

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'**

Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* - type W e do *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas de abobrinha-de-moita

Débora Maria Sansini Freitas

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2007**

Débora Maria Sansini Freitas
Engenheiro Agrônomo

Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus - type W* e do *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas de abobrinha-de-moita

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

Dissertação apresentada para o título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Freitas, Débora Maria Sansini

Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* – type W e do *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas de abobrinha-de-moita / Débora Maria Sansini Freitas. - - Piracicaba, 2007.

62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Abobrinha 2. Mosaico - Doença de planta 3. Potyvirus 4. Proteção de plantas
5. Vírus de plantas I. Título

CDD 635.62

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

À minha família,
especialmente à meus pais, Ana Maria e Adilson,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, pois torna tudo possível;

Ao professor Jorge Alberto Marques Rezende, que soube orientar-me e realizar o seu trabalho com toda a dedicação e paciência;

À todos os amigos que convivi e com quem pude aprender muitas coisas: Katherine, Estela, Adriana Moreira, Scheila, Ricardo, José Segundo, Marília, Armando, Ana Lúcia, Ana C. Negreiros, Hugo, Ana C. Firmino, Edivaldo, Adriana Jidão, Daniel, Davi, Maria Cândida, Júlio, Luzia, Luana, Luciano, Luís Antônio, Isolda, Evelyn, Jair, Shirley, Vânia, Tathyana, Michel, Eros, Alessandra, Isabeli, Eliane, Ana Paula, Alan, Daniela, Maria Cristina, Luís Fernando, Bárbara, Fátima e todos os demais colegas de curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por todo o apoio financeiro;

À bibliotecária Sílvia pela correção da revisão e Pedro C. Arthuso pelo auxílio no campo experimental;

À todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, que muito contribuem para a formação e manutenção deste curso de mestrado e da pesquisa científica.

‘O temor ao Senhor é uma glória, um motivo de glória, uma fonte de alegria, uma coroa de regozijo.’

Eclesiástico 1:11

‘Pela ciência enchem-se os celeiros de todo bem precioso e agradável’.

Provérbios 24:4

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2. 1 Generalidades sobre o PRSV-W e o ZYMV.....	16
2. 2 Controle de viroses em cucurbitáceas.....	18
2. 3 Mecanismos de proteção.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3. 1 Preparo de plantas-teste.....	26
3. 2 Estirpes do vírus.....	26
3. 3 Inoculação mecânica.....	26
3. 4 Escala de notas de sintomas.....	27
3. 5 Teste serológico de PTA-ELISA.....	28
3. 5. 1 Pré-absorção do antissoros.....	28
3. 6 Extração de RNA total e RT-PCR.....	29
3. 6. 1 Síntese de cDNA e PCR.....	29
3. 7 Avaliação do movimento sistêmico do vírus PRSV-W em plantas de abobrinha-de-moita Caserta'.....	31
3. 8 Avaliação da competição por sítios de replicação entre as estirpes do PRSV-W.....	32
3. 9 Determinação do tempo necessário para a proteção de abobrinha-de-moita com a estirpe fraca ZYMV-M.....	33
3. 9. 1 Inoculação de proteção.....	33
3. 9. 2 Inoculação de desafio.....	33
3. 9. 3 Teste de recuperação.....	34
3. 10 Avaliação da proteção das estirpes do ZYMV-M e do PRSV-W-1 em plantas de abobrinha-de-moita.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

4.1 Movimento sistêmico do PRSV-W em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta'.....	35
4. 2 Competição por sítios de replicação entre estirpes do PRSV-W.....	37
4. 3 Tempo necessário para proteção com a estirpe fraca ZYMV-M.....	44
4. 4 Proteção das estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1 em plantas de abobrinha-de-moita	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* - type W e do *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas de abobrinha-de-moita

O *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) são as duas espécies de potyvírus que mais causam danos em cucurbitáceas no estado de São Paulo e no Brasil. Uma boa alternativa de controle para as doenças causadas por esses vírus é o emprego da premunização. O principal objetivo desse trabalho foi estudar a competição por sítios de replicação como possível mecanismo de proteção entre a estirpe fraca PRSV-W-1 e a estirpe severa PRSV-W-C em plantas de abobrinha-de-moita. Além disso, procurou-se também conhecer o período mínimo necessário para a proteção de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M, só e em dupla premunização com a estirpe fraca PRSV-W-1, para fornecer subsídios para o uso em condições de campo. O estudo da competição por sítios de replicação como mecanismo de proteção foi feito inoculando-se plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' com a estirpe fraca PRSV-W-1 e desafiando-as com a estirpe severa PRSV-W-C. As inoculações de proteção foram feitas nas folhas cotiledonares e as de desafio na folha nova verdadeira, e vice-versa, aos 3, 6 e 9 dias após a primeira inoculação. Plantas infectadas com a estirpe fraca e não desafiadas e plantas infectadas com a estirpe severa foram usadas como controles. As avaliações foram feitas com base na manifestação dos sintomas 30 dias após o desafio. Também foi feito teste de recuperação da estirpe desafiante e detecção desta por RT-PCR, com primers específicos, aos 8 dias após o desafio. Os resultados sugerem que, independente do local onde foi realizada a inoculação de proteção (folha cotiledonar ou folha nova expandida), de uma maneira geral parece haver alguns sítios livres para a superinfecção com a estirpe severa. Quando esta foi inoculada aos três dias após a proteção, ela se estabeleceu em algumas plantas, moveu-se sistemicamente e sobrepôs a estirpe fraca, uma vez que as plantas exibiram sintomas severos. Com o passar do tempo (seis e nove dias após a proteção), todas as plantas ficaram protegidas contra a expressão dos sintomas severos da estirpe desafiante, porém esta foi capaz de se estabelecer nas folhas inoculadas e até mesmo mover sistemicamente em algumas plantas. No caso da proteção com a estirpe fraca ZYMV-M, só ou em mistura com a estirpe fraca PRSV-W-1, constatou-se que plantas de abobrinha-de-moita premunizadas e desafiadas sete dias depois ficaram protegidas contra a infecção e/ou manifestação dos sintomas das respectivas estirpes severas usadas no desafio.

Palavras-chave: PRSV-W; ZYMV; Potyvírus; *Cucurbita pepo*

ABSTRACT

Further insights on the protection between strains of *Papaya ringspot virus* – type W and *Zucchini yellow mosaic virus* in zucchini squash plants

Papaya ringspot virus - type W (PRSV-W) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) are two potyviruses associated with severe yield losses on cucurbit crops in the State of São Paulo and other parts of the Brazilian territory. Preimmunization with mild strains has proved to be a good alternative for the control of both viruses in susceptible cultivars. The main purpose of this work was to evaluate the competition for infectable sites as a possible mechanism of cross protection between the mild strain PRSV-W-1 and the severe strain PRSV-W-C in zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. Caserta). Protective inoculation with the mild strain was done at the cotyledon and the challenge inoculation with the severe strain was applied on the first true expanded leaf, and vice-versa. Different plants were challenged at three, six and nine days, respectively. No challenge protected plants and healthy plants infected with the severe strain were used as controls. Evaluations were based on the expression of the symptoms at 30 days after challenge inoculation. Attempts to recover the challenge strain from challenge inoculated and new developed leaves were also done at eight days after challenge inoculation. RT-PCR with specific pairs of primers was also used to detect both stains in some of these samples. Regardless the leaf on which the protective strain was applied (cotyledon or first true expanded leaf) there appear to be some infectable sites available for superinfection with the severe strain. When the challenge inoculation was done at three days after preimmunization, the severe strain was able to superinfect some plants, move systemically and overcome the mild strain, since these plants expressed severe symptoms. All plants become protected against the expression of the symptoms induced by the severe strain when the challenge inoculation was done at six and nine days after preimmunization. However, the severe strain was still detected in the inoculated and upper leaves of few test-plants, eight days after challenge inoculation. In addition to this, it was also determined the period of time necessary to protect zucchini squash plants with a mild strain of ZYMV, named ZYMV-M, alone and in mixture with mild strain PRSV-W-1. The results indicated that single and double preimmunized plants were protected against infection and/or expression of the homologous severe strain seven days after protective inoculation.

Keywords: PRSV-W; ZYMV; Potyvirus; *Cucurbita pepo*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Plantas de abobrinha-de-moita infectadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 (A) e ZYMV-M (B); planta sadia (C) e plantas infectadas com as estirpes severas PRSV-W-C (D) e ZYMV-RI (E)..... 27
- Figura 2- RT-PCR para a detecção do gene da capa protéica do PRSV-W com o uso dos primers para a detecção da estirpe severa (PS) e da estirpe fraca (PM). (1) e (2) plantas sadias, (4) e (5) planta infectada com PRSV-W-C e (3) e (6) planta infectada com PRSV-W-1..... 30
- Figura 3- Notas médias de sintomas de dois experimentos (Tabelas 6 e 7) de acordo com o número de dias entre a inoculação de proteção e a inoculação de desafio com as estirpes do ZYMV..... 45
- Figura 4- Porcentagem de proteção de plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas com as estirpes ZYMV-M, PRSV-W-1, sós e em mistura e desafiadas 7 dias após a inoculação de proteção..... 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Detecção do PRSV-W-C na folha cotiledonar inoculada e não inoculada, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação em uma das folhas cotiledonares..... 36
- Tabela 2- Detecção do PRSV-W-C nas folhas cotiledonares, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação do vírus na primeira folha verdadeira parcialmente expandida.....36
- Tabela 3- Detecção do PRSV-W-C nas folhas cotiledonares, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação do vírus na primeira folha verdadeira parcialmente expandida..... 37
- Tabela 4- Notas de sintomas de plantas de abobrinha-de-moita cv. Caserta premunizadas com a estirpe fraca PRSV-W-1 nas folhas cotiledonares e desafiadas com a estirpe fraca PRSV-W-C nas folhas novas e vice-versa..... 41
- Tabela 5- Detecção das estirpes fraca (PRSV-W-1) e severa (PRSV-W-C) a partir das amostras dos tecidos onde foram feitas as superinoculações (desafios) e dos ponteiros das plantas testes indicadas na tabela por meio dos testes de recuperação biológica e RT-PCR.....42
- Tabela 6- Reação de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M e desafiadas com a estirpe severa ZYMV-RI, em diferentes

intervalos de tempo após a inoculação de
proteção.....46

Tabela 7- Reação de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M e desafiadas com a estirpe severa ZYMV-RI em diferentes intervalos de tempo após a inoculação de
proteção.....47

Tabela 8- Avaliação de proteção de plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, só e em mistura e desafiadas com as respectivas estirpes severas (PRSV-W-C e ZYMV-RI), sete dias após a premunização..... 50

Tabela 9- Avaliação de proteção de plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, só e em mistura e desafiadas com as respectivas estirpes severas (PRSV-W-C e ZYMV-RI), sete dias após a premunização..... 51

1 INTRODUÇÃO

No Brasil já foram relatados nove vírus que afetam a família Cucurbitaceae. Dentre eles, os que mais tem causado danos, especialmente à cultura da abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) são o *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), causadores do mosaico comum e amarelo da abobrinha, respectivamente. Em diversos cultivos comerciais de cucurbitáceas foram verificadas altas incidências desses vírus em estados brasileiros. No estado de São Paulo, verificou-se incidências de 48,3% para o PRSV-W, e de 24,5% para o ZYMV (YUKI et al., 2000). No Maranhão, foram observadas incidências de 64,4% para o PRSV-W e de 3,4% para o ZYMV (MOURA; LIMA; OLIVEIRA, 2001). Stangarlin; Dias e Rezende (2000) encontraram uma incidência de 63,4% do PRSV-W, 56,1% do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e 41,4% do ZYMV no estado do Mato Grosso. Incidências de 68,7% de WMV (sin: *Watermelon mosaic virus* - 2; WMV-2) e 31,2% de PRSV-W foram encontradas nas culturas de melão e melancia da região do Sub-médio S. Francisco (CRUZ et al., 1999).

