

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

Efeito do gene de resistência *Zym-1* no fenótipo e nos títulos virais de plantas F<sub>2</sub>  
de meloeiro segregando para resistência ao *Zucchini yellow mosaic virus*

**Ana Luiza Homsí Galesi**

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

Piracicaba  
2023

Ana Luiza Homsí Galesi  
Engenheira Agrônoma

Efeito do gene de resistência *Zym-1* no fenótipo e nos títulos virais de plantas F<sub>2</sub> de meloeiro segregando para resistência ao *Zucchini yellow mosaic virus*

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

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

Piracicaba  
2023

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

Galesi, Ana Luiza Homs

Efeito do gene de resistência *Zym-1* no fenótipo e nos títulos virais de plantas  $F_2$  de meloeiro segregando para resistência ao *Zucchini yellow mosaic virus* / Ana Luiza Homs Galesi. - - Piracicaba, 2023.

43 p.

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

1. Resistência a doença 2. ZYMV 3. *Cucumi melo* 4. Melhoramento genético I. Título

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à

Luís Vicente de Souza Queiroz e

Ermelinda Ottoni de Souza Queiroz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo por me permitir realizar esse mestrado juntamente à ele. Por confiar na minha capacidade e sempre me incentivar a ir além.

Agradeço à Sakata Seeds Sudamerica pela disponibilidade, parceria e apoio no que foi preciso para realizarmos esse trabalho.

Agradeço à CNPq e a CAPES pelo financiamento da minha bolsa de mestrado e principalmente à FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto 2019/13397-2.

Agradeço ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP.

Agradeço com muito carinho à Camila Perdoncini de Carvalho, Lillian Bibiano, Amanda Dumit, Jéssica Maria Israel de Jesus, Pedro Confort e Pedro H. Rodrigues companheiros de laboratório que, sem medir esforços (e muito menos distância), me ajudaram sempre que precisei, dividindo conhecimentos profissionais e de vida.

Agradeço ao Marcelo Brossi Santoro, que sempre me apoiou nas minhas decisões. E não somente isso, me auxiliou no trabalho, principalmente na parte estatística e no desenvolvimento escrito.

Agradeço aos meus pais Roberto e Angélica pelo amor e dedicação, pela paciência e respeito, pelos educação de vida, por tudo que sou hoje.

Agradeço aos meus irmãos Rafaella e André, por serem os meus melhores amigos.

Agradeço a Deus pela vida, sem ela nada disso seria possível.

*“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele.  
Por isso, o universo de cada um se resume no tamanho de seu saber.”*

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. A cultura do meloeiro .....	9
1.2. Mosaico amarelo do meloeiro (ZYMV) .....	10
1.3. Resistência ao ZYMV .....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
2.1. Material vegetal e inoculação com <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) .....	15
2.2. Avaliação fenotípica da população F2 .....	17
2.3. Extração de RNA e quantificação viral em plantas F2 por RT-qPCR .....	18
2.4. Genotipagem de plantas F2 com loco microssatélite .....	19
2.5. Análise de dados .....	21
3. RESULTADOS .....	23
3.1. Quantificação do ZYMV por qPCR .....	23
3.2. Genotipagem com o marcador CMAG36 .....	26
4. DISCUSSÃO .....	33
5. CONCLUSÕES .....	37
REFERÊNCIAS .....	39

## RESUMO

### **Efeito do gene de resistência *Zym-1* no fenótipo e nos títulos virais de plantas $F_2$ de meloeiro segregando para resistência ao *Zucchini yellow mosaic virus***

O *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) causa um severo mosaico e tem alto potencial de dano à cultura do melão. A principal estratégia de seu controle é por meio de variedades resistentes. O acesso PI414723 é a principal fonte utilizada nos programas de melhoramento de melão e sua resistência é controlada pelo locus de grande efeito fenotípico denominado de *Zym-1*. O efeito deste locus no fenótipo e na multiplicação do vírus foram investigados em uma população  $F_2$  derivada do cruzamento entre o acesso resistente PI414723 e a cultivar suscetível 'Védrantais'. Para isso foi realizado *i*: a fenotipagem de plantas  $F_2$  por meio de escala de sintomas, *ii*: a quantificação do vírus nesses fenótipos através da técnica de PCR em tempo real, e *iii*: a genotipagem das plantas por meio do marcador microssatélite CMAG36 ligado ao locus *Zym-1*. Na avaliação fenotípica tivemos quatro tipos de reação, classificados de 1 a 4, nas plantas  $F_2$  21 dias após a inoculação; o resultado da quantificação viral nos mostra que os títulos virais médios das reações 1 e 2 diferiram entre si e de 3 e 4, mas não houve diferença entre as reações 3 e 4; o marcador não apresentou distorções de segregação, uma vez que as frequências observadas de indivíduos homocigóticos para o parental PI414723 (R), heterocigóticos (H) e homocigóticos para o parental 'Védrantais' (S) não diferiram das frequências esperadas (1:2:1); no entanto, não refletiram diferenças quanto à multiplicação do ZYMV, uma vez que os títulos virais das plantas R e H, que foram bem baixos, não diferiram entre si

Palavras-chave: Resistência de plantas, ZYMV, *Cucumis melo*, Melhoramento genético

## ABSTRACT

### **Effect of the resistance gene *Zym-1* on the phenotype and viral titers of F<sub>2</sub> melon plants segregating for resistance to *Zucchini yellow mosaic virus***

*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) causes severe yellow mosaic and has a high potential to damage melon crops. The main strategy for its control is through resistant varieties. The accession PI414723 is the main source of resistance used in breeding programs, and its resistance is controlled by the major effect locus *Zym-1*. The effect of this locus on the phenotype and on viral multiplication were investigated on an F<sub>2</sub> population derived from the cross between the resistant accession PI414723 and the susceptible cultivar 'Védrantais'. For this, the plants were phenotyped according to their reaction types and their viral titers as quantified by quantitative PCR (qPCR) and their genotypes inferred by their allelic composition at the CMAG36 marker locus linked to *Zym-1*. The phenotypic evaluation revealed four types of reaction, from 1 to 4. The result of viral quantification of the F<sub>2</sub> plants 21 days after inoculation shows us that the mean viral titers of reactions 1 and 2 are statistically different from each other and from 3 and 4. However, there was no difference between reactions 3 and 4. The marker showed no segregation distortions and the observed frequencies of individuals homozygous for the parental PI414273 (R), heterozygous (H) and homozygous for the parental 'Védrantais' (S) did not differ from the expected frequency (1:2:1). Moreover, despite being quite low, the viral titers of the R and H plants did not show any statistical differences regarding ZYMV multiplication.

Keywords: Disease resistance, ZYMV, *Cucumis melo*, Breeding

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A cultura do meloeiro

O melão (*Cucumis melo*) é uma olerícola pertencente à família das Cucurbitáceas e é uma das dez frutas mais produzidas em todo o mundo. Acredita-se que seu centro de origem seja a África ou Ásia. Existem nove variedades botânicas de melão, sendo que as mais cultivadas pertencem a duas variedades: *Cucumis melo* var. *inodorus* (tipo amarelo) e *Cucumis melo* var. *cantalupensis* (tipo cantaloupe) (SEBRAE, 2016).

A produção mundial de melão totalizou uma produção em torno de 28 milhões de toneladas em 2020, o que coloca a cultura entre as dez frutas mais produzidas mundialmente (FAOSTAT STATISTICAL DATABASE, 2022). A China é o maior país produtor e responsável por 55% da produção mundial, totalizando 13.838.234 toneladas em 2020. O mercado interno chinês consome cerca de metade da produção mundial de melão e o Brasil desempenha um papel importante como país exportador de fruta para a Ásia através do acordo bilateral firmado em 2019. O Brasil ocupa a 9ª posição no ranking mundial de produtores de melão e sua produção ascendeu a mais de 613 mil toneladas em 2020. As exportações brasileiras renderam um total de 147 milhões de dólares em 2020, com principais destinos na Holanda, Espanha e Reino Unido, o que representa cerca de 40% da produção total de melão no Brasil em termos de volume (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2020).

Dentre as regiões brasileiras produtoras de melão, o Nordeste se destaca com o Estado do Rio Grande do Norte em primeiro lugar, com uma colheita de 338.615 toneladas em 2018, e o Ceará com 85.201 toneladas. Essa grande produção se deve às condições da região que favorecem o cultivo em função dos elevados níveis de radiação solar e as altas temperaturas, permitindo ao produtor a colheita de três safras por ano (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2020).

As culturas de cucurbitáceas são muito afetadas pelos vírus, e a melhoria dos métodos de diagnóstico permitiu novos relatos dessas doenças (LECOQ; KATIS, 2014). Os hospedeiros também podem ser infectados por mais do que uma espécie de vírus, resultando frequentemente em sintomas graves. As infecções combinadas levam a uma redução no rendimento das culturas e na qualidade dos frutos, e afetam substancialmente as exigências do mercado (SPADOTTI et al., 2014). Entre os

principais vírus nas cucurbitáceas com distribuição mundial podem ser incluídos: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (LECOQ; KATIS, 2014).

