

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

**Caracterização da resistência da moranga (*Cucurbita maxima*)  
‘Exposição’ ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não  
interferência de dois potyvirus na resistência das plantas.**

**Vanessa Cícera dos Santos**

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

**Piracicaba  
2011**

Vanessa Cícera dos Santos  
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização da resistência da moranga (*Cucurbita maxima*) 'Exposição' ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirus na resistência das plantas.**

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

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

**Piracicaba  
2011**

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

Santos, Vanessa Cícera dos

Caracterização da resistência da moranga (*Cucurbita maxima*) "Exposição" ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirus na resistência das plantas / Vanessa Cícera dos Santos. - - Piracicaba, 2011.  
57 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Cucurbitaceae 2. ELISA 3. Reação em cadeia por polimerase 4. Virus de plantas  
I. Título

CDD 635.6  
S237c

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

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Angelo e Maria do Carmo por toda dedicação, paciência e amor incondicional que me levaram a conquista de mais uma etapa,

## **DEDICO**

Ao meu esposo Bruno, à minha irmã Larissa e à minha pequena Giovana, pelo amor, apoio e incentivo,

## **OFEREÇO**



## AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida e pelo amor ciumento e zeloso que me conduziram em todos os momentos para que mais esta graça pudesse ser alcançada;

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela orientação sempre muito próxima, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos e conselhos profissionais, pelo apoio, pelo incentivo, por toda compreensão, pela amizade e pelas lições de vida;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, especialmente ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pela oportunidade concedida à realização deste curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos valiosos conhecimentos transmitidos, em especial ao professor Dr. Nelson S. Massola Jr. pela compreensão e apoio que me ajudaram a terminar este trabalho no tempo previsto;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial José Edivaldo Buriola e Pedro C. Arthuso pela ajuda, convivência e ensinamentos que não se aprende em sala de aula;

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, em especial aos colegas do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos pela convivência sempre agradável;

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal: Pedro, Débora, Ana Carolina, Viviana, Carla, David e Ana Paula Mello, pela amizade, conselhos, apoio e principalmente pela ajuda e carinho na etapa final da realização deste trabalho;

Aos amigos de Campinas que contribuíram incentivando e torcendo para que este trabalho fosse concluído;

E finalmente um agradecimento especial aos meus pais, minha irmã e meu marido Bruno, que com todo amor e paciência estiveram ao meu lado contribuindo ativamente para a realização e conclusão deste trabalho, sem eles eu não teria conseguido.

*“ Tudo posso Naquele que me fortalece”*

*Filipenses 4-13*





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão bibliográfica.....	19
2.1.1 Generalidades do ZLCV.....	19
2.1.2 Resposta das plantas aos vírus.....	23
2.2 Objetivos.....	25
2.3 Metodologia.....	25
2.3.1 Preparo de plantas-teste.....	25
2.3.2 Fonte de inoculo dos vírus.....	26
2.3.3 Inoculação mecânica.....	26
2.3.4 Indexação das plantas-teste.....	27
2.3.4.1 PTA-ELISA.....	27
2.3.4.2 Impressão de tecido (“Tissue printing”).....	28
2.3.4.3 RT-PCR.....	29
2.3.4.4 Teste de recuperação biológica do ZLCV.....	30
2.3.5 Avaliação da reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV.....	31
2.3.6 Avaliação da interferência dos potyvirus (PRSV-W e ZYMV) na reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV em casa de vegetação.....	32
2.3.7 Avaliação da interferência dos potyvirus (PRSV-W e ZYMV) na reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV em campo.....	32
2.3.7.1 Monitoramento de tripes nas plantas no campo.....	33
2.3.7.2 Detecção do ZLCV em tripes por impressão em membrana de nitrocelulose.....	33
2.3.8 Sequenciamento do produto da RT-PCR.....	34
2.4 Resultados.....	34
2.4.1 Reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV.....	34

2.4.1.1 Detecção do ZLCV em folhas inoculadas por impressão de tecido.....	36
2.4.2 Interferência dos potyvirus PRSV-W e ZYMV na reação da moranga 'Exposição' ao ZLCV em casa de vegetação.....	37
2.4.3 Interferência dos potyvirus PRSV-W e ZYMV na reação da moranga 'Exposição' ao ZLCV em campo.....	40
2.4.3.1 Tripes coletados nas plantas no campo.....	40
2.4.3.2 Detecção do ZLCV em tripes por impressão em membrana de nitrocelulose.....	41
2.4.4 Sequenciamento parcial do gene da proteína capsidial do ZLCV.....	42
2.5 Discussão.....	44
3 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

## RESUMO

### **Caracterização da resistência da moranga (*Cucurbita maxima*) ‘Exposição’ ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirus na resistência das plantas.**

Nos últimos anos a incidência da clorose letal, causada pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) vem aumentando em plantios de cucurbitáceas e preocupando produtores pelos danos causados na produção. Devido às poucas informações sobre esta virose em cucurbitáceas, somente algumas medidas profiláticas de controle têm sido recomendadas para minimizar a incidência da doença. A resistência genética, seja da forma tradicional ou por meio da transgenia, é considerada a melhor e mais eficiente forma de controle de viroses em geral. Sendo assim essa proposta de pesquisa visou caracterizar a resistência da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV, para gerar informações que auxiliem programas de melhoramento vegetal e também estudar a possível interferência do *Papaya ringspot virus – type W* (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) na resistência das plantas ao ZLCV. A infecção pelo ZLCV e sua movimentação na planta foram avaliadas por PTA-ELISA, RT-PCR, impressão de tecido (“Tissue printing”) e teste de recuperação biológica. Os resultados mostraram que o vírus pôde ser detectado no local da infecção, mas não foi detectado além do ponto de inoculação. Estes resultados sugerem que a moranga ‘Exposição’ apresenta uma resistência à invasão sistêmica de longa distância ao ZLCV. Para verificar a possível interferência dos potyvirus na resistência da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, onde os vírus foram inoculados em mistura nas plantas teste e experimentos em campo onde os potyvirus foram pré-inoculados e a infecção pelo ZLCV ocorreu naturalmente pelo vetor. Em nenhum dos casos foi verificada interferência dos potyvirus na resistência das plantas de moranga ao ZLCV.

Palavras-chave: Cucurbitaceae; Tospovirus; Movimento sistêmico; RT-PCR; PTA-ELISA



## ABSTRACT

### **Characterization of the resistance of winter squash (*Cucurbita maxima*) 'Exposição' to *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and the lack of interference of two potyviruses on plant resistance.**

The occurrence of lethal chlorosis in the past years, caused by *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), has become common in cucurbit crops, which concerns producers in terms of yield losses. Due to the lack of information about this virus disease, only few prophylactic precautions have been recommended in order to minimize the occurrence of the disease. The genetic resistance, either via conventional means or via transgenesis, is considered the most efficient way so far to control virus diseases. With that in mind, the present work aimed to characterize the genetic resistance of winter squash 'Exposição' against ZLCV in order to generate important information for cucurbit breeding programs, as well as to investigate the potential effect of *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in winter squash 'Exposição' resistance against ZLCV. The ZLCV infection and its systemic mobility inside the plant were evaluated by PTA-ELISA, RT-PCR, tissue printing and biological recovery test. The results have shown that ZLCV can be detected at the infection spot, but was not detected beyond the inoculation point. These results suggest that winter squash 'Exposição' is resistant to long-distance systemic invasion of ZLCV. In order to verify the potential interference of the potyviruses on the winter squash 'Exposição' resistance against ZLCV, experiments were carried out into greenhouse, where the viruses were inoculated together into testing plants, and also in field trials, where the potyviruses were pre-inoculated and the infection by ZLCV naturally occurred by the vector. Interference of potyviruses on the winter squash resistance was not observed via the investigation methods presented.

Keywords: Cucurbits; Tospovirus; Systemic movement; RT-PCR; PTA-ELISA



## 1 INTRODUÇÃO

A família Curcubitaceae é composta por duas subfamílias, oito tribos e aproximadamente 118 gêneros e 825 espécies (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Entre essas, melancia, pepino, melão e abóboras são as de maior expressão econômica mundial, enquanto que chuchu, bucha, maxixe e cabaça caxi são cultivadas regionalmente e em menor escala. A produção mundial das principais cucurbitáceas, no ano de 2007, estimada pela Food and Agriculture Organization - FAO (2010), foi acima de 184 milhões de toneladas, sendo que a melancia é a principal espécie dessa família, com cerca de 93,1 milhões de toneladas, seguida pelo pepino (44,6 milhões t), melão (26,1 milhões t) e abóboras e abobrinhas de moita (20,3 milhões t). Para o Brasil, este mesmo órgão estimou, no mesmo ano, a produção apenas de melancia (1,947 milhões t) e melão (196 mil t). O Instituto de Economia Agrícola - IEA (2011) estimou que a produção das principais cucurbitáceas no Estado de São Paulo, no ano de 2010, foi ao redor de 506 mil t, sendo que desta, as produções de melancia, abóbora, chuchu, pepino, abobrinha de moita e melão foram de 202,3; 89,4; 63,7; 72,6; 60 e 18,1 mil t, respectivamente.

Como as demais espécies cultivadas, as cucurbitáceas em geral estão sujeitas a problemas fitossanitários associados a fungos, bactérias e vírus. As doenças causadas por vírus são sempre relatadas como fator limitante no cultivo, pois quando ocorrem em percentuais elevados causam prejuízos na produção como consequência da redução na quantidade e qualidade dos frutos. Sendo assim, os vírus geralmente são os que causam maiores preocupações, pois em regiões e/ou épocas de maior incidência podem afetar culturas inteiras, uma vez que em muitos casos não se dispõem de variedades resistentes/tolerantes e não há medidas curativas de controle. Diversos vírus já foram relatados em cucurbitáceas no Brasil (ALBUQUERQUE; IKEDA; COSTA, 1972; CHAGAS, 1970; COSTA; KITAJIMA; NAGAI, 1972; KITAJIMA et al., 1991; KITAJIMA; COSTA, 1972; LIN; KITAJIMA; MUNHOZ, 1983; NAGATA et al., 2003, 2005; POZZER et al., 1994; REZENDE et al., 1995; SÁ; KITAJIMA, 1991; VEGA et al., 1992; VEGA; REZENDE; YUKI, 1995). Dentre eles, os vírus do mosaico do mamoeiro -



estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type W - PRSV-W) e do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) têm sido considerados os mais importantes, pela predominância em diversas regiões produtoras dessa olerícola no país e pelos prejuízos significativos que geralmente causam à produção. As plantas afetadas produzem menos e os frutos são de baixíssima qualidade (LIMA; FERNANDES; MENDES, 1980; LIMA; VIEIRA, 1992; PAVAN; CARVALHO; FERNANDES, 1989; PEREIRA et al., 2007; YUKI, 1990).