As viroses causadas pelo PRSV-W e pelo ZYMV são geralmente de difícil controle na maioria das culturas de cucurbitáceas (KUROSAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). No entanto, avaliações experimentais conduzidas por Rezende et al. (1994), Rezende e Pacheco (1998), Rezende; Pacheco e lemma (1999), Dias e Rezende (2000), Rabelo (2002), mostraram que a premunização foi experimentalmente eficiente para o controle dessas viroses em diferentes espécies de cucurbitáceas, com ganhos significativos na produção. A premunização é um método de controle no qual as plantas previamente inoculadas com estirpes fracas dos vírus ficam protegidas contra a posterior infecção e/ou manifestação de sintomas das estirpes severas presentes no campo (DODDS, 1982). Essa tecnologia é conhecida há várias décadas e vem sendo aplicada com sucesso no controle da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV) no Brasil a mais de trinta e cinco anos (MÜLLER; CARVALHO, 2001). Também tem sido útil no controle dessa virose em pomares da África do Sul (VON BROEMBSSEN; LEE, 1988) e na Austrália (BROADBENT et al., 1995). No caso de culturas anuais, a premunização foi eficiente e popular na década de 70 para o controle de *Tomato mosaic virus* (ToMV) em diversos países da Europa (RAST, 1975; LECOQ, 1998),

Canadá (HIRUKI, 1979), Japão (OSHIMA, 1975) e E.U.A. (AHOONMANESH; SHALLA, 1981). O seu uso foi interrompido com o desenvolvimento de variedades resistentes. Atualmente a premunização tem sido empregada comercialmente para o controle do mosaico amarelo da abobrinha (ZYMV) em cucurbitáceas em Israel (YARDEN et al., 2000) e no Havaí (CHO et al., 1992), do mosaico causado pelo vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* – CMV) em tomateiro no Japão (YOSHIDA; GOTO; IIZUKA, 1985) e do mosaico causado pelo CMV em pimentão na China (TIEN; WU, 1991). Outros exemplos de sucesso da premunização foram obtidos no controle do entumescimento da haste do cacauzeiro (*Cocoa swollen shoot virus*) na África (HUGUES; OLLENNU, 1994, POSNETTE; TODD, 1955), do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Passion fruit wildness virus*) na Austrália (SIMONDS, 1959) e do vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* – type P) em mamoeiro em Taiwan (YEH et al., 1988; YEH e GONSALVES, 1994). Nesses últimos casos, todavia, não há relatos de continuidade no uso da premunização. Apesar de ser uma técnica conhecida há vários anos e com aplicação comercial de sucesso em alguns casos, pouco se conhece sobre o(s) mecanismo(s) de proteção, embora esse assunto já tenha sido motivo de diversos estudos e especulações. Muitas teorias têm sido propostas para explicá-lo(s), porém experimentos adequados para testar algumas delas não foram executados. Entre as teorias propostas encontram-se as seguintes: a) formação de substâncias de proteção, semelhantes aos anticorpos produzidos em animais (THUNG, 1931 apud HIATT; CAFFERKEY; BOWDISH, 1989); b) adsorção das partículas do segundo vírus, após elas penetrarem nas células já ocupadas pelo vírus protetor (KANAVAU, 1949); c) competição para precursores ou para sítios de replicação (KUNKEL, 1934; ROSS, 1974; PONZ; BRUENING, 1986); d) teorias envolvendo a capa protéica (COSTA, 1975; DEZOETEN; FULTON, 1975; SHERWOOD; FULTON, 1982); e) captura da fita negativa do ácido nucléico do segundo vírus, pela fita positiva e abundante do vírus protetor, que seria válida apenas para vírus de fita simples de RNA, com senso positivo ou viróides (PALUKAITIS; ZAITLIN, 1984), inibição do movimento sistêmico do segundo vírus (DODDS; LEE; TIFFANY, 1985, REZENDE et al., 1992) e g) silenciamento gênico (LINDBO; DOUGHERTY, 2005; NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990).

O principal objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo experimental para estudar a competição por sítios de replicação como possível mecanismo de proteção entre estirpes do PRSV-W em plantas de abobrinha-de-moita. Além disso, procurou-se também conhecer o período mínimo necessário para a proteção de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca do ZYMV, só e em dupla premunização com a estirpe fraca do PRSV-W para fornecer subsídios para o uso em condições de campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades sobre o PRSV-W e o ZYMV

Dentre as culturas oleráceas tipicamente tropicais, as cucurbitáceas ocupam lugar de destaque, sendo seus produtos de ampla aceitação popular. São membros importantes desta família o pepino (*Cucumis sativus* L.), a melancia (*Citrullus lanatus* Thunb. Matsumara & Nakai), o melão (*C. melo* L.), a abóbora (*C. moschata* Duchesne ex Poiret), a moranga (*C. maxima* Duchesne), a abobrinha-de-moita (*C. pepo*.), o chuchu [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] e o maxixe (*C. anguria* L.).

A abobrinha-de-moita, também chamada abobrinha italiana, abobrinha de tronco ou árvore, originou-se da região central do México. Algumas cultivares foram introduzidas no Brasil, mas somente a cultivar Caserta, de origem americana, conquistou o consumidor (é o tipo preferido pelo consumidor brasileiro), além de se destacar pela produtividade. Os mosaicos causados por vírus são os principais problemas fitossanitários desta cultura, devido à alta susceptibilidade da maioria das variedades dentro da espécie *C. pepo* (FILGUEIRA, 2003).

No Brasil, os principais vírus que causam mosaico e provocam danos em abobrinha-de-moita são o PRSV-W e o ZYMV, espécies da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* que possuem a forma de um filamento cilíndrico e flexuoso e são constituídos de um único RNA de fita simples positiva. Ambos medem aproximadamente 700-800 nm de comprimento por 11-12 nm de diâmetro e possuem genoma linear e unipartido. O PRSV-W tem peso molecular de aproximadamente 10,3 kb, enquanto que o ZYMV possui cerca de 9 kb de peso molecular (BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, 1996; FAUQUET et al., 2005, PURCIFUL et al., 1996).

Considerado um importante patógeno de plantas dos últimos 20 anos, o ZYMV tem sido relatado em vários países além do Brasil: Argélia, Austrália, Egito, França, Alemanha, Israel, Itália, Japão, Jordânia, Líbano, Marrocos, Espanha, Formosa, Turquia, Reino Unido, EUA e Cingapura (BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, 1996; WONG; CHONG; CHONG, 1994).

As plantas infectadas com o ZYMV podem apresentar sintomas de amarelecimento entre as nervuras principais, mosaico, redução no desenvolvimento das

plantas e sementes, redução ou deformação do limbo foliar e frutos mal formados e escurecidos (KUROSAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; ZITTER; HOPKINS, 1996).

O ZYMV é transmitido por várias espécies de afídeos de maneira não persistente, não circulativa. Experimentalmente já foi transmitido por diversas espécies de afídeos, entre elas: *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, *Aphis citricola* Van der Goot, *A. pisum* Harris, *A. craccivora* Koch, *A. gossypii* Glover, *A. middletonii* Tomas, *A. spiraecola* Van der Goot, *Lypaphis erysimi* Kaltentbach, *Macrosiphum euphorbiae* Tomas, *Myzus persicae* Sulzer e *Uroleucon* sp (BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, 1996; CASTLE et al., 1992; LECOQ; PITRAT; CLEMENT, 1981). No trabalho de Yuan e Ullman (1996) constatou-se uma eficiência de 52,77% na transmissão por *A. craccivora* e 11,73% na transmissão feita por *A. gossypii*. Castle et al. (1992) verificaram uma eficiência de 41% para *M. persicae*, 35% para *A. gossypii*, 4% para *A. pisum* e baixas freqüências de transmissão para *A. kondoi*, *L. erysimi* e *A. spiraecola*. É importante salientar que os isolados de ZYMV diferem nos sintomas que causam, transmissibilidade por afídeos ou virulência para um gene de resistência (LECOQ, 1986; LECOQ; PITRAT; CLEMENT, 1981; PROVVIDENTI; GONSALVES; HUMAIDAN, 1984). Já a sua transmissão por sementes, ainda não está elucidada, pois há experimentos que confirmam sua transmissão e outros que a negam (BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, 1996; LECOQ; PITRAT; CLEMENT, 1981).

O ZYMV pode ser encontrado principalmente nas espécies de cucurbitáceas, incluindo as principais espécies cultivadas e há relatos de infecção de algumas outras espécies de famílias de dicotiledôneas. Quando inoculados com este vírus, hospedeiros não pertencentes à família Cucurbitaceae costumam exibir sintomas latentes ou localizados, com exceção de *Sesamum indicum* L., que em um experimento realizado no Sudão, foi inoculado com vinte e dois isolados do ZYMV, mostrando posteriormente sintomas de mosaico severo (MAHGOUB et al., 1997). Duas espécies da família Chenopodiaceae, *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reynier e *C. quinoa* Willd, quando inoculadas reagem com sintomas locais nas folhas, sendo boas indicadoras do ZYMV (DESBIEZ; LECOQ, 1997). Além destes, são relatados outros hospedeiros alternativos como *Gomphrena globosa* L., *Luffa acutangula* L. Roxb., *Melothria pendula* L., *Moluccella laevis* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., *Ranunculus sardous*

Crantrus e *Senescio vulgaris* L. (AL-MUSA, 1989; BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, 1996).

O PRSV-W encontra-se distribuído nas Américas (do Sul, Central, Estados Unidos, México), Oriente Médio, Austrália, China, França, Alemanha, Índia, África do Sul e Itália (PURCIFUL et al., 1996).

Os sintomas do PRSV-W em *C. pepo* consistem em mosaico, deformação de folhas, que apresentam bolhas, frutos malformados e com coloração alterada e atrofia de plantas (KUROSAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

O vírus é transmitido por inoculação mecânica, mas não por semente (PURCIFUL et al., 1996). É transmitido em campo de maneira não persistente, não circulativa, por várias espécies da família Aphididae, como *M. persicae*, *A. gossypii*, *A. (Aulacorthum) solani* Kaltentbach, *A. craccivora*, *M. euphorbiae* Tomas, *A. fabae* Scopoli (MOLNAR; SCHMELZER, 1964). *Toxoptera citricidus* Kirkaldy e *L. erysimi* (GIAMPAN; REZENDE, 2001). Adlerz (1974) obteve 92% de transmissão do PRSV-W por *A. gossypii*, enquanto que Yuki (1990) obteve apenas 15,4% de transmissão por essa espécie de afídeo e 92,3% de transmissão com *M. persicae*. Giampan e Rezende (2001) em experimentos com quarto estirpes do PRSV-W obtiveram uma média de 75% de transmissão com *M. persicae*, 35% com *A. gossypii*, 13% com *T. citricidus* e 2% com *L. erysimi*. A maioria das variedades de abobrinha-de-moita são altamente susceptíveis ao PRSV-W. Alguns isolados do PRSV-W causam lesões locais em *C. amaranticolor* e *C. quinoa*. Outras espécies suscetíveis que apresentam sintomas sistêmicos quando inoculadas são: *C. lanatus*, *C. melo*, *C. metuliferus* Naud. Mey, *C. sativus*, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *L. acutangula*, *Macroptilium lathyroides* L., *Psiguria triphylla* Miquel, *M. pendula* L., todas da família Cucurbitaceae (PURCIFUL et al., 1996, NAKANO et al., 2007).