Para garantir uma produção de boa qualidade e que possa ser comercializada tanto no mercado interno e especialmente no externo, é importante atentar aos cuidados fitossanitários do início ao fim do ciclo produtivo, de modo a manter a qualidade e aumentar a vida útil do fruto fresco. Para isso é necessário um grande investimento em melhoramento genético com objetivo de obter cultivares híbridas mais resistentes a viroses, em especial ao ZYMV uma vez que o controle químico não é eficiente para os afídeos que transmitem esse patógeno através da picada de prova, (RAMM et al., 2017).

## **1.2. Mosaico amarelo do meloeiro (ZYMV)**

O *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), pertencente ao gênero *Potyvirus* e a família *Potyviridae*, é considerado um patógeno economicamente importante em cucurbitáceas e é especialmente devastador para as culturas de melão (DESBIEZ; LECOQ, 1997). Este potivírus foi identificado pela primeira vez na Itália (1981) e generalizou-se em todo o mundo (LISA et al., 1981).

É transmitido por afídeos pertencentes aos gêneros *Aphis* e *Myzus* de uma forma não persistente, ou seja, através da picada de prova, e o vírus pode ser mecanicamente inoculado para fins experimentais (SIMMONS et al., 2008). Os vetores propagam o vírus de um hospedeiro para outro através da picada de prova e a infecção viral causa clorose sistêmica, mosaico, deformação grave das folhas e descoloração irregular dos frutos. Embora as aplicações químicas sejam eficientes para reduzir a população de afídeos, não diminui a propagação do ZYMV dentro da cultura devido à sua rápida disseminação (LECOQ; KATIS, 2014). Portanto, a utilização de cultivares resistentes é uma estratégia viável para manejar viroses de relação não persistente (BERKE et al., 2021).

O ZYMV é facilmente transmitido mecanicamente, mas sua transmissão por sementes ainda não foi confirmada em decorrência de resultados conflitantes na literatura (PAVAN et al., 2016; LECOQ et al., 2014). A principal forma de manutenção

do vírus se dá em espécies de cucurbitáceas, plantas daninhas e algumas plantas ornamentais (LECOQ et al., 2014).

O genoma do ZYMV apresenta uma molécula de RNA de fita simples, de senso positivo, e com aproximadamente 9.700 nucleotídeos. O RNA viral possui uma fase única de leitura que codifica uma poliproteína de 350 kDa, que é clivada por três diferentes proteases, dando origem a 11 diferentes proteínas. Dentre as proteínas geradas está a proteína P1, responsável pela atividade proteolítica, a proteína capsidial (CP), que auxilia na movimentação do vírus pela planta e na transmissão por afídeos, a HC-Pro que também auxilia na transmissão dos afídeos, mas ao mesmo tempo apresenta atividades proteolíticas, a P3, que está envolvida na replicação viral, e a “pretty interesting potyvirus ORF” (PIPO), a qual é essencial para o movimento intercelular do vírus (REZENDE; KITAJIMA, 2016). Unir parágrafo seguinte

O movimento do vírus célula-a-célula ocorre logo após o processo de infecção e garante a infecção sistêmica via plasmodesmas e para outros tecidos via floema, ou seja, o movimento viral é o mesmo dos fotoassimilados (REZENDE; KITAJIMA, 2016).

### 1.3. Resistência ao ZYMV

Resistência a viroses é um dos principais objetivos no desenvolvimento de linhagens melhoradas. Porém, é geralmente um processo longo e complexo. A princípio, é necessário selecionar uma fonte de resistência à determinada espécie de vírus ou resistente a mais de uma espécie (SILVEIRA et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2011). No caso de melão, existem 4 acessos descritos como resistentes ao ZYMV: IC274007, IC274014 (DHILLON et al., 2007), AM87 (FERGANY et al., 2011), e o genótipo indiano PI414723 (*Cucumis melo* subsp. *agrestis*), que é a fonte mais comum utilizada em programas de melhoramento (MCCREIGHT; BOHN; KISHABA, 1992; DESBIEZ; LECOQ, 1997; DANIN-POLEG et al., 2002). PI414723 é resistente à ZYMV e tem múltiplas resistências a agentes patogênicos (FAZZA et al., 2013), é derivado de uma planta do acesso PI371795, resistente a afídeos. Quando autopolinizada, deu origem à progênie 90234 (ou LJ90234). Sementes de 16 plantas dessa progênie foram cruzadas entre si dando origem a PI414723 (MCCREIGHT; BOHN; KISHABA, 1992). Uma característica interessante deste acesso é que quando o ZYMV é inoculado em seus cotilédones, o vírus infecta, é translocado célula-a-célula no tecido inoculado, mas não para tecidos novos, ao contrário do que é observado no genótipo suscetível

‘Védrantais’, onde o vírus é translocado para tecidos novos e coloniza sistemicamente a planta (BIBIANO, 2020).

Os isolados de ZYMV podem ser classificados em três patótipos de acordo com os sintomas que causam no acesso PI414723: o patótipo 0 compreende isolados que não induzem sintomas, o patótipo 1 induz sintomas de necrose sistêmica e o patótipo 2 de amarelecimento, murcha, mosaico e deformação das folhas (DESBIEZ; LECOQ, 1997).

A resistência ao patótipo 0 de PI414723 foi inicialmente descrita por Lecoq e Pitrat (1984) como sendo controlada por um único gene denominado *Zym-1*. Posteriormente, com base em análise de segregação de uma população derivada do cruzamento de PI414723 com a cultivar suscetível Dulce, aventou-se a hipótese da existência de outros dois genes dominantes de ação aditiva, denominados *Zym-2* e *Zym-3*. Os três genes são necessários para um alto nível de resistência (DANIN-POLEG et al., 1997). O gene *Zym-1* foi mapeado no grupo de ligação 2 (LGII) próximo ao marcador microssatélite CMAG36 por Périn et al (2002). Já o gene *Zym-2*, apresenta efeito fenotípico menos pronunciado e com possível interação epistática com alelos de *Zym-1*, foi tentativamente localizado pelo nosso grupo de pesquisa no grupo de ligação 10 (LGX) mas sua ligação com marcadores microssatélites ainda está por ser confirmada (WASSANO, 2013; BIBIANO, 2016). Quanto ao *Zym-3*, sua existência ainda é uma suposição.

Os efeitos individuais dos genes *Zym-1* e *Zym-2* na dinâmica da colonização da planta pelo vírus são desconhecidos. Em plantas F<sub>2</sub> segregantes oriundas do cruzamento entre PI414723 e “Védrantais”, observam-se quatro fenótipos diferentes.

Plantas assintomáticas foram aqui denotadas como pertencentes à classe 1; classe 2 quando apresentaram lesões necróticas semelhantes à de hipersensibilidade em folhas mais velhas, mas não nas folhas apicais; classe 3 quando apresentaram sintomas severos de mosaico, deformação foliar e atrofia; e classe 4 quando apresentaram atrofia severa e sintomas severos de mosaico que evoluíram para morte (Figura 4A). Indivíduos da classe 2 foram classificados como “*recovery phenotype*”. Esse fenótipo foi anteriormente notado por Anagnostou (2000) quando uma população F<sub>2</sub>, inoculada com ZYMV mostrou que esses indivíduos aos 21 d.a.i. (dias após a inoculação) começaram a recuperar sua sanidade e folhas novas surgiram sem sintomas da doença.

Nos programas de melhoramento, os genótipos do melão são geralmente classificados por avaliação fenotípica baseada em categorias de sintomas ZYMV (DANIN-POLEG et al., 1997). Por outro lado, os métodos de fenotipagem reprodutíveis, tais como abordagens de biologia molecular, são melhores para avaliar os níveis de resistência em populações segregadas, uma vez que a categorização dos sintomas não é uma técnica precisa. Um protocolo de quantificação ZYMV por qPCR em tempo real foi desenvolvido por Zeng et al. (2007) utilizando a sequência de proteína de revestimento (CP) de um isolado chinês (GenBank: AF513552.1). O seu protocolo permite exclusivamente a quantificação relativa de ZYMV comparando os valores do limiar de ciclo (Cq) de amostras infectadas com os valores Cq normalizados da planta 18SrRNA. A quantificação viral absoluta baseada em números de cópias é mais precisa para a análise de títulos virais em genótipos inoculados. Além disso, o desenvolvimento de um novo protocolo de quantificação ZYMV foi necessário para superar as divergências nas sequências de proteínas do revestimento entre o isolado brasileiro e o chinês (BIBIANO, 2016).