Nos últimos anos o vírus da clorose letal da abobrinha (*Zucchini lethal chlorosis virus* – ZLCV), pertencente ao gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* (BEZERRA et al., 1999; POZZER et al., 1996), tem chamado atenção de produtores nos estados de São Paulo (YUKI et al., 2000), Mato Grosso (STANGARLIN et al., 2001), e Distrito Federal (NAGATA et al., 1998) pela alta incidência, o ZLCV foi detectado em 58% das regiões produtoras de cucurbitáceas do Estado de São Paulo (YUKI et al., 2000) e pelos danos severos a produção. Os danos à produção foram demonstrados experimentalmente por Giampan, Rezende e Piedade (2009) em ensaio com abobrinha de moita ‘Caserta’ infectada com o ZLCV em diferentes idades. Constatou-se que as plantas que exibiram sintomas até os 23 dias após a emergência (DAE) não produziram frutos viáveis para o comércio. Frutos comerciais somente foram colhidos de plantas que apresentaram sintomas a partir dos 42 DAE, porém com redução de 78,5 % na produção.

Além da abobrinha de moita ‘Caserta’, também mostraram-se suscetíveis ao ZLCV a abóbora híbrida ‘Takaiama’, o pepino ‘Safira’, a melancia ‘Crimson Sweet’, o maxixe do Norte, a abóbora rasteira ‘Menina Brasileira’ e a moranga ‘Alice’. A moranga ‘Exposição’ não foi infectada tanto em campo como em casa de vegetação, sugerindo ser altamente resistente a esse tospovírus (GIAMPAN; REZENDE; SILVA, 2007). Leastro (2011), em seu estudo sobre o círculo de plantas hospedeiras do ZLCV, determinado via inoculação mecânica, observou a infecção de outras duas variedades de pepino: Pepino ‘Verde Comprido’ e pepino ‘Caipira Esmeralda’. A moranga ‘Exposição’ novamente não foi infectada pelo ZLCV. No entanto, Rezende<sup>1</sup> (comunicação pessoal) em um experimento exploratório em casa de vegetação indicou

---

<sup>1</sup> REZENDE, J.A.M. Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP.

que a infecção dessa variedade de moranga com o PRSV-W parece ter ocasionado a quebra da resistência ao ZLCV.

Diante desses fatos, este trabalho visou realizar análises complementares para melhor caracterizar a resistência da moranga 'Exposição' ao ZLCV, para que esta variedade seja utilizada em programas de melhoramento vegetal. Também estudou-se a interferência dos dois potyvirus (PRSV-W e ZYMV), predominantes em culturas de cucurbitáceas no país, na resistência dessa variedade de moranga ao ZLCV.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão bibliográfica

#### 2.1.1 Generalidades do ZLCV

O ZLCV é uma espécie do gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* (BEZERRA et al., 1999; POZZER et al., 1996), não há relatos deste fora da América do Sul (PAPPU; JONES; JAIN, 2009). Embora a caracterização dessa espécie seja relativamente recente, os primeiros relatos da infecção de cucurbitáceas com tospovírus no país foram feitos nas décadas de 70 e 80 (COSTA et al., 1972; CUPERTINO et al., 1988; KITAJIMA; COSTA, 1972; SILVEIRA; ÁVILA; MUNOZ, 1985). Naquela ocasião, o vírus foi identificado como sendo o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), causador do vira-cabeça do tomateiro. Como a incidência desse tospovírus em plantios de cucurbitáceas era esporádica, sem danos significativos à produção, o problema foi considerado sem importância e não recebeu adicional atenção. No início da década de 1990, todavia, esse quadro mudou e o ZLCV tem sido encontrado com mais frequência em alguns plantios de cucurbitáceas, algumas vezes associado a danos na produção (GIAMPAN, 2002; NAGATA et al., 1998; REZENDE et al., 1995; REZENDE et al., 1997; STANGARLIN; DIAS; REZENDE, 2000; YUKI et al., 2000). No campo experimental do Setor de Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, desde 1996 tem-se observado alta incidência desse tospovirus em experimentos envolvendo abobrinha de moita 'Caserta', na maioria dos casos ocasionando danos de 100% na produção (J.A.M. REZENDE, dados não publicados). Infecções indesejadas causadas pelo ZLCV foram relatadas em experimentos desenvolvidos no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP por Pereira et al. (2007) e Rezende et al. (1999).

A variabilidade na incidência do ZLCV pode ser constatada em relatos sobre a ocorrência de viroses em cucurbitáceas em diversos estados brasileiros. Rezende et al. (1997) verificaram a ocorrência do ZLCV em campos experimentais de abobrinha de moita e de abóbora rasteira, localizados na região de Campinas, de 1991 a 1994, com incidências de 20% a 78%, alcançando uma média de 50,6%. Estudos realizados no Estado de São Paulo mostraram que o PRSV-W foi o vírus predominante, seguido pelo ZYMV. O ZLCV foi constatado em 7,8% das amostras analisadas por Yuki et al. (2000).

Em um experimento de premunização de melancia com estirpes fracas do PRSV-W, em Anhembi-SP, Giampan (2002) observou alta incidência do ZLCV, atingindo 63,5%. Em um primeiro estudo realizado com amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Stangarlin, Dias e Rezende (2000) também constataram que o PRSV-W e o ZYMV foram os vírus de maior incidência, seguidos pelo ZLCV. Posteriormente, avaliando a incidência de viroses em ensaios de genótipos de abóboras e pepino nesse mesmo Estado, Stangarlin et al. (2001) verificaram que os vírus mais comuns foram o PRSV-W, o ZLCV e o ZYMV, com incidências médias de 63,4 %, 56,1 % e 41,4 %, respectivamente. O ZLCV também foi relatado afetando a cultura do pepino no Distrito Federal (NAGATA et al., 1998).

O ZLCV possui partículas esféricas envelopadas, de aproximadamente 80 a 90 nm de diâmetro, constatadas no interior do retículo endoplasmático no citoplasma, onde também foram observadas massas amorfas densas (viroplasma) (REZENDE et al., 1997). O genoma desse vírus apresenta três segmentos de RNA de fita simples com tamanhos correspondentes aos do TSWV. Os segmentos de RNA são denominados de L (large), M (medium) e S (small). O L RNA é de polaridade negativa e o M e S RNA tem uma estratégia de codificação ambisenso. O L RNA codifica uma proteína que provavelmente representa a RNA polimerase. O M RNA codifica uma proteína não estrutural (NSm) envolvida no movimento celular viral à curta distância e um precursor das glicoproteínas G1 e G2 localizadas na membrana da partícula viral e que são importantes para a transmissão desses vírus por tripes de modo circulativo e propagativo. O S RNA codifica uma outra proteína não estrutural (NSs) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (CHU et al., 2001; JONES, 2005; WIJKAMP et al., 1993).

Em relação ao vetor, os *Tospovirus* são transmitidos por espécies de tripes dos gêneros *Frankliniella* e *Thrips*. Apresentam um tipo de relação circulativa e propagativa com o inseto (PAPPU; JONES; JAIN, 2009). As partículas virais são adquiridas no primeiro instar larval do inseto durante a alimentação em plantas hospedeiras infectadas e são transmitidos pelas larvas e/ou tripes adultos virulíferos quando se alimentam de hospedeiras sadias (VAN DE WETERING; GOLDBACK; PETERS, 1996). O ZLCV é transmitido, na natureza, apenas pelo tripe *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), descrita por Nakahara e Monteiro (1999), normalmente

encontrada em folhas e flores de plantas infectadas em campo. Bezerra et al. (1999) e Nagata (dados não publicados) não obtiveram êxito na transmissão desse vírus através de outras espécies de tripses (*Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi*) que transmitem outras espécies de tospovirus.

O círculo de hospedeiros do ZLCV foi estudado somente em condições experimentais em casa de vegetação e apresentou alguma variabilidade em função dos isolados em estudo. As seguintes espécies/variedades vegetais foram suscetíveis à transmissão mecânica do vírus, exibindo sintomas de lesões locais (LL) e/ou invasão sistêmica (S): *Capsicum annuum* (LL, S), *C. chinense* PI 159236 (LL, S), *Citrullus lanatus* 'Rajada' (LL, S) e 'Charleston Gray' (S), *Cucurbita pepo* 'Caserta' (S) e 'Clarinda' (S), *C. moschata* 'Menina Brasileira' (S), *C. maxima* x *C. moschata* 'Takayama' (S), *Cucumis melo* (S), *C. sativus* (LL, S), *Datura stramonium* (LL, S), *Gomphrena globosa* (LL, S), *Nicotiana benthamiana* (LL, S), *N. occidentalis* (LL) e *N. tabacum* 'Turkishi' (LL) e 'TNN' (LL) (BEZERRA et al., 1999; LEASTRO, 2011; RESENDE et al., 1996; REZENDE et al., 1995; REZENDE et al., 1997).

Os sintomas causados pelo ZLCV em plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) 'Caserta' no campo são bastante característicos e começam com uma coloração verde clara em todas as folhas. Em seguida, as folhas mais novas tornam-se cloróticas, com bordos encurvados. Folhas de plantas doentes são mais espessas do que aquelas de plantas saudáveis. Algumas folhas basais normalmente mostram necroses sistêmicas. Plantas infectadas definham e morrem em pouco tempo, especialmente quando a infecção ocorre antes do florescimento. Plantas infectadas após o florescimento exibem quase os mesmos sintomas, mas não morrem. Elas se tornam atrofiadas e têm sua produção drasticamente reduzida (REZENDE et al., 1997). Em plantas de abóbora (*C. moschata*) 'Menina Brasileira' os sintomas dessa doença são caracterizados principalmente por mosaico amarelo, rugosidade foliar, internódios reduzidos e folhas levemente encurvadas nas bordas. No entanto, ao contrário do caso anterior, não causa morte de plantas. Em plantas de melancia (*C. lanatus*) os sintomas iniciais são caracterizados por epinastia foliar, ocorrendo, algumas vezes, um encurvamento dos bordos das folhas para cima. O vírus causa ainda clorose, rugosidade, deformação foliar e necrose nas folhas e redução nos internódios. A planta apresenta atrofiamento,

produzindo frutos menores, os quais podem apresentar pontos necróticos na casca e descoloração interna. Em plantas de pepino (*C. sativus*) infectadas com esse tospovírus, Nagata et al. (1998) observaram amarelecimento, mosqueado e mosaico das nervuras nas folhas.

A diagnose da clorose letal da abobrinha pode ser feita através de testes biológicos, sorológicos, RT-PCR e exames de microscopia eletrônica (ÁVILA, 1992; GIAMPAN, 2007).