2. 2 Controle de viroses em cucurbitáceas

Para o controle do mosaico comum e amarelo da abobrinha-de-moita, a pulverização com inseticidas para o controle dos afídeos não tem mostrado efeito satisfatório. Os inseticidas não são eficientemente rápidos para matarem os afídeos antes da inoculação do vírus na planta. Como esses vírus são transmitidos de modo

não persistente, não circulativo, os inseticidas podem até excitar os insetos a realizar mais picadas de prova e aumentar a incidência desses dois vírus. O uso de óleo mineral pode causar fitotoxidez e não oferece uma proteção desejada (KUROSAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). Materiais como a casca de arroz, segundo Costa e Costa (1971) e Yuki (1990) ou látex biodegradável (SUMMERS et al., 1995), podem reduzir significativamente a incidência do mosaico da abobrinha-de-moita causado pelo PRSV-W, com ganhos na produção. Todavia, não há relato sobre a aplicação comercial desse tipo de proteção. Fontes de resistência genética à essas duas viroses em *C. pepo* são ainda muito escassas. Tricoli et al. (1995) desenvolveram uma linhagem transgênica de abobrinha-de-moita resistente ao CMV, ao WMV e ZYMV, mas estas plantas não estão sendo comercializadas no Brasil.

A premunização (ou proteção) é uma outra opção importante para o controle de viroses (REZENDE; MÜLLER, 1995). Tem-se mostrado viável no controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita em campo pela falta de outras alternativas econômicas e efetivas de controle (WANG et al., 1991).

Na França, Lecoq; Lemaire e Wipf-Scheibel (1991) foram os que primeiramente propuseram o uso da premunização para o controle do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita.

Experimentos em campo com uma estirpe fraca (ZYMV-WK) de ineficiente transmissão por afídeos, mostraram que as plantas premunizadas produziram 14,7 vezes mais frutos comerciais (peso) do que as não premunizadas. Essa estirpe também foi eficaz para o controle do mosaico amarelo em Taiwan (WANG et al.; 1991) e na Inglaterra (WALKEY et al., 1992). Em Taiwan, os ganhos na produção proporcionados pela premunização foram de 116% no primeiro ano e de 1.256% no segundo ano de experimentações. A premunização para o controle do mosaico amarelo também foi avaliada experimentalmente na Califórnia, E.U.A., com resultados promissores (PERRING et al., 1995).

As primeiras tentativas de controle do mosaico comum de abobrinha-de-moita, causado pelo PRSV-W, foram feitos no Brasil por Rezende et al. (1994). Subsequentemente, as estirpes fracas estáveis e protetoras selecionadas por estes investigadores mostraram-se altamente eficazes para o controle do mosaico em

abobrinha-de-moita, abóbora e abóbora híbrida em condições experimentais de campo. No caso da abobrinha-de-moita, Rezende e Pacheco (1998) relataram que as plantas premunizadas tiveram ganhos da ordem de 633% e 344% na produção (peso) de frutos comerciais no primeiro e segundo ano de experimentação em campo, respectivamente, se comparados com as plantas infectadas apenas com as estirpes severas. Em abóbora 'Menina Brasileira', sob condições de campo, houve um aumento de 33% na produção (peso) de frutos comerciais colhidos de plantas premunizadas com a estirpe fraca do PRSV-W em relação às plantas naturalmente infectadas com a estirpe severa desse vírus (REZENDE; PACHECO; IEMA, 1999). Em abóbora híbrida do tipo 'Tetsukabuto' as plantas premunizadas com a estirpe fraca do PRSV-W produziram aproximadamente cerca de 3,1 e 2,3 vezes mais frutos por planta (peso) do que as plantas não protegidas, no primeiro e segundo experimento, respectivamente (DIAS; REZENDE, 2000).

Anos mais tarde, também no Brasil, Rabelo (2002), selecionou uma estirpe fraca do vírus do mosaico amarelo da abobrinha, denominada ZYMV-M, que protegeu plantas de abobrinha-de-moita contra a estirpe severa desse vírus em condições de casa de vegetação e de campo. Plantas premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M obtiveram ganhos de 101% no peso de frutos e 76,6% no número médio de frutos por planta, se comparado com plantas somente infectadas com a estirpe severa ZYMV-RI. Plantas duplamente premunizadas com ZYMV-M e PRSV-W-1 obtiveram ganhos de 85% no peso de frutos comerciais e 70% no número médio de frutos por planta em comparação com as plantas somente infectadas com a mistura das duas estirpes severas homólogas. A produção de frutos comerciais das plantas duplamente protegidas foi 9,5% inferior ao daquelas plantas premunizadas separadamente com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, respectivamente, sugerindo um pequeno efeito sinérgico da dupla premunização. Efeito de mesma natureza foi constatado no Japão em experimentos de campo com plantas de pepino premunizadas com estirpes fracas do CMV, ZYMV e WMV (KOSAKA e FUKUNISHI, 1997). As plantas com proteção tripla produziram 15% menos frutos comerciais do que as plantas sadias. Esse fato fez os autores recomendarem a tripla premunização apenas nas épocas de maior incidência

desses vírus, onde os danos que eles causam são maiores que os ocasionados pela múltipla proteção.

Bons resultados utilizando a premunização também foram obtidos em experimentos com abobrinha-de-moita e outras cucurbitáceas na Inglaterra, Japão e Estados Unidos (KAMEYA-IWAKI et al., 1992; PERRING et al., 1995; WALKEY et al., 1992).

2. 3 Mecanismos de proteção

Quanto aos mecanismos de proteção, muito pouco ainda é conhecido, apesar de esse assunto ter sido motivo de diversos estudos e especulações (REZENDE ; MÜLLER, 1995). Muitas teorias tem sido propostas, podendo ser encontradas nos artigos de revisão de Fulton (1982), de Ponz e Bruening (1986), de Sherwood (1987), de Urban et al. (1989) e de Rezende e Müller (1995). Algumas destas teorias são apresentadas a seguir:

Thung (1931 apud HIATT; CAFFERKEY; BOWDISH, 1989) formulou a idéia de que a proteção poderia resultar da formação de substâncias de defesa do tipo anticorpo. Sabe-se que a planta não possui um sistema imunológico semelhante aos dos animais, mas há relatos de que células de fumo transformadas geneticamente com genes que codificam a produção de imunoglobinas produziram anticorpo funcional.

A adsorção do segundo vírus foi a hipótese apresentada por Kanavau (1949), para explicar o não estabelecimento deste em uma célula já ocupada pelo primeiro.

Kunkel (1934) formulou a hipótese de que os vírus relacionados utilizam os mesmos materiais precursores para a sua replicação, e que o primeiro vírus estaria utilizando todos os precursores, pouco ou nada sobrando desse material para a multiplicação do segundo vírus. Ross (1974), propôs que estes precursores seriam ribossomos. Ponz e Bruening (1986) sugeriram que a *RNA-dependent RNA polymerase*, proteína necessária como parte da replicase do vírus, poderia estar relacionada ao mecanismo de proteção.

Kunkel (1934) e Bawden e Kassanis (1945), propuseram que nas células das plantas devem existir sítios específicos para a multiplicação de vírus e que são em número limitado. Assim sendo, a estirpe protetora de um vírus ocuparia todos os sítios

não deixando sítios disponíveis para outra estirpe do mesmo vírus se estabelecer. Segundo Costa (1975), esse efeito competitivo pode ser exercido em qualquer uma das fases do ciclo do vírus dentro das células e dos tecidos da hospedeira, além de que, o segundo vírus, mesmo estabelecido em poucas células, levaria enorme desvantagem competitiva para se estabelecer em outras partes da planta. Sherwood e Fulton (1982) estudando a proteção entre uma estirpe comum do *Tobacco mosaic virus* (TMV-C) e outra necrotizante (TMV-P) em plantas de *Nicotiana sylvestris*, constataram que plantas com mosaico induzido pela estirpe TMV-C exibiam lesões locais da estirpe TMV-P apenas nas áreas verde-escuras, onde havia menor concentração da estirpe protetora. Posteriormente Sherwood e Funton (1983) relataram que a proteção entre essas estirpes está relacionada com a competição por sítios de infecção e a multiplicação da estirpe desafiante. Rezende e Sherwood (1991) em testes de proteção com essas mesmas estirpes de TMV, em plantas de *N. tabacum* cultivares Samsun e Xanthi, também constataram maior superinfecção em áreas verde-escuras das folhas com mosaico. Nesse modelo, todavia, ambas as estirpes causam mosaico caracterizado por áreas verde-claras e verde-escuras. As áreas verde-escuras, que possuem menor concentração de vírus, sempre foram as mais susceptíveis à superinfecção com a estirpe desafiante. Por outro lado, esses autores constataram que protoplastos obtidos de áreas verde-clara e verde-escuras de *N. sylvestris* infectada com TMV-C e superinoculadas com a estirpe TMV-P exibiram o mesmo nível de suscetibilidade à superinfecção.

A hipótese de que as partículas do segundo vírus, para o qual o primeiro oferece proteção, seriam separadas em ácido nucléico e capa protéica, porém ocorreria uma recapeação do ácido nucléico do segundo vírus pela capa protéica do primeiro, foi apresentada por Costa (1975) e De Zoeten e Fulton (1975). Essa hipótese foi testada experimentalmente através de mutantes de TMV incapazes de recapear, uma estirpe comum do mesmo vírus, mas os resultados sugeriram que o recapeamento do ácido nucléico do segundo vírus não estava relacionado com a proteção nesse sistema (ZAITLIN, 1976). Foi sugerido por Horikoshi et al. (1987), com base em resultados experimentais, que a regulação da replicação através da capa protéica pode ser um

mecanismo que explica a proteção entre vírus de plantas, não implicando que haja completa recapeação do ácido nucléico do segundo vírus.

Costa (1975), propôs que a não separação do ácido nucléico do capsídeo poderia explicar o mecanismo de proteção, postulando que nas células já ocupadas pelo primeiro vírus deixaria de ser operativo o mecanismo que leva à separação do ácido nucléico do vírus de seu capsídeo, não permitindo que o ácido nucléico do segundo vírus exercesse suas funções. Essa hipótese foi reapresentada e testada por Sherwood e Fulton (1982) que demonstraram que a proteção estava associada à incapacidade do ácido nucléico das estirpes desafiantes sair da capa protéica e se manifestar. Esses autores inocularam plantas de *Nicotiana sylvestris* com uma estirpe de TMV que causa mosaico caracterizado por áreas verde-claro e verde-escuras. Quando essas plantas foram desafiadas com uma estirpe severa do TMV que causa lesões necróticas, essas lesões somente pareceram nas áreas verde-escuras, mas quando o desafio foi feito apenas com o RNA da estirpe necrotizante, os sintomas apareceram tanto em áreas verde-claras como em áreas verde-escuras. Dodds; Lee e Tiffany (1985), verificaram essa mesma hipótese em seu trabalho com as estirpes CMV-S (fraca) e CMV-P (severa) utilizando plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Rutgers) onde a proteção foi completa quando plantas foram inoculadas com partículas completas do desafiante, havendo quebra na proteção quando desafiadas apenas com o RNA do vírus. Experimentos com plantas transgênicas que contém o gene responsável pela formação das subunidades da capa protéica apresentam evidências desta no papel da proteção (BEACHY; LOESCH-FRIES; TUMER, 1990). Zinnen e Fulton (1986) verificaram que outros fatores, além da capa protéica, parecem estar envolvidos nos mecanismos de proteção.

Palukaitis e Zaitlin (1984) formularam a hipótese de que em vírus constituídos por RNA de fita simples, a infecção com o vírus desafiante seria reduzida ou anulada, porque as fitas nascentes do ácido nucléico do desafiante, de polaridade negativa, se tornariam hibridizadas com o excesso de fitas positivas do vírus protetor presente nas células.