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os efeitos do gene *Zym-1* nos fenótipos e nos títulos virais de plantas segregantes para resistência a ZYMV de uma população F<sub>2</sub> oriunda do cruzamento entre PI414723 e 'Védrantais'. Para isso foi realizada a fenotipagem de uma população F<sub>2</sub>, segregante para o gene de resistência *Zym-1*, derivada do cruzamento entre PI414723 e Védrantais e inoculada com o vírus do ZYMV e identificar plantas de fenótipos distintos; quantificação do vírus nesses fenótipos através da técnica de PCR em tempo real e avaliação para verificar se há diferenças entre eles; genotipagem das plantas dos diferentes fenótipos para o gene *Zym-1* por meio de marcador microssatélite CMAG36 e averiguar se os fenótipos pertencem ao genótipo em questão. Não há relatos que relacionem fenótipos a genótipos no locus *Zym-1*. A hipótese é que as classes fenotípicas intermediárias devem refletir combinações de alelos de resistência e de suscetibilidade, e a identificação das identidades desses alelos através do uso de marcadores moleculares é o objeto de investigação desta dissertação.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e inoculação com *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

O material vegetal constitui uma população F<sub>2</sub> produzida derivada do cruzamento do acesso resistente PI414723, acesso indiano do grupo *Momordica*, resistente ao patótipo 0, com a variedade altamente suscetível 'Védrantais', uma cultivar de melão do grupo *Cantalupensis*, altamente suscetível ao vírus (PITRAT AND LECOQ, 1984). Além disso, também foram utilizados os genitores ('Védrantais' e PI414723) e o genótipo F<sub>1</sub> como controles (Figura 1).



Figura 1. Fenótipos de plantas PI414723, F1 e 'Védrantais', inoculadas e não inoculadas com ZYMV.

O isolado de ZYMV utilizado foi o RN6-F, obtido a partir de amostras de folhas de diferentes híbridos de meloeiro com sintomas de mosaico e distorção foliar que

foram coletadas em regiões produtoras de melão do Rio Grande do Norte em 2011 (WASSANO, 2013). O isolado foi mantido em folhas herbarizadas de melão e por inoculações sucessivas em plantas de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta' cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da ESALQ – USP.

Para este trabalho foram utilizados 300 indivíduos F<sub>2</sub> selecionados ao acaso de um experimento maior, com 850 indivíduos, conduzido em duas casas de vegetação da Estação Experimental da empresa Sakata Seeds Sudamerica, situada em Bragança Paulista, município do Estado de São Paulo (23°00'46.1"S 46°35'18.0"W), pela doutoranda Camila Perdoncini Carvalho como parte de seu projeto de tese. As sementes foram germinadas em papel de germinação GermTest por 2 dias em câmara FABBE (modelo 192) com 100% de umidade e a 27°C. Após germinadas, foram transplantadas para vasos de 800g com vermiculita, substrato *Tropstrato HT Hortaliças – Vida Verde* e solo na proporção 1:6:25 Kg onde continuaram sendo cultivadas em duas casas de vegetação, seguindo delineamento inteiramente ao acaso. Além disso, em uma das casas de vegetação foi feita a suplementação com fertilizante Yoorin Master (16% Ca, 6,5% Mg, 6% S, 0,1% B, 0,05% Cu, 0,3% Mn, 9% Si, 0,55% Zn), Minercal Agrícola (Pnrt 91%, Mg 13%) e NPK 4/14/8, na proporção 1:1:2,5 Kg. Na outra casa de vegetação foi utilizado somente substrato. Em ambas as casas de vegetação, foram plantadas as seguintes variedades para monitoramento do inóculo de ZYMV: *Cucurbita pepo* var. 'Caserta' (abobrinha de moita), a qual apresenta os sintomas do mosaico amarelo após a inoculação; *Cucumis melo* variedade 'CAC', o qual morre na presença do vírus; e *Chenopodium amaranticolor*, espécie que apresenta lesões necróticas no ponto da inoculação.

Na fase cotiledonar, em torno de 8 dias após a sementeira, as plantas foram inoculadas com o vírus. Como controle foram incluídas cinco plantas inoculadas e cinco plantas não-inoculadas de cada genitor (PI 414723 e 'Védraçais') e da geração F<sub>1</sub>. Como inóculo, folhas de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta' infectadas com o isolado RN6-F de ZYMV, foram maceradas em liquidificador com tampão de fosfato de potássio 0,02 M (pH 7,0) acrescidos de sulfato de sódio 0,02 M na proporção 1:10 (p:v). O vírus foi inoculado mecanicamente por dois esfregaços consecutivos de um chumaço de algodão embebido na suspensão de inóculo na superfície cotiledonar previamente polvilhada com carborundum (ANAGNOSTOU; JAHN; PERL-TREVES, 2000).

Oito dias após a inoculação (d.a.i.) a folha apical (segunda folha verdadeira) foi colhida para extração de RNA e quantificação de ZYMV, e aos 15 d.a.i. a primeira folha verdadeira foi colhida para extração de DNA e genotipagem com o marcador CMAG36 SSR.

## **2.2. Avaliação fenotípica da população F<sub>2</sub>**

As plantas foram avaliadas visualmente aos 21 d.a.i. e classificadas de acordo com uma escala de notas de sintomas de quatro classes: plantas assintomáticas (classe 1); plantas que apresentaram lesões necróticas semelhantes à da resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas mais velhas, mas não nas folhas apicais (classe 2); plantas que apresentaram sintomas severos de mosaico, deformação foliar e atrofia (classe 3); plantas que apresentaram atrofia severa e sintomas severos de mosaico que evoluíram para morte (classe 4) (Figura 4A).

Durante a avaliação fenotípica, notou-se a presença de indivíduos da classe 2 que apresentavam sintomas leves, como pontos cloróticos e leve mosaico, apenas nas folhas mais velhas, porém as folhas mais novas cresciam saudáveis e “recuperavam” esses sintomas (Figura 2). Elas foram chamadas de “*recovery phenotype*”, já anteriormente identificadas por Anagnostou et al. (2000).

Elas foram então coletadas e armazenadas para posterior análise de quantificação viral.



Figura 2. Planta pertencente à classe 2, classificada como “*Recovery phenotype*”

### 2.3. Extração de RNA e quantificação viral em plantas F<sub>2</sub> por RT-qPCR

Para a quantificação viral, o RNA total foi extraído da segunda folha verdadeira, coletada aos 8 d.a.i. de todos os indivíduos e, também, aos 21 d.a.i. dos 46 indivíduos pertencentes ao fenótipo classe 2 (“*recovery phenotype*”), neste caso, foi coletada a última folha com sintoma e a folha apical que já não apresentava sintoma algum de cada indivíduo. As folhas coletadas foram congeladas e mantidas a -80°C até a extração, onde foram maceradas em almofariz de porcelana previamente esterilizado e congelado com nitrogênio líquido. Para a extração, foi utilizado 1 mL de Trizol® para cada 100 mg de tecido macerado. Após, foi utilizado o kit PureLink RNA Mini kit (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante.

Ao final da extração, o RNA foi tratado com 1 µL de enzima DNase para cada 1 µg de RNA, utilizando o kit DNase I Amplification Grade (Invitrogen). A qualidade do RNA foi verificada através de gel desnaturante de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta em transiluminador. Em seguida, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific®), sendo utilizadas apenas amostras com concentração superior a 400 ng/µL.

Quatrocentos ng de RNA foram utilizados para a síntese do cDNA, realizada com o kit GoScrip Reverse Transcription System (Promega®) de acordo com as informações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação de partículas

virais por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com base em curva padrão de titulação viral desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular utilizando a sequência do gene de cópia única que codifica a capa proteica do ZYMV (BIBIANO, 2020). As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante (RAMAKERS et al., 2003). Para cada reação foi utilizado 2 µL de cDNA diluído 1:100 (v:v); 6,25 µL de tampão de amplificação Master Mix (Promega®); 0,5 µL de cada primer (CPF - GGTTATGATGGACGGGAATG e CPR2 - ATATCGTGCCAACTCCTATCC) na concentração de 10 µM e água isenta de nucleases para um volume final de 12,5 µL. O protocolo de amplificação consistiu em um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento e extensão a 61°C por 45 segundos. As curvas de dissociação foram analisadas para confirmar a especificidade dos produtos amplificados.

Uma diluição em série de um plasmídeo recombinante contendo um fragmento parcial do gene da capa proteica da estirpe ZYMV-RN foi usada para gerar uma curva padrão relativa aos valores Cq, para estimar o número de partículas virais, já que se trata de um único gene de cópia. A equação que descreve a curva é  $[Cq = -3,167 * \text{Log}(\text{partículas virais}) + 40,18]$  ( $R^2 = 0,98$ ). Os valores Cq de 15 e 31 corresponderam às maiores e menores concentrações de partículas virais de 108 e 103 partículas virais/ng de RNA, respectivamente (BIBIANO, 2020).

O Cq é uma medida relativa da concentração do fragmento alvo na reação de PCR, ou seja, para valores dos indivíduos acima de 34 foram geradas curvas de *melting* inespecíficas para o fragmento alvo e a amostra foi considerada negativa. Nesses casos, considerou-se que as plantas estavam isentas do vírus, ou seja, apresentaram título viral igual a 0.

Os valores de Cq obtidos foram normalizados no software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), o qual determina a eficiência da PCR quantitativa para cada amostra a partir de uma regressão linear.

