VMM-Me
- T2- Inoculação com VMMe-2
- T3-Inoculação com VMM-Me e VMMe-2 simultaneamente
- T4- Inoculação com VMM-Me e após 24 hs VMMe-2
- T5- Inoculação com VMM-Me e após 48 hs VMMe-2
- T6- Inoculação com VMM-Me e após 72 hs VMMe-2
- T7- Inoculação com VMMe-2 e após 24 hs VMM-Me
- T8- Inoculação com VMMe-2 e após 48 hs VMM-Me
- T9- Inoculação com VMMe-2 e após 72 hs VMM-Me
- T10- Testemunha (plantas sadias)

4.7. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

4.7.1) Sintomas

Os sintomas foram observados semanalmente nas cinco primeiras folhas de *C. pepo* e *C. moschata* e registrados através de anotações e fotografias até aos 15 dias após a inoculação (DAI).

4.7.2) Presença e concentração dos vírus

4.7.2.1. Teste de ELISA- indireto

Com o objetivo de avaliar a presença e a concentração dos vírus nas plantas inoculadas, foram realizados testes de ELISA-indireto com as cinco primeiras verdadeiras das plantas de cada tratamento.

O procedimento de ELISA-indireto (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) baseou-se no descrito por LOMMEL et al. (1982), foram usados discos de folhas das plantas de cada

tratamento diluído em tampão fosfato na proporção 1:50, contra os anti-soros para VMM-Me, VMMe-2 e VMAA, diluídos em tampão-fosfato na proporção 1:1000. A intensidade da reação imunoenzimática foi determinada pela leitura da absorbância, em um comprimento de onda de 405 nm em leitor de ELISA modelo "UNISKAN" da TITERTEK.

A concentração relativa de vírus nos diferentes tratamentos foi estimada com base nos valores médios de absorbância.

4.7.2.2. Microscopia eletrônica

Decoração é uma técnica de imunomicroscopia eletrônica, na qual podem ser observadas partículas virais em reação com anticorpos específicos (MILNE, 1984). Neste caso, telinhas de cobre revestidas com filme de colódio reforçado com carvão, foram inicialmente colocadas sobre uma gota do extrato foliar infectado, obtido em presença de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (na proporção 1:5 g/ml) onde permaneceram por 5 minutos. A seguir foram lavadas no mesmo tampão e colocadas sobre uma gota do antissoro específico para os tratamentos estudados (T1, T2, T3 e T10 dos experimentos III e IV). O antissoro foi diluído na proporção 1:50. Após 15 minutos as telinhas foram lavadas com 5 gotas de água destilada e a seguir as preparações foram contrastadas em acetato de uranila 1%, antes de serem observadas ao microscópio eletrônico EM-300 (Philips).

Esta técnica foi usada para observar a presença das partículas virais na cv. Piramoita nos tratamentos T1, T2 e T3, que constituem-se das infecções isolada e simultâneas dos vírus.

4.7.3) Área foliar:

A área das folhas foi avaliada pela equação $Y = 0,7914 + 0,6486 X$, desenvolvida por SANTOS (1990) sendo este um método indireto para obtenção da área foliar, onde Y = área foliar, foi obtido pela medida da maior largura (L) e do maior comprimento diagonal (C) das folhas de abobrinha, como ilustra a figura 02, e o componente X da equação foi obtido pelo produto dessas duas medidas.

Figura 02. Croqui das medidas tomadas das folhas para obtenção da área foliar pelo método indireto (SANTOS, 1990).

4.7.4) Pesos fresco (PF) e seco (PS) da parte aérea.

Aos 30 DAE, procedeu-se o corte das plantas rente ao solo, a parte aérea foi cuidadosamente acondicionada em placas de Petri previamente taradas. Pesaram-se as placas contendo o material e obteve-se o PF da parte aérea das plantas. Em estufas pré-aquecidas, foram colocadas as placas contendo a parte aérea e mantidas por 12 horas a 100 °C. Em seguida pesaram-se novamente as placas e obteve-se o PS da parte aérea das plantas. Foram feitas quatro repetições para cada tratamento.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos constituíram-se em delineamentos experimentais inteiramente casualizados. As análises estatísticas necessária para interpretação dos dados obtidos nos testes de ELISA, de peso fresco e seco, quantificação de clorofila e área foliar foram baseadas no teste " F " de significância e no teste de Tukey de comparação entre médias, com auxílio do programa de computação SAS-Estatística.

5. RESULTADOS

5.1. SINTOMATOLOGIA

Os sintomas causados pelos VMM-Me, VMMe-2 e VMAA nas infecções simples e mistas foram observados desde o início de seu aparecimento até o 15º DAI, época da realização das demais avaliações. Os sintomas foram descritos qualitativamente utilizando-se as siglas da figura 03. Os sintomas de mosaico amarelo (MA) e "vein-banding"(VB), estão ilustrados na figura 04.

Figura 03. Abreviações usadas para os sintomas observados nos experimentos.

ABREVIACÕES	SINTOMAS
ABF	Amarelecimento basal da folha
B	Bolhosidade
CN	Clareamento de nervuras
DF	Deformação foliar
EF	Enrolamento foliar
Fr	Fraco
M	Mosaico
MA	Mosaico Amarelo
Mo	Mosqueado
PC	Pontos cloróticos
S	Severo
VB	“Vein banding”

Fig. 04. A) Sintoma de mosaico amarelo (MA) em folha de *C. moschata* cv. Piramoita aos 15 DAI. B) Sintoma de “Vein-banding” (VB) em folha de *C. pepo* cv. Caserta aos 15 DAI.

5.1.1. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na cv. Caserta - Experimento I.

A tabela 01 apresenta os tipos de sintomas observados 15 DAI de acordo com as abreviações da Figura 03.

A infecção simples por VMM-Me (T1), apresentou sintomas mais fracos onde, na avaliação final das plantas 15 DAI, o porte destas foi igual ao da testemunha, não ocorrendo nanismo. Não ocorreu também sintoma de "Vein banding" (VB), comum aos demais tratamentos. A primeira folha verdadeira apresentou sintoma de clareamento de nervuras (CN) somente 15 DAI, enquanto nos demais tratamentos esse sintoma ocorreu a partir do 8º DAI.

A infecção simples por VMAA (T2), assim como a infecção simultânea (T3) e as interações onde VMAA precedeu VMM-Me (T7, T8 e T9) mostraram sintomas mais severos e semelhantes entre si, sendo característicos os sintomas de VB e Nanismo.

Nas infecções mistas em que o VMM-Me precedeu o VMAA (T4, T5 e T6), os sintomas foram semelhantes entre as plantas desses tratamentos, tendo como sintoma comum o mosaico amarelo (MA) característico. Neste caso o intervalo de tempo entre as inoculações do VMM-Me seguido pelo VMAA não alterou os sintomas exibidos pelas plantas.

Porém, com relação a sintomatologia na cv. Caserta verificou-se que, na interação VMM-Me e VMAA a ordem das inoculações foi visualmente significativa na sintomatologia, enquanto o intervalo de tempo entre as inoculações não causou variação nos sintomas observados nestes tratamentos que fossem dignos de nota.

Tabela 01 : Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMAA, nas primeiras cinco folhas verdadeiras da cv. Caserta.

Tipos de sintomas ***					
Tratamentos*	folha 01	folha 02	folha 03	folha 04	folha 05
01	CN	CN,PC	CNS	MFr	MFr
02 **	EF, ABF	M	M	DF, M, VB, B	VB, B
03 **	EF, ABF	M	M	DF, M, VB, B	VB, B
04	ABF	MA	MA, PC	MAS	MA
05	ABF	MA	MA, PC	MAS	MA
06	ABF	MA	MA, PC	MAS	MA
07 **	EF, ABF	M	M	DF, M, VB, B	VB
08 **	EF, ABF	M	MS, B	MS, VB, B	DF, ABF
09 **	EF, ABF	M	MS, B	MS, VB, B	VB
10	----	----	----	----	----

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMAA seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

** Tratamentos que apresentaram plantas com nanismo

*** Os significados das abreviações estão apresentados na figura 03

5.1.2. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na cv. Caserta - Experimento II.

A Tabela 02 apresenta os tipos de sintomas observados 15 DAI de acordo com as abreviações da Figura 03.

Comparando-se a interação VMM-Me X VMMe-2 (experimento II) com a interação VMM-Me X VMAA (experimento I) verificou-se pelos sintomas que o VMAA foi o vírus mais severo na cv. Caserta. Todos os tratamentos apresentaram plantas com sintomas de pontos cloróticos (PC) e/ou clareamento de nervuras (CN) na primeira folha verdadeira 10 DAI, exceto no tratamento VMMe-2 (T2) no qual verificou-se um atraso de 3 dias no aparecimento dos sintomas em relação aos demais tratamentos.

As infecções mistas referentes aos tratamentos T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9, praticamente apresentaram a mesma sintomatologia, portanto a ordem e o intervalo de tempo entre as inoculações não interferiram na manifestação dos sintomas na cv. Caserta na interação dos vírus VMM-Me e VMMe-2..

Nos experimentos realizados com a cv. Caserta foi observado que o sintoma de bolhas nas folhas (B) foi constante nos tratamentos com o vírus VMMe-2. É interessante notar, que a interação do VMM-Me com o VMMe-2 na cv. Caserta não provocou sintomas sistêmicos de nanismo, vein-banding e mosaico amarelo em nenhum dos tratamentos, sugerindo um efeito antagônico entre esses vírus.

Tabela 02: Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMMe-2, nas primeiras cinco folhas verdadeiras da cv. Caserta.