Com relação ao controle dessa virose, devido a pouca informação sobre aspectos epidemiológicos e reação das variedades, poucas medidas têm sido recomendadas. As medidas geralmente preconizadas são: produção de mudas saudáveis, quando pertinente, sob telados à prova de tripes; eliminação de plantas daninhas que possam ser hospedeiras do vírus e do vetor próximo ao local de produção; e aplicação de inseticidas durante a obtenção de mudas e no início do desenvolvimento das plantas no campo para reduzir a população de tripes (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Considerando os danos causados por viroses em cucurbitáceas e a ineficiência do controle dos vetores, a melhor maneira de conviver com essas doenças é o uso de resistência genética (SILVEIRA et al., 2009), sendo assim, a descoberta de fontes de resistência são essenciais para fornecer novas alternativas aos melhoristas no desenvolvimento de novos híbridos ou variedades com resistência a vírus.

Giampan, Rezende e Silva (2007) estudando a reação de espécies de cucurbitáceas à infecção com o ZLCV em experimentos de campo e casa de vegetação constataram que a abobrinha de moita 'Caserta' e a abóbora híbrida 'Takaiama' apresentaram alta suscetibilidade em todos os testes. O pepino 'Safira' apresentou baixa infecção em campo e intermediária em casa de vegetação. Enquanto que melancia 'Crimson Sweet', maxixe do Norte, abóbora rasteira 'Menina Brasileira' e moranga 'Alice' mostraram um bom nível de resistência à infecção. A moranga 'Exposição' não foi infectada tanto em campo (46 plantas avaliadas) como em casa de vegetação (89 plantas avaliadas), mostrando-se altamente resistente à infecção com esse tospovírus. Leastro (2011), também não observou sintoma em nenhuma das 20 plantas de moranga 'Exposição' inoculadas mecanicamente com o ZLCV. O alto nível de resistência a infecção desta planta sinalizam seu potencial uso em programas de

melhoramento visando à produção de variedades resistentes a esta importante doença viral.

### **2.1.2 Resposta das plantas aos vírus**

Cooper e Jones (1983) sugerem que as plantas ao serem atacadas pelos vírus podem ter como primeira resposta a imunidade, isto é, total ausência de infecção após sucessivas inoculações. Nesse caso, o vírus não se replica nem nos protoplastos quando estes são inoculados experimentalmente. Por outro lado, se o vírus infecta e se replica na planta esta é considerada hospedeira. Neste caso, porém, a reação da planta ao vírus pode variar de altamente suscetível a resistente. Esta resistência, por sua vez, pode ser à infecção, à replicação ou à invasão sistêmica do vírus. Neste último caso, o vírus pode infectar e se multiplicar na planta, no entanto, seu movimento a longa distância é impedido. A infecção sistêmica de plantas por vírus envolve três etapas distintas: replicação viral na célula inicialmente infectada, movimento célula a célula (curta distância) e movimento sistêmico (longa distância). Em todas estas etapas, as proteínas codificadas pelo vírus devem interagir com as proteínas do hospedeiro, a fim de executar suas funções e permitir o sucesso da infecção viral. Ao contrario do movimento célula a célula, cujos mecanismos vêm sendo rapidamente elucidados, o movimento a longa distância, ainda não é bem compreendido (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002).

Este tipo de resistência, que restringe o movimento do vírus a longa distância já foi descrito para vários sistemas vírus-hospedeira, como por exemplo, a resistência do *Cucumis melo* L. 'Doublon' ao *Melon necrotic spot virus* (MNSV). Plantas dessa variedade inoculadas mecanicamente com o MNSV desenvolveram lesões locais necróticas nos cotilédones (hipersensibilidade) e o vírus não invadiu as plantas sistemicamente (MALLOR; ÁLVAREZ; LUIS-ARTEGA, 2003), uma vez que este não foi detectado nas raízes, nos hipocótilos e nas folhas dos ponteiros analisados por ELISA (MALLOR et al., 2006). No entanto, quando as plantas da variedade Doublon foram inoculadas com o fungo vetor *Oplidium bornovanus*, o vírus foi detectado nas raízes e nos hipocótilos de todas as plantas, porém não moveu sistemicamente para a parte



aérea. Sintomas de necrose na base dos hipocótilos e escurecimento das raízes foram observados nessas plantas. Segundo esses autores, a resistência da variedade Doublon, controlada por dois genes dominantes (Mnr1 e Mnr2), parece estar relacionada com a restrição do movimento de longa distância do vírus na planta, resultante de possível hipersensibilidade sistêmica nas partes (raiz e hipocótilo) invadidas sistemicamente.

Resistência a invasão sistêmica de longa distância também foi relatada por Dufour et al. (1989) em variedades de pimentão inoculadas mecanicamente com *Cucumber mosaic virus* (CMV). Tanto na variedade suscetível como naquelas resistentes o movimento do CMV de célula a célula nas folhas inoculadas foi semelhante. Microscopia de imunofluorescência revelou que a infecção nos pecíolos, no caule e raízes das variedades resistentes foi restrita a um ou dois feixes do floema e não se espalhou para os tecidos vizinhos ou outros órgãos da planta.

As barreiras que impedem a invasão sistêmica de longa distância do vírus podem ser quebradas, levando a propagação deste e assim a expressão dos sintomas em diferentes partes da planta. Celebi-Toprak et al. (2003) mostraram que o CMV pode replicar em plantas de batata, mas a infecção é usualmente localizada na folha infectada e não se espalha para o resto da planta. Neste estudo, dos 18 genótipos de batata testados 13 foram resistentes a infecção sistêmica pelo CMV quando as plantas foram cultivadas a 24°C. No entanto, todos os 18 genótipos tornaram-se sistemicamente infectados quando as plantas inoculadas foram cultivadas a 30°C.

A abobrinha de moita 'Black Beauty' apresenta resistência ao movimento a longa distância do CMV estirpe M. No entanto, Choi et al. (2002) demonstraram que ao ser co-inoculada com o potyvirus ZYMV-A esta resistência é quebrada e o CMV-M torna-se capaz de se mover na planta. Estes autores observaram que o ZYMV-A sozinho induziu sintoma severo nas plantas de abobrinha de moita 7 a 10 dias após a inoculação, enquanto que a infecção com CMV-M sozinho não induziu nenhum sintoma nas folhas superiores, no mesmo período. Já quando plantas de abobrinha de moita foram co-infectadas com CMV-M e ZYMV-A mostraram sintomas severos que mais tarde evoluíram para a morte das plantas. O movimento do CMV-M foi confirmado pela

presença da proteína capsidial do vírus na 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> folha verdadeira quando estas foram analisadas por “tissue printing”.

Plantas de *Capsicum annum* ‘Avelar’ apresentam resistência à infecção sistêmica do *Pepper mottle virus* isolado Florida (PepMoV-FL). Guerini e Murphy (1999) demonstraram que em plantas da variedade ‘Avelar’ co-infectadas com PepMoV-FL e CMV-KM, o PepMoV-FL foi capaz de infectar, acumular e mover dentro do floema interno, permitindo que o vírus invadisse os tecidos jovens sistemicamente. Os autores sugerem que o CMV-KM compensa a incapacidade do PepMoV-FL de entrar no floema interno.

## **2.2 Objetivos**

- a) Identificar se a resistência da moranga ‘Exposição’ consiste num caso de resistência à infecção ou de hipersensibilidade ao vírus que impede a posterior invasão sistêmica.
- b) Avaliar a interferência dos potyvirus (PRSV-W e ZYMV) na resistência da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV.

## **2.3 Metodologia**

### **2.3.1 Preparo de plantas-teste**

Os testes foram conduzidos em casa de vegetação e no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN), localizado na Universidade de São Paulo – Campus “Luiz de Queiroz” em Piracicaba – SP. Foram utilizadas plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) ‘Caserta’, moranga (*Cucurbita maxima*) ‘Exposição’ e *Datura stramonium*.

### **2.3.2 Fonte de inóculo dos vírus**

Foram utilizados isolados do ZLCV, PRSV-W e ZYMV. O isolado do ZLCV foi obtido de plantas de abobrinha de moita naturalmente infectadas no campo experimental do LFN, ESALQ/USP. Tripes coletados de folhas de plantas infectadas foram transferidos para plantas saudias de abobrinha de moita mantidas em casa de vegetação. As plantas assim inoculadas foram usadas como fonte de inóculo. O inóculo foi sempre renovado através do mesmo procedimento. Em alguns casos, o inóculo foi obtido através de transmissão mecânica de extratos foliares obtidos de plantas de abobrinha de moita sabidamente infectadas somente com o ZLCV no campo, para plantas de abobrinha de moita saudias mantidas em casa de vegetação. O PRSV-W e o ZYMV foram obtidos da coleção de isolados virais mantidos em tecido desidratado no Laboratório de Virologia Vegetal, ESALQ/USP. Foram mantidos em plantas de abobrinha de moita por meio da transmissão mecânica.

### **2.3.3 Inoculação mecânica**

O inóculo viral (ZLCV, PRSV-W e ZYMV) foi preparado por meio da maceração de folhas de abobrinha de moita 'Caserta' sintomáticas em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M, na proporção de 1:10 (p/v). A inoculação mecânica das plantas-teste foi feita friccionando uma escova de dentes umedecida no inóculo, nas folhas previamente polvilhadas com carbureto de silício (Carborundum). Logo em seguida as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo. Todas as plantas foram reinoculadas no dia seguinte para assegurar maior infectividade. A mesma forma de inoculação mecânica foi realizada para o tospovirus e para os potyvirus.

### 2.3.4 Indexação das plantas-teste

A confirmação da infecção e do movimento sistêmico do ZLCV nas plantas-teste foi feita por meio de análises sorológica, molecular e recuperação biológica do vírus. A detecção dos potyvirus foi feita somente por meio de teste sorológico.