A idéia de que o primeiro vírus inoculado estabelece um mecanismo específico para a invasão sistêmica da planta, e que o segundo vírus inicia o processo de

replicação após o processo de inoculação, mas fica impedido de estabelecer seu próprio mecanismo de invasão sistêmica (devido a mudanças de supostos receptores envolvidos no movimento inicial de célula para célula ou de longa distância ou à saturação de sítios nas células) tem por base os resultados de Dodds; Lee e Tiffany (1985), que verificaram que a proteção em plantas de tomateiro (*L. esculentum* Mill cv. Rutgers) foi completa quando as plantas foram inoculadas com partículas completas do vírus desafiante. Quando o inóculo do desafio foi apenas o RNA, houve quebra de proteção, mas a multiplicação da estirpe desafiante ficou restrita ao local de inoculação, não sendo constatada a invasão sistêmica do desafiante nas folhas novas destas plantas. No trabalho de Urban; Sherwood e Melcher (1988), onde os ensaios de proteção entre estirpes do TMV foram conduzidos em folhas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, também verificou-se que em todos os casos onde constatou-se a multiplicação da estirpe desafiante nas folhas inoculadas, esta não foi encontrada dias mais tarde nas folhas jovens das plantas.

Por outro lado, quando os testes de proteção com essas mesmas estirpes do TMV foram feitos em *N. tabacum* cvs. Samsun e Xanthi, constatou-se que em todos os casos onde detectou-se a multiplicação da estirpe desafiante nas folhas inoculadas, esta moveu-se sistemicamente para as folhas jovens, onde foi detectada dias mais tarde (Rezende et al., 1992). Esses fatos sugerem também um possível efeito da hospedeira no fenômeno da proteção.

Diversas linhas de evidência sugerem que a resistência de plantas transgênicas à vírus está relacionada com o silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcriptional gene silencing* – PTGS). Também parece haver uma ligação entre PTGS e a proteção entre vírus em plantas não transgênicas. Estudos feitos com espécies de nepovírus e caulimovirus indicaram essa ligação (COVEY et al., 1997; RATCLIFF et al., 1999). Nesses exemplos, as plantas infectadas exibem uma resposta de recuperação, onde as folhas do ponteiro se tornam assintomáticas e contém baixa concentração de vírus. Nas plantas infectadas pelo nepovírus (*Tomato black ring virus*), as folhas assintomáticas ficam resistentes à superinfecção com a estirpe homóloga. Essa proteção está relacionada com o processo de PTGS. Mais evidências do envolvimento

do silenciamento gênico pós-transcricional no processo de proteção de vírus de plantas provém do trabalho de Ratcliff et al. (1999) com *Tobacco rattle virus* e *Potato virus X*.

Estudos posteriores de diversos pesquisadores demonstraram que esse mecanismo engloba processos citoplasmáticos e nucleares relacionados com a regulação da expressão dos genes durante e após a transcrição, por meio do bloqueio da tradução ou da degradação de seqüências específicas de mRNAs alvos (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Vírus podem sofrer silenciamento em células de plantas, quando o RNA dupla fita formado durante sua replicação é processado por enzimas do tipo Dicer (enzimas do tipo RNase III), gerando *small interfering RNAs* (siRNAs, pequenos RNAs de cerca de 21 nt), que serão incorporados ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex) para guiar a atividade das nucleases desse complexo para a seqüência do RNA alvo do vírus, degradando-o (LINDBO; DOUGHERTY, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 Preparo de plantas-teste

Plantas de abobrinha-de-moita (*C. pepo* cv. Caserta) foram produzidas em casa de vegetação, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – Setor de Fitopatologia – na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Em vasos de alumínio esterelizados, de 14,5 cm de diâmetro por 16 cm de altura, com substrato formado de composto orgânico e adubo mineral, autoclavado previamente a 121°C, realizou-se a semeadura, que foi feita a cerca de 1 cm de profundidade, com 3 sementes por vaso. Depois da germinação, com as plantas no estágio cotiledonar, foi feito um desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso. As plantas foram freqüentemente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia por vaso.

3. 2 Estirpes dos vírus

Foram utilizadas duas estirpes do ZYMV. A estirpe fraca ZYMV-M, selecionada por Rabelo (2002) e uma estirpe severa, oriunda da região de Rinópolis, SP (ZYMV-RI), mantida na coleção de vírus do Laboratório de Virologia, ESALQ-USP. Também foram utilizadas duas estirpes do PRSV-W. Uma estirpe fraca, denominada PRSV-W-1, selecionada por Rezende et al. (1994) e a estirpe severa, PRSV-W-C, originária de Campinas. Essas estirpes foram mantidas separadamente em plantas de abobrinha-de-moita ‘Caserta’ em casa de vegetação.

3. 3 Inoculação mecânica

Os inóculos das estirpes do ZYMV e do PRSV-W foram obtidos de folhas de abobrinha-de-moita, maceradas em almofariz de porcelana, juntamente com tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0 e sulfito de sódio 0,02 M, na diluição de 1:10. As inoculações foram feitas nas folhas cotiledonares ou nas folhas parcialmente expandidas, por meio da inoculação mecânica convencional com o abrasivo carbureto de silício ou “carburundum”. As plantas posteriormente foram lavadas com água para a retirada do excesso de “carburundum” e de inóculo.

3. 4 Escala de notas de sintomas

As avaliações das plantas-teste foram feitas por meio de leituras periódicas de sintomas até a conclusão dos testes.

Em todas as fases do desenvolvimento das plantas foi adotada uma escala de notas de severidade de sintomas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido. A figura 1 ilustra os sintomas induzidos pelas estirpes fracas e severas do PRSV-W e ZYMV.



Figura 1- Plantas de abobrinha-de-moita infectadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 (A) e ZYMV-M (B); planta sadia (C) e plantas infectadas com as estirpes severas PRSV-W-C (D) e ZYMV-RI (E)

3.5 Teste serológico de PTA-ELISA

Foi utilizado o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), do tipo PTA (*Plate Trapped Antigen*), com algumas modificações da forma descrita por Mowat e Dawson (1987). Neste teste, foram utilizados antissoros policlonais específicos contra o ZYMV e contra o PRSV-W, disponíveis no Laboratório de Virologia da ESALQ.

O procedimento utilizado neste teste foi o seguinte: 100 µL das amostras, diluídas 1:20 (p:v) em tampão carbonato (15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃ e 3 mM NaN₃) pH 9,6, foram colocados em placas de ELISA de 96 pocinhos. Cada amostra foi colocada em 2 pocinhos e incubada por 15 minutos, a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween [1L PBS (*Phosphate buffered saline*: 0,0015 M KH₂PO₄ , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4) acrescido de 0,5 mL de *Tween* 20]. A seguir adicionou-se o antissoro diluído 1:500 em tampão PBS-TPB (PBS +0,05% *Tween* 20 + 2% *polyvinylpyrrolidone* MW 44.000 + 0,2% *Bovine Serum Albumin*), no volume de 100 µL por pocinho. As placas foram incubadas por duas horas, a 37°C. Depois de lavadas como anteriormente, foi adicionada a proteína A conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Protein A - *Alkaline Phosphatase Conjugate*, P-7488), diluída 1:40000 em tampão PBS-TPB. As placas foram lavadas 3 vezes após uma nova incubação por 2 horas a 37°C. Após a lavagem foram colocados 100 µL de p-fosfato de nitrofenil por pocinho (Sigma, N-9389), diluído em tampão de dietanolamina pH 9.8 (0.6 mg/mL). Para ocorrer a reação enzimática as placas foram colocadas no escuro por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em um leitor de ELISA Metertech 960 com filtro de 405 nm foi lida a absorbância de cada um dos pocinhos. Como controles foram usados extratos de plantas sadias e infectadas com o ZYMV e o PRSV-W. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância foi pelo menos duas a três vezes superior à média da absorbância do extrato da planta sadia.

3. 5.1 Pré-absorção do antissoro

Primeiramente foi preparada uma suspensão de extrato de folha de abóbora sadia (Caserta), diluído 1:20 em PBS-TPB. O antissoro contra o vírus em questão foi diluído na razão de 1:500 no mesmo tampão. Essas soluções foram então misturadas na proporção de 1:1 e a mistura foi colocada em geladeira a 4°C, durante 16 horas. A mistura foi centrifugada a 10000 g, durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante (antissoro diluído 1:1000), que foi diretamente usado no teste de PTA-ELISA na etapa de adição do antissoro.

3. 6 Extração de RNA total e RT-PCR

A extração de RNA total das plantas de abobrinha-de-moita foi feita utilizando Trizol® LS (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante.

3. 6.1 Síntese de cDNA e PCR

A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas infectadas com o vírus. Três microlitros de suspensão de RNA total foram misturados ao oligonucleotídeo iniciador (*primer*) anti-senso originário do gene da proteína capsial do PRSV-P (5'–AGCTAACCATGGGCGAGTATTTCAGTTGCGC–3') (SOUZA Jr.,1999), diluído em água destilada previamente tratada com DEPC, na concentração de 20 pmoles, 1 µL de mistura de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10 mM e 5 µL de água DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente mantida no gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4 µL do tampão 5X da enzima transcriptase reversa, 1 µL de DTT (ditiotreitól) 0,1M, 200 unidades da enzima Superscript III, 4 µL de água DEPC, misturados num volume final de 20µL. Essa solução foi incubada por 25 °C por 5 minutos, por 50 °C a 60 minutos e a 70 °C por 15 minutos.

O cDNA foi usado em uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase). Desse modo, 2,5 µL do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µL de tampão 10X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 1,5 µL de MgSO₄ 50 mM, 0,5 µL do *primer*

senso 20 pmoles, 1 μ L do *primer* anti-senso 20 pmoles descrito anteriormente, 0,5 μ L de mistura de dNTP's 10 mM e 16,25 μ L de água Milli Q. O *primer* senso utilizado para a detecção da estirpe fraca do PRSV-W foi o 'PM' (5'-GACTAGCAAAAATGA-3'). O utilizado na detecção da estirpe severa foi o 'PS' (5'-AACTAGCACAAAAC-3') (DELLA VECCHIA; CAMARGO; REZENDE, 2003) (Figura 2). A mistura foi então incubada a 80°C por 2 minutos e após esse período adicionou-se 1 unidade de Taq DNA Polymerase. O regime do termociclador (MJ Research PTC 200) foi de um ciclo de 94°C por 30 segundos, seguido de 60 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. No segundo ciclo, as temperaturas foram de 94 °C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 1 minuto a 72°C. O terceiro ciclo foi de 94 °C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 1 minuto a 72°C, sendo repetido 29 vezes e finalizado com 72°C por 7 minutos. O produto da RT-PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%, contendo 7 mL de SYBR Safe™ DNA Gel Stain em 0,5X TBE (45mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3).