Tipos de sintomas **					
Tratamentos*	folha 01	folha 02	folha 03	folha 04	folha 05
01	CN	CN	M, B	M, B	M
02	PCFr	CN	M, B	DF, M, B	M
03	CN	CN	DF, MS	M, B	M
04	CN, PC	CN, B	M, B	M, B	M, B
05	CN, PC	CN, DF	M, B	M, B	M, B
06	CN, PC	CN, DF	M, B	M, B	M, B
07	CN, PC	CN, DF	M, B	M, B	M, B
08	CN, PC	CN, DF	M, B	M, B	M
09	CN, PC	CN, DF	M, B	M, B	M
10	----	----	----	----	----

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMMe-2 seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

** Os significados das abreviações estão apresentados na figura 03

5.1.3. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na cv. Piramoita - Experimento III.

A tabela 03 apresenta os tipos de sintomas observados 15 DAI de acordo com as abreviações descritas na Figura 03.

Na infecção simples pelo VMM-Me (T1) as plantas não apresentaram sintomas até o 15º DAI, confirmando a tolerância da cv. Piramoita a este vírus. Nos tratamentos onde o VMM-Me precedeu o VMAA, referentes aos tratamentos 4, 5 e 6, observou-se um atraso na manifestação inicial dos sintomas, visíveis apenas no 14º DAI, enquanto nos demais tratamentos já eram visíveis no 10º DAI e caracterizavam-se por clareamento de nervuras severo (CNS).

Todos os tratamentos nos quais foram inoculado o VMAA (T2, T3, T7, T8 e T9) apresentaram sintoma sistêmico de nanismo em relação à testemunha (T10). Não foi encontrado sintoma de VB nos tratamentos em que o VMM-Me foi inoculado primeiro, os quais são: T4, T5 e T6 e na infecção simples pelo VMM-Me no T1.

A tolerância da cv. Piramoita, refletiu-se na ausência de sintomas em todas as primeiras folhas verdadeiras tanto na infecção simples por VMAA (T2) quanto nas infecções mistas pelo VMM-Me e VMAA.

Comparando-se a interação do VMM-Me com o VMAA na cv. Caserta (EXP I) e na cv. Piramoita (EXP III), verificou-se que o genótipo foi determinante na variação dos sintomas provocados nesta interação.

Tabela 03: Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMAA, nas primeiras cinco folhas verdadeiras da cv. Piramoita.

Tipos de sintomas ***					
Tratamentos*	folha 01	folha 02	folha 03	folha 04	folha 05
01	----	----	----	----	----
02 **	----	MAS	MAS	MAS	VB
03 **	----	PC	MA	MA	M
04	----	PCFr	MA	MA	----
05	----	----	MA	MA	M
06	----	----	PC	PC, M	M
07 **	----	MAS	M	M	M
08 **	----	MA	VB	VB	VB
09 **	----	MAS	MAS	VB	VB
10	----	----	----	----	----

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMAA seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

** Tratamentos que apresentaram plantas com nanismo

*** Os significados das abreviações estão apresentados na figura 03

5.1.4. Sintomas observados nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na cv. Piramoita -Experimento IV.

A Tabela 04 apresenta os tipos de sintomas observados 15 DAI, de acordo com as abreviações descritas na Figura 03.

Na infecção simples pelo VMM-Me (T1) até o 15º DAI as plantas não apresentaram nenhum sintoma, confirmando os dados obtidos no Experimento III.

O VMMe-2 ao contrário do VMAA, não provocou sintomas de nanismo na cv. Piramoita, mostrando-se menos severo quanto a sintomatologia nos dois cultivares estudados. O sintoma de bolhas nas folhas só foi observado na infecção simples pelo VMMe-2 (T2), ficando ausente das infecções mistas, nesta cultivar.

Foi observada a ausência de sintomas nas 1^{as} e 2^{as} folhas verdadeiras das plantas inoculadas pelo VMMe-2 (T2), na infecção simultânea (T3), nas interações nas quais o VMM-Me precedeu o VMMe-2 com intervalos de 48 e 72 h. (T5 e T6, respectivamente), e quando o VMMe-2 precede o VMM-Me com intervalo de 72 h.(T9). Na infecção simples pelo VMM-Me (T1) e nas infecções mistas, nas quais, o VMM-Me precedeu o VMMe-2 (T4,T5 e T6), não foi observado o sintoma de deformação foliar (DF). Nos demais tratamentos todas as 5^{as} folhas verdadeiras apresentaram DF.

Tabela 04: Sintomas observados 15 dias após as inoculações simples e mistas, com o VMM-Me e o VMMe-2, nas primeiras cinco folhas verdadeiras da cv. Piramoita.

Tipos de sintomas **					
Trata- mentos*	folha 01	folha 02	folha 03	folha 04	folha 05
01	----	----	----	----	----
02	----	----	CN	MFr	DF, B
03	----	----	M	MFr	DF, M
04	----	CNFr	MFr	MFr	MFr
05	----	----	MFr	MFr	MFr
06	----	----	Mo	M	M
07	----	CNFr	Mo	M	DF, M
08	----	CN	MFr	DF, M	DF, M
09	----	----	CN	M	DF, M
10	----	----	----	----	----

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMMe-2 seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha sem inoculação.

** Os significados das abreviações estão apresentados na figura 03

5.2. TESTES SEROLÓGICOS

5.2.1. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMAA nas infecções simples e mistas na cv. Caserta - Experimento I.

O gráfico da figura 05 mostra a concentração estimada do VMM-Me e do VMAA, na cv. Caserta, avaliada através do teste de ELISA-indireto nas cinco primeiras folhas verdadeiras, nos tratamentos realizados.

Com relação à concentração do VMM-Me, observou-se maior concentração do vírus na infecção simples (T1), na infecção simultânea com os dois vírus (T3) e na interação na qual o VMM-Me precedeu o VMAA em 72 h. (T6). Neste experimento, todos os tratamentos inoculados com o VMM-Me apresentaram-se estatisticamente diferentes da testemunha.

Com relação à concentração do VMAA, observou-se uma baixa concentração do vírus nos tratamentos em que o VMM-Me precedeu o VMAA em 24 h.(T4) e o VMAA precedeu o VMM-Me em 72h. (T9). Nestes tratamentos, os valores da concentração de VMAA não diferiram estatisticamente da testemunha, sugerindo um efeito antagônico entre estes vírus nesta ordem e intervalo de tempo entre as inoculações. Em todos os tratamentos realizados, o VMAA sempre apresentou concentração menor ou igual ao VMM-Me nunca sendo superior a este último.

Figura 05: Valores médios de absorbância obtidos para o VMM-Me e o VMAA, através do teste de ELISA-indireto, nos tratamentos* da cv *Caserta*.

Tratamentos: 1. Inoculação simples pelo vírus VMM-Me; 2. Inoculação simples pelo VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 inoculações de VMM-Me seguida pelo VMAA com intervalo de 24,48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9 inoculações de VMAA seguida pelo VMM-Me com intervalo de 24,48 e 72 h. e 10. testemunha, sem inoculação

5.2.2. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMMe-2 nas infecções mistas e simples na cv. Caserta - Experimento II.

O gráfico da figura 06 mostra a concentração estimada do VMM-Me e do VMMe-2, na cv. Caserta, avaliada através do teste de ELISA-indireto nas cinco primeiras folhas verdadeiras, nos tratamentos realizados.

Com relação à concentração do VMM-Me na infecção simples e mistas com o VMMe-2, observou-se que no tratamento T1 e nos tratamentos T4, T5 e T6, nos quais o VMM-Me precedeu o VMMe-2 com intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h. as concentrações de VMM-Me foram mais elevadas, atingindo valores três vezes maiores do que no experimento I.

Na inoculação simultânea (T3), e no tratamento em que o VMMe-2 precedeu o VMM-Me em 72 h. (T9), observou-se diminuição na concentração do VMM-Me.

Com relação à concentração do VMMe-2, notou-se uma acentuada diminuição da concentração deste vírus no tratamento (T4), no qual o VMMe-2 foi inoculado 24 h. após o VMM-Me, sugerindo um efeito antagônico entre o VMM-Me e o VMMe-2 nesta ordem e intervalo de tempo entre as inoculações, uma vez que a concentração do VMMe-2 neste tratamento não diferiu da testemunha (T10). Pelos resultados obtidos verificou-se uma correspondência direta entre o aumento da concentração do VMM-Me e a diminuição da concentração do VMMe-2, nos tratamentos T4, T5 e T6. Enquanto, nos tratamentos T7, T8 e T9 verificou-se o inverso, isto é, um aumento da concentração de VMMe-2 em detrimento da concentração de VMM-Me. Estes resultados sugerem uma interação entre esses vírus do tipo antagônica, competição na replicação viral na cv. Caserta.

Fig 06 : Valores médios de absorvância obtidos para o VMM-Me e o VMMe-2, através do teste de ELISA-indireto, nos tratamentos* na cv. *Caserta*.

*Tratamentos: 1. Inoculação simples com os VMM-Me; 2. Inoculação simples pelo VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6 inoculações de VMM-Me seguida pelo VMMe-2 com intervalo de 24,48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9 inoculações de VMMe-2 seguida pelo VMM-Me com intervalo de 24,48 e 72 h. e 10. testemunha, sem inoculação.

5.2.3. Avaliação da concentração do VMM-Me e do VMAA nas infecções simples e mistas na cv. Piramoita - Experimento III.

O gráfico da figura 07 mostra a concentração estimada do VMM-Me e do VMAA, na cv. Piramoita, avaliada através do teste de ELISA-indireto nas cinco primeiras folhas verdadeiras, nos tratamentos realizados.

Com relação à concentração do VMM-Me foi observado que todos os tratamentos, nos quais o vírus foi inoculado, diferiram estatisticamente da testemunha. Os tratamentos com intervalos de 24 h. (T4 e T7) foram os que apresentaram menor concentração do VMM-Me.