#### **2.4. Genotipagem de plantas F<sub>2</sub> com loco microssatélite**

Para a genotipagem com o marcador CMAG36 ligado ao *Zym-1* (PÉRIN et al., 2002), o DNA genômico foi extraído das primeiras folhas verdadeiras, coletadas aos

15 d.a.i e mantidas em ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em almofariz de porcelana e o tecido foi transferido para microtubos de 1,5 mL, preenchendo aproximadamente metade do tubo. A cada tubo foi adicionado tampão de extração 1:1 (amostra:tampão) (3% CTAB; 10% Tris-HCl pH 8,0; 4% EDTA 0,5M pH 8,0; 28% NaCl 5M; 3% PVP; 0,2%  $\beta$ -2 mercaptoetanol; 24,8% água destilada) e as amostras foram incubadas por 45 minutos em banho-maria à  $65^{\circ}\text{C}$  e agitadas a cada 10 minutos. Após este período, foi adicionado 600  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a  $23^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado de 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram centrifugados novamente e o sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após este período, foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante (isopropanol) foi descartado, deixando somente o pellet ao qual foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de NaCl 1M em cada amostra para a limpeza do DNA. O pellet foi aquecido a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e, então, dissolvido. Novamente as amostras foram levadas à incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  (geladeira) por 30 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . A limpeza dos pellets foi realizada por lavagem em série com 700  $\mu\text{L}$  de etanol (75%, 90% e 100%). Os pellets foram secos a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa por 30 minutos. O RNA contaminante foi digerido pela adição de 20 mg de Pure Link RNaseA (Invitrogen) seguido de incubação novamente a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O DNA foi suspenso em um volume de 50  $\mu\text{L}$  de água nuclease free e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific®), sendo aceitas apenas amostras com concentração superior a 50 ng/ $\mu\text{L}$ . A qualidade do DNA também foi verificada em gel de agarose 2%, visualizado em luz ultravioleta em transiluminador. A sequência do primer, bem como sua condição de anelamento é F-TACATTATGGGTAAGGTAAG e R-CCATCTCTTAACTTTCTCTC ( $53^{\circ}\text{C}$ ) (PÉRIN et al., 2002).

As reações de amplificação de loco microsatélite por PCR consistiram em 2  $\mu\text{L}$  de DNA não diluído (concentração acima de 50ng/  $\mu\text{L}$ ), 0,6  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (aqui, inclua o nome e sequência dos primers F e R), 1X PCR GoTaq MasterMix (Promega) e água livre de nucleases para completar o volume de 12  $\mu\text{L}$  por reação. As condições de amplificação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, 30 segundos em

temperatura de anelamento especificada acima, extensão a 72 °C por 1 minuto e, por fim, uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

O produto de PCR foi resolvido por eletroforese em gel de agarose 2%. Para isso, foram carregados 7 µL por poço, sendo 28% do volume de tampão de carregamento para ácidos nucleicos, e 72% do produto de PCR. As condições utilizadas para a eletroforese foram 40 V durante 20 minutos, seguidos de 60 V durante 40 minutos. Para a análise dos tamanhos dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador molecular de 100 pb (Invitrogen).

Para a classificação dos genótipos das plantas com base na análise dos géis, utilizamos sempre DNA de indivíduos 'Védrantais', PI414723 e FI que foram extraídos juntamente com as amostras. Com isso, pudemos fazer uma comparação das bandas juntamente com esses controles positivos (Figura 6).

## **2.5. Análise de dados**

A análise de regressão linear utilizada para determinar a curva de quantificação padrão por qPCR de ZYMV foi realizada utilizando o software STATISTICA® (versão 7.0, StatSoft, Tulsa, EUA). O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparar médias porque os dados de títulos virais tiveram distribuição não-normal.

Os genótipos das plantas F<sub>2</sub> no locus do marcador CMAG36 foram determinados comparando visualmente os tamanhos dos fragmentos amplificados em gel com os dos genótipos dos pais e híbridos. As plantas foram classificadas como R, H, ou S no caso de homozigóticas para os alelos marcadores PI414723, H heterozigóticas e S se homozigóticas para os alelos de 'Védrantais', respectivamente. A conformação das proporções de segregação observadas em relação à proporção esperada de 1R:2H:1S no caso de um marcador codominante foi avaliada pelo teste de qui-quadrado.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Quantificação do ZYMV por qPCR

Os valores de concentração inicial de RNA das amostras extraídas variaram de 400 a 4000 ng/ $\mu$ L, mostrando a eficiência do protocolo de extração e um rendimento satisfatório. As amostras apresentaram integridade adequada quando visualizadas no gel de RNA a 1% podendo ser observado através da distinção das bandas 28S e 18 S que correspondem às frações de RNA ribossomal (Figura 3).

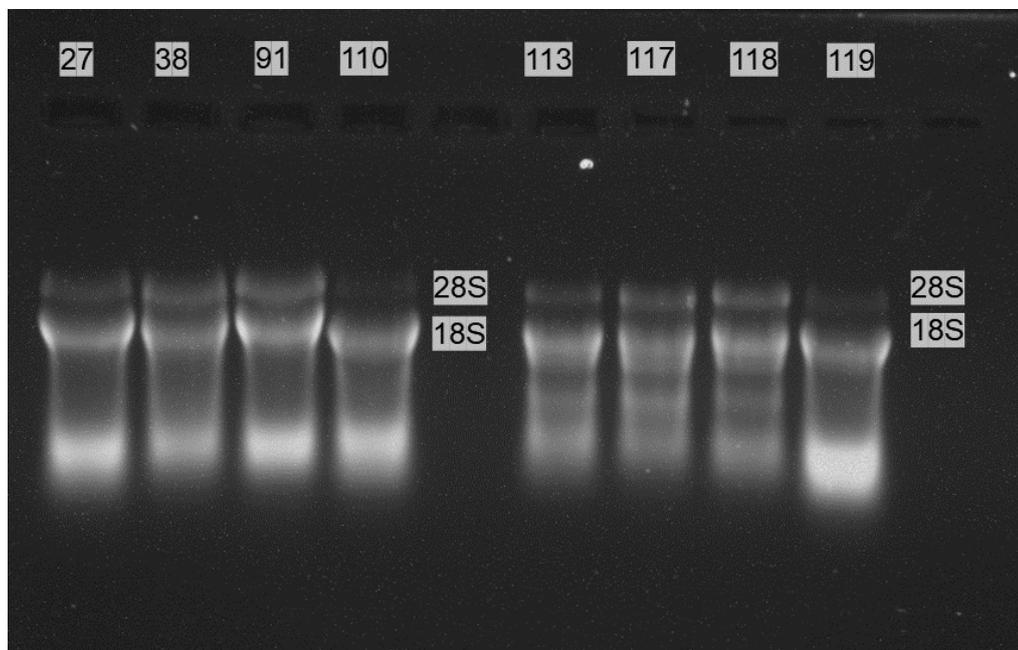


Figura 3. Gel de RNA a 1% para confirmação de qualidade do material extraído

Quatro tipos de reação, classificados de 1 a 4, foram observados nas plantas de F<sub>2</sub> 21 dias após a inoculação quando as plantas tinham de seis a oito folhas: 1 = sem sintomas; 2 = um "*recovery phenotype*" onde as plantas apresentavam sintomas de mosaico até a terceira ou quarta folha e, então, se recuperavam; 3 = mosaico sistêmico, clorose e retardo de crescimento; 4 = sintomas do tipo três seguidos de morte (Figura 4A). Correspondentemente, o número de plantas em cada classe foi de 120, 58, 69 e 51. Todas as plantas PI414723 e F<sub>1</sub> pertenceram à classe 1, enquanto as plantas 'Védrantais' pertenceram à classe 4.

Os valores de C<sub>q</sub> das plantas inoculadas foram superiores a 34 e a inspeção de suas curvas evidenciou ampliações não específicas (dados não mostrados). Portanto, este valor C<sub>q</sub> foi considerado o limite de detecção e as plantas com C<sub>q</sub>  $\geq$  34

foram consideradas livres de vírus. Nenhum vírus foi detectado em plantas do genótipo resistente PI414723 (n=4), enquanto naquelas de 'Védrantais' (n=4) o número de partículas virais/ ng de RNA variou de 10.471 a 20.386 (média = 14.376). Curiosamente, ZYMV foi detectado em plantas de F<sub>1</sub>, embora em quantidades muito baixas em comparação a 'Védrantais' (faixa = 4 a 10 partículas; média = 6). A distribuição de frequência dos títulos virais em 298 indivíduos da população F<sub>2</sub> não apresentou normalidade, com uma frequência maior de plantas com títulos entre 0 e 10.000 partículas virais/ ng RNA (Figura 4B), variando de 0 a aproximadamente 47.393. O ZYMV não foi detectado em 78 plantas (26%). Como esperado, os títulos virais aumentaram de acordo com a intensidade dos sintomas (Figura 4 A-B). Apesar dos altos desvios padrão, os títulos virais médios das reações 1 e 2 diferiram entre si e de 3 e 4, mas não houve diferença entre as reações 3 e 4 ( $P \leq 0,01\%$ ; Figura 4B; Tabela 2). Os títulos virais das reações 1 foram dez e 170 vezes inferiores aos das reações 2 e 3-4, respectivamente (Tabela 2). Vale notar que o ZYMV não foi detectado por qPCR em plantas de todas as classes, embora em uma frequência menor nas classes 3 e 4 em comparação com as 1 e 2 (aproximadamente 7% em 3-4 e 38% em 1-2). Os títulos virais de quatro plantas F<sub>2</sub> da classe 4 foram duas vezes maiores do que o valor máximo do genitor suscetível (ou seja, >40.000 partículas).