#### 2.3.4.1 PTA-ELISA

Foi utilizado o teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) conforme protocolo desenvolvido por Mowat e Dawson (1987), com algumas modificações. Para este teste foram utilizados antissoros específicos contra a proteína capsidial do ZLCV, PRSV-W e ZYMV disponíveis no laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP. O antissoro contra o ZLCV foi gentilmente cedido pela Dra. Alice K. Inoue-Nagata, Embrapa, CNPH, DF. Amostras individuais de tecido vegetal foram maceradas na presença de tampão carbonato (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$  e 3 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 9,6), na diluição 1:50 (p/v), sendo colocados 100  $\mu\text{L}$  destas amostras por cavidade de placas de ELISA. Foram usadas duas cavidades por amostra. As amostras foram incubadas por 15 minutos, a 37°C. Após, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM  $\text{NaCl}$ , 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM  $\text{KCl}$ , pH 7,4, acrescido de 0,5 ml de Tween 20). Na etapa seguinte foram colocados em cada cavidade 100  $\mu\text{L}$  do antissoro diluído (1:1000 para o PRSV-W e ZYMV e 1:2000 para o ZLCV) em tampão PBS-TPB (PBS-Tween + 2% de polyvinylpyrrolidone MW 44.000 + 0,2% de Bovine Serum Albumin). Os antissoros contra o ZLCV e o PRSV-W foram pré-absorvidos com extrato de tecido de plantas sadias, diluído 1:50 em PBS-TPB, cerca de 30 minutos antes de serem usados. As placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como anteriormente. Foram colocados 100  $\mu\text{L}$  do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025) diluído 1:34000 em tampão PBS-TPB, e incubado novamente por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e a seguir foram colocados em cada cavidade 100  $\mu\text{L}$  de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/ml). As placas foram incubadas por 30

minutos à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA Metertech  $\Sigma$  960 utilizando-se filtro de 405 nm. Extratos de plantas sadias e de plantas sabidamente infectadas com os vírus em questão foram usados como controles. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância foi superior a três vezes a média de absorbância do extrato da planta sadia.

#### **2.3.4.2 Impressão de tecido (“Tissue printing”)**

Círculos de cotilédone e folha verdadeira previamente marcados e inoculados com o ZLCV foram cortados e pressionados em membrana de nitrocelulose. A membrana foi deixada ao ar por alguns minutos para secar. Quando seca, a membrana foi incubada em PBS (1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM KCl, pH 7,4) + 7,5% de leite em pó por 30 minutos, sob agitação lenta. Em seguida, a membrana foi transferida para solução com antissoro, diluído 1:2000 em PBS + 7,5% de leite em pó, mantida em geladeira (5°C), durante a noite. Após, a membrana foi lavada 5 vezes em PBS-Tween (1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM KCl, pH 7,4, acrescido de 0,5 ml de Tween 20), sendo 2 minutos para cada lavagem sob agitação. Após as lavagens, adicionou-se a imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025) diluída 1:34000 em tampão PBS-Tween. Incubou-se por 4 horas em temperatura ambiente sob agitação lenta. A membrana foi lavada como descrito anteriormente. Preparou-se 10 ml de substrato (1 mL de tampão fosfatase alcalina 10X + 9 mL de água destilada deionizada + 25  $\mu\text{l}$  BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) + 50  $\mu\text{l}$  NBT (nitro blue tetrazolium)). Incubou-se a temperatura ambiente sob agitação lenta para que ocorresse a reação enzimática. Quando observou-se a coloração da membrana a reação foi interrompida através da lavagem com água destilada. Com o objetivo de retirar o excesso de tecido verde remanescente na membrana, esta foi lavada com uma solução de hipoclorito 15%. A avaliação foi feita visualmente.

### 2.3.4.3 RT – PCR

A detecção do ZLCV por meio de RT-PCR foi feita a partir da extração de RNA total das plantas utilizando Trizol® LS (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. Cem miligramas de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em tubos de eppendorf de 2 ml. Em seguida, 1 ml de Trizol® LS foi acrescentado e misturou-se bem. A suspensão foi incubada por 5 minutos a 4°C. Após acrescentaram-se 200 µl de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. A suspensão foi incubada por 10 minutos a 4°C. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de eppendorf de 1,5 ml. O RNA foi precipitado adicionando-se 500 µl de álcool isopropílico a 4°C e a mistura foi incubada por 2 horas a 4°C. Após centrifugou-se os tubos a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O álcool isopropílico foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1 ml de etanol 75% preparado com água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e centrifugado a 7.500 g por 15 minutos. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco a 37°C por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, este foi dissolvido em 20 µl de água Mili-Q estéril tratada com DEPC, e armazenado a -20°C até o uso.

A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas teste. Três microlitros de suspensão de RNA total foram misturados a 1 µl do oligonucleotídeo iniciador ZLCV-P1 (GIAMPAN, 2007). Esse oligonucleotídeo iniciador foi diluído em água destilada previamente tratada com DEPC, na concentração de 20 pmoles/µl. Também foram adicionados a esta mistura 1µl de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10 mM e 7 µl de água Mili-Q estéril tratada com DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente mantida a 2°C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 5 µl do tampão 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3) da enzima transcriptase reversa, 2 µl de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 1 µl da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200 µ/ml). Essa solução foi incubada por 50 minutos a 37°C e posteriormente aquecida a 70°C por 15 minutos. Finalmente foi mantida a 4°C.

O cDNA obtido a partir do RNA total foi amplificado por uma reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR). Para isso, 2 µl do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µl de tampão 10X de

PCR (Tris-SO<sub>4</sub> 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 1,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 0,15 µl de Taq Polymerase, 100 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o ZLCV, ZLCV P1 [5'-TCAACCCATAAGCCTGAACC-3'] e ZLCV P2 [5'-TGTTGCTTTGCTGACTCA-3'] (GIAMPAN, 2007) desenhados a partir do gene da proteína do nucleocapsídeo do S-RNA do ZLCV, que amplifica um fragmento de 350 pares de base (pb). Completando o volume para 25 µl com água Mili-Q estéril tratada com DEPC. O regime do termociclador foi de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 segundos, divididos em 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 62°C e 25 segundos a 72°C, finalizando com 72°C por 10 minutos. O resultado da RT-PCR foi visualizado em gel de agarose 0,8%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) diluído 1:10000 em tampão de TBE (Tris-Borato 100 mM, EDTA 2 mM), tendo como padrão o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Promega).

#### **2.3.4.4 Teste de recuperação biológica do ZLCV**

O teste biológico consistiu da recuperação do ZLCV das folhas inoculadas e dos ponteiros das plantas-teste, para plantas de *D. stramonium*. Extratos de tecidos foliares a serem analisados foram obtidos em tampão fosfato de potássio 0,02 M, na proporção de 1:10 (p/v). Os extratos foram inoculados mecanicamente em folhas de *D. stramonium*, devidamente identificadas, previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício (Carborundum). Logo em seguida as plantas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e do inóculo. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação das lesões locais 7 a 10 dias após a inoculação.

Plantas de *D. stramonium* exibem sintomas típicos de lesões locais necróticas e necrose sistêmica quando infectadas com o ZLCV.

### 2.3.5 Avaliação da reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV

Plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’ (controle suscetível) foram inoculadas mecanicamente com o ZLCV nas folhas cotiledonares. A inoculação foi repetida 24 horas após a primeira para assegurar a infectividade. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Após sete dias da inoculação foram colhidas amostras das folhas inoculadas (cotilédones) para a detecção da presença do ZLCV por meio dos testes biológico, PTA-ELISA e RT-PCR. A mesma análise foi feita 20 dias após a inoculação, porém em folhas do ponteiro das plantas, para verificar a invasão sistêmica do ZLCV. Foram realizados dois experimentos independentes. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo que cada experimento contou com 8 repetições para cada planta teste.

No intuito de detectar a possibilidade do vírus ficar restrito ao local de inoculação, foram realizados ensaios onde a inoculação foi restrita a locais previamente marcados nos cotilédones e folhas verdadeiras. Círculos foram feitos nos cotilédones (Figura 1) e folhas de plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’, no interior dos quais inoculou-se mecanicamente o vírus. Oito dias após a inoculação estes círculos de tecido foram retirados e testados por impressão de tecido para detecção do ZLCV. Foram realizados 4 ensaios independentes, o delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado.



Figura 1 - Planta de moranga ‘Exposição’ com cotilédones marcados com círculos para inoculação do ZLCV e posterior análise por impressão de tecido



### **2.3.6 Avaliação da interferência dos potyvirus (PRSV-W e ZYMV) na reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV em casa de vegetação.**

Para essa análise foram comparados os seguintes tratamentos: a) plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’ inoculadas apenas com o ZLCV; b) plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’ inoculadas com o ZLCV + PRSV-W; c) plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’ inoculadas com o ZLCV + ZYMV; d) plantas de moranga ‘Exposição’ e de abobrinha de moita ‘Caserta’ inoculadas apenas com tampão (controle).

As inoculações foram feitas nas folhas cotiledonares e as avaliações para a detecção do ZLCV foram feitas como descritas no item anterior. A confirmação da presença dos potyvirus foi feita por PTA-ELISA. Foram realizados dois experimentos independentes, sendo que cada um deles contou com 8 plantas de abobrinha de moita ‘Caserta’ e 8 plantas de moranga ‘Exposição’, para cada tratamento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

### **2.3.7 Avaliação da interferência dos potyvirus (PRSV-W e ZYMV) na reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV em campo.**

Dois experimentos independentes foram conduzidos no campo experimental do LFN, ESALQ/USP. Para o estabelecimento do ensaio, previamente foram semeadas em casa de vegetação 30 sementes de moranga ‘Exposição’ em bandejas de isopor. Cerca de 8 dias após a semeadura, 15 plantas foram inoculadas com PRSV-W e 15 plantas foram inoculadas com ZYMV. Sete dias após a inoculação um teste de PTA-ELISA confirmou a infecção das plantas pelos potyvirus. Paralelamente a isto, foram semeadas aleatoriamente no campo previamente preparado com adubo 04-14-08 (150 g/cova), 20 covas de abobrinha de moita ‘Caserta’ e 10 de moranga ‘Exposição’. Sete dias depois, foram transplantadas as mudas de moranga ‘Exposição’ que foram previamente preparadas em casa de vegetação com os potyvirus, 10 mudas inoculadas com o PRSV-W e 10 mudas com o ZYMV. Periodicamente as plantas foram avaliadas com base nos sintomas e na detecção do ZLCV por PTA-ELISA. A presença de tripes

nos ponteiros de algumas plantas também foi monitorada. A presença do vírus em alguns insetos foi testada por impressão em membrana de nitrocelulose. Os ensaios foram conduzidos por aproximadamente 55 dias.

### 2.3.7.1 Monitoramento de tripes nas plantas no campo

A população de tripes foi acompanhada ao longo dos experimentos no campo com o intuito de verificar a distribuição de ninfas e adultos entre as plantas de abobrinha de moita e moranga, para certificar que ambas estavam tendo as mesmas chances de infecção. A cada coleta, folhas jovens de 3 plantas de cada planta-teste, escolhidas aleatoriamente, foram colhidas e colocadas em tubos contendo álcool 60%. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente e a solução vertida em placa de Petri para identificação e quantificação de ninfas e adultos através de visualização em lupa estereoscópica (Figura 2). Foram coletadas ninfas e adultos de tripes amarelos. Foram amostradas 36 plantas no primeiro experimento e 25 plantas no segundo experimento.