Com relação à concentração do VMAA, o tratamento T7, no qual o VMAA precedeu o VMM-Me com intervalo de 24 h., não diferiu serologicamente da testemunha, podendo ser considerada uma replicação muito pequena ou ausente do VMAA. Tal fato sugere que a inoculação de VMM-Me 24 h. após a inoculação pelo VMAA, provoca acentuada diminuição da concentração do VMAA. Portanto ocorreu um efeito antagônico do VMM-Me sobre o VMAA. Os tratamentos 5 e 6 onde o VMM-Me precedeu o VMAA em 48 e 72h. e no tratamento 9, onde o VMAA precedeu o VMM-Me de 72 h. foram observados valores de concentração de VMAA maiores e estatisticamente mais significativos do que aqueles obtidos no tratamento T2, infecção simples pelo VMAA, sugerindo um sinergismo na multiplicação desse vírus nesta ordem e intervalo de tempo entre as inoculações.

Figura 07: Valores médios de absorvância obtidos para o VMM-Me e o VMAA, através do teste de ELISA-indireto, nos tratamentos* da cv. *Piramoita*.

*Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples pelo VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 inoculações de VMM-Me seguida pelo VMAA com intervalo de 24,48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9 inoculações de VMAA seguida pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h. e 10. testemunha, sem inoculação

5.2.4. Avaliação da concentrações do VMM-Me e do VMMe-2 nas infecções simples e mistas na cv. Piramoita - Experimento IV.

O gráfico da fig. 08 mostra a concentração estimada do VMM-Me e do VMMe-2, na cv. Piramoita, avaliada através do teste de ELISA-indireto nas cinco primeiras folhas verdadeiras, nos tratamentos realizados.

Com relação ao VMM-Me, a concentração foi estatisticamente significativa em todos os tratamentos, com exceção do tratamento no qual o VMMe-2 precedeu o VMM-Me em 48 h. (T8) que não diferiu da testemunha. Tal fato, sugere um efeito antagônico do VMMe-2 sobre o VMM-Me quando inoculados nesta ordem e intervalo de tempo entre as inoculações. Os tratamento 5 e 6 nos quais o VMM-Me precedeu o VMMe-2 em 48 e 72h. respectivamente, foram àqueles que apresentaram concentrações de VMM-Me estatisticamente superiores àquelas da infecção simples (T1), observando-se nestes tratamentos, um efeito sinérgico.

Com relação à concentração do VMMe-2, foi constatado em todos os tratamento nos quais foi inoculado, com exceção do tratamento no qual o VMM-Me precedeu o VMMe-2 em 72h. (T6), que não diferiu estatisticamente da testemunha. Tal fato, sugere um efeito antagônico do VMM-Me sobre o VMMe-2 na concentração viral nesta ordem e neste intervalo de tempo entre as inoculações. O tratamento no qual o VMMe-2 precedeu o VMM-Me de 48h. (T8) mostrou uma concentração de VMMe-2 estatisticamente maior em comparação à infecção simples pelo VMMe-2 (T2) e uma acentuada redução na concentração do VMM-Me.

Figura 08: Valores médios de absorvância obtidos para o VMM-Me e o VMMe-2, através do teste de ELISA-indireto, nos tratamentos* da cv. Piramoita.

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6. Inoculações de VMM-Me seguida pelo VMMe-2 com intervalo de 24, 48 e 72h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações de VMMe-2 seguida pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h.; 10. Testemunha, sem inoculação.

5.2.5. Microscopia Eletrônica

A técnica de decoração foi empregada a fim de constatar a presença das partículas virais de VMM-Me, VMAA e VMMe-2 nas infecções simples e simultâneas em plantas da cv. Piramoita, tolerante ao VMM-Me.

Com o uso de antissoro específico para cada um dos vírus, foi possível identificar as partículas dos vírus ao microscópio eletrônico, a presença de partículas decoradas, indicou a reação positiva entre o antissoro específico e a partícula viral. A ausência de partículas decoradas indicou a reação negativa.

Foram constatados ao microscópio eletrônico a presença dos vírus VMM-Me, VMMe-2 e VMAA nos tratamentos pertinentes, identificados pela decoração com os antissoros específicos, além da presença de novos arranjos das partículas virais, onde os vírus foram inoculados simultaneamente (VMM-Me X VMAA e VMM-Me X VMMe-2). Nestes dois tratamentos foram constatadas partículas totalmente decoradas, partículas não decoradas e partículas parcialmente decoradas (fig. 09). A constatação de partículas parcialmente decoradas indicam um rearranjo das partículas nas infecções mistas por estes vírus, tal fenômeno já foi anteriormente descrito para alguns potyvírus, recebendo o nome de HETEROENCAPSIDAÇÃO (NELSON & WHEELER, 1979; BOURDIN & LECOQ, 1991; VEGA et al., 1995).

Fig. 09. Fotomicrografias : A) Partícula viral parcialmente decorada pelo antissoro específico para o PRSV-W na infecção simultânea por PRSV-W e ZYMV (T3) na cv. Piramoita - Exp. III. B) Partícula viral parcialmente decorada pelo antissoro específico para o PRSV-W na infecção simultânea por PRSV-W e WMV-2 (T3) na cv. Piramoita - Exp. IV.

5.3. EFEITO DAS INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS DO VMM-Me COM O VMAA OU O VMMe-2 NA ÁREA FOLIAR E NO PESO FRESCO E SECO DAS CULTIVARES CASERTA E PIRAMOITA.

5.3.1. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na área foliar e no peso fresco e seco da parte aérea, da cv. Caserta (Exp. I).

A tabela 05, apresenta os dados obtidos para a área foliar média, das cinco primeiras folhas verdadeiras (cm^2), e os dados de peso fresco e seco médios (g), da parte aérea das plantas, analisados pelo teste de Tukey, de comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A área foliar foi o parâmetro usado que mais diferenciou os tratamentos, formando pelo teste de Tukey até 6 classes diferentes (a,b,c,d,e,f). A testemunha (T10) diferenciou-se estatisticamente dos demais tratamentos, sendo os tratamentos nos quais o VMM-Me foi inoculado sozinho (T1) ou quando precedeu o VMAA de 72 h.(T6) os que apresentaram a maior área foliar. Na infecção simples pelo VMAA (T2) e na inoculação simultânea (T3) observaram-se os menores valores de área foliar, não havendo diferença entre estes tratamentos.

No parâmetro peso fresco, o tratamento T2, infecção simples com o VMAA, e o tratamento T8, infecção mista na qual o VMAA precedeu o VMM-Me de 48 h., foram os únicos que se diferenciaram da testemunha. No peso seco foram estatisticamente diferentes da testemunha a infecção simples por VMAA (T2), a infecção simultânea (T3) e o tratamento no qual o VMAA precedeu o VMM-Me de 24 h. (T7); os demais tratamentos tiveram seus valores de peso seco semelhante ao da testemunha.

Com os dados apresentados na tabela 05, foram realizados cálculos percentuais da redução da área foliar e da redução do peso seco em relação à testemunha evidenciando os danos causados pelas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMAA na cv. Caserta que estão apresentados na figura 10.

Observa-se que a infecção simples pelo VMAA (T2) e a inoculação simultânea dos vírus (T3) apresentaram as maiores reduções de área foliar, sendo 67% e 70 % inferior a área foliar da

testemunha (T10), respectivamente. A infecção simples pelo VMAA (T2) foi o tratamento que mais reduziu o peso seco das plantas da cv. Caserta (59%), enquanto a média de redução de peso seco esteve na ordem de 35 %.

Tabela 05: Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea da cv. Caserta nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA.

Trata- mentos**	Média da área foliar (cm ²)	Média do PF (g)	Média do PS (g)
01	231,65 (b)*	12,24 (h,j)*	0,827 (m,n)*
02	107,67 (e,f)*	6,04 (j)*	0,387 (o)*
03	99,47 (f)	7,77 (h,i,j)	0,485 (n,o)
04	176,67 (c,d)	10,11 (h,i,j)	0,755 (m,n,o)
05	146,50 (c,d)	10,54 (h,i,j)	0,787 (m,n)
06	222,34 (b)	10,44 (h,i,j)	0,565 (m,n,o)
07	139,83 (d,e)	7,96 (h,i,j)	0,560 (n,o)
08	143,75 (c,d,e)	6,78 (i,j)	0,515 (m,n,o)
09	177,68 (c)	8,26 (h,i,j)	0,597 (m,n,o)
10	336,09 (a)	13,53 (h)	0,945 (m)

* Teste de Tukey de comparação entre médias de cada genótipo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMAA seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

Figura 10: Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Caserta, em relação a testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA nos tratamentos*.

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4, 5 e 6. Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações com o VMAA seguidas pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação.

5.3.2. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na área foliar e no peso fresco e seco da parte aérea da cv. Caserta (Exp II).

A tabela 06, apresenta os dados obtidos para a área foliar média, das cinco primeiras folhas verdadeiras (cm^2), e os dados de peso fresco e seco médios (g), da parte aérea das plantas, analisados pelo teste de Tukey, de comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Como no experimento I, a média da área das 5 primeiras folhas foi o parâmetro que melhor diferenciou os tratamentos, formando através da aplicação do teste de Tukey 3 classes distintas (a,b,c). A testemunha (T10) diferenciou-se dos demais tratamentos. A infecção simples pelo VMM-Me (T1) diferenciou-se estatisticamente da infecção mista na qual o VMM-Me precedeu o VMMe-2 de 48 h. (T5). Os demais tratamentos do experimento II, não se diferenciaram estatisticamente quanto a área foliar, e a sintomatologia, mostrando que a ordem e o intervalo de inoculações estudados não causaram diferenças, nesses parâmetros, entre as infecções mistas desta interação.

Quanto ao peso fresco, a testemunha diferenciou-se estatisticamente da infecção simultânea (T3) e da infecção mista na qual o VMMe-2 precedeu o VMM-Me em 24 h.(T7), nos demais tratamentos não foram detectadas diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao parâmetro peso seco (g) não foi notada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos.

Com os dados apresentados na tabela 06, foram realizados os cálculos percentuais da redução da área foliar e da redução do peso seco em relação à testemunha, evidenciando os danos causados pelas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMMe-2 na cv. Caserta que estão apresentados na figura 11.