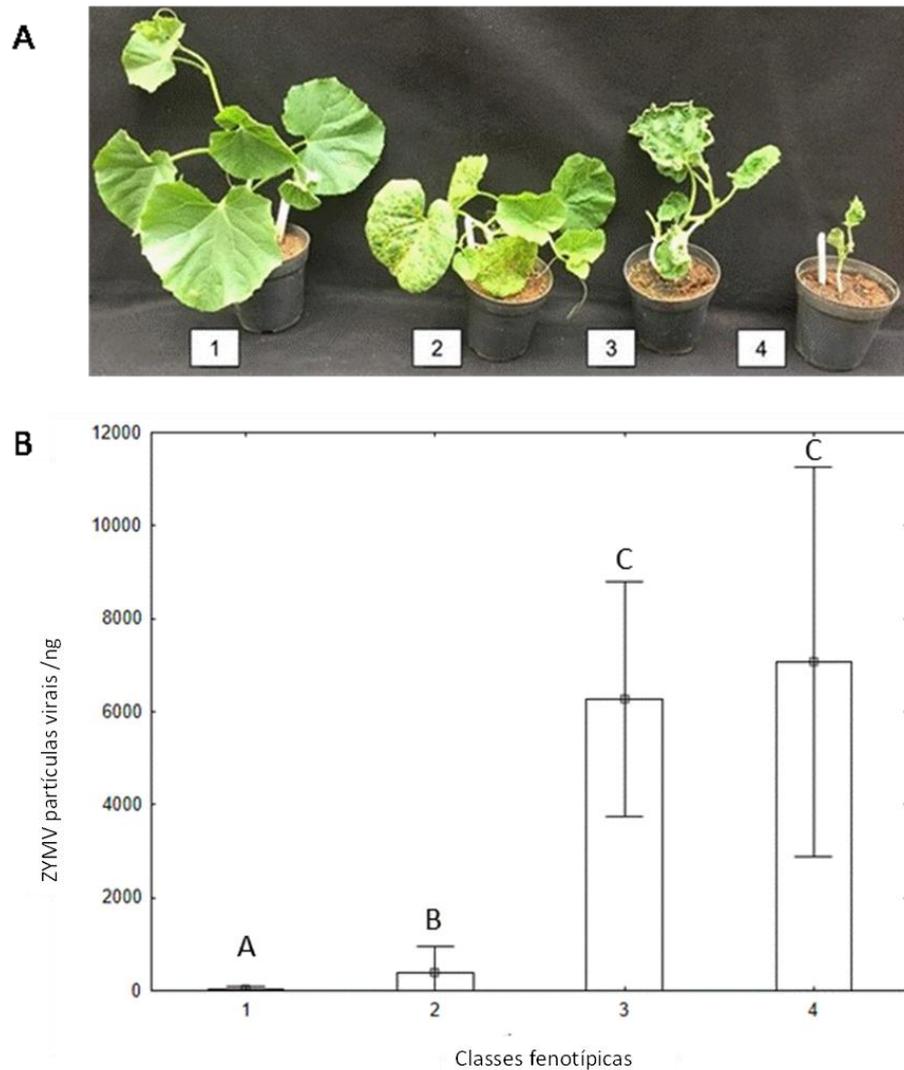


Figura 4. (A) Classes fenotípicas da população  $F_2$  aos 21 dias após a inoculação (d.a.i) e (B) Títulos virais (partículas virais de ZYMV/ng de RNA) aos 8 d.a.i por classe fenotípica. As barras representam intervalos de confiança de 95%. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças entre médias de acordo com o teste Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,01\%$ ).

**Tabela 1.** Número de plantas da população  $F_2$  e média  $\pm$  desvio padrão, mínimo e máximo número de partículas virais/ng de RNA total em cada classe

Classe	Número de plantas	Média $\pm$ Desvio padrão	Mínimo	Máximo
1	120	36 $\pm$ 257A*	0 (n=57)	2,533
2	58	396 $\pm$ 2,062 B	0 (n=11)	15,512
3	72	6,275 $\pm$ 10,744 C	0 (n=5)	64,426
4	51	7,070 $\pm$ 14,902C	0 (n=4)	88,440

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.01\%$ ).

Os títulos virais das últimas folhas com sintoma coletadas aos 21 d.a.i dos 46 indivíduos que apresentaram sintomas do tipo 2 (*Recovery phenotype*) apresentaram maior quantidade de partículas virais quando comparadas com as folhas apicais das mesmas plantas (Figura 5).

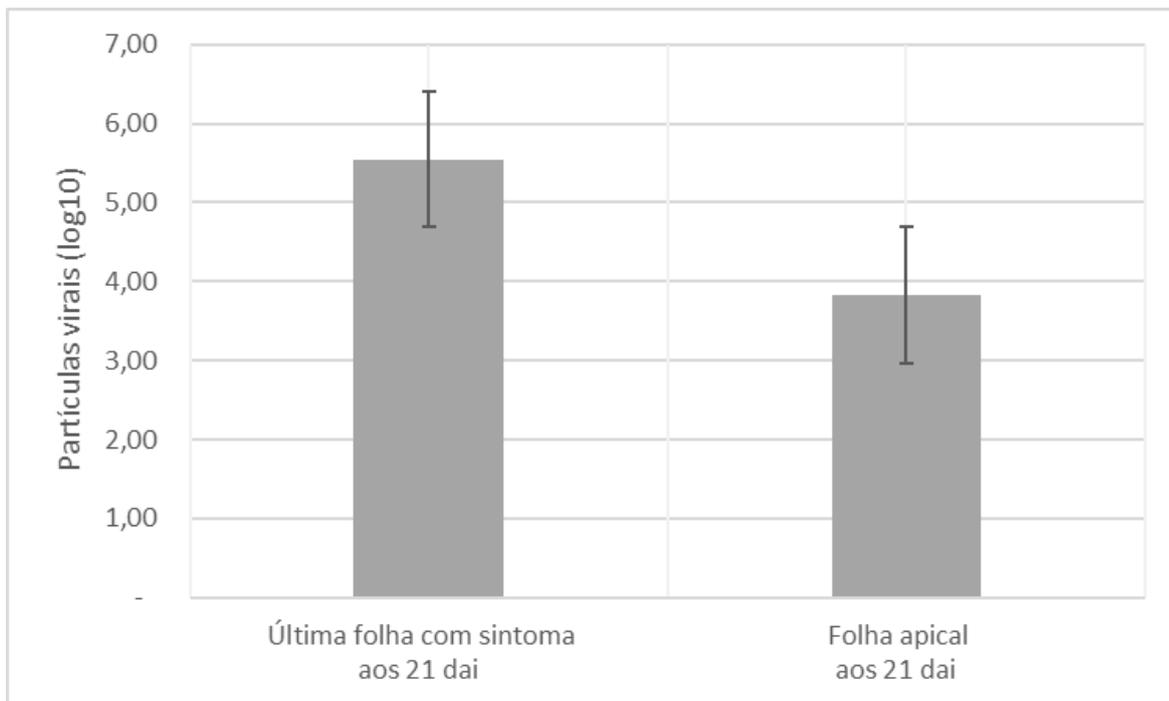


Figura 5. Valor médio de partículas virais/ng de RNA (em escala logarítmica) em função das últimas folhas com sintoma e folhas apicais dos indivíduos da classe fenotípica 2.

### 3.2. Genotipagem com o marcador CMAG36

Dos 300 indivíduos selecionados da população F<sub>2</sub>, 241 indivíduos foram efetivamente genotipadas com o marcador CMAG36 (Figura 6).