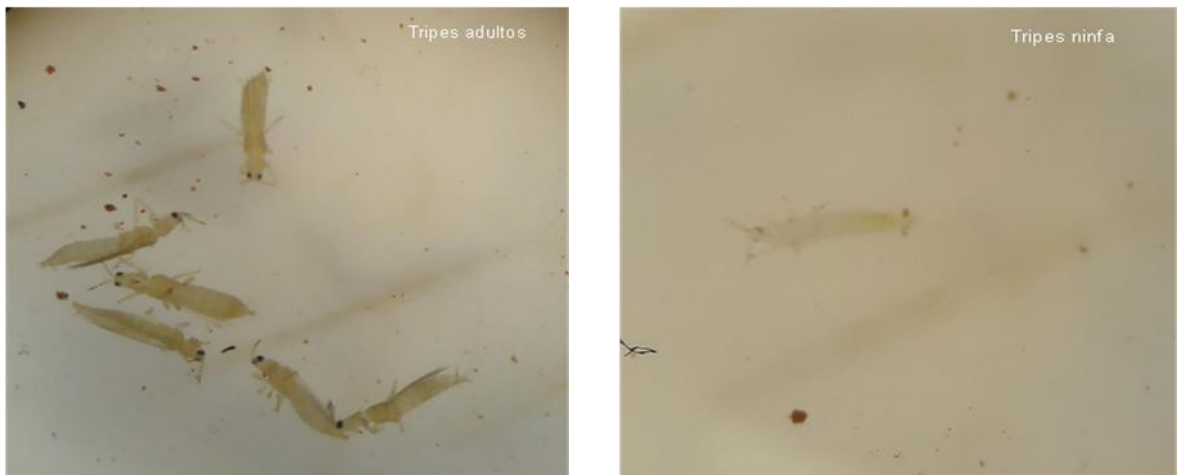


Figura 2 - Adultos e ninfa de tripes amarelos coletados em avaliações de experimento no campo

### 2.3.7.2 Detecção do ZLCV em tripes por impressão em membrana de nitrocelulose

Amostras aleatórias dos ponteiros de algumas plantas foram coletados em diferentes épocas durante os experimentos no campo, colocados em tubos e mantidos a 5°C por 30 minutos para que o inseto ficasse paralisado. Depois disso os insetos foram transferidos para membrana de nitrocelulose onde foram pressionados com

auxílio de um pistilo. Prosseguiu-se a reação sorológica conforme descrito anteriormente.

### 2.3.8 Sequenciamento do produto da RT-PCR

Para confirmar a identidade do isolado do ZLCV, produtos de RT-PCR de duas amostras, denominados ZLCV-V01 e ZLCV-V02, foram purificados com o kit Promega, de acordo com as recomendações do fabricante e quantificados em gel de agarose com o marcador Lambda em 100 ng/μL. Produtos das amostras foram enviados para o sequenciamento do ácido nucléico na empresa Macrogen, Coréia. Foram enviados 15 μl de cada amostra (20 ng) e 20 μl de cada primer (ZLCVP1 e ZLCVP2) a 10 pmol.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas à ferramenta de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e tiveram sua identidade comparadas as sequências de nucleotídeos já depositadas no GenBank (disponível no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Reação da moranga 'Exposição' ao ZLCV

Os resultados da somatória de dois experimentos independentes estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Detecção do ZLCV por PTA-ELISA, RT-PCR e teste de recuperação biológica em cotilédones (C) e folhas dos ponteiros (FP) de plantas de moranga 'Exposição' e de abobrinha de moita 'Caserta' inoculadas mecanicamente

Testes de detecção	n° plantas infectadas/n° plantas avaliadas			
	Moranga		Abobrinha de moita	
	C	FP	C	FP
PTA-ELISA	1/16	0/16	11/16	15/16
RT-PCR	4/13	0/6	5/16	9/9
Teste biológico*	0/8	0/8	7/7	0/8

\* Teste de recuperação biológica do ZLCV em *Datura stramonium*

A infecção do ZLCV em cotilédones, avaliada por PTA-ELISA, foi confirmada em 69% das plantas de abobrinha e 6% das plantas de moranga. No ponteiro, o vírus foi detectado em 94% das plantas de abobrinha de moita, porém em nenhuma planta de moranga.

Nem todas as plantas inoculadas nos dois ensaios foram avaliadas por RT-PCR e pelo teste de recuperação biológica, pois no momento da obtenção das amostras a serem avaliadas não se dispunha de material vegetal suficiente para todas as análises ou de plantas de *D. stramonium* em boas condições para inoculação. No entanto, para as amostras disponíveis as avaliações foram realizadas, as análises de RT-PCR, com RNA total das folhas dos ponteiros indicaram que o ZLCV estava presente em 100% das plantas de abobrinha de moita testadas, mas em nenhuma planta de moranga avaliada. Nos extratos cotiledonares, no entanto, a detecção do ZLCV foi em menor proporção nas duas variedades.

Na avaliação pelo teste de recuperação biológica constatou-se que extratos de cotilédones de 100% das plantas de abobrinha de moita inoculados causaram infecção em *D. stramonium*, porém nenhum dos extratos cotiledonares de 8 plantas de moranga infectou essa espécie (Figura 3). Os extratos das folhas dos ponteiros da abobrinha de moita e da moranga não causaram lesão local em *D. stramonium*.

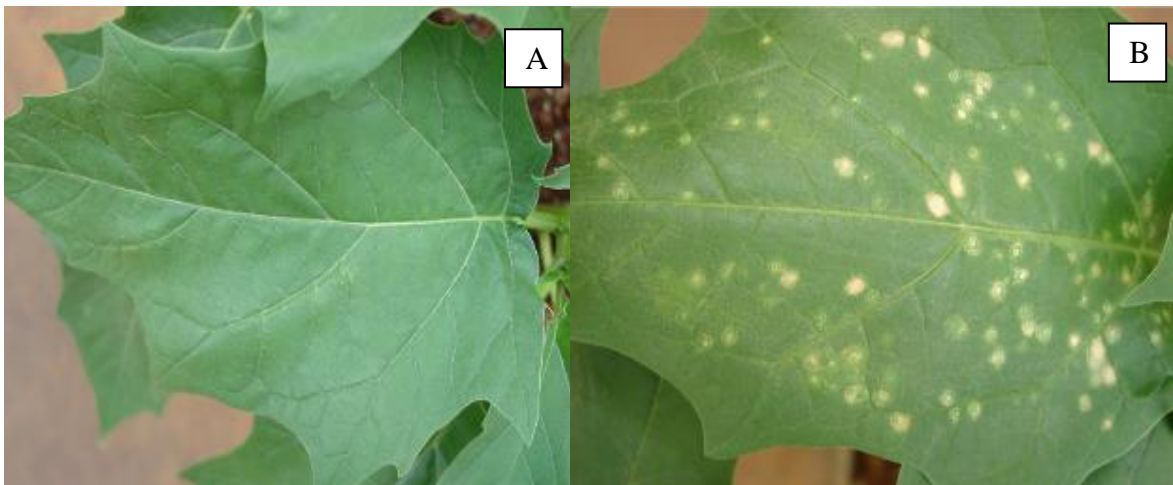


Figura 3 - Recuperação do ZLCV em plantas de *D. stramonium*. A) inoculada com extrato cotiledonar de moranga 'Exposição'. B) inoculada com extrato cotiledonar de abobrinha de moita 'Caserta'

### 2.4.1.1 Detecção do ZLCV em folhas inoculadas por impressão de tecido

Os resultados da detecção do ZLCV inoculado mecanicamente em círculos previamente marcados em folhas cotiledonares e verdadeiras de moranga 'Exposição' e de abobrinha de moita 'Caserta' estão ilustrados na figura 4. Dos 24 círculos inoculados nos cotilédones das plantas de moranga, 16 apresentaram reação positiva para a presença do ZLCV. Dos 4 círculos inoculados nas folhas verdadeiras das plantas de moranga, 1 apresentou reação positiva para a presença do vírus. Na abobrinha de moita, dos 12 círculos inoculados nos cotilédones, em 9 deles o vírus pôde ser detectado, e nas folhas dos ponteiros, dos 4 círculos inoculados em 3 o vírus foi detectado.

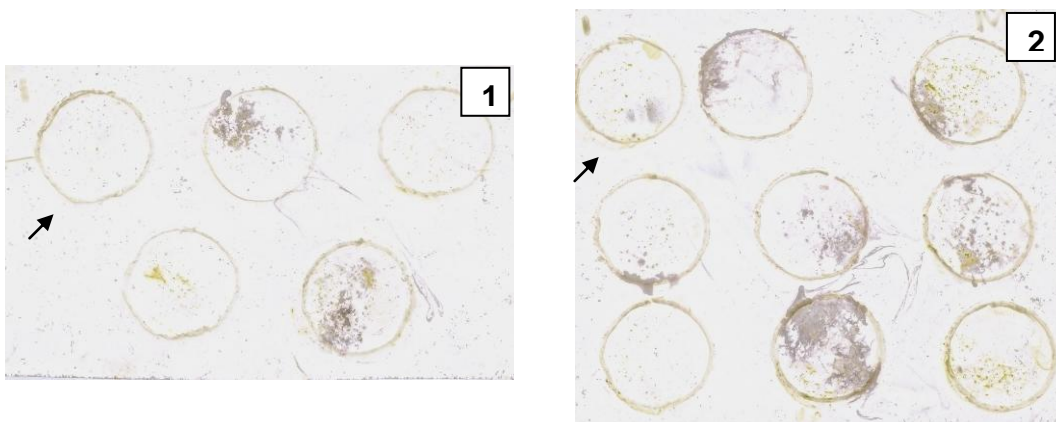


Figura 4 - Resultado da impressão de tecido de alguns dos círculos dos cotilédones inoculados com o ZLCV: 1) abobrinha de moita 'Caserta' e 2) moranga 'Exposição'. Os círculos indicados com a seta são de cotilédones de plantas sadias (controles)

Após a retirada dos círculos inoculados nos cotilédones, o restante da folha foi também pressionado na membrana e avaliado para verificar o movimento do vírus ao redor do ponto de inoculação, como ilustrado na figura 5. Foram avaliados três cotilédones de abobrinha de moita, dos quais foi possível detectar o vírus em dois deles, e três cotilédones de moranga onde em nenhum deles o vírus foi detectado além do local de inoculação.