Tabela 06: Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea da cv. Caserta nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2.

Trata- mentos**	Média da área foliar (cm ²)	Média do PF (g)	Média do PS (g)
01	181,80 (b)*	13,06 (d,e)*	1,055 (f)*
02	156,79 (b,c)	15,82 (d,e)	1,274 (f)
03	172,27 (b,c)	11,81 (e)	1,128 (f)
04	160,18 (b,c)	13,85 (d,e)	1,068 (f)
05	116,59 (c)	16,60 (d,e)	1,286 (f)
06	142,53 (b,c)	14,47 (d,e)	1,211 (f)
07	134,67 (b,c)	12,07 (e)	1,096 (f)
08	139,66 (b,c)	17,06 (d,e)	1,441 (f)
09	138,13 (b,c)	14,72 (d,e)	1,232 (f)
10	267,54 (a)	20,86 (d)	1,569 (f)

* Teste de Tukey de comparação entre médias de cada genótipo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMMe-2 seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

Figura 12: Redução média da área foliar(%) e do peso seco (PS) na cv. Caserta, em relação a testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 nos tratamentos*

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4, 5 e 6. Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações com o VMMe-2 seguidas pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação.

5.3.3. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA na área foliar e no peso fresco e seco da parte aérea da cv. Piramoita (Exp III).

A tabela 07, mostra os dados obtidos da área foliar média, das cinco primeiras folhas verdadeiras (cm^2), e os dados de peso fresco e seco médios (g), da parte aérea das plantas, analisados pelo teste de Tukey, de comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Neste experimento III, o parâmetro área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras foi o único que permitiu diferenciar estatisticamente os tratamentos, não havendo diferenças significativas no peso fresco e seco nestas interações entre os vírus VMM-Me e VMAA na cv. Piramoita.

Os tratamentos que se diferenciaram da testemunha quanto à área foliar foram: a infecção simples pelo VMAA (T2), a infecção mista quando VMM-Me precedeu o VMAA em 72 h. (T6) e a infecção mista na qual o VMAA precedeu o VMM-Me de 48 h. (T8). Os demais tratamentos foram semelhantes à testemunha sadia (T10).

A infecção mista na qual o VMM-Me precedeu o VMAA de 24 h. (T4) foi a única que se diferenciou significativamente da infecção simples pelo VMAA (T2), sugerindo a ocorrência de uma interação do tipo antagônica quanto ao parâmetro área foliar.

Com os dados apresentados na tabela 07, foram realizados os cálculos percentuais da redução da área foliar e da redução do peso seco em relação à testemunha, evidenciando os danos causados pelas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMAA em Piramoita que estão apresentados na figura 12.

Tabela 07: Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea da cv. Piramoita nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA.

Trata- mentos**	Média da área foliar (cm2)	Média do PF (g)	Média do PS (g)
01	442,12 (a,b,c)*	15,58 (d)*	2,380 (e)*
02	304,52 (c)	26,69 (d)	3,240 (e)
03	397,06 (a,b,c)	23,74 (d)	2,875 (e)
04	526,56 (a,b)	16,44 (d)	2,290 (e)
05	448,58 (a,b,c)	19,14 (d)	2,612 (e)
06	367,65 (b,c)	25,48 (d)	3,253 (e)
07	456,93 (a,b,c)	19,03 (d)	2,615 (e)
08	376,86 (b,c)	24,85 (d)	2,775 (e)
09	378,17 (a,b,c)	23,52 (d)	2,880 (e)
10	541,37 (a)	21,49 (d)	2,958 (e)

* Teste de Tukey de comparação entre médias de cada genótipo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMAA seguido pelo VMM-Me com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente e o 10. Testemunha, sem inoculação.

Figura 12: Redução média da área (%) e do peso seco (PS) na cv. Piramoita, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMAA nos tratamentos*.

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMAA; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMAA; 4, 5 e 6. Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMAA com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações com o VMAA seguidas pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação.

5.3.4. Efeito das infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 na área foliar e no peso fresco e seco da parte aérea, na cv. Piramoita (Exp IV).

A tabela 08, mostra os dados obtidos para a área foliar média, das cinco primeiras folhas verdadeiras (cm^2), e os dados de peso fresco e seco médios (g), da parte aérea das plantas, analisados pelo teste de Tukey, de comparação entre médias, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Como no experimento III, a média da área foliar das cinco primeiras folhas, foi o único parâmetro que diferenciou os tratamentos. Nos parâmetros peso fresco e seco não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os tratamento que apresentaram diferenças estatísticas em relação à testemunha (T10) foram: as infecções mistas nas quais o VMM-Me precedeu o VMMe-2 de 24 (T4) e de 48h.(T5), os demais apresentaram área foliar semelhantes ao da testemunha.

Ao contrário do que foi visto na infecção mista pelo VMM-Me e VMAA (EXP. III) no tratamento em que o VMM-Me precedeu o VMAA de 24 h. (T4), na interação do VMM-Me com o VMMe-2, este tratamento foi o que apresentou menor área foliar, não tendo sido verificado o antagonismo observado no experimento III.

Com os dados apresentados na tabela 08, foram realizados os cálculos percentuais da redução da área foliar e da redução do peso seco em relação à testemunha, evidenciando os danos causados pelas infecções simples e mistas dos vírus VMM-Me e VMMe-2 na cv. Piramoita que estão apresentados na figura 13.

Tabela 08: Área foliar média das cinco primeiras folhas verdadeiras, peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea da cv. Piramoita nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2.

Trata- mentos**	Média da área foliar (cm ²)	Média do PF (g)	Média do PS (g)
01	465,13 (a,b)*	24,41 (e)*	2,08 (h)*
02	427,88 (a,b,c)	26,97 (e)	1,84 (h)
03	398,15 (a,b,c)	24,41 (e)	1,69 (h)
04	398,72 (c)	26,27 (e)	1,81 (h)
05	380,35 (b,c)	34,32 (e)	2,59 (h)
06	395,10 (a,b,c)	33,82 (e)	2,54 (h)
07	424,33 (a,b,c)	36,92 (e)	2,72 (h)
08	466,52 (a,b)	31,61 (e)	2,65 (h)
09	457,86 (a,b,c)	34,63 (e)	3,60 (h)
10	519,94 (a)	27,74 (e)	2,45 (h)

* Teste de Tukey de comparação entre médias de cada genótipo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

** Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4,5 e 6 Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalo de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7,8 e 9 Inoculações com o VMMe-2 seguido pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 H., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação.

Figura 13: Redução média da área foliar (%) e do peso seco (PS) na cv. Piramoita, em relação à testemunha, nas infecções simples e mistas com o VMM-Me e o VMMe-2 nos tratamentos*.

* Tratamentos: 1. Inoculação simples com o VMM-Me; 2. Inoculação simples com o VMMe-2; 3. Inoculação simultânea com o VMM-Me e o VMMe-2; 4, 5 e 6. Inoculações com o VMM-Me seguido pelo VMMe-2 com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 7, 8 e 9. Inoculações com o VMMe-2 seguidas pelo VMM-Me com intervalos de 24, 48 e 72 h., respectivamente; 10. Testemunha, sem inoculação.

6. DISCUSSÃO

6.1. SINTOMAS CAUSADOS PELO VMM-Me, VMMe-2 E PELO VMAA NAS CULTIVARES ESTUDADAS.

Nas infecções simples dos vírus estudados foi observada uma variação dos sintomas para cada cultivar. O VMM-Me não causou sintomas na cv. Piramoita, concordando com os dados da literatura que afirmam ser esta cultivar tolerante ao VMM-Me (KUABARA & COSTA, 1987). Já na cultivar Caserta o VMM-Me provocou sintomas de mosaico, bolhas e clareamento de nervuras, concordando com FILGUEIRA, 1981, que atesta ser esta cultivar muito sensível às viroses.

Tanto o VMMe-2 como o VMAA provocaram sintomas mais severos na cv. Caserta do que na cv. Piramoita, nas infecções simples, mostrando que a tolerância da cv. Piramoita ao VMM-Me, reflete-se com menor intensidade a estes outros dois vírus.

As infecções mistas do VMM-Me com o VMMe-2 produziram uma variedade de sintomas conforme os tratamentos realizados. Entre as cultivares estudadas a cv. Piramoita foi a que apresentou sintomas mais amenos, verificando-se em todos os tratamentos ausência de sintomas na 1ª folha verdadeira. Os sintomas observados nessa infecção mista, em condições de casa-de-vegetação, foram semelhantes àqueles descritos para as infecções simples destes vírus (PURCIFUL et al., 1984a; 1984b).

As infecções mistas do VMM-Me com o VMAA também apresentaram uma grande variedade de sintomas conforme os tratamentos realizados. A cv. Piramoita mostrou sintomas mais amenos do que a cv. Caserta, mantendo as 1ªs folhas verdadeiras sem sintomas, fato já observado na interação anterior. Nestes experimentos, foi observado que os sintomas de "vein-banding", mosaico amarelo e nanismo, foram restritos aos tratamentos em que o VMAA estava presente. Os sintomas aqui observados em casa-de-vegetação são semelhantes àqueles descritos por DAVIS & MIZUKI (1987) para a mesma interação, de ocorrência natural, nos EUA.

Não foi observado nos experimentos realizados nenhum efeito de sinergismo com relação aos sintomas, pelo contrário, foi notado em alguns tratamentos, efeito antagônico quanto à

sintomatologia. Nas infecções mistas o efeito antagônico caracteriza-se por provocar sintomas mais amenos do que a somatória dos sintomas observados nas infecções simples. Tais efeitos antagônicos foram notados somente na cv. Piramoita, sugerindo que a tolerância do hospedeiro aos vírus é determinante na sintomatologia das infecções mistas. SIEVERT (1973) estudando a interação entre os vírus Potato Virus Y (PVY) e Tobacco Mosaic Virus (TMV), notou que o efeito de sinergismo entre os vírus, depende da suscetibilidade dos cultivares aos dois vírus. Os resultados obtidos neste trabalho, confirmam àqueles obtidos por SIEVERT (1973) de que a ação dos genótipos foi determinante na sintomatologia das interações.