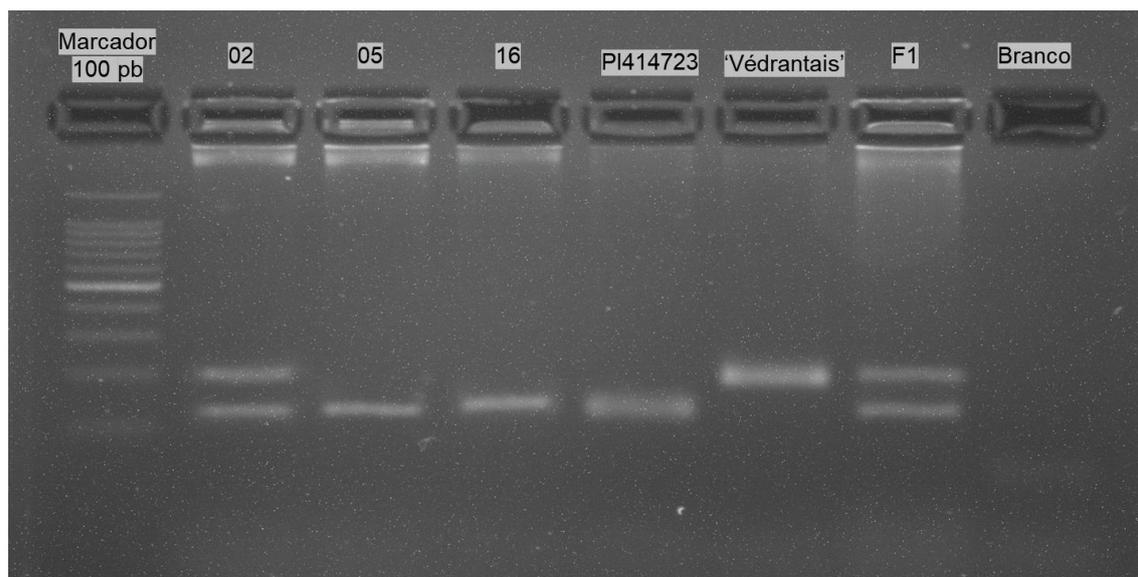


Figura 6. Representação de fragmentos de DNA amplificados no locus marcador CMAG36 resolvidos em gel de agarose.

Os genótipos das plantas foram determinados de acordo com o tamanho dos fragmentos nos géis de agarose (Figura 6), sempre sendo comparadas com os padrões dos genitores e do F1.

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$  tabelado = 5,991, com dois graus de liberdade e 5% de significância) mostrou que o marcador não apresentou distorções de segregação, uma vez que as frequências observadas de indivíduos homocigóticos para o parental PI414273 (R), heterocigóticos (H) e homocigóticos para o parental 'Védrantais' (S) não diferiram das frequências esperadas (1:2:1) no caso de segregação de marcador codominante (Tabela 2).

**Tabela 2.** Frequências esperadas e observadas da genotipagem com o SSR CMAG36 e resultado do teste de qui-quadrado para a adequação ao modelo 1:2:1 de segregação.

Marcador SSR	Genótipos	Frequência esperada	Frequência observada	Valor $\chi^2$ calculado
CMAG36	R	60	60,25	0,07 n.s
	H	119	120,5	
	S	62	60,25	

\*R – Indivíduos homocigóticos para o alelo marcador de PI414273

\*H – Indivíduos heterocigóticos.

\*S – Indivíduos homocigóticos para o alelo marcador de 'Védrantais'

n.s. – não significativo ( $p = 0,05$ ).

Em nível de fenótipo, a maioria das plantas F<sub>2</sub> do genótipo R (45 de 59 ou 76%) apresentou reação do tipo 1, a maioria das S apresentou reações 3 e 4 (45 de 55 ou 82%), ao passo que as reações das plantas heterozigóticas se distribuíram de forma mais homogênea entre os tipos de reação (Figura 7). O interessante foi que seis plantas R apresentaram reação de suscetibilidade (reações 3 e 4) e 10 S apresentaram reações de resistência (reações 1 e 2) (Figura 7). Como esperado, as reações médias das três classes genóticas diferiram entre si (Figura 4A). A reação média das plantas S foi aproximadamente o dobro da verificada nas plantas R, ao passo que as plantas heterozigóticas apresentaram reações intermediárias. No entanto, estas não refletiram diferenças quanto à multiplicação do ZYMV, uma vez que os títulos virais das plantas R e H, que foram bem baixos, não diferiram entre si (Tabela 3; Figura 4B). Em contraste, o título médio das plantas S foi aproximadamente 59 vezes mais alto (Tabela 3).

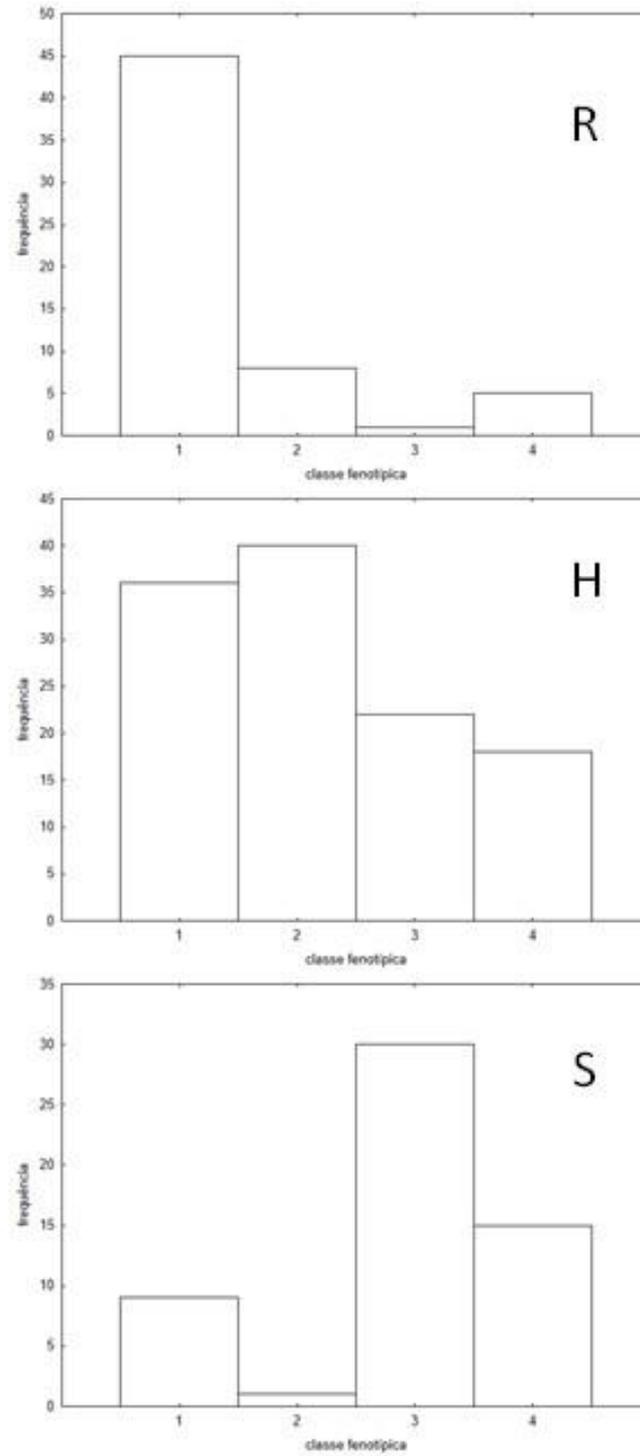


Figura 7 – Distribuição de frequências de classes fenotípicas de reação ao ZYMV em plantas  $F_2$  homozigóticas para alelos de PI414723 (R), heterozigóticas (H) ou homozigóticas para alelos de 'Védrantais' (S) no locus marcador CMAG36 ligado a *Zym-1*.

**Tabela 3.** Número de plantas F<sub>2</sub> e média ± desvio padrão, e valores mínimos e máximos de títulos virais, (partículas de ZYMV/ ng de RNA) em plantas homozigóticas para alelos de PI414273 (R), heterozigóticas (H) e homozigóticas para alelos de 'Védrantais' no locus marcador CMAG36 ligado a *Zym-1*.

Genótipo	Número de plantas	Título médio ± desvio padrão	Título mínimo	Título máximo
R	59	174 ± 958A*	0	7,279
H	116	100± 380 A	0	2,641
S	55	7,574±9,533 B	0	47,497

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem segundo o teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.01\%$ ).