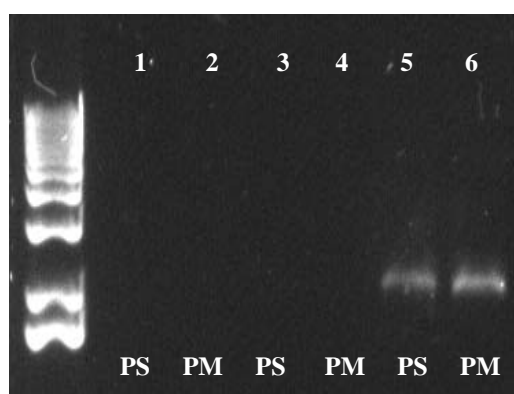


Figura 2- RT-PCR para a detecção do gene da proteína capsial das estirpes fraca e severa do PRSV-W com os *primers* específicos da estirpe severa (PS) e da estirpe fraca (PM). (1) e (2) planta sadia, (4) e (5) planta infectada com PRSV-W-C e (3) e (6) planta infectada com PRSV-W-1

3. 7 Avaliação do movimento sistêmico do PRSV-W em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta'

Esse estudo preliminar teve como propósito validar um possível modelo experimental que permitisse investigar a competição entre as estirpes fraca e severa do PRSV-W por sítios de replicação em abobrinha-de-moita cv. Caserta, para estudo dos possíveis mecanismos de proteção. Para a obtenção desse modelo, foi necessário avaliar o movimento sistêmico do vírus, a fim de encontrar locais na planta onde a estirpe protetora não estivesse estabelecido em todas as células. É oportuno lembrar que a movimentação de vírus na planta segue o fluxo de fotoassimilados (da fonte para o dreno) (ROBERTS et al., 1997). Para analisar isso, foi utilizada a estirpe severa PRSV-W-C, devido à sua maior sensibilidade na detecção pelo teste serológico de PTA-ELISA. Foram feitos alguns testes preliminares de acompanhamento do movimento sistêmico do PRSV-W para calibrar o método para a determinação do estágio de desenvolvimento da planta e dos períodos de amostragem após a inoculação. Após estes testes, decidiu-se realizar o experimento com plantas com cerca de 8 dias após a germinação (quando as folhas cotiledonares já estão bem expandidas, e provavelmente já tenham passado de dreno a fonte dos fotoassimilados).

Num primeiro teste, plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', em estágio cotiledonar, foram inoculadas mecanicamente com a estirpe PRSV-W-C em apenas uma das folhas cotiledonares. Nos tempos de 4, 6 e 8 dias após a inoculação, foram colhidas amostras da folha cotiledonar inoculada, da folha cotiledonar oposta não inoculada, da haste da planta e de parte do sistema radicular. Com o passar do tempo foram colhidas também amostras das folhas novas. Todas as amostras foram avaliadas por meio do PTA-ELISA, para a detecção da presença do vírus.

Em outro experimento, foi alterado o local da inoculação, que foi feita na primeira folha verdadeira, parcialmente expandida das plantas de abobrinha-de-moita cv. Caserta. Nos tempos de 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação foram colhidas amostras das folhas cotiledonares, da folha nova do ponteiro, da raiz e do caule. Estas amostras foram submetidas a um teste de PTA-ELISA. Os experimentos que mostraram resultados favoráveis ao modelo esperado foram repetidos, para a confirmação dos dados.

3. 8 Avaliação da competição por sítios de replicação entre estirpes do PRSV-W

Os resultados do teste anterior serviram de base para a construção do modelo para avaliar a competição por sítios de replicação entre estirpes protetora e desafiante do PRSV-W. Deste modo, a primeira folha verdadeira parcialmente expandida do ponteiro foi inoculada mecanicamente com a estirpe fraca PRSV-W-1 e posteriormente os desafios com a estirpe severa PRSV-W-C foram feitos nas folhas cotiledonares. Entende-se por desafio, ou superinoculação, a inoculação de uma segunda estirpe, geralmente a estirpe severa, em plantas previamente infectadas com uma estirpe fraca do mesmo vírus. Também foi feita a inoculação de proteção nas folhas cotiledonares e desafio com a estirpe severa nas folhas expandidas do ponteiro. Foram usadas como controles plantas apenas premunizadas com a estirpe fraca e plantas inicialmente sadias e inoculadas com a estirpe severa por ocasiões dos desafios. Os desafios foram feitos por meio da inoculação mecânica aos três, seis e nove dias após a inoculação de proteção, em grupos distintos de plantas. As avaliações foram feitas da seguinte maneira: oito dias após o desafio foram coletados discos foliares dos tecidos onde foram feitas as inoculações de desafio e das folhas novas após posterior desenvolvimento das plantas. Metade de cada amostra foi usada para a extração de RNA total e análise por RT-PCR com os dois pares de *primers* específicos para a detecção da estirpe fraca e severa do PRSV-W (DELLA VECCHIA; CAMARGO; REZENDE, 2003). A outra parte foi usada para preparar inóculos para o teste de recuperação, através da inoculação em abobrinha-de-moita cv. Caserta, seguindo o mesmo procedimento adotado para o ZYMV, conforme descrito no item 3. 9. 3.

As plantas permaneceram em casa-de-vegetação, onde a proteção foi posteriormente avaliada por um período de 30-40 dias com base na expressão dos sintomas, usando a escala de notas descrita no item 3.4.

3. 9 Determinação do tempo necessário para a proteção de abobrinha-de-moita com a estirpe fraca ZYMV-M

3. 9. 1 Inoculação de proteção

Plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta', no estágio cotiledonar, cultivadas em vaso, em casa de vegetação, foram inoculadas mecanicamente em um mesmo dia com a estirpe fraca ZYMV-M. Plantas da mesma idade foram inoculadas apenas com o tampão. A confirmação da infecção com a estirpe fraca ZYMV-M foi feita pelos testes de PTA-ELISA e RT-PCR.

3. 9. 2 Inoculação de desafio

A inoculação de desafio foi feita por meio de inoculação mecânica com a estirpe severa ZYMV-RI, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias após a inoculação de proteção. As primeiras inoculações de desafio foram feitas nas folhas cotiledonares. Com o passar do tempo e o desenvolvimento das plantas os desafios posteriores foram feitos nas folhas novas expandidas. Para cada inoculação de desafio foram inoculadas duas plantas previamente inoculadas apenas com a solução tampão, para servirem como controle da infectividade do inóculo. Duas plantas apenas inoculadas com a estirpe fraca e duas plantas sadias foram mantidas como controles para comparações nas avaliações de proteção com base nos sintomas.

3. 9. 3 Teste de recuperação

As avaliações do efeito protetor da estirpe ZYMV-M foram feitas através da avaliação de sintomas e pelo teste de recuperação da estirpe utilizada no desafio. Inóculos extraídos dos ponteiros de cada planta desafiada, 20-30 dias após o desafio, foram inoculados separadamente em duas plantas de abobrinha no estágio cotiledonar. A presença dos sintomas severos nessas plantas foi o indicativo da recuperação da estirpe severa do ZYMV usada no desafio, indicando portanto ausência de proteção.

3.10 Avaliação da proteção das estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1 em plantas de abobrinha-de-moita.

Em testes posteriores, plantas premunizadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura, foram desafiadas com as estirpes severas PRSV-W-C e ZYMV-RI, sós e em mistura. Estes testes foram similares aos testes anteriores, mas o desafio foi feito apenas no tempo de 7 dias após a inoculação de proteção. Plantas premunizadas não desafiadas foram mantidas como controles. Plantas sadias foram inoculadas com os inóculos dos desafios para controle da infectividade destes. Foram realizados testes de recuperação das estirpes severas nos mesmos moldes citados no item anterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Movimento sistêmico do PRSV-W-C em plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta'

Os testes de acompanhamento do movimento sistêmico de vírus tiveram a finalidade de estabelecer um modelo experimental que permita estudar a hipótese relativa à competição por sítios de replicação no processo de proteção (KUNKEL, 1934 e BAWDEN; KASSANIS, 1945). Para isso, tentou-se encontrar possíveis sítios de replicação livres para a segunda estirpe (desafiante), em locais da planta onde a primeira estirpe (protetora) ainda não estivesse bem estabelecida.

Quando a estirpe PRSV-W-C foi inoculada em uma das folhas cotiledonares da planta de abobrinha-de-moita cv. Caserta, o vírus foi detectado no caule no quarto dia após a inoculação. No sexto dia, foi detectado no caule e nas folhas novas do ponteiro e no oitavo dia o vírus foi detectado nas folhas novas, raiz e folhas cotiledonares não inoculadas (Tabela 1).

No entanto, quando a estirpe PRSV-W-C foi inoculada na primeira folha verdadeira parcialmente expandida, logo no segundo dia após a inoculação ela foi detectada no caule das plantas. No sexto e oitavo dia após a inoculação ela foi encontrada também na raiz e nas folhas novas. A presença desta estirpe não foi detectada nas folhas cotiledonares durante o período avaliado (Tabela 2). Este teste foi repetido e os resultados foram semelhantes aos obtidos no primeiro experimento (Tabela 3).

A não detecção do PRSV-W-C nas folhas cotiledonares das plantas-testes dos dois experimentos pode ser devido à ausência do vírus, conforme desejado para estabelecer o modelo de estudo de mecanismos de proteção, ou à concentração do PRSV-W-C estar abaixo do nível detectável pelo teste serológico. Neste último caso supõe-se que a menor concentração pode estar associada com a existência de alguns sítios livres de vírus. Possível suporte para a possibilidade de existência de alguns sítios livres de vírus nas folhas cotiledonares, depois de 8 dias da inoculação, provêm do trabalho de Robert et al. (1997) que, de forma bastante precisa, mostraram que o movimento sistêmico dos vírus de plantas segue o movimento dos produtos da fotossíntese, de acordo com a transição fonte/dreno. Como as folhas cotiledonares das

plantas de abobrinha têm a dupla função de fornecer substâncias de reserva e fotoassimilados para o desenvolvimento das plantas (BISOGNIN et al., 2004), pode-se supor que as partículas virais oriundas da replicação do vírus inoculado na primeira folha expandida da planta tem maior dificuldade em atingir as folhas cotiledonares, pois estas estão funcionando como fonte e não como dreno. Assim sendo, a ocupação das células nos tecidos cotiledonares pelo vírus deve ser mais lenta, deixando portanto, alguns sítios livres de vírus por mais tempo.

Tabela 1 – Detecção do PRSV-W-C na folha cotiledonar inoculada e não inoculada, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação em uma das folhas cotiledonares

Número de plantas-teste avaliadas	Número de plantas onde o PRSV-W-C foi detectado por PTA-ELISA				
	Folha cotiledonar inoculada	Raiz	Caule	Folha Nova	Folha cotiledonar não inoculada
2	0	0	2	0	0
2	0	0	2	1	0
2	0	0	2	2	2

Tabela 2– Detecção do PRSV-W-C nas folhas cotiledonares, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação do vírus na primeira folha verdadeira parcialmente expandida

Dias após a inoculação	Número de plantas-teste avaliadas	Número de plantas onde o PRSV-W-C foi detectado por PTA-ELISA			
		Folhas cotiledonares	Raiz	Caule	Folha Nova
2	2	0	0	2	0
4	2	0	0	2	0
6	2	0	1	2	2
8	2	0	2	2	1

Tabela 3- Detecção do PRSV-W-C nas folhas cotiledonares, caule, raiz e folha nova de plantas de abobrinha-de-moita, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação do vírus na primeira folha verdadeira parcialmente expandida

Dias após a inoculação	Número de plantas-teste avaliadas	Número de plantas onde o PRSV-W-C foi detectado por PTA-ELISA			
		Folhas cotiledonares	Raiz	Caule	Folha Nova
4	2	0	0	2	0
6	2	0	1	2	2
8	2	0	2	2	1

4. 2 Competição por sítios de replicação entre estirpes do PRSV-W

Os resultados de sete experimentos independentes para avaliar a competição por sítios de replicação como um dos possíveis mecanismos de proteção entre estirpes do PRSV-W, usando o modelo pré-estabelecido, estão apresentados conjuntamente nas tabelas 4 e 5. Quando as plantas foram premunizadas nas folhas cotiledonares e desafiadas nas folhas novas expandidas, três dias após a inoculação de proteção, apenas uma planta, entre onze analisadas, exibiu sintomas severos 30 dias após o desafio, indicando quebra de proteção. Quando a inoculação de proteção foi na primeira folha verdadeira parcialmente expandida e o desafio nas folhas cotiledonares, três de onze plantas exibiram sintomas acentuados de mosaico após o mesmo período de tempo de avaliação (Tabela 4). Apesar de poucas plantas exibirem sintomas severos de mosaico, indicativos de quebra de proteção, os testes de recuperação da estirpe desafiante indicaram que esta foi capaz de se replicar e movimentar sistemicamente em um maior número de plantas, sem, todavia expressar sintomas, independente de a inoculação de proteção ter sido feita nas folhas cotiledonares ou na folha verdadeira parcialmente expandida. Em alguns casos a presença da estirpe severa também foi confirmada por RT-PCR com o par de primers específicos (Tabela 5).