6.2 EFEITO DA ORDEM E DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE AS INOCULAÇÕES, NOS SINTOMAS OBSERVADOS.

Nas infecções mistas entre VMM-Me e VMMe-2 na cv. Caserta não houve diferença significativa entre os tratamentos na sintomatologia. Já nas infecções mistas de VMM-Me e VMAA nas duas cultivares notamos uma atenuação dos sintomas nos tratamentos 4, 5 e 6 que são os tratamentos nos quais inoculou-se primeiro o VMM-Me, sendo detectado um efeito ANTAGÔNICO nesta ordem de inoculação. Quando o VMAA antecedeu o VMM-Me em 24, 48 e 72 horas não se verificou efeito antagônico significativo nos sintomas das plantas.

ATIRI & MIH (1991) estudaram o efeito do intervalo de tempo e sequência de inoculação de "cowpea aphid borne mosaic virus" (CAMV) e "cucumber mosaic virus" (CMV) em 4 linhagens de caupi e concluíram que o efeito do intervalo entre as inoculações e da sequência de inoculação variaram com o nível de resistência de cada linhagem de caupi. As linhagens mais suscetíveis aos dois vírus, tiveram sintomas mais severos e, maior redução de matéria seca e de produtividade.

6.3. CONCENTRAÇÃO DOS VÍRUS

Pela concentração dos vírus avaliada através do teste de ELISA-indireto, verificou-se que o VMM-Me multiplicou-se mais rápido em ambas as cultivares. Ficou comprovada a tolerância

da cv. Piramoita ao VMM-Me uma vez que esta cultivar replicou o vírus e não manifestou sintomas do mesmo.

Nas infecções mistas do VMM-Me com o VMAA, em ambas cultivares, foram observados casos de antagonismo do VMM-Me sobre o VMAA. Na cv. Caserta o VMM-Me inibiu a replicação do VMAA quando foi inoculado 24 horas antes, e também quando foi inoculado 72 horas após. Na cv. Piramoita o VMM-Me inibiu a replicação do VMAA quando foi inoculado 24 horas após o VMAA. Nestas infecções mistas de VMM-Me com VMAA o intervalo de tempo de 24 horas foi determinante na manifestação do antagonismo em ambas cultivares. COLARICCIO et al. (1991), também observaram um efeito antagônico do vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) sobre o vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV) nas interações no intervalo de 24 h.

Nas infecções mistas do VMM-Me com o VMMe-2, em ambas cultivares, foram observados casos de ANTAGONISMO do VMM-Me sobre o VMMe-2. Na cv. Caserta o VMM-Me inibiu a replicação do VMMe-2 quando foi inoculado 24 horas antes. O mesmo efeito foi observado na cv. Piramoita quando a inoculação com VMM-Me precedeu o a com VMMe-2 em 72 horas. Efeito ANTAGÔNICO do VMMe-2 sobre o VMM-Me foi observado quando o VMMe-2 foi inoculado 48 h. antes do VMM-Me. Efeito de SINERGISMO para a concentração do VMM-Me foi observado na cv. Piramoita, nos tratamentos onde o VMM-Me precedeu o VMMe-2 em 48 e 72 h., sendo respectivamente da ordem de 1,4 e 1,2 vezes o valor da concentração do VMM-Me na infecção simples, na cv. Piramoita. O mesmo fenômeno foi observado quando o VMM-Me precedeu o VMAA em 72 h. e quando o VMAA precedeu o VMM-Me em 48 e 72 horas chegando a concentração do VMM-Me ser até 1,57 vezes a concentração de VMM-Me na infecção simples. Efeito de SINERGISMO para a concentração do VMAA foi observada apenas na cv. Piramoita, quando o VMM-Me precedeu o VMAA em 48 e 72 h. e quando o VMAA precedeu o VMM-Me em 72 h., nestes casos a concentração do VMAA nas infecções mistas foi 2,3 vezes a concentração na infecção simples.

GOLDBERG & BRAKKE (1987) constataram também efeito de sinergismo na concentração do vírus "Maize chlorotic mottle virus"(MCMV) em infecções mistas com o "Maize

dwarf Virus” (MDV), que foi 5,4 vezes o valor da concentração do MCMV na infecção simples. O “Bean pod mottle virus” (BPMV) apresentou o mesmo fenômeno de sinergismo na concentração quando em infecções mistas com o “Soybean mosaic virus” (SMV), sua concentração foi até 2,67 vezes a concentração detectada nas infecções simples de SMV (LEE & ROSS, 1972 & ALMEIDA & LISTER, 1990).

6.4. HETEROENCAPSIDAÇÃO

Na cv. Piramoita foram observados ao microscópio eletrônico partículas heteroencapsidadas, em infecções simultâneas conduzidas em casa-de-vegetação. O fenômeno da heteroencapsidação foi descrito por NELSON & WHEELER (1979) para os potyvírus “Tobacco etch virus” (TEV) e “Pepper mottle virus” (PeMV) isolados de pimentas, importadas pelos EUA do México e, constatarem partículas parcialmente decoradas ao microscópio eletrônico após o tratamento com um dos antissoros específicos. Além disso, na capa protéica foram constatados capsômeros (subunidades de proteínas) dos dois vírus. A heteroencapsidação das partículas de VMM-Me e VMAA em infecções mistas foi descrita por BOURDIN & LECOQ (1991) em condições de campo ao estudarem a transmissão por afídeos. Estes autores observaram que um isolado de VMAA não era transmitido por afídeos e que passou a sê-lo quando as plantas estavam simultaneamente infectadas pelo VMAA e VMM-Me. Esse fenômeno foi reproduzido experimentalmente e foi verificada deficiência na capa protéica do VMAA. O fenômeno revelou-se de grande importância epidemiológica, podendo explicar a transmissão de isolados que normalmente não seriam transmitidos pelos vetores. VEGA et al. (1995), observaram também o mesmo fato entre esses dois vírus.

É sabido que o ácido nucléico (RNA) dos vírus é responsável pela codificação da capa protéica e, em nenhum trabalho consultado fala-se da possibilidade de que essa heteroencapsidação seja a manifestação do fenótipo de uma hibridação entre os RNAs destes potyvírus nas infecções mistas. Parece interessante a realização de estudos a nível molecular, a fim de elucidar se há a formação de um terceiro RNA (híbrido), no fenômeno de heteroencapsidação.

6.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS: ÁREA FOLIAR , PESO FRESCO E SECO DA PARTE AÉREA.

A cv. Caserta teve redução de área foliar de até 70 % na infecção simultânea do VMM-Me com o VMAA e na infecção simples de VMAA, sendo a cv. mais atingida pelo VMAA.

Na infecção simples de VMAA, na cv. Piramoita, verificou-se a maior redução de área foliar, chegando ser até 43% menor do que a testemunha sadia.

Em ambas as cultivares, podemos notar que o VMAA foi o vírus mais severo na redução de área foliar não havendo nenhuma infecção mista onde pudesse ser observado efeito de sinergismo.

O VMMe-2 também afetou a área foliar das cultivares estudadas sendo que os maiores valores de redução foram observados na cv. Caserta, indicando ser esta cultivar a mais sensível a este vírus.

O parâmetro área foliar foi nesse experimento o que melhor diferenciou os tratamentos, mostrando ser um excelente parâmetro para avaliação da reação de plantas às interações dos vírus. COLARICCIO, et al. (1991) confirmaram ser a área foliar importante parâmetro na avaliação de interações entre dois vírus. SANTOS (1990) utilizando a área foliar verificou também, significativa diferenciação nos tratamentos com os vírus CMV e do VMM-Me em Caserta.

O peso fresco e seco ao contrário da área foliar não diferenciaram de maneira significativa os tratamentos realizados. Pelos resultados obtidos o VMAA provocou maior redução da área foliar do que redução do peso seco da parte aérea. A redução da área deve-se em grande parte a deformação foliar que provoca. A inoculação simples com VMM-Me provocou 12% a 18% de redução da área foliar comparando-se com as plantas sadias, apesar da cv. Piramoita ser tolerante ao VMM-Me. Enquanto na cv. Caserta, esses valores atingiram 32%. Outros autores já utilizaram esses métodos para avaliar interações entre vírus com sucesso (PIO-RIBEIRO et al., 1978; SANTOS, 1990; COLARICCIO et al., 1991; ATIRI & MIH, 1991; MARTINS et al., 1994; entre outros).

6.6. DISCUSSÃO GERAL COM ÊNFASES VISANDO RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS VÍRUS VMM-Me, VMMe-2 e VMAA.

Diante dos resultados obtidos, podemos observar que a cv. Piramoita mostrou-se superior à cv. Caserta em todos os tratamentos. A tolerância ao VMM-Me quanto a sintomatologia e redução de área foliar, mostrou ser a cv. Piramoita (*C. moschata*), a mais promissora para o desenvolvimento de um cultivar de abobrinha geneticamente resistente aos potyvírus: VMAA, VMM-Me e VMMe-2. Já foram descritas fontes de resistência aos vírus VMAA e VMMe-2 em *C. moschata* (PARIS et al., 1988; PROVVIDENTI, et al., 1978) provindas respectivamente de Portugal e da Nigéria. O uso de fontes de resistência na mesma espécie facilita a obtenção de sementes F1 viáveis, acelerando o processo de melhoramento, uma vez que os cruzamentos interespecíficos apresentam barreiras de natureza gênica (WALL & YORK, 1960; WALL & WITAKER, 1971).