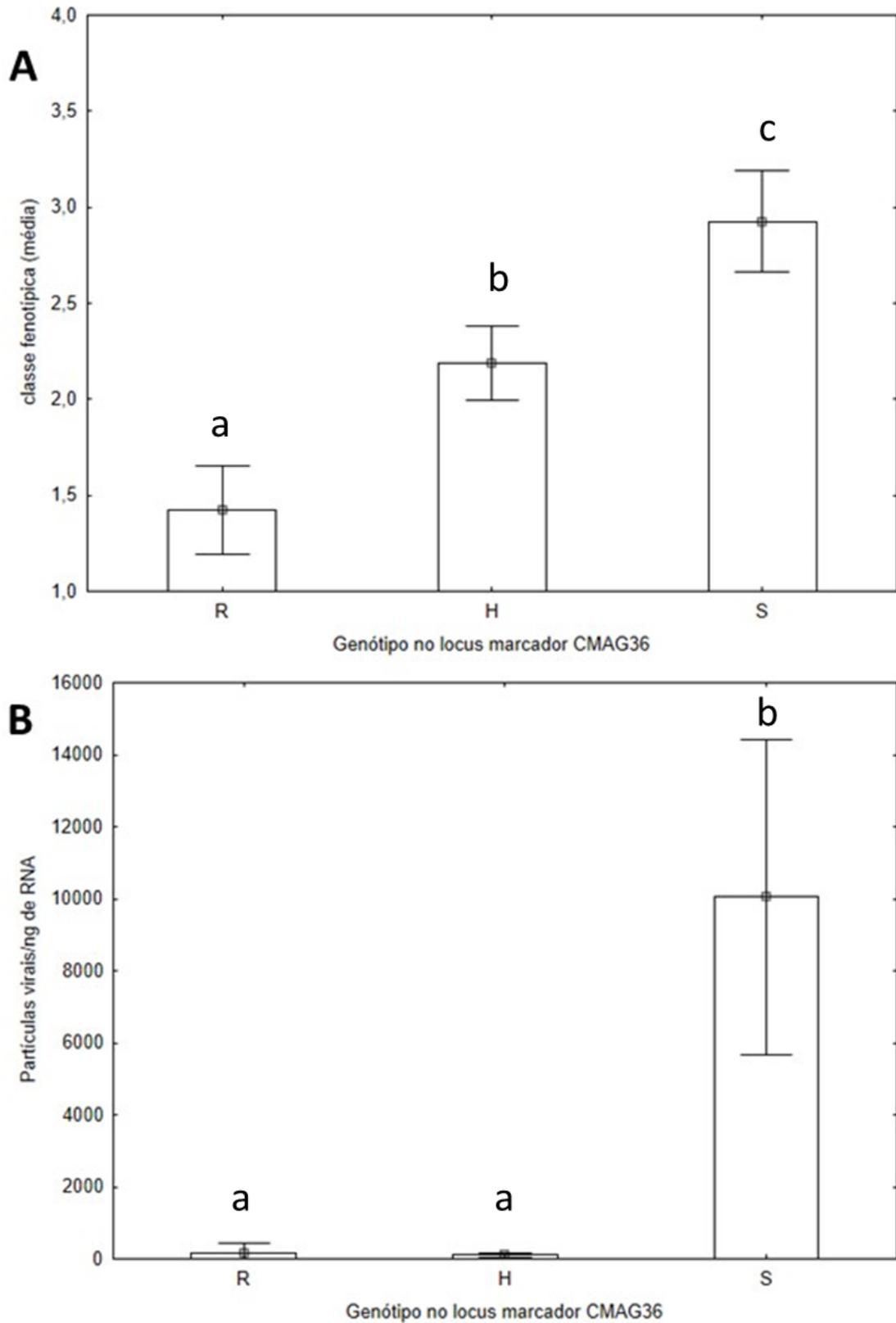


Figura 8. Valores médios das classes fenotípicas (A) e títulos virais de ZYMV (B) de plantas F<sub>2</sub> homocigóticas para alelos resistentes (R) no locus *Zym-1*, heterocigóticas (H) ou homocigóticas para alelos de suscetibilidade (S) inferidos por seus genótipos no locus marcador CMAG36.



#### 4. DISCUSSÃO

Programas de melhoramento vegetal dependem do conhecimento dos genes que governam a resistência genética e de seus modos de ação para estabelecer a melhor estratégia de seleção. A defesa de plantas a ataque de patógenos pode ser por meio de resistência quantitativa ou qualitativa. No primeiro caso, existem múltiplos genes de resistência que atuam em conjunto em etapas subsequentes ao reconhecimento do patógeno (resistência horizontal). Já no segundo, a resistência é controlada por genes R de grande efeito fenotípico que em alguns casos estão envolvidos no reconhecimento do patógeno (CAMARGO, 2018; JONES; DANGL, 2006).

A severidade da infecção do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em melão é avaliada através da escala visual de sintomas, desenvolvida por Danin-Poleg et al. (1997) cujos tipos de reação são: 0 = ausência de sintomas, 1 = pontos cloróticos, 2 = sintomas de mosaico, 3 = mosaico severo e distorção do limbo foliar, 4 = necrose das folhas. Para o presente trabalho, uma população segregante F<sub>2</sub> inoculada com ZYMV foi avaliada fenotipicamente e considerou-se a escala modificada da seguinte forma: 1 = plantas assintomáticas, 2 = plantas com lesões necróticas semelhantes à de hipersensibilidade em folhas mais velhas, mas não nas folhas apicais, denominadas de “*recovery phenotype*”, 3 = plantas com sintomas severos de mosaico, deformação foliar e atrofia e 4 = plantas com atrofia severa e sintomas severos de mosaico com evolução para a morte. O método de fenotipagem de populações segregantes é muito usual em programas de melhoramento sendo aplicado principalmente a resistências do tipo qualitativa. A classificação das plantas em resistentes ou suscetíveis por esta abordagem, no entanto, não permite uma avaliação mais detalhada dos níveis de resistência que possam existir entre as diferentes classes de sintomas (PITRAT; LECOQ, 1984; DANIN-POLEG et al., 1997, 2002; ANAGNOSTOU et al., 2000; HAREL-BEJA et al., 2010).

As reações das plantas de PI414723 e ‘Védrantais’ foram classificadas nas classes 1 e 4, respectivamente, existindo, porém, duas classes intermediárias entre elas na população segregante (classes 2 e 3). Assim como o genitor resistente PI414723, os indivíduos F<sub>1</sub> também apresentaram reações de classe 1. Essa avaliação e classificação dos indivíduos da população F<sub>2</sub>, sugere inicialmente que a resistência conferida por *Zym-1* é dominante.

Como sabemos, somente a avaliação qualitativa através de escalas podem não identificar pequenas diferenças em níveis de resistência, ou seja, a análise visual de sintomas pode dificultar a seleção de plantas resultando no chamado 'efeito Vertifolia' proposto por Vanderplank (1963), no qual o melhoramento para a resistência vertical leva à perda de resistência horizontal no processo de retrocruzamentos sucessivos para o parental recorrente (suscetível). Devido a isso, além da análise da reação de plantas segregando para o locus *Zym-1* à infecção por meio da análise de sintomas, também foi realizada a quantificação do vírus através da técnica de RT-qPCR, que é um método sensível de quantificação de vírus, como demonstrado por Ramos et al. (2018) com o vírus *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) em plantas de *Cucurbita máxima*.

Para o presente trabalho, além da análise visual de sintomas, o ZYMV foi quantificado em plantas F<sub>2</sub> utilizando um protocolo de qPCR desenvolvido a partir da clonagem do gene de sua capa proteica viral (CP) (BIBIANO, 2020). Com a análise dos resultados notou-se um desvio padrão relativamente alto para as médias dos títulos virais em cada classe fenotípica. Além disto, não foi possível detectar o ZYMV em 7% das plantas que apresentaram sintomas 3 e 4, isto é, sabidamente infectadas, o que indica ser esta a frequência de falsos-negativos desta técnica. Já nas classes 1 e 2, por outro lado, verificou-se uma frequência muito maior, de 38% de indivíduos onde o vírus não foi detectado, indicando que, não obstante a técnica permitir falsos-negativos, espera-se que, em parte destes indivíduos não houve a multiplicação do patógeno após a inoculação, ou seja, nessas classes observou-se resistência à multiplicação. Alguns fatores podem explicar esse escape. O primeiro, e talvez mais importante, é a padronização da concentração do inóculo que não é realizada, como geralmente é feito em outros métodos de inoculação com outros patógenos como, por exemplo, inoculação com bactéria, já que para vírus não existe nenhum método determinado para isso, o que pode causar variações entre plantas durante a inoculação. Outro fator refere-se ao método de inoculação utilizando chumaço de algodão que não é padronizado, pois este pode absorver mais ou menos inóculo de uma planta para outra. A pressão exercida ao inocular uma planta é outra variável, causando mais ou menos ferimentos na planta. Por fim, não é possível determinar a quantidade da primeira fita de cDNA utilizada como molde na reação de transcriptase reversa de qPCR (RT-qPCR). Dessa forma, se a reação não for muito eficiente,

teremos menos DNA molde ou, até mesmo, nenhum, caso a reação não funcione corretamente, o que pode explicar os falso-positivos mencionados acima.