Usando-se os mesmos procedimentos, porém desafiando-se as plantas aos seis dias após a premunização, obteve-se total proteção em termos de expressão dos sintomas induzidos pela estirpe severa (Tabela 4). No entanto, mais uma vez foi

possível recuperar e detectar a estirpe severa por RT-PCR, porém na maioria dos casos somente a partir da folha onde foi feita a inoculação de desafio (Tabela 5). Quando a inoculação de proteção foi feita nas folhas cotiledonares e a de desafio na folha nova, foi possível recuperar a estirpe severa desafiante do local de inoculação, de três das onze plantas analisadas. Porém essa estirpe não foi recuperada do ponteiro de nenhuma dessas plantas, oito dias após o desafio, embora tenha sido detectada por RT-PCR em uma das onze plantas-teste. Por outro lado, quando a inoculação de proteção foi feita na primeira folha nova e a de desafio nas folhas cotiledonares, recuperou-se a estirpe severa das folhas cotiledonares de oito das onze plantas-teste. Quando o teste de recuperação foi feito a partir do tecido do ponteiro dessas plantas, oito dias após o desafio, a estirpe PRSV-W-C somente foi recuperada de uma planta, sugerindo que a sua invasão sistêmica nas demais plantas parece ter sido dificultada. Análise de RT-PCR confirmou a presença da estirpe severa em algumas dessas plantas estudadas (Tabela 5).

Finalmente, quando a inoculação de desafio foi realizada aos nove dias após a inoculação de proteção, mais uma vez obteve-se total proteção contra a manifestação de sintomas da estirpe severa (Tabela 4). Entretanto, mais uma vez foi possível recuperar e detectar a estirpe severa por RT-PCR em tecidos onde foram feitas as inoculações de desafio e de folhas novas após 8 dias do desafio (Tabela 5).

Em conjunto esses resultados sugerem que, independente do local onde foi realizada a inoculação de proteção (folha cotiledonar ou folha nova expandida), de uma maneira geral parece haver alguns sítios livres para a superinfecção com a estirpe severa. Quando esta foi inoculada aos três dias após a proteção, ela se estabeleceu em algumas plantas, moveu-se sistemicamente e sobrepôs a estirpe fraca, uma vez que as plantas exibiram sintomas severos. Com o passar do tempo (seis e nove dias após a premunização), todas as plantas ficaram protegidas contra a expressão dos sintomas severos da estirpe desafiante, porém esta foi capaz de se estabelecer nas folhas inoculadas e até mesmo mover sistemicamente em algumas plantas. Como não foi feito teste de recuperação depois de 30 dias da inoculação de desafio, fica difícil saber se a estirpe desafiante ainda estava presente nos ponteiros das plantas. No entanto, resultados de outros testes de proteção envolvendo essas mesmas estirpes (item 4.4),

onde testes de recuperação foram realizados 30 dias após o desafio, indicaram que a estirpe severa somente foi recuperada de uma entre as vinte plantas testadas. Esse resultado é um forte indicativo de que com o passar do tempo a estirpe severa do PRSV-W pode ter sido gradativamente eliminada em processo semelhante ao do silenciamento gênico, conforme demonstrado por Ratcliff et al. (1999) como sendo um dos mecanismos de proteção entre vírus de plantas.

A idéia de que o segundo vírus é inibido pelo movimento sistêmico do primeiro, que estabelece um mecanismo específico para a invasão sistêmica da planta, devido à saturação de sítios nas células ou à mudanças de supostos receptores envolvidos no movimento inicial de célula-a-célula ou à longa distância, baseia-se nos resultados de Dodds; Lee e Tiffany (1985), que estudaram a proteção de plantas de tomateiro premunizadas com uma estirpe fraca do vírus do mosaico do pepino, designada CMV-P e desafiada por uma estirpe severa (CMV-S). Quando as plantas foram desafiadas apenas com o RNA da estirpe severa, esta só se multiplicou no local de inoculação. Estes autores não detectaram a multiplicação da estirpe desafiante nas folhas novas da planta, apesar de detectá-las nas folhas inoculadas. Em poucas plantas, onde houve a invasão sistêmica da estirpe forte, a mesma foi associada a uma invasão incompleta pela estirpe protetora. Acredita-se que o movimento sistêmico do vírus na planta deve ser similar para vírus com identidade semelhante como estirpes fracas e fortes do mesmo vírus. Dessa forma, o segundo vírus ficaria impedido de exercer seu próprio mecanismo de invasão sistêmica devido à saturação dos sítios nas células ou à mudanças de supostos receptores envolvidos no movimento inicial de célula-a-célula ou de longa distância.

Estudos feitos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh com estirpes do TMV serologicamente distintas (TMV-C e TMV-P) mostraram que em quase todas as plantas desafiadas, a estirpe desafiante foi detectada nas folhas inoculadas, mas não se moveu sistemicamente na planta. O efeito da hospedeira foi evidenciado quando esse mesmo teste foi feito em plantas de *N. tabacum* cvs. Samsun e Xanthi, onde se verificou que em todas as plantas onde a estirpe desafiante se multiplicou no local de desafio, ela se moveu sistemicamente para as folhas novas das plantas (REZENDE et al., 1992; URBAN; SHERWOOD; MELCHER, 1988).

Novaes (2002) selecionou seis estirpes fracas do PWV (*Passion fruit woodiness virus*) que não ofereceram proteção em maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) contra uma estirpe severa desse vírus, a PWV-SP. Uma hipótese que explicaria a quebra da proteção foi a baixa concentração e a distribuição irregular das estirpes fracas dos tecidos foliares, que permitiu a infecção e o estabelecimento da estirpe severa usada no desafio. Este autor estimou a concentração de vírus em várias partes da planta por meio de PTA-ELISA e observou que esse vírus não se distribuiu uniformemente em plantas de maracujazeiro. Dessa forma, em algumas regiões onde a concentração da estirpe protetora é baixa, poderia haver sítios livres da estirpe fraca para a infecção com a estirpe severa, que seria mais competitiva, se movendo sistemicamente e infectando as folhas mais novas. Apesar dessas estirpes não promoverem a proteção desejada em maracujazeiro, todas elas proporcionaram 100% de proteção quando inoculadas em plantas de crotalária (*Crotalaria juncea* L.). Essa proteção contra a infecção e/ou a manifestação de sintomas que variou em função da planta hospedeira foi relacionada com uma concentração mais uniforme da estirpe fraca encontrada nos tecidos de *C. juncea*.

Tabela 4 - Notas de sintomas de plantas de abobrinha-de-moita cv. Caserta premunizadas com a estirpe fraca PRSV-W-1 nas folhas cotiledonares e desafiadas com a estirpe fraca PRSV-W-C nas folhas novas e vice-versa

Inoculação		Desafio após a proteção (dias)	Número de plantas testadas	Número de plantas de acordo com escala de notas de sintomas*		
Proteção	Desafio			1	2	3
Folhas cotiledonares	Folha Nova	3	11	10		1
Folha Nova	Folhas cotiledonares	3	11	8		3
	Controle PRSV-W-C	3	5			5
	Controle PRSV-W-1		2	2		
Folhas cotiledonares	Folha Nova	6	11	11		
Folha Nova	Folhas cotiledonares	6	11	11		
	Controle PRSV-W-C	6	5			5
	Controle PRSV-W-1		3	3		
Folhas cotiledonares	Folha Nova	9	11	11		
Folha Nova	Folhas cotiledonares	9	11	11		
	Controle PRSV-W-C	9	4			4
	Controle PRSV-W-1		4	4		

* Escala de notas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido.

Tabela 5- Detecção das estirpes fraca (PRSV-W-1) e severa (PRSV-W-C) a partir das amostras dos tecidos onde foram feitas as superinoculações (desafios) e dos ponteiros das plantas testes indicadas na tabela por meio dos testes de recuperação biológica e RT-PCR

(continuação)

Inoculação		Desafio após proteção	Número de plantas testadas	Amostra Analisada	Teste de recuperação (2)		RT-PCR	
Proteção	Desafio				PRSV-W-1	PRSV-W-C	PRSV-W-1	PRSV-W-C
Folhas cotiledonares	Folha Nova	3	11	F. desafio	5/11	6/11	4/7	4/7
				Ponteiro	7/11	4/11	5/7	2/7
Folha Nova	Folhas cotiledonares	3	11	F. desafio (1)	3/9	6/9	3/7	4/7
				Ponteiro	7/11	4/11	4/7	2/7
	Controle PRSV-W-C	3	5	Ponteiro	0/5	5/5	0/5	5/5
	Controle PRSV-W-1		3	Ponteiro	3/3	0/3	3/3	0/3
Folhas cotiledonares	Folha Nova	6	11	F. desafio	8/11	3/11	2/6	0/6
				Ponteiro	11/11	0/11	2/6	1/6
Folha Nova	Folhas cotiledonares	6	11	F. desafio	3/11	8/11	2/6	3/6
				Ponteiro	10/11	1/11	2/6	1/6
	Controle PRSV-W-C	6	5	Ponteiro	0/5	5/5	0/5	4/5
	Controle PRSV-W-1		2	Ponteiro	2/2	0/2	2/2	0/2

Tabela 5- Detecção das estirpes fraca (PRSV-W-1) e severa (PRSV-W-C) a partir das amostras dos tecidos onde foram feitas as superinoculações (desafios) e dos ponteiros das plantas testes indicadas na tabela por meio dos testes de recuperação biológica e RT-PCR

Inoculação		Desafio após proteção	Número de plantas testadas	Amostra Analisada	Teste de recuperação (2)		RT-PCR	
Proteção	Desafio				PRSV-W-1	PRSV-W-C	PRSV-W-1	PRSV-W-C
Folhas cotiledonares	Folha Nova	9	11	F. desafio	8/11	3/11	10/11	5/11
				Ponteiro	8/11	3/11	4/11	3/11
Folha Nova	Folhas cotiledonares	9	11	Folha desafio	9/11	2/11	7/11	5/11
				Ponteiro	9/11	2/11	4/11	2/11
Controle PRSV-W-C		9	4	Ponteiro	0/4	3/4	0/4	4/4
Controle PRSV-W-1			4	Ponteiro	3/4	0/4	4/4	0/4

(1) Algumas folhas cotiledonares senesceram antes da coleta.

(2) Notas de sintomas superiores à nota 2 indicam a presença da estirpe forte PRSV-W-C, enquanto que notas inferiores indicam somente a presença da estirpe fraca PRSV-W-1.

4. 3 Tempo necessário para proteção com a estirpe fraca ZYMV-M

Desde a obtenção das estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M, nos anos de 1993 (PRSV-W) e 2002 (ZYMV-M), respectivamente, diversos estudos tem sido realizados e até hoje essas estirpes têm se mostrado estáveis e continuam apresentando eficiência na premunização de cucurbitáceas. Assim, podem ser úteis para a proteção de diversas cucurbitáceas que ainda não possuem resistência a esses vírus que causam danos em vários estados brasileiros. No Brasil, a premunização vem sendo adotada desde 1968 para o controle da tristeza do citros, sem nenhum problema aparente com a estabilidade da estirpe fraca empregada para este fim (COSTA; MULLER, 1980; MULLER; CARVALHO, 2001).