Nas interações aqui estudadas, observou-se que o ANTAGONISMO entre o VMM-Me e os vírus VMAA e VMMe-2 foi o fenômeno mais freqüente. Tal fato permite concluir que a seleção para resistência aos vírus, pode ser feita separadamente com cada vírus, uma vez que estas interações não acarretam sinergismo. Assim, se um cultivar for resistente a cada vírus separadamente provavelmente o será nas interações.

Cumprе ressaltar que a resistência ao VMAA deve ser desenvolvida com a maior urgência pois, além de ser um vírus mais severo do que o VMM-Me e o VMMe-2, tem vantagem epidemiológica sobre o VMMe-2 (ADLERZ, 1987) já que pode ser transmitido pelas sementes em pequena escala (DAVIS & MIZUKI, 1986; WALKEY, 1992). Possivelmente foi através da transmissão por sementes que o VMAA entrou no Brasil em 1992 (VEGA et al., 1992; CANER et al., 1992).

A transmissão dos vírus nas infecções mistas pelos vetores (afídeos) são de grande importância na epidemiologia e carecem de mais estudos. Salientamos aqui a importância do desenvolvimento da resistências aos vetores em abobrinhas.

Os programas de melhoramento visando a resistência de abobrinhas ao VMM-Me, VMMe-2 e VMAA necessitam do apoio de técnicas serológicas, que permitem a identificação dos

vírus e a avaliação da concentração dos vírus na planta. No presente estudo comprovou-se a existência de uma grande variação nos sintomas nas infecções mistas, impossibilitando a diferenciação dos sintomas macroscópicos de cada vírus.

O fenômeno da heteroencapsidação, observado nas duas interações estudadas, também pode ter implicação na resistência genética, como o tem, na transmissão pelos vetores (BOURDIN & LECOQ, 1991). Este assunto necessita de maiores esclarecimentos para comprovar se existe, somente a heteroencapsidação dos RNAs dos vírus ou se trata, de uma hibridação dos RNA dos vírus, a qual seria responsável pela codificação de uma capa protéica heterogênea (híbrida).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitam as seguintes conclusões:

7.1. COM RELAÇÃO À CV. CASERTA:

- Foi verificado efeito ANTAGÔNICO do VMM-Me sobre o VMAA nos parâmetros avaliados de concentração dos vírus na planta e na área foliar, nas infecções mistas onde o VMM-Me precedeu o VMAA com intervalo de 24 h. (T4) e o VMAA precedeu o VMM-Me com intervalo de 72 h. (T9).

- Foi observado efeito ANTAGÔNICO do VMM-Me sobre o VMMe-2 quanto à concentração dos vírus na planta, nas infecções mistas onde o VMM-Me precedeu o VMMe-2 com intervalos de 24 e 72 h. (T4 e T6, respectivamente).

- Não foi observado nenhum caso de antagonismo dos vírus VMMe-2 e VMAA sobre o VMM-Me.

7.2. - COM RELAÇÃO À CV. PIRAMOITA:

- Confirmou possuir tolerância ao VMM-Me quanto à sintomatologia. Porém, com relação a concentração de partículas, esta atingiu altos valores não se diferenciando da cv. Caserta (considerado suscetível ao VMM-Me).

- Efeito ANTAGÔNICO do VMM-Me sobre o VMAA somente com relação à concentração dos vírus na planta, na infecção mista, na qual o VMAA precedeu o VMM-Me com intervalo de 24 h. (T7).

- Efeito ANTAGÔNICO do VMM-Me sobre o VMMe-2 somente com relação à concentração dos vírus na planta, na infecção mista, na qual o VMM-Me precedeu o VMMe-2 em 72 h. (T6).

- Efeito ANTAGÔNICO do VMMe-2 sobre o VMM-Me somente com relação à concentração de partículas dos vírus na planta, na infecção mista, na qual o VMMe-2 precedeu o VMM-Me com intervalo de 48 h. (T8). Sendo esta a única interação na qual o VMM-Me sofreu influência de outro vírus, com relação a concentração de partículas.

- Na infecção mista onde o VMM-Me precedeu o VMMe-2 com intervalo de tempo de 24h (T4) as plantas apresentaram reduções acentuadas da área foliar e no teor de clorofila total, ficando muito próximas a concentração das partículas virais dos vírus. Assim, neste caso foi verificado um efeito de SINERGISMO entre esses vírus.

- Ocorrência do fenômeno de heteroencapsidação nas infecções simultâneas entre os vírus estudados.

7.3. COM RELAÇÃO ÀS DUAS CULTIVARES:

- O VMAA mostrou-se mais severo do que o VMM-Me e o VMMe-2 com relação aos parâmetros de sintomatologia e redução da área foliar.

- O genótipo, o intervalo de tempo e a ordem das inoculações interferiram na sintomatologia, na redução da área foliar e na concentração do VMMe-2 e VMAA nas plantas quando inoculadas em infecções mistas com o VMM-Me.

- Na infecção mista pelo VMM-Me e VMAA, a sintomatologia foi significativamente afetada pela ordem das inoculações. O mesmo foi observado na infecção mista pelo VMM-Me e VMMe-2 na cv. Piramoita. Porém, na cv. Caserta a interação destes dois vírus não apresentou variação na sintomatologia em nenhuma das infecções mistas estudadas.

- O VMM-Me apresentou concentrações de partículas superiores aos vírus VMMe-2 e VMAA, mostrando que a sua replicação é mais rápida nestes hospedeiros, do que os outros dois potyvírus.

- A severidade dos sintomas foi diretamente proporcional a redução da área foliar em todos os tratamentos, nas duas cultivares estudadas.

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ADLERZ, W.C. Spring aphid flights and incidence of watermelon mosaic viruses 1 and 2 in Florida. **Phytopathology**, **64**: 350-353. 1974.
- ADLERZ, W.C. Cucurbit potyvirus transmission by alate aphids (Homoptera: aphidae) trapped alive. **Journal of Economic Entomology**, **80**(1):87-92. 1987.
- ALMEIDA, A.M.R. & LISTER, R.M. The synergistic effect between bean pod mottle virus and soybean mosaic virus in soybeans. **Fitop. Bras.**, **15**:318-322. 1990.
- ALMEIDA, A.M.R. & LISTER, R.M. Bud blight symptomatology and virus titer in soybeans singly and doubly infected with soybean mosaic virus and tobacco ringspot virus. **Fitop. Bras.**, **16**:98-103. 1991.
- ATIRI, G.I. & MIH, A.M. Effect of timing and sequence of inoculation of cowpea aphid-borne and cucumber mosaic viruses on the performance of four cowpea lines. **Fitop. Bras.**, **17** (1): 53-56. 1992.
- ÁVILA, A.C. Viroses de Cucurbitáceas. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, **8** (85): 52-60. 1982.
- ÁVILA, A.C.; LIN, M.T. & KUHN, G.B. Os efeitos biológicos do vírus do mosaico da abóbora e vírus do mosaico da melancia sobre abóboras. **Fitop. Bras.**, **2**:66. 1977.
- BOURDIN, D. & LECOQ, H. Evidence that heterocapsidation between two potyvirus is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. **Phytopathology**, **81** (11): 1459-1464, 1991.
- BROADBENT, L. Insecticidal control of the spread of plant viruses. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, **2**:339- 407, 1957.
- CANER, J.; GALLETI, S.R.; LOTZ, I.M.P; OLIVEIRA, J.M. Natural infection of cucumber (*Cucumis sativus*) by Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in Santa Catarina, Brasil. **VI Congresso Nacional de Virologia**, nov. 1992.
- CEAGESP- Cia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo - Secretaria de Agricultura e Abastecimento - **Boletim Anual - Dados Estatísticos relativos aos produtos hortigranjeiros e pescado**. São Paulo. 1991.

- CEAGESP- Cia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo Secretaria de Agricultura e Abastecimento - **Boletim Mensal**- Dados Estatísticos relativos aos produtos hortigranjeiros e pescado, setembro. São Paulo. 1993.
- COLARICCIO, A.; BARRADAS, M.M.; VICENTE, M. Interação do vírus da nerose branca do tomateiro (VNBT) com dois outros vírus que afetam o tomateiro: mosaico do fumo (TMV) e vira-cabeça (TSWV). **Arq. do Inst. Biol.**, **58** (1/2): 51-59. jan-dez, 1991.
- COSTA, C. P. Obtenção de abobrinha menina brasileira (*Cucurbita moschata*) com hábito de crescimento tipo moita e com tolerância ao mosaico da melancia. **Rel. Cient. do Inst. de Genética**. Piracicaba, **8**:61-62. 1974.
- COSTA, C.L. & COSTA, A.S. Redução da disseminação de mosaico em abóbora de moita (*Cucurbita pepo* var. melopepo) com superfícies refletivas repelentes aos afídeos vectores. **Revista de Olericultura**, **11**:24. 1971 (resumo).
- CROSBIE, E.S. & MATTHEWS, R.E.F. Effects of TYMV infection on growth of *Brassica pekinensis* Rupr. **Physiological Plant Pathol.**, **4**: 389-400, 1974.
- DAVIS, R.F. Partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in Turkey. **Plant Disease**, **70**(8). 1986.
- DAVIS, R.F. & MIZUKI, M.K. Seed transmission of zucchini yellow mosaic virus in squash. **Phytopathology**, **76**: 1073. 1986 (abstr.).
- DAVIS, R.F. & MIZUKI, M.K. Detection of cucurbit viruses in New Jersey. **Plant Disease**, **71**: 40-44. 1987.
- DE BOKX, J.A. Hosts and electron microscopy of two papaya viruses. **Pl. Dis. Reporter**, **49** (9). 1965.
- DE ZOETEN, G.A. & FULTON, R.W. Understanding generates possibilities. **Phytopathology**, **65**:221-222. 1975.
- DICKSON, B. Tobacco and tomato mosaic. **Science**, **62**: 398. 1925.
- DODDS, J.A. & HAMILTON, R.I. Strutral interations between viruses as a consequence of mixed virus infections. **Adv. Virus Res.**, **20**:33-89, 1976.