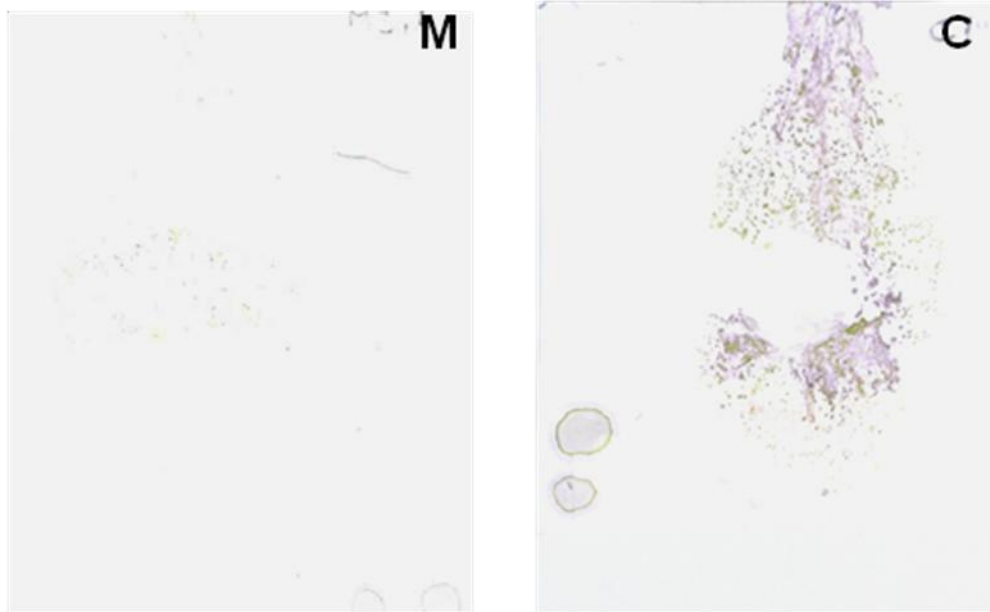


Figura 5 - Resultado da impressão de tecido de um dos cotilédones de moranga (M) e um cotilédone de abobrinha de moita (C) após a retirada dos círculos que foram inoculados com o ZLCV

#### **2.4.2 Interferência dos potyvirus PRSV-W e ZYMV na reação da moranga ‘Exposição’ ao ZLCV em casa de vegetação**

Os resultados da detecção do ZLCV nos cotilédones e folhas dos ponteiros para avaliação da interferência dos potyvirus na quebra de resistência da moranga ao tospovirus estão apresentados na tabela 2, que traz a somatória de dois experimentos independentes.

Tabela 2 - Detecção do ZLCV em cotilédones (C) e folhas dos ponteiros (FP) de plantas de moranga 'Exposição' e de abobrinha de moita 'Caserta' inoculadas mecanicamente somente com ZLCV e com este em mistura com o PRSV-W ou o ZYMV

Tratamentos	Testes de detecção	n° plantas infectadas/n°plantas avaliadas			
		Moranga		Abobrinha de moita	
		C	FP	C	FP
ZLCV	PTA-ELISA	0/15	0/15	9/13	12/15
	RT-PCR	1/9	0/15	3/7	4/11
	Teste biol.*	0/11	0/11	2/12	6/9
ZLCV+PRSV-W	PTA-ELISA	1/16	0/15	2/15	9/15
	RT-PCR	NT**	NT	NT	NT
	Teste biol.	0/12	0/8	3/11	3/9
ZLCV+ZYMV	PTA-ELISA	1/12	0/11	0/12	5/9
	RT-PCR	NT	NT	NT	NT
	Teste biol.	0/10	0/8	1/7	2/3

\* Teste de recuperação biológica do ZLCV em *Datura stramonium*

\*\*NT= não testado

Nas plantas de moranga inoculadas somente com o ZLCV, quando testadas por PTA-ELISA, o vírus não foi detectado nem nos cotilédones, nem nos ponteiros. Já para as plantas de abobrinha de moita, 69% dos cotilédones e 80% dos ponteiros estavam infectados com o vírus. As análises por RT-PCR dos RNAs totais dos extratos cotiledonares indicaram que o vírus estava presente em três plantas de abobrinha de moita e apenas uma planta de moranga. Nos RNAs totais extraídos das folhas dos ponteiros, o vírus foi detectado em quatro plantas de abobrinha de moita, mas em nenhuma planta de moranga avaliada. Quando avaliadas por teste biológico, nenhuma das plantas de moranga, que tiveram seus extratos cotiledonares e das folhas dos ponteiros inoculados em *D. stramonium*, estava infectada com o ZLCV. Por outro lado, 17% e 67% dos extratos dos cotilédones e dos ponteiros de abobrinha de moita, respectivamente, foram capazes de causar lesões locais nas folhas de *D. stramonium*.

No tratamento onde o ZLCV e o PRSV-W foram inoculados em mistura, quando as plantas foram avaliadas por PTA-ELISA, o tospovirus foi detectado nos cotilédones de apenas uma planta de moranga, mas nenhuma planta foi invadida sistemicamente pelo ZLCV. Em abobrinha de moita, 60% das plantas foram invadidas sistemicamente pelo ZLCV. No teste biológico, novamente os extratos obtidos dos cotilédones e ponteiros das plantas de moranga não causaram lesão local em nenhuma planta de *D. stramonium*. Das plantas de abobrinha de moita testadas, 27% dos extratos dos cotilédones e 33% dos extratos dos ponteiros foram capazes de causar lesão local em *D. stramonium*.

Quando o ZLCV e o ZYMV foram inoculados juntos, o ZLCV foi detectado no cotilédone de uma das plantas de moranga que foram avaliadas por PTA-ELISA, mas não nos ponteiros destas mesmas plantas. No caso da abobrinha de moita, o teste sorológico não detectou o ZLCV em nenhum dos cotilédones testados. No entanto, quando as folhas dos ponteiros destas plantas foram avaliadas, 55% estavam infectadas com o ZLCV. O teste de recuperação biológica, feito a partir dos extratos cotiledonares e dos extratos das folhas dos ponteiros das plantas de moranga, não detectou o vírus em nenhuma das amostras. Por outro lado, quando as plantas de abobrinha de moita tiveram seus extratos cotiledonares e dos ponteiros inoculados em *D. stramonium*, 14 e 66%, respectivamente, causaram lesão local nesta planta.

A detecção dos potyvirus foi feita por PTA-ELISA. No experimento onde o ZLCV foi inoculado em mistura com PRSV-W este foi detectado em 10 dos 16 cotilédones e 5 dos 15 ponteiros das plantas de moranga testadas. Nas plantas de abobrinha de moita, os 15 cotilédones e as 15 folhas dos ponteiros avaliadas tiveram o vírus detectado. Quando o tospovirus foi inoculado na moranga com o ZYMV, este foi detectado em 5 dos 12 cotilédones testados e em 6 das 11 folhas dos ponteiros avaliadas. Na abobrinha de moita em 11 dos 12 cotilédones e em 7 dos 9 ponteiros o ZYMV foi detectado.



### 2.4.3 Interferência dos potyvirus PRSV-W e ZYMV na reação da moranga 'Exposição' ao ZLCV em campo

Os resultados da detecção do ZLCV nas folhas dos ponteiros das plantas-teste dos dois experimentos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Detecção do ZLCV por PTA-ELISA nas folhas dos ponteiros de plantas de abobrinha de moita 'Caserta' e de moranga 'Exposição', inicialmente sadias e previamente infectadas com o ZYMV ou o PRSV-W

Plantas-teste	n° plantas infectadas/n° plantas avaliadas	
	experimento 1	experimento 2
Abobrinha de moita	18/18	14/20
Moranga	0/10	0/9
Moranga + ZYMV	0/10	0/9
Moranga + PRSV-W	0/10	0/10

A infecção do ZLCV em plantas de abobrinha de moita, quando testadas por PTA-ELISA, foi de 100% no experimento 1 e de 70% no experimento 2. Todas as plantas de moranga 'Exposição' foram avaliadas por PTA-ELISA e RT-PCR para detecção do ZLCV. Nenhuma planta de moranga, inicialmente sadia ou previamente infectada pelos potyvirus, foi infectada pelo ZLCV.

As plantas de abobrinha de moita e as plantas de moranga inicialmente sadias não foram avaliadas quanto à infecção natural com os potyvirus.

#### 2.4.3.1 Tripes coletados nas plantas no campo

O número de insetos encontrados nas plantas-teste do experimento de avaliação da interferência dos potyvirus na reação da moranga 'Exposição' no campo está apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Número de ninfas e adultos de tripes amarelos encontrados em avaliações periódicas nas plantas-teste, nos dois experimentos

Plantas-teste	Experimento 1		Experimento 2	
	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos
Abobrinha de moita	10	22	3	13
Moranga sadia	2	27	1	19
Moranga + ZYMV	6	27	0	8
Moranga + PRSV-W	2	10	2	10

#### 2.4.3.2 Detecção do ZLCV em tripes por impressão em membrana de nitrocelulose

Para verificar se os tripes amarelos presentes nas plantas-teste estavam infectados com o ZLCV, estes foram testados por impressão em membrana de nitrocelulose. A figura 6 ilustra os resultados obtidos no experimento 1. O mesmo tipo de análise foi feito para o experimento 2 e os resultados foram semelhantes.

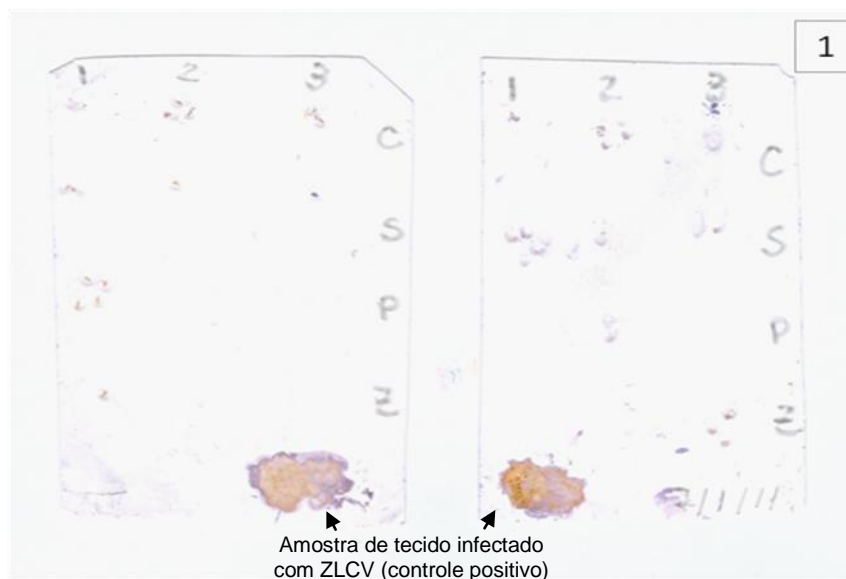


Figura 6 - Detecção do ZLCV em tripes amarelos coletados das plantas-teste. Experimento 1: amostragens em duas épocas realizada em 3 plantas diferentes (1, 2 e 3) nas plantas de abobrinha de moita (C), moranga (S), moranga pré-infectada com PRSV-W (P) e moranga pré-infectada com ZYMV (Z)

O ZLCV foi detectado nos insetos coletados em plantas de abobrinha de moita e de moranga de ambos os experimentos. Como a única espécie vetora desse vírus é *Frankliniella zucchini* é provável que a espécie coletada seja esta. Vale ressaltar também que a manutenção da fonte de inóculo do ZLCV em abobrinha de moita em casa de vegetação foi feita por meio da inoculação dessas plantas com tripes coletados de plantas de abobrinha de moita doentes no campo.