No primeiro teste de proteção (Tabela 6) do presente trabalho, plantas premunizadas com a estirpe ZYMV-M foram desafiadas com a estirpe severa ZYMV-RI nos tempos de 0 a 10 dias após a premunização. As plantas premunizadas e desafiadas no mesmo dia, ou um dia após a inoculação de proteção, apresentaram sintomas iguais aos das duas plantas testemunhas, somente inoculadas com a estirpe severa. Quando as plantas foram desafiadas no intervalo de 2 a 6 dias após a premunização, notou-se que a maioria exibiu sintomas severos, enquanto que algumas mostraram sintomas intermediários entre os sintomas da estirpe severa e os da estirpe fraca (nota 2). Plantas desafiadas a partir do sétimo, até o décimo dia após a inoculação da estirpe fraca apresentaram sintomas de mosaico fraco, semelhantes aos das plantas premunizadas e não desafiadas. Todas as plantas inicialmente sadias e que foram inoculadas com a estirpe severa por ocasião de cada desafio exibiram sintomas severos.

Resultados semelhantes foram obtidos no segundo experimento de avaliação da proteção da estirpe fraca ZYMV-M em plantas desafiadas em diferentes intervalos de tempo após a inoculação de premunização (Tabela 7). Os resultados de ambos os experimentos indicaram que a estirpe fraca ZYMV-M ofereceu total proteção às plantas a partir do sétimo dia após a premunização. Desse dia em diante todas as plantas premunizadas e desafiadas exibiram sintomas fracos de mosaico (Figura 3).

WANG et al. (1991) testaram a proteção da estirpe fraca ZYMV-WK, selecionada na França, contra quatro isolados, oriundos de Connecticut, Flórida, França e Taiwan

em plantas de pepino, melão e abóbora sob condições de casa de vegetação e constataram que a proteção foi eficiente aos quatorze dias após a inoculação de premunização.

Rabelo (2002) após selecionar a estirpe ZYMV-M avaliou a proteção em plantas de abobrinha-de-moita cv. Caserta contra três estirpes severas do ZYMV, também coletadas em municípios do estado de São Paulo: Atibaia (ZYMV-AT), Iacri (ZYMV-IA), e Várzea Paulista (ZYMV-VP). Sob condições de casa de vegetação, com o intervalo de 10 dias entre a primeira e a segunda inoculação, a proteção foi eficiente contra as três estirpes e nenhuma das plantas premunizadas exibiu sintomas severos.

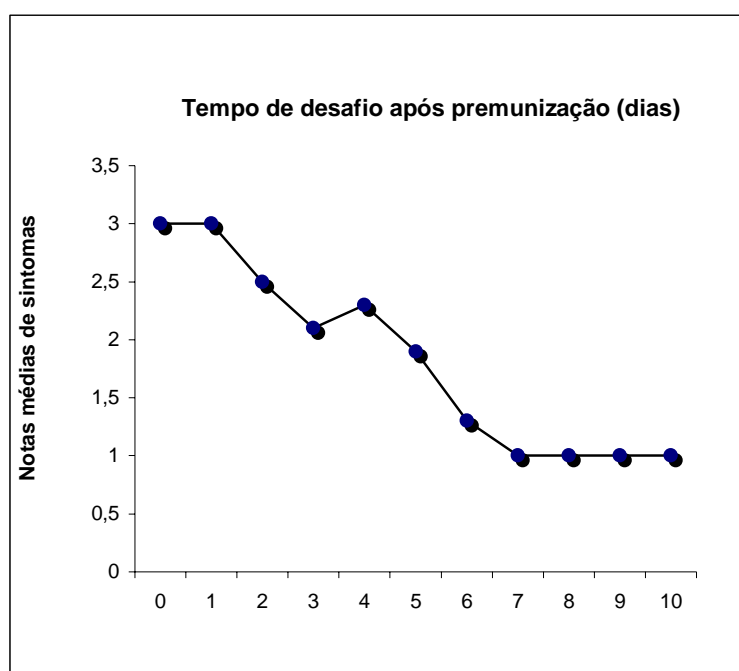


Figura 3- Notas médias de sintomas de dois experimentos (Tabelas 6 e 7) de acordo com o número de dias entre a inoculação de proteção e a inoculação de desafio com as estirpes do ZYMV

Tabela 6- Reação de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M e desafiadas com a estirpe severa ZYMV-RI, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação de proteção

Tratamento	Desafio após a premunização (dias)	Número de plantas-teste	Número de plantas segundo escala de notas de sintomas **			
			0	1	2	3
Premunizada	0	4				4
Premunizada	1	4				4
Premunizada	2	3			2	1
Premunizada	3	3			1	2
Premunizada	4	3			1	2
Premunizada	5	3			1	2
Premunizada	6	3			1	2
Premunizada	7	2		2		
Premunizada	8	3		3		
Premunizada	9	3		3		
Premunizada	10	4		4		
Premunizada	Sem desafio	2	2			
Não premunizada*	ZYMV-RI	20				20

* Em cada desafio foram inoculadas 2 plantas que serviram de controle do inóculo da estirpe severa.

** Escala de notas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido.

Tabela 7 - Reação de plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M e desafiadas com a estirpe severa ZYMV-RI em diferentes intervalos de tempo após a inoculação de proteção

Tratamento	Desafio após a premunização (dias)	Número de plantas-teste	Número de plantas segundo escala de notas de sintomas **			
			0	1	2	3
Premunizada	0	4				4
Premunizada	1	3				3
Premunizada	2	2			1	1
Premunizada	3	2			2	
Premunizada	4	3			2	1
Premunizada	5	4		2	2	
Premunizada	6	3		2	1	
Premunizada	7	3		3		
Premunizada	8	3		3		
Premunizada	9	2		2		
Premunizada	10	4		4		
Premunizada	Sem desafio	2	2			
Não premunizada*	ZYMV-RI	20				20

* Em cada desafio foram inoculadas 2 plantas que serviram de controle do inóculo da estirpe severa.

** Escala de notas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido.

4. 4 Proteção das estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1 em plantas de abobrinha-de-moita

No primeiro experimento de dupla premunização de plantas de abobrinha 'Caserta', foi feita a confirmação da infecção de proteção por PTA-ELISA. As plantas que não confirmaram a infecção foram descartadas. Nesse teste, além das notas de sintomas, a proteção foi avaliada por meio da tentativa de recuperação da estirpe severa após 30 dias do desafio. Todas as plantas inoculadas com a estirpe fraca (ZYMV-M) e desafiadas após sete dias com a estirpe ZYMV-RI, obtiveram nota 1 de sintomas 30 dias após a inoculação de desafio. Em nenhum caso foi possível recuperar a estirpe forte desafiante quando o extrato dos ponteiros dessas plantas foram inoculados em plantas saudáveis de abobrinha-de-moita. O mesmo aconteceu para as plantas protegidas com a estirpe PRSV-W-1 e desafiadas com a estirpe PRSV-W-C. As plantas duplamente premunizadas (ZYMV-M e PRSV-W-1) e desafiadas com a mistura das respectivas estirpes severas (ZYMV-RI e PRSV-W-C) também ficaram protegidas, embora uma planta apresentou sintoma intermediário (nota 2) (Tabela 8). No teste de recuperação das estirpes desafiantes, só foi constatada a sua presença no ponteiro da planta duplamente premunizada que exibiu sintoma intermediário, porém não foi feita a identificação da estirpe recuperada. Nas demais plantas duplamente premunizadas e naquelas premunizadas individualmente com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1 somente foi recuperada a respectiva estirpe protetora. Esse teste foi repetido e os resultados estão apresentados na tabela 9. Nota-se mais uma vez que a maioria das plantas premunizadas e desafiadas exibiu sintomas fracos de mosaico, trinta dias após o desafio. Das plantas que receberam nota 1 de sintomas não foi possível recuperar a(s) estirpe(s) severa(s) usada(s) no desafio. A estirpe severa ZYMV-RI foi recuperada do ponteiro de duas das três plantas que exibiram sintomas intermediários (nota 2). O inóculo extraído do ponteiro da única planta premunizada com a estirpe PRSV-W-1 e desafiada com a estirpe PRSV-W-C, que recebeu nota 2 de sintoma, causou sintoma intermediário na cv. Caserta. A proteção oferecida pelas estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, aparentemente, pode ter impedido ou dificultado a infecção pela segunda estirpe na maioria dos casos. Raramente houve a invasão sistêmica da estirpe severa, comprovada quando a mesma foi recuperada do ponteiro das poucas plantas que

exibiam uma proteção parcial (sintomas intermediários ou de nota 2) contra a manifestação dos sintomas.

Considerando-se os resultados desses dois experimentos, verifica-se que cerca de 85% das plantas premunizadas com ZYMV-M e desafiadas com ZYMV-RI, 95% das infectadas com PRSV-W-1 e desafiadas com PRSV-W-C e 92,9% das duplamente premunizadas e desafiadas com ambas estirpes severas ficaram protegidas contra a infecção ou manifestação dos sintomas (sintomas de nota 1) da estirpe severa. As demais plantas premunizadas tiveram proteção parcial, exibindo sintomas intermediários, nota 2 (Figura 4). Esse resultado foi semelhante ao observado por Rabelo (2002) em um experimento de campo. Neste experimento, plantas de abobrinha-de-moita foram premunizadas com as estirpes fracas ZYMV-M e PRSV-W-1, sós e em mistura. Após 30 e 45 dias as plantas foram desafiadas com as estirpes severas homólogas às estirpes premunizantes. Aproximadamente 89% das premunizadas com ZYMV-M, 89% das protegidas com PRSV-W-C e 91% das duplamente premunizadas obtiveram plantas com bom desenvolvimento, com nenhum sintoma ou sintomas de mosaico fracos, sem deformações foliares. Naquele estudo, no entanto, os autores não fizeram testes de recuperação para verificar se a proteção estava suprimindo a infecção ou apenas a manifestação de sintomas.

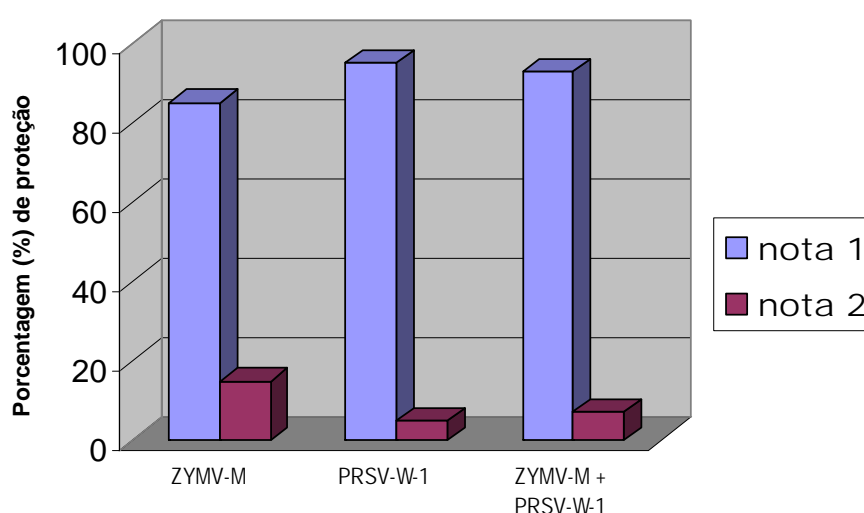


Figura 4- Porcentagem de proteção de plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas com as estirpes ZYMV-M, PRSV-W-1, sós e em mistura e desafiadas 7 dias após a inoculação de proteção

Tabela 8- Avaliação de proteção de plantas de abobrinha-de-moita ‘Caserta’ premunizadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura e desafiadas com as respectivas estirpes severas (PRSV-W-C e ZYMV-RI), sete dias após a premunização

Tratamentos	Estirpe do desafio	Número de plantas	Número de plantas de acordo com a severidade do sintoma*			
			0	1	2	3
ZYMV-M	ZYMV-RI	8		8		
PRSV-W-1	PRSV-W-C	8		8		
ZYMV-M + PRSV-W-1	ZYMV-RI + PRSV-W-C	8		7	1	
ZYMV-M	Sem desafio	2	2			
PRSV-W-1	Sem desafio	2	2			
ZYMV-M + PRSV-W-1	Sem desafio	2	2			
Sadia	ZYMV-RI	2				2
Sadia	PRSV-W-C	2				2
Sadia	ZYMV-RI + PRSV-W-C	2				2

* Escala de notas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido.