Na avaliação fenotípica observou-se claramente diferenças em títulos virais entre as classes 1-2 e 3-4 e que não houve diferença entre as classes 3 e 4. Dessa forma, considerando a multiplicação viral como variável, vemos que a escala pode ser reduzida de quatro para três classes. A classe 2, denominada de “*recovery phenotype*” já havia sido observada por Anagnostou et al. (2000). De acordo com os autores, após a inoculação com o vírus do ZYMV em plantas de uma população F<sub>3</sub>, a disseminação sistêmica dos sintomas não foi observada em algumas plantas classificadas como resistentes, no entanto, foi observado um mosqueado internerval nas folhas, resultado da infecção local. As análises por qPCR das últimas folhas com sintoma e das folhas apicais destes 46 indivíduos demonstraram que, apesar da ausência de sintomas, as folhas apicais ainda apresentaram certa quantidade de partículas virais, ainda que em menor quantidade quando comparadas com as últimas folhas com sintomas. Isso nos mostra que nestes indivíduos a remissão dos sintomas não decorre do bloqueio da movimentação do ZYMV, mas sim que a expressão de sintomas depende de um nível mínimo de carga viral. Conclui-se que essas plantas se recuperaram dos sintomas, mas não da infecção viral, o que indica que há ao menos dois tipos de reação: uma reação à multiplicação do vírus, expressa pela redução nos títulos, e outra à doença, com a remissão de sintomas. De fato, segundo a proposta de Cooper & Jones (1982) as plantas podem ser resistentes ou suscetíveis à infecção, o que vai levar ao aparecimento ou não de sintomas, pode ser resistente ou suscetível à replicação, aqui ela irá apresentar variações em títulos, e pode ser resistente ou suscetível à movimentação sistêmica do vírus, mostrando que, no início, o vírus infecta a planta e causa sintomas, porém com o tempo ocorre a recuperação desses sintomas e a planta retorna ao seu desenvolvimento saudável. Este fenômeno de remissão de sintomas em partes mais novas das plantas também foi descrito por Gioria et al. (2002) na resposta de maracujazeiro frente ao *Cucumber mosaic vírus*. Neste caso, as plantas foram infectadas e não apresentaram uma resistência à replicação, mas observou-se que ocorria uma resistência à movimentação do vírus, o que sugere o mesmo efeito observado nos indivíduos da classe 2 desse trabalho. Foi, então, realizado um teste de réplica biológica. Para isso, utilizaram folhas das plantas que recuperaram os sintomas para servir como fonte de inóculo para a inoculação em uma outra espécie de maracujá (plantas testadoras). Nessas plantas testadoras ocorreu a infecção e não

houve a mesma recuperação observada anteriormente na outra espécie, o que demonstra que as plantas que recuperaram os sintomas, ainda apresentam vírus e serviram de inóculo para as plantas testadoras.

Os resultados da análise genotípica possibilitaram correlacionar as diferenças entre as classes fenotípicas com as composições alélicas das plantas F<sub>2</sub> no locus *Zym-1*, onde as reações de indivíduos homozigóticos para alelos de resistência (R), heterozigóticos (H) ou homozigóticos para alelos de suscetibilidade (S) no locus *Zym-1* diferiram entre si, confirmando seu grande efeito na reação ao vírus e, mais importante, que a reação média dos indivíduos H diferiu da dos indivíduos R. Por outro lado, ao compararmos a genotipagem com a quantificação viral nesses genótipos, diferente do observado na análise fenotípica, não foi observada diferença entre R e H, ao passo que genótipos S apresentaram 1200 vezes mais partículas virais do que estes. Diante dessas informações, podemos inferir que, nesse caso, a resistência de PI414723 é oligogênica e conferida por mais de um gene, caso contrário os indivíduos heterozigóticos seriam iguais aos indivíduos resistentes em nível de reação, e isso não foi observado. De fato, DANIN-POLEG et al. (1997) sugerem a existência de mais dois genes de resistência neste acesso, *Zym-2* e *Zym-3*, porém a localização destes ainda é desconhecida. Segundo Bibiano (2020), em plantas de 'Védrantais' ocorre a infecção, multiplicação e invasão sistêmica, enquanto em plantas de PI414723, o vírus infecta e pode ou não ser translocado célula-a-célula nos cotilédones, não sendo observada, no entanto, uma invasão sistêmica. Assim, espera-se que estes genes de resistência de PI414723 ainda não identificados e caracterizados do ponto de vista genético governem mecanismos distintos ao de *Zym-1*. Neste caso, este gene controlaria principalmente o processo de multiplicação de ZYMV de modo dominante, como se depreende dos baixos títulos em plantas R e H, mas apresentaria relação de epistase com os demais que controlariam a reação da planta e movimentação sistêmica, explicando a reação intermediária de plantas heterozigóticas diferente das de plantas homozigóticas para alelos de resistência em *Zym-1*.

## 5. CONCLUSÕES

- Na avaliação fenotípica tivemos quatro tipos de reação, classificados de 1 a 4, nas plantas F<sub>2</sub> aos 21 dias após a inoculação.

- A quantificação viral nos mostrou um resultado diferente daquele visto na fenotipagem, no qual as classes 3 e 4 não se diferenciaram, o que nos mostra que, apesar da análise visual nos mostrar 4 classes de sintomas, os títulos virais as classificam em apenas 3.

- Plantas classificadas fenotipicamente como resistentes podem apresentar quantidades de partículas virais evidenciando que, nestas, não ocorre resistência à infecção.

- O marcador CMAG36 possibilitou correlacionar as diferenças entre as classes fenotípicas com as composições alélicas das plantas F<sub>2</sub> no locus *Zym-1*, o que nos permite, portanto, utilizá-lo para selecionar plantas com baixo título.

- Por fim, vimos que a resistência de PI414723 é oligogênica e conferida por mais de um gene.



## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. (2020). Gazeta, 89.

ANAGNOSTOU, K.; JAHN, M.; PERL-TREVES, R. Inheritance and linkage analysis of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Papaya ringspot virus* and *Powdery mildew in melon*. **Euphytica**, v. 116, p. 265–270, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1004005716806>

ARAÚJO, D.V.; MARIANO, R. DE L.R.; MICHEREFF, S.J. Métodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.69-73, 2005.

BIBIANO, L. B. J. Análise de ligação do gene de resistência *Zym-2* com marcadores microssatélites e reação de acessos de meloeiro ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). 66p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BIBIANO, L. B. J. Caracterização dos mecanismos de defesa do acesso PI414723 de *Cucumis melo* L. ao *Zucchini yellow mosaic virus* e seleção de candidatos a genes de resistência no locus *Zym-1*. 86p. (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

BIOTECHNIQUES. Extra-Long First-Strand cDNA Synthesis. **Benchmarks**, vol. 32, pag. 984-985, 2002.

CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**, 5. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 85-92.

DANIN-POLEG, Y.; PARIS, H.S.; COHEN, S. et al. Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. **Euphytica**, v.93, p.331–337, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1002944432083>

DANIN-POLEG, Y.; TADMOR, Y.; TZURI, G.; REIS, N.; HIRSCHBERG, J.; KATZIR, N. Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits and localization of genes associated with ZYMV resistance. **Euphytica**, Heidelberg, v. 125, p. 373-384, 2002.

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

DHILLON, N. P. S.; RANJANA, R.; SINGH, K.; EDUARDO, I.; MONFORTE, A. J.; PITRAT, M.; DHILLON, N. K.; SINGH, P. P. Diversity among landraces of Indian snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, 1267–1283, 2007.

FAOSTAT STATISTICAL DATABASE. (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

FAZZA, A. C.; DALLAGNOL, L. J.; FAZZA, A. C.; MONTEIRO, C. C.; LIMA, B. M.; WASSANO, D. T.; CAMATGO, L. E. A. Mapping of resistance genes to races 1, 3 and 5 of *Podosphaera xanthii* in melon PI 414723. **Crop Breeding an Applied Biotechnology**, 13(14), 394-355. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000400005>

FERGANY, M.; BALVIR KAUR, A. J.; MONFORTE, A. J.; PITRAT, M.; RYS, C.; LECOQ, H.; DHILLON, N. P. S.; DHALIWAL, S. S. Variation in melon (*Cucumis melo*) landraces adapted to the humid tropics of southern India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 2, n. 58, p. 225-243, 2011.

FUKINO, N.; OHARA, T.; MONFORTE, A. J.; SUGIYAMA, M.; SAKATA, Y.; KUNIHISA, M.; MATSUMOTO., S. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 1, p. 165–175, 2008.

GAZZOLA, R. et al. Melão: taxas de crescimento da produção, exportação e importação. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 10, n. 3, p. 75-80, 2020.

GIORIA, R., ESPINHA, L. M., REZENDE, J. A. M., GASPAR, J. O., KITAJIMA, E. W. Limited movement of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, v. 51, p. 127-133, 2002.

JONES, J., DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

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

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

LECOQ, H.; KATIS, N. Control of cucurbit viruses. **Virus Research**, v.90, p.255-96, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00005-6. PMID: 25410104.

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

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

NOGUEIRA, D. W.; MALUF, W. R.; FIGUEIRA, A. R.; MACIEL, G. M.; GOMES, L. A. A.; BENAVENTE, C. A. T. Combining ability of summer-squash lines with different degrees of parthenocarpy and PRSV-W resistance. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.4, p.616-623, 2011.

PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, 5. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, p. 323-334, 2016.

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

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

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.

RAMM, A. et al. Comparação entre índices de competitividade do Brasil no mercado internacional de melão in natura. **Revista da jornada da pós-graduação e pesquisa - congrega**, Bagé, RS, v. 14, 2017.

REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Vírus e viroides. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, 5. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 161-180.

RITSCHER, P. S. et al. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 9, 18 maio 2004.

SEBRAE. **O cultivo e o mercado do melão**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-melao,5a8837b644134410VgnVCM2000003c74010aRCRD>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

SILVEIRA, L. M.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA NETO, I. S. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 34, p. 123- 126, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000200008>.

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

WANG, Y., LI, B., LI, X., XI, D. Fluorescent detection of *Zucchini yellow mosaic virus* based on recombinase polymerase amplification and enzyme-assisted signal amplification. **Microchemical Journal**, China, v. 159, p. 2-8, 2020.

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