#### **2.4.4 Sequenciamento parcial do gene da proteína capsidial do ZLCV**

As sequências de nucleotídeos obtidas com tamanhos de 750 pb (ZLCV-V01) e 788 pb (ZLCV-V02) apresentaram identidades de 95% e 94% respectivamente, com a sequência correspondente do ZLCV depositada no GenBank (AF067069), confirmando tratar-se de um isolado dessa espécie de tospovírus. As sequências podem ser vistas na figura 7.

```

>ZLCV-V01
ACCTCAACCCATAAGCGCTGAAGCTCAACCTCTAATCCTGAACCTCAAGCCTGAACACCT
CGAATAACAGTCATGTCATTAGATCCAATTTTGTGACAGACTTTTTTAATACTGACTTTG
CCAAAAGTAAAATCACTTTGTTTGACAACCTTCATAATGCTCTGGCGGTTTTTCAGGAAT
GTCAAGCATGATGTGATGCTCATGTTCTTGATCAGCTTGAGATTTCCCTCATAGAAAGTT
TTAAAGTTGAAAGCAGTTTGATTCTGGTCTTCTTCAAATTCCAATTCTGTTGCTTGAGTC
AGCAAAGCAACAAAAGAGGAGTTTTTAGAAGAAGAGAATAATACTGCTGTTTACTTTAAA
ACTTTCTATGAAGGAAATCTCAAGCTGATCAAGAACATGAGCTTCATCTGATGCTTGTC
TTGCATGAACAACCACCAGAGCATTATTAGGGTTGTCAATCAATGTGATTTTGCTTTTGC
CAAAGTCACAATTCTCAAAGTCTCTGACAAAATTGGACCTAATGACATGACTTTTAGGAG
ACTGGACAGCATGATAAGGGTGAAGTTGATTGAAGCCACTGCAAACGATGAAAACCTTATC
TGCTATTAGATCAAAAATAGCTTCACATCCTCTGGTTCAGGCTTATGGGTTGAAAAGGAA
GGGCAATTGGAAGAAGACCAAAAATCAAACCTGCTTACATTTTAAGCTTTTCTGTTGAGGAT
ATCCAGCTGATCAAGAACTTGACCTTCATC

>ZLCV - V02
GAACCTCAACCCATAAGCCTGAACCTCAACCCATAAGCCTGAACCTCAAGCCATAAACCT
GAACCTCAACCCAGAAGCCTGAACCACTTTTGTGACAGCCTATTTTAATACTGACTTTGC
CAACAGTAAAATCACTTTGTTTGACAACCTTCATAATGCTCTGGCGGTTTTTCAGGAATG
TCAAGCATGATGTGATGCTCATGTTCTTGATCAGCTTGAGATTTCCCTCATAGAAAGTTT
TAAAGTTGAAAGCAGTTTGATTCTGGTCTTCTTCAAATTCCAATTCTGTTGCTTGAGTCA
GCAAAGCAACAAAAGTGAATTTGTAGAAGACCAGAATCAAACCTGCTTTCAACTTTAAA
CTTTCTATGAGGGAAATCTCAAGCTGATCAAGAACATGAGCATCATATGATGCTTGTCAT
TCCTGACAAACCGCCAGAGCATTATGAAGGTTGTCAAACAAAGTGATTTTACTTTTGGCA
AAGTCACTATTAATAAAAGTCTCTGACAAAATTGGACCTAATGACATGACTTTTAGGAGAC
TGGACAGCATGATAAGGGTGAAGTTGATTGAAGCCACTGCAAACGATGAAAACCTTATCTG
CTATTAGATCACAAATAGCTTCACATCCTCTGGTTCAGGCTTATGGGTTGAAGCTCNNA
TCCACNNACNGGGCTCTCACCTCTATGGCATCCCGTTCCCTGGAACCTCGGAGGGCGCC
TCCCCTAAAGCATCCTCTGCAAATTCAAACCTCGGGCCCTGGGGACCATATTTCAAATTTT
AGCTGTTG

```

Figura 7 - Sequências de nucleotídeos de duas amostras (ZLCV-V01 e ZLCV-V02) usadas no sequenciamento parcial do gene da proteína capsidial

## 2.5 Discussão

A resistência da moranga 'Exposição' ao ZLCV foi pela primeira vez relatada por Giampan, Rezende e Silva (2007) que demonstraram que esta variedade não foi infectada tanto em campo como em casa de vegetação. Leastro (2011) em seu estudo sobre o círculo de hospedeiros do ZLCV também não observou infecção desta variedade em ensaios em casa de vegetação.

Os resultados obtidos nos diversos experimentos deste trabalho confirmaram a alta resistência da moranga, pois a taxa de detecção do vírus nas plantas inoculadas mecanicamente foi baixíssima e nenhuma planta dos experimentos no campo foi infectada naturalmente pelo ZLCV. Nos testes em casa de vegetação, o ZLCV foi detectado por PTA-ELISA nos extratos cotiledonares de 3 plantas, entre as 59 inoculadas mecanicamente, mas em nenhum dos extratos dos ponteiros dessas mesmas plantas (Tabelas 1 e 2). Os testes de detecção do ZLCV nos círculos marcados e inoculados nos cotilédones e folhas verdadeiras, por impressão de tecidos seguida de reação sorológica, permitiram uma melhor análise da presença do vírus nos pontos de inoculação (Figura 4). Utilizando esse critério, foi possível detectar a presença do ZLCV em 61% dos discos de tecidos inoculados, principalmente cotilédones. Ao se analisar, pelo mesmo critério, o restante do tecido cotiledonar ao redor das áreas inoculadas, constatou-se que o ZLCV ultrapassou os pontos de inoculação em abobrinha de moita 'Caserta', mas não na moranga 'Exposição'. Estes resultados permitiram constatar que o vírus não só causou infecção no local de inoculação nos cotilédones da moranga 'Exposição', como foi capaz de se multiplicar e mover sistemicamente a curta distância ao redor dos pontos de infecção, mas não a longa distância.

Exemplos clássicos de restrição do movimento sistêmico do vírus nas plantas são as respostas de hipersensibilidade. Nesses casos a planta responde à infecção com o vírus com uma morte celular rápida, restringindo-o ao local de infecção. Na maioria das vezes esta morte celular resulta em necrose do tecido, que pode ser facilmente visualizada na forma de lesão local. Há casos, todavia, que a lesão local fica oculta, como observado por Lindner, Hugh e Weeks (1959) em cotilédones de pepino

inoculados com o *Tobacco mosaic virus* (TMV). Neste caso a detecção das lesões locais somente foi possível após a remoção da clorofila das folhas inoculadas, seguida de incubação em solução de iodo. No presente trabalho nenhuma lesão local foi observada nas folhas inoculadas de moranga 'Exposição'. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que o movimento sistêmico de longa distância do ZLCV foi inibido nas plantas de moranga 'Exposição'.

A resistência da planta ao vírus expressa na forma de restrição ao movimento sistêmico de longa distância tem sido descrita para outros patossistemas (DUFOR et al., 1989; GIORIA et al., 2002; MALLOR et al., 2003; MALLOR et al., 2006; SCHAAD; CARRINGTON, 1996). Resultado similar ao encontrado nesse trabalho foi observado por Goodrick, Kuhn e Hussey (1991) em soja PI 346304 inoculada com o *Cowpea chlorotic mottle virus*. Os autores observaram que quando as folhas unifolioladas da PI 346304 e da variedade suscetível Davis foram inoculadas mecanicamente com o vírus, este causou lesões cloróticas nas folhas inoculadas da PI 346304 e atingiu concentrações similares em ambas as plantas. No entanto, a PI 346304 restringiu o movimento do vírus e seu subsequente acúmulo nas regiões não inoculadas das folhas inoculadas, nas folhas não inoculadas e nas raízes. Testes imunocitoquímicos indicaram que tanto na PI como na variedade Davis não houve restrição ao movimento do vírus de célula para célula nos pontos de infecção. Diante desses resultados os autores sugeriram que uma restrição a entrada e/ou saída do vírus nos tecidos vasculares é a responsável pela resistência não-necrótica da PI 346304, que impede a invasão sistêmica de longa distância.

Lei e Agrios (1986) ao estudarem os mecanismos de resistência do milho ao *Maize dwarf mosaic virus* estirpe B (MDMV-B), usando duas linhagens resistentes (Pa405, Bsq) e uma suscetível (Ma5125), verificaram que o MDMV-B replicou e se espalhou localmente nas folhas inoculadas das três linhagens, mas somente se movimentou sistemicamente a longa distância na linhagem suscetível.

Estudo sobre a multiplicação e a migração do CMV em plantas de pimentão em condições de casa de vegetação mostrou que a multiplicação do vírus nas folhas inoculadas foi semelhante na variedade suscetível Yolo wonder e nas variedades resistentes Milord e Vania. No entanto, nas variedades resistentes o movimento a longa

distância foi impedido. Os autores observaram também que esta resistência a migração do vírus variou com a temperatura, pois na variedade resistente Milord o CMV invadiu a planta sistemicamente no inverno, mas não durante o verão (NONO-WOMDIM et al., 1991).

Existem varias hipóteses que tentam explicar este mecanismo de resistência que impede a movimentação do vírus à longa distância. Na maioria dos casos, a resistência parece envolver uma incapacidade do vírus em entrar ou sair dos vasos do floema (CHOI et al., 2002). Lei e Agrios (1986) ao tentarem explicar a restrição ao movimento sistêmico de longa distância do MDMV-B nas linhas de milho Pa405 e Bsq, apontaram como primeira hipótese a existência de algum tipo de bloqueio físico dos vasos condutores. Outra possibilidade seria ausência de algum tipo de sinal de reconhecimento do vírus, por exemplo, a capa protéica, envolvido no transporte vascular do patógeno, ou ainda uma falta de habilidade do vírus em modificar o tecido do hospedeiro para o transporte via plasmodesma. Gioria et al. (2002) ao estudarem o movimento sistêmico limitado do CMV em hastes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) levantaram três hipóteses para tentar explicar o fenômeno: a primeira é a de que o vírus perde a habilidade de se replicar ou mover sistemicamente na planta; a segunda sugere um mecanismo de resistência da planta que é induzido com o progresso da infecção; e a terceira seria algum tipo de atividade inibitória na planta infectada que progressivamente prejudica a replicação do vírus e conseqüentemente a sua circulação na planta. Qualquer um desses mecanismos pode estar envolvido na resistência do movimento de longa distância do ZLCV em plantas de moranga 'Exposição'.