- DUSI, A.N.; TATEISHI, N.Y. & DIAS, R.C.S. Ocorrência de WMV-2 em cucurbitáceas no sub-médio São Francisco. **Fitop. Bras.**, 16(2). 1991.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Ed. Edgard Blüger LTDA. São Paulo. 1976. (reimpressão) 293 p. FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de Olericultura** - vol I. 2ª ed. rev. e ampl. - São Paulo. Editora Ceres, 1981. 338p.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de Olericultura**. Vol. I, ed. Agronômica Ceres, São Paulo. 1981. 338p.
- FISHER, H.U. & LOCKHART, B.E.L. Serious losses in cucurbits caused by Watermelon mosaic virus in Marroco. **Plant Disease Reporter**, 58 (2): 143-146. 1974.
- FUJISAWA, I.; HAYASHI, T. & MATSUI, C. Electron microscopy of mixed infections with two plant viruses. I. Intracellular interactions between Tobacco Mosaic Virus and Tobacco Etch virus. **Virology**, 33: 70-76. 1967.
- FULTON, R.W. Unilateral cross-protection among some NEPO viruses. **Acta Hortic.**, 44: 29-31. 1975.
- GARCIA DE SALCEDO, M.J. **Resistência ao mosaico da melancia raça 1 e sua herança em moranga *C. máxima* Duch.** Piracicaba, ESALQ/ USP. (Dissertação de Mestrado). 1984. 78p.
- GARDINGO, J.R. **Aplicação das técnicas de cultura de embrião e diversidade gamética na hibridação interespecífica no gênero *Cucurbita***. Piracicaba, ESALQ/ USP. (Dissertação de Mestrado) 1986. 139p.
- GATES, D.W. & GUDAUSKAS, R.T. Photosynthesis, respiration and evidence of a metabolic inhibitor in corn infected with maize dwarf mosaic virus. **Phytopathology**, 59:575-580, 1969.
- GREBER, R.S. Vireuses infecting cucurbits in Queensland. **Qd. J. Agric. Anim. Sci.**, 26 (2). 1969.
- GIBBS, A.J. Plant virus classification. **Adv. Virus res.**, 14: 263-328, 1969.
- GOLDBERG, K-B. & BRAKKE, M.K. Concentration of Maize chlorotic mottle virus increased in mixed infections with Maize dwarf mosaic virus, strain B. **Phytopath.**, 77 (2): 162-167. 1987

- GONSALVES, D. & GARNSEY, S.M. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. **Plant Dis.** 73:92-5596, 1989.
- HAMILTON, R.I. Defenses triggered by previous invaders: viruses. IN: **Plant Viruses** vol. V 1980.
- HARBONE, J.B. **Phytochemical methods.** First published, distributed in the USA by Halsted Press, New York. 1973, 278p.
- HERRINGTON, M.E.; TEAKLE, D.S.; GREBER, R.S. & BROWN, P.J. Inhibition of mechanical transmission of virus by sap., and infection of *Cucurbita ecuadorensis* with papaya ringspot virus type W. **Australian Journal of Exp. Agric.**, 28: 651-654. 1988 a.
- HERRINGTON, M.E.; GREBER, R.S.; PERSLEY, D.M. Response of progeny from the cross *Cucurbita moschata* X *C. ecuadorensis* to infection with papaya ringspot virus type W and WMV-2. **Quensland J. of Agric. and Anim. Sci.**, 45 (2). 1988 b.
- HERRINGTON, M.E.; GREBER, R.S. & BROWN, P.J. & PERSLEY, D.M. Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita maxima* cv. Queensland Blue X *C. ecuadorensis*. **Quensland J. of Agric. and Anim. Sci.**, 45(2). 1988 c.
- HERRINGTON, M.E.; BYTH, D.E.; TEAKLE, D.S. & BROWN, P.J. Inheritance of resistance to papaya ringspot virus W in hybrids between *C. ecuadirensis* and *C. maxima*. **Australian Journal of Exp. Agric.**, 29: 253-259. 1989.
- HONDA, Y.; YAMAGUCHI, A & MATSUI, C. A variety of bean suitable for cytological investigation with souther bean mosaic virus. **Phytopathology**, 58: 1439. 1968.
- KITAJIMA, E.W. Uma peculiar associação de partículas do VMM-Me e SqMV em infecções mistas. **Fitop. Bras.**, 11(2).1986 (resumo)
- KUABARA, M.Y. & COSTA,C.P. Reação de populações segregantes de abobrinha cv. Piramoita (*Cucurbita moschata* Duch.) ao vírus do mosaico da melancia-1 (WMV-1). **Hort. Bras.**, 5(2). 1987.
- LECOQ, H. & LEMAIRE, J.M. Control of Zucchini Yellow Mosaic Virus in squash by cross protection. **Plant Disease**, 75(2). 1991.

- LECOQ, H.; PITRAT, M. & CLEMENT, M. Identification et caractérisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. (Identification and characterization of a potyvirus that induces muskmelon yellow stunt). **Agronomie** 1:(10).1981.
- LECOQ, H. & PITRAT, M. Specificity of the helper - component- mediated aphid transmission of tree potyvirus infecting muskmelon. **Phytopathology**, 75(8). 1985.
- LEE, Y. & ROSS, J.P. Top necrosis and cellular changes in soybean doubly infected by soybean mosaic and bean pod mottle viruses. **Phytopathology**, 62: 839-845. 1972.
- LESEMANN, D.-E.; MAKKOUK, K.M.; KOENIG, R. & NATAFJI-SAMMAN, E. Natural infection of cucumbers by Zucchini Yellow Mosaic Virus in Lebanon. **Phytopath. Z.**, 108: 304-313. 1983.
- LIMA, J.A.. Principais problemas de plantas ocasionados por vírus no Brasil. **Fitop. Bras.**, 11(2). 1986.
- LIMA, J.A.; SOUZA, C.A.V.; MARTINS, O.F. Infecção dupla de watermelon mosaic virus e squash mosaic virus em melancia no Estado do Piauí. **Fitop. Bras.**, 5:417. 1980.
- LIMA, J.A.; MARQUES, M.A.L. & SILVEIRA, L.F.S. Efeito sinérgico entre "cowpea aphid-borne mosaic virus" e "cucumber mosaic virus" em cultivares de *Vigna unguiculata*. **Fitop. Bras.**, 14:119. 1989 (resumo).
- LISA, V.; BOCCARDO, G.; AGOSTINHO, G.; DELLAVALLE, G. & D'AQUINO, M. Characterization of potyvirus that causes zucchini yellow mosaic virus. **Phytopathology**, 71: 668-672. 1981.
- LISA, V & LECOQ, H. Zucchini yellow mosaic virus. CMI/AAB **Descriptions of Plant Viruses** n° 282. 1984.
- LOEBENSTEIN, G. Localizations and induced-resistance in virus infected plants. **Anu. Rev. Phytopathol.**, 10: 177-206, 1972.
- LOMMEL, S.A.; Mc CAIN, A.M. & MORRIS, T.J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Phytopathology**, 72: 1018-1022. 1982.

- LOPES, J.F. I Simpósio sobre Cucurbitáceas. **Hort. Bras.** 9 (2):98-99, nov. 1991.
- MALUF, W.R. & SOUZA, E.L.S. Resistência ao vírus do mosaico da melancia 1 (WMV-1) em moranga. **Horticultura Bras.** 2 (2). 1984.
- MARTINS, T.R.; ALMEIDA, A.M.R.; ALMEIDA, L.A.; NEPOMUCENO, A.; CHAGAS, C.M. & TOLEDO, J.F.F. Sinergismo observado em plantas de soja infectadas pelos vírus do mosaico comum da soja e do mosaico em desenho do feijoeiro. **Fitop. Bras.**, 19(3): 430-436. 1994.
- MATTHEWS, R.E.F. Induction of disease by viruses, with special reference to turnip yellow mosaic virus. **Annu. Rev. Phytopath.**, 11: 147-170, 1973.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology**. 2ª ed. Academic Press, INC. New York. 1981, 897p.
- MAYO, M.A.; FRITSH, C.; HISTH, L. Translation of tobacco ratle virus RNA in vitro using wheat germ extracts. **Virology**, 69: 408-415, 1976.
- McLEOD, P.J.; SCOTT, H.A. & MORELOCK, T.E. Zucchini yellow mosaic virus: a new severe cucurbit disease. **Ark. Farm. Res.**, 35:2. 1986.
- McLEOD, P.J.; SCOTT, H.A. & MORELOCK, T.E. Temporal relationships of Watermelon Mosaic Virus-2 inoculation date and symptom appearance and yield in yellow squash. **HortScience**, 22 (5). 1987.
- McWHORTER, F.P. & PRICE, W.C. Evidence that two different plant viruses can multiply simultaneously in the same cell. **Science**, 109: 116-117. 1949.
- MILNE, K.S. Electron microscopy for the identification of plant viruses in vitro preparations. In: MARAMOSCH, K. & KOPROWSKI, H. Ed. **Methods in Virology**. New York, Academic Press, V.7 p:87-120. 1984.
- MILNE, K.S.; GROGAN, R.G.; KIMBLE, K.A. Identification of viruses infecting cucurbits in California. **Phytopathology**, 59: 819-828, 1969.
- MOHIER, E.; HIRTH, L.; LEMEUR, M.A.; GELLINGER, P. Translation of alfafa mosaic virus RNA's in mammalian cell-free systems. **Virology**, 68: 349-359, 1975.
- NAGAI, H. Obtenção de híbridos entre *Cucurbita pepo* melopepo e *C. moschata* por meio de cultura de embrião. **Rev. de Olericultura, Brasília**, 13:25. 1973.

- NAMETH, S.T. Zucchini Yellow Mosaic Virus associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California Desert Valleys. **Plant Disease**, 69 (9). 1985.
- NAMETH, S.T.; LAEMMLEN, F.F.; DODDS, J.A. Viruses cause heavy melon losses in desert valleys. **California Agriculture**, July-August:28-30. 1985.
- NELSON, M.R. & WHEELER, R.E. Heterologous encapsidation of viral RNA in mixed infections of two potyviruses, **Phytopathology**, 69: 918. 1979.
- PARIS, H.S.; COHEN, S.; BURGER, Y & YOSEPH, R. Single-gene resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. **Euphytica**, 37: 27-29. 1988.
- PAVAN, M.A. **Vírus do mosaico da melancia: purificação variabilidade e distribuição nas principais regiões produtoras de pepino e abobrinha de Minas Gerais**. UFV, Viçosa/ M.G. (Dissertação de mestrado) 1985.
- PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; MAYBERRY, K. & BLUA, M.J. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. **California Agriculture**, 46 (2):35-40, 1992.
- PINTO, DE A.N.F.J. & BERGAMIN FILHO, A. Determinação do conteúdo de clorofila em folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) sadias e infectadas com o vírus do mosaico da cana-de-açúcar (VMCA) p.314 - In **Resumos do 18º Congr. Bras. de Fitop.** (Fortaleza - CE, 8 a 12 de Julho), 1985.
- PIO-RIBEIRO, G.; WYATT, S.D. KUHN, C.W. Cowpea stunt, a disease caused by a synergistic interaction of two viruses. **Phytopathology**, 68:1260-1265. 1978.
- PROVVIDENTI, R ; ROBINSON, R W and MUNGER, H.M. Resistance in feral species of six viruses infecting Cucurbita. **Plant Disease Reporter** 62: 326-329. 1978.
- PROVVIDENTI, R. Sources of resistance and tolerance to viruses in acessions of Cucurbita maxima. **Cucurbit Genetics Cooperative** 5: 46-47.1982.
- PROVVIDENTI, R. Viral diseases of cucrbits a sources of resistance. **Technical Bulletin nº 93**. Departament of Plant Pathology, New York- 14456, March. 1986.
- PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. Serological distintiction of watermelon mosaic virus isolates. **Phytopathology**, 69:112-116. 1979

- PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. & GONSALVES, D. Papaya ringspot virus. CMI/AAB. **Descriptions of plant viruses n° 292**. 1984a.
- PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. & EDWARDSON, J.R. Watermelon Mosaic Virus 2. CMI/AAB **Descriptions of Plant viruses n°293** (n°63 revised). 1984b.
- QUIOT-DOUINE, L.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. & MEJIA, M.V.G. Serological relationships and in vitro translation of an antigenically distinct satrain of papaya ringspot virus. **Phytopathology**, 76(3). 1986.
- RACCHAH, B. Non persistent viruses; epidemiology and control. **Advances in Virus Research**, New York, 31: 387-429, 1986.
- REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. & VEGA, J. Obtenção de isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro a partir de "bolhas" das folhas com mosaico. **Fitopatol. Bras.** 7:542. 1982 (resumo)
- REZENDE, J.A.M. & COSTA, A.S. Intensificação dos sintomas dificulta o controle do mosaico do mamoeiro por premunização. **Fitop. Bras.**, 12: 100-101. 1987.
- REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.F. & COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presente em bolhas atuam na premunização. **Fitop. Bras.**, 19(1): 55-61. 1994
- ROBINSON, R.W.; BOETTGER, M.A. & SHAIL, J.W. Gynoecious sex expression in *Cucurbita* resulting from an interespecific cross. **Cucurbit Genetics Coop. Pept.**, Madson, 1: 31-32. 1978.
- ROGGERO, P. & PENNAZIO, S. Biochemical changes during the necrotic systemic infection of tobacco plants by potato virus Y, necrotic strain. **Physiol. Molecular Plant Pathol.**, 32:105-113, 1988.
- ROSS, A.F. Interations of viruses in the host. In "Virus Diseases of Ornamental Plants" (R.H. Lawson and M.K. Corbeet, eds.)pp., 247-260. **Int. Soc. Hortic. Sci.**, Netherlands, 1974.]

- SÁ, P.B.; MARINHO, V.A.; OLIVEIRA, C.R.B. & KITAJIMA, E.W. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico amarelo da melancia 2 (Watermelon mosaic virus 2) procedente de Campinas, S.P. **Fitop. Bras.**, 13: 145. 1988 (res.)
- SAKO, N.; OKUMURA, T. NOMAKA, F. Aphid transmission of watermelon mosaic virus. **Agric. Bull. Saga Univ.**, 42:1-8. 1977.
- SAMMONS, B & BARNETT, O.W. A survey of viruses infecting yellow summer squash in South Caroline. **Plant Disease**, 73 (5). 1989.
- SANTOS, C.D.G. Infecção mista pelos vírus do mosaico da melancia e do mosaico do pepino em cucurbita pepo 'caserta'. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, (Dissertação de Mestrado) 1990. 96 p.
- SHALLA, T.A. & PETERSEN, L.J. Studies mechanism of viral cross protection. **Phytopathology**, 68: 1681-1683. 1978.
- SHIFRISS, O. Do Cucurbita plants with silvery leaves escape virus infection? Origin and characteristics of NJ260. **Cucurbit Genet. Coop. Rep.**, 4:42-43, 1981.
- SHIFRISS, O. On the silver leaf trait in Cucurbita pepo L. **Cucurbit Genet. Coop. Rep.**, 5:48-50. 1982.
- SIEVERT, R.C. Individual and combined effects of tobacco mosaic virus and potato virus Y on Burley Tobacco. **Phytopathology**, 63:697-698. 1973.
- VAULX, R.D. & PITRAT, M. Realization of the interespecific hybridization (F1 and BC1) between *Cucurbita pepo* and *C. ecuadorensis*. **Cucurbit Genetics Coop. Rept.**, Madson, 3:42. 1980.
- VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A. & NAGAI, H. Constatação do vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (Zucchini yellow mosaic virus) no Brasil, através de MEIAD e ELISA. **Fitop. Bras.**, 17(2), agosto, 1992. (res. nº 220)
- VEGA, J.; REZENDE, J.A.M. & YUKI, V.A. Detecção do Vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita no Brasil: caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. **Fitop. Bras.**, 20 (1): 72-79. 1995

- VELA, A. Analisis comparativo de cloroplastos aislados de plantas de *Brassica chinensis* sanas e infectadas con el virus del mosaico amarillo del nabo. **Microbial. Españ.**, **25**: 51-60, 1972.
- WALKEY, D.G.A. Zucchini yellow mosaic virus: Control by mild strain protection. **Phytoparasitica**, **20**:suppl. 1992
- WALL, J.R. & YORK, T.L. Gametic diversity as an aid to interespecific hybridization in *Phaseolus* and in *Cucurbita*. **American Society for Horticulture Science Proceed.**, **75**: 419-28. 1960.
- WALL, J.R. & WITAKER, T.W. Genetic control of leucine aminopeptidase and esterase isosymes in the interespecific cross *Cucurbita maxima* X *C. ecuadorensis*. **Biochemical Genetics**, **5**:223-9. 1971.
- WANG, H.L; YEH, D.-D.; CHIU, R.-J & GONSALVES, D. Effectiveness of cross protection by a mild strain of papaya ringspot virus for control of ringspot in Taiwan. **Plant Dis.** **71**: 491-497. 1987.
- WANG, H.L; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R. & LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by a mild strain of zucchini yellow mosaic virus in cucumber, melon and squash. **Plant Disease**, **75**(2):203-207. 1991.
- WEBB, R.E. Watermelon mosaic virus 1 and 2 in squash on the Atlantic seaboard. **Plant Disease Reporter**, **55**(2), 1971.
- WEBB, R.E. & SCOTT, H.A. Isolation and identification of watermelon mosaic viruses 1 and 2. **Phytopathology**, **55** (8). 1965. WEBB, R.E. *Luffa acutangula* for separation and maintenance of watermelon mosaic virus 1 free of watermelon virus 2. **Phytopathology**, **55**:1379-1380. 1965.
- WHITAKER, T.W. & DAVIS, G.N. **Cucurbits: botany, cultivation and utilization**. Leonardo Hill. 1962. 250p.
- WYATT, S.D.; PIO-RIBEIRO, G. & KUHN, C.W. A cowpea disease caused by two viruses. **Proceedings of the Am. Phytopath. Society**, **3**: 344. 1976.

- YAMAMOTO, T. & ISHII, M.; KATSUBE, T & SORIN, M. Transmission of watermelon mosaic virus by aphid species (Homoptera - Aphidae). **Japn. J. Appl. Entomol. Zool.**, 26: 218-223. 1982.
- YAMAMOTO, T. & ISHII, M. Aphid transmission from cucumber cultivars infected with watermelon mosaic virus and cucumber mosaic virus. **Annals of the Phytop. Soc. of Japan**, 49(4): 508-513. 1983.
- YEH, S.-D.; GONSALVES, D. & PROVVIDENTI, R. Comparative studies on host range and serology of papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. **Phytopathology**, 74(9). 1984.
- YEH, S.-D & GONSALVES, D. Purification and immunological analyses of cylindrical-inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. **Phytopathology**, 74(11). 1984.
- YEH, S.-D; GONSALVES, D.; WANG, H.-L.; NAMBA, R. & CHIU, R.-J. Control of papaya ringspot virus by cross protection. **Plant Dis.**, 72: 375-380. 1988.
- YUKI, V.A. **Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita**. Piracicaba, ESALQ/ USP. (Tese de doutorado). 1990. 84p.
- ZAMBOLIM, E.M.; CARVALHO, M.G. & SANTOS, C.D.G. Detecção sorológica do vírus do mosaico da abóbora em cucurbitáceas em Minas Gerais. **Fitopatologia. Brasileira.**, 14(2). 1989 (resumo).