A infecção com os potyvirus PRSV-W e ZYMV, inoculados previamente ou simultaneamente com o ZLCV, não alterou a resistência da moranga ao tospovirus.

Considerando-se que há casos em que a temperatura pode influenciar a resposta da planta ao movimento sistêmico de longa distância do vírus (CELEBI-TOPRAK; SLACK; RUSSOR, 2003; NONO-WOMDIM et al., 1991), seria interessante conduzir estudos para investigar o efeito de diferentes temperaturas na resistência da moranga 'Exposição' ao ZLCV. Também seria valiosa a identificação da herança dessa

resistência, de tal sorte que essa variedade de moranga possa ser útil para programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de variedades resistentes ao ZLCV.





### 3 CONCLUSÕES

- a) A resistência da moranga 'Exposição' caracteriza-se pela restrição ao movimento sistêmico do vírus a longa distância.
  
- b) Os potyvirus (PRSV-W e ZYMV) não interferiram na resistência da moranga 'Exposição' ao ZLCV.



## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F.C.; IKEDA, H.; COSTA A.S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad.) em plantações de melão (*Cucumis melo* L.) na região de Belém-PA. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 12, p. 94, 1972.

ÁVILA, A.C. **Diversity of Tospovirus**. 1992. 136p. Ph. D. Thesis - Agricultural Wageningen University, Wageningen, 1992.

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 823-830, 1999.

CELEBI-TOPRAK, F.; SLACK, S.A.; RUSSO, P. Potato resistance to *Cucumber mosaic virus* is temperature sensitive and virus-strain specific. **Breeding Science**, Japan, v. 53, p. 69-75, 2003.

CHAGAS, C.M. Mosaico da abóbora em pepino. **O Biológico**, São Paulo, v. 36, p. 326, 1970.

CHOI, S.K.; YOON, J.Y.; RYU, K.H.; CHOI, J.K.; PALUKAITIS, P.; PARK, W.M. Systemic movement of a movement-deficient strain of *Cucumber mosaic virus* in zucchini squash is facilitated by a cucurbit-infecting potyvirus. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 83, p. 3173-3178, 2002.

CHU, F.-H.; CHAO, C.-H.; PENG, Y.-C.; LIN, S.-S.; CHEN, C.-C.; YEH, S.-D. Serological and molecular characterization of *Peanut chlorotic fanspotvirus*, a new species of the genus *Tospovirus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 856-863, 2001.

COOPER, J.I.; JONES, A.T. Responses of Plants to Viruses: Proposals for the Use of Terms. **The American Phytopathological Society**, England, v. 73, n. 2, p. 127-128, 1983.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; NAGAI, H. Alguns vírus que afetam o pepino (*Cucumis sativus* L.) em São Paulo. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 12, p. 100-101, 1972.

CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, E.W.; FONSECA, M.E.N.; MEYER, M.C. Viroses em plantas olerícolas no Estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 101, 1988.

DUFOUR, O.; PALLOIX, A.; SELASSIE, K. G.; POCHARD, E.; Marchoux, G. The distribution of *Cucumber mosaic virus* in resistant and susceptible plants of pepper. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 67, p. 655-660, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Statistics Division Online Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 2 set. 2010.

GIAMPAN, J.S. **Infectividade e proteção de três estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia**. 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

\_\_\_\_\_. ***Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)*: detecção, avaliação de danos de abobrinha de moita e reação de espécies de curcubitáceas**. 2007. 51p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GIAMPAN, J.S.; REZENDE, J.A.M.; SILVA, R.F. Reaction of cucurbits species to infection with *Zucchini lethal chlorosis virus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, p. 129-132, 2007.

GIAMPAN, J.S.; REZENDE, J.A.M.; PIEDADE, S.M.S. Danos causados pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita 'Caserta'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 223-225, 2009.

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**, Oxford, v. 51, p. 127-133, 2002.

GOODRICK, B.J.; KUHN, C.W.; HUSSEY, R.S. Restricted systemic movement of *Cowpea chlorotic mottle virus* in soybean with nonnecrotic resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 1426-1431, 1991.

GUERINI, M.N.; MURPHY, J.F. Resistance of *Capsium annuum* 'Avelar' to *Pepper mottle potyvirus* and alleviation of this resistance by co-infection with *Cucumber mosaic cucumovirus* are associated with virus movement. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 80, p. 2785-2792, 1999.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Banco de dados IEA**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em: 12 set. 2011.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by thrips. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, p. 119-157, 2005.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Alterações no complexo de golgi associada a infecção de tecido foliar de plantas infectadas por uma estirpe do vírus do vira-cabeça **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 5, p. 180-181, 1972.

KITAJIMA, E.W.; SÁ, P.B.; DE RITZINGER, C.H.S.P.; RODRIGUES, M.G.R. Detecção de partículas do tipo rhabdovirus em algumas compostas, abóboreira e mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 141-144, 1991.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2 p. 293-302.

LEASTRO, M.O., **Uma Abordagem Biológica e Molecular de Estudos do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), Uma Espécie Diferenciada do Grupo Americano de *Tospovirus***. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2011.

LEI, J.D.; AGRIOS, G.N. Mechanisms of resistance in corn to *Maize dwarf mosaic virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 1034-1040, 1986.

LIMA, J.A.A.; VIEIRA, A.C. Distribuição do vírus do mosaico da abóbora em municípios cearenses e gama de hospedeiros de um isolado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 112-114, 1992.

LIMA, J.A.A.; FERNANDES, E.R.; MENDES, M.L. Identificação sorológica de "*Watermelon mosaic virus 1*" em cucurbitáceas cultivadas e nativas do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 414, 1980.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; MUNHOZ, J.O. Isolamento e propriedade do vírus da necrose da abóbora, um possível membro do grupo "*Tobacco Necrosis Virus*". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 622, 1983.

LINDNER, R.C.; HUGH C.K.; WEEKS, T.E. Some factors affecting the susceptibility of cucumber cotyledons to infection by *Tobacco mosaic virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 49, p. 78-88, 1959.

MALLOR, C.; ÁLVAREZ, J.M.; LUIS-ARTEGA, M. A resistance to systemic symptom expression of *Melon necrotic spot virus* in melon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 4, p. 541-547, 2003.

MALLOR, C.; LUIS-ARTEGA, M.; ÁLVAREZ, J.M.; MONTANER, C.; FLORIS, E. Resistance to *Melon necrotic spot virus* in *Cucumis melo* L. 'Doublon' artificially inoculated by the fungus vector *Oplidium bornovanus*. **Crop Protection**, Guildford, v. 25, p. 426-431, 2006.

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

NAGATA, T.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C. First report on natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis virus* on cucumber and *Chrysanthemum stem necrosis tospovirus* on tomato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 1403, 1998.

NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W.; ALVES, D.M.T.; CARDOSO, J.E.; INOUE-NAGATA, A.K.; OLIVEIRA, M.R.V.; ÁVILA, A.C. Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 797, 2003.

NAGATA, T.; ALVES, D.M.T.; INOUE-NAGATA, A.K.; TIAN, T.Y.; KITAJIMA, E.W.; CARDOSO, J.E.; ÁVILA, A.C. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, Vienna, v. 150, p. 379-387, 2005.

NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R.C. *Frankliniella zucchini* (Trypanoptera: Thripidae), a new species and vector of tospovirus in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 101, p. 290-294, 1999.

NONO-WOMDIN, R.; MARCHOUX, G.; POCHARD, E.; PALLOIX, A.; GEBRE-SELASSIE, K. Resistance of pepper lines to the movement of *Cucumber mosaic virus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 132, p. 21-32, 1991.

PAPPU, H.R.; JONES, R.A.C.; JAIN, R.K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, Amsterdam, v. 141, p. 219–246, 2009.

PAVAN, M.A.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, J.J. Distribuição do vírus do mosaico da melancia (*Papaya ringspot virus - W*), nas principais regiões produtoras de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, p. 84-85, 1989.

PEREIRA, M.J.Z.; SUSSEL, A.A.B.; SILVA, R.F.; KUHN, O.J.; DOMINGUES, F.; REZENDE, J. A. M. Danos na produção da abobrinha de moita causados pelo *Papaya ringspot virus - type W* e *Zucchini yellow mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n.2, p. 192-194, 2007.

POZZER, L.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. A new tospovirus infecting Cucurbitaceae in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 21, 1994.

POZZER, L.; RESENDE, R.O.; BEZERRA, M.I.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C. *Zucchini lethal chlorotic virus (ZLCV)* a proposed new specie in Tospovirus genus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 432, 1996.

RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; GIORDANO, L.B.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 431, p. 78-79, 1996.

REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A.; IEMMA, A.F. Efeitos da premunização da abóbora 'menina brasileira' com estirpes fracas do vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1481-1489, 1999.



REZENDE, J.A.M.; GALLETI, S.R.; POZZER, L.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C.; SCAGLIUSI, S.M.M. Incidence, biological and serological characteristics of a tospovirus in experimental fields of zucchini in São Paulo State, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 92-95, 1997.

REZENDE, J.A.M.; GALLETI, S.R.; SCAGLIUSI, S.M.M.; POZZER, L.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. Incidência e algumas características biológicas e serológicas de um tospovirus em abobrinha de moita em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 343-344, 1995.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. Cucurbits. New York: **CAB International**, 1997. 226p.

SÁ, P.B.; KITAJIMA, E.W. Characterization of an isolate of *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2) from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 217-233, 1991.

SCHAAD, M.C.; CARRINGTON, J.C. Suppression of long-distance movement of *Tobacco etch virus* in a nonsusceptible host. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2556-2561, 1996.

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

SILVEIRA, W.G.; ÁVILA, A.C.; MUNOZ, J.O. Chuchu (*Sechium edule* Sw.): nova espécie hospedeira do vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 661-665, 1985.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; BURIOLLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 532, 2001.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, p. 132, 2000.

VAN DE WETERING, F.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 900-905, 1996.

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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 72-79, 1995.

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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 118, 1992.

WIJKAMP, I.; VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 74, p. 341-349, 1993.

YUKI, V.A. **Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita**. 1990. 84 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

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

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. Movimento de vírus na planta. In: \_\_\_\_\_. **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2002. cap. 7, p. 71-86.