Tabela 9- Avaliação de proteção de plantas de abobrinha-de-moita ‘Caserta’ premunizadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura e desafiadas com as respectivas estirpes severas (PRSV-W-C e ZYMV-RI), sete dias após a premunização

Tratamentos	Estirpe do desafio	Número de plantas	Número de plantas de acordo com a severidade do sintoma*			
			0	1	2	3
ZYMV-M	ZYMV-RI	12		9	3	
PRSV-W-1	PRSV-W-C	12		11	1	
ZYMV-M + PRSV-W-1	ZYMV-RI + PRSV-W-C	6		6		
ZYMV-M	Sem desafio	2	2			
PRSV-W-1	Sem desafio	2	2			
ZYMV-M + PRSV-W-1	Sem desafio	2	2			
Sem proteção	ZYMV-RI	2				2
Sem proteção	PRSV-W-C	2				2
Sem proteção	ZYMV-RI + PRSV-W-C	2				2

* Escala de notas: nota zero, para plantas sem sintomas; nota 1, para plantas com sintoma de mosaico fraco, sem deformações foliares e com bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e nota 3 para aquelas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A competição por sítios de replicação está envolvida na proteção entre estirpes do PRSV-W nos primeiros dias após a inoculação de proteção com a estirpe fraca.
- Plantas de abobrinha-de-moita premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-M, só ou em mistura com a estirpe fraca PRSV-W-1, ficaram protegidas contra as respectivas estirpes severas sete dias após a inoculação de proteção. Após trinta dias da inoculação de desafio parece haver algum mecanismo de degradação da estirpe forte, que pode ser do tipo silenciamento gênico, mas para que isso seja comprovado serão necessários mais estudos que confirmem essa hipótese.

REFERÊNCIAS

ADLERS, W.C. Spring aphid flights and incidence of *Watermelon mosaic virus 1* and 2 in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 3, p. 350-353, 1974.

AHOONMANESH, A.; SHALLA, T.A. Feasibility of cross-protection for control of mosaic virus in fresh market field-grown tomatoes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n.1, p. 56-58, 1981.

AL-MUSA, A. M. Oversummering hosts for some cucurbits viruses in the Jordan Valley. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 127, p. 49-54, 1989.

BAWDEN, F.C.; KASSANIS, B. The suppression of one plant virus by another. **Annals of Biology**, Warwick , v. 32, p. 52-57, 1945.

BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N.E. Coat protein-mediated resistance against virus infection. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 32, p. 52-57, 1990.

BISOGNIN, D.A., AMARANTE C.V.T. E DELLAI, J. Contribuição das folhas cotiledonares para o crescimento e estabelecimento de plântulas de cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 309-313, 2004.

BROADBENT, P.; DEPHOFF, C.M.; FRANKS, N.; GILLINGS, M.; Pre-immunization of grapefruit with a mild protective isolate of citrus tristeza in Australia. In:INTERNATIONAL WORKSHOP (FINAL REPORT) CITRUS TRISTEZA AND THE BROWN CITRUS APHID IN THE CARIBEAN BASIN. MANAGEMENT STRATEGIES. 3.,1995, Lake Alfred. **Proceedings....** Lake Alfred: CREC, 1995, p.163-168.

BÜCHEN-OSMOND; PURCIFUL, D. *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. In: BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J., WATSON, L.; ZURCHER, E. J. (Ed.). **Viruses of Plants** – Descriptions and Lists from the VIDE Database. Wallingford: CAB International, 1996. p.1414-1417.

CASTLE, S.J.; PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; KISHABA, A.N. Field and laboratory transmission of *Watermelon mosaic virus 2* and *Zucchini yellow mosaic virus* by various aphid species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 235-240, 1992.

CHO, J.J.; ULLMAN, D.E.; WHEATLEY, E.; HOLLY, J.; GONSALVES, D.
Comercialization of ZYMV cross protection for zucchini production in Hawaii.
Phytopathology, Saint Paul, v. 82, p. 1073, 1992. Abstract.

COSTA, A.S. Proteção. In: **Virologia vegetal**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, 1975. 1 v.(Mimeografado).

COSTA, C.L.; COSTA, A.S. Redução da disseminação de mosaico em abóbora de moita (*Cucurbita pepo* var. *melopepo*) com superfícies reflectivas repelentes aos afídeos vetores. **Revista de Olericultura**, Piracicaba, v. 11, p. 24-25, 1971.

COSTA, A.S.; MÜLLER, G.W. Tristeza control by cross protection: A U.S. Brazil cooperative success. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 538-541, p. 64, 1980.

COVEY, S. N.; AL-KAFF, N.S.; LANGARE, A.; TURNER, D.S. Plants combat infection by gene silencing. **Nature**, London, v. 385, p. 781-782, 1997.

CRUZ, E.S., PAZ, C.D., PIO-RIBEIRO, G., BATISTA, D.C.; PEREIRA FILHO, G.G. ; ANDRADE, G.P. Levantamento de viroses em melancia e melão no Submédio São Francisco. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, p. 21. 1999. Resumo.

DELLA VECCHIA, M. G. S.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Nucleotide sequence comparison of the capsid protein gene of severe and protective mild strains of *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 678-681, 2003.

DESBIEZ, C.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 809-829, 1997.

DE ZOETEN, G.A.; FULTON, R.W. Understanding generates possibilities.
Phytopathology, Saint Paul, v. 65, n. 1, p. 221-222, 1975.

DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida "Tetsukabuto" para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus* - type W. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 390-398, 2000.

DODDS, J. A. Cross protection and interference between eletroforetically distinct strains of *Cucumber mosaic virus* in tomato. **Virology**, London, v. 118, p. 235-240, 1982.

DODDS, J.A.; LEE, S.Q.; TIFFANY, M. Cross protection between strains of *Cucumber mosaic virus*; effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. **Virology**, London, v.144, p. 301-309, 1985.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J. U.; DESSELBERGER, BALL , L.A (Ed.). **Virus Taxonomy** (International Committee on Taxonomy of Viruses, Report, 8). San Diego: Elsevier, Academic Press, 2005, 1162 p.

FILGUEIRA, F.A.R. Cucurbitáceas - pepino e outras hortaliças-fruto. In:_____. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2003. p. 321-350.

FULTON, R.W. The protective effects of systemic virus infection. In: WOOD, R.K.S. (Ed.) **Active defense mechanisms in plant**. New York: Plenum, 1982. p. 231-245.

GIAMPAN, J. S.; REZENDE, J. A. M. Transmissibilidade por afídeos e reação de diversas espécies vegetais às estirpes fracas premunizantes do PRSV-W. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 279-283, 2001.

HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, London, n. 342, p. 76-78, 1989.

HIRUKI, C. Increases in marketable fruit yield of greenhouse tomatoes as the result of cross protection against tomato mosaic. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 916, 1979.

HORIKOSHI, M.; NAKAYAMA, M.; YMAOKA, N.; FUROSAWA, I.; SHISHIAMA, J. *Brome mosaic virus* coat protein inhibits viral RNA synthesis *in vitro*. **Virology**, London, v. 158, p. 15-19, 1987.

HUGUES, J. D'a.; OLLENNU, L.A.A. Mild strain protection of cocoa in Ghana against *Cocoa swollen shoot virus* - a review. **Plant Pathology**, Edinburgh, v. 43, n. 3, p. 442-457, 1994.

KAMEIA-IWAKI, M.; TOCHIHARA, H.; HANADA, K.; TORIGOE, H. Attenuated isolate of *Watermelon mosaic virus* (WMV-2) and its cross protection against virulent isolate. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 3, p. 491-494, 1992.

KANAVAL, J.L. On the correlation of the phenomena associated with chromosomes, foreign proteins and viruses. III. Virus associated phenomena, characteristics and reproduction. **The American Naturalist**, Chicago, v. 83, p. 13-38, 1949.

KOSAKA, Y.; FUKUNISHI, T. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus diseases. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 7, p. 733-738, 1997.

KUNKEL, L.O. Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba mosaics. **Phytopathology**, Lancaster, v. 24, n. 5, p. 437-66, 1934.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: doenças das plantas cultivadas, Ed. Agronômica Ceres, 2005, São Paulo, cap. 32, p. 293-294.

LECOQ, H. A poorly aphid transmissible variant of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 1063, 1986. Resumo.

LECOQ, H. Control of plant virus diseases by cross protection. In: HADIDI, A., KHETARPAL, R. K. e KOGANEZAWA, H (Ed.). **Plant virus disease control**. Saint Paul: APS, 1998. p. 33-40.

LECOQ, H.; PITRAT, M.; CLEMENT, M. Identification et caracterization d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune du melon. **Agronomie**, Paris, v. 1, p. 827-834, 1981.

LECOQ, H.; LEMAIRE, J.M.; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 2, p. 208-211, 1991.

LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W. G. Plant Pathology and RNAi: a Brief History. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 191-204, 2005.

MAHGOUB, H.A.; DEZBIEZ, C.; WIPF-SCHEIBEL, C.; DAFALLA, G.; LECOQ, H. Characterization and occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in Sudan. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 800-805, 1997.

MOLNAR, A.; SCHUMELZER, K. A non-aphid-transmissible variant was reported in Europe. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, p. 361, 1964.

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

MOURA, M.C.C.L., LIMA, J. A. A., OLIVEIRA, V.B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 90-92, 2001.

MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A. Trinta e três anos de controle da tristeza dos citros por premunização no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 241, 2001.

NAKANO, D.H.; SANSINI, D.M.F.; BURIOLLA, J.E.; JUNQUEIRA, N.T.V.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE J.A.M. *Psiguria triphylla*: a new natural host of *Papaya ringspot virus* – type W in Brazil. **New Disease Reports**, Wellesbourne, v. 14, 14 dec. 2006. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2007/2006-95.asp>> Acesso em 15 jan. 2007.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone sintetase gene into petunia result in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, p. 279-289, 1990.

NOVAES, Q.S., FREITAS-ASTUA, J., SAO JOSE, A.R.; YUKI, V.A., KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Infecção mista de maracujazeiro com o *Passion fruit woodiness virus* e um Begomovírus no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, 2002.

OSHIMA, N. The control of tomato mosaic virus disease with attenuated virus of tomato strain of TMV. **Review of Plant Protection Research**, [s.l.], v. 8, p. 126-135, 1975.

PALUKATIS, P.; ZAITLIN, M. A model to explain the cross protection phenomenon shown by plant virus and viroids. In: KOSUGE, T.; NESTER, E. W. (Ed.). **Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives**, New York: Macmillan, 1984. p. 420-429.

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

PONZ, F.; BRUENING, G. Mechanisms of resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 355-381, 1986.

POSNETTE, A.F.; TODD, J. Mca. Virus diseases of cacao in West Africa IX: strain variant and interference in virus 1A. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 43, p. 433-453, 1955.

PROVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; HUMAIDAN, H.S. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in Connecticut, New York, Florida, and California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 443-446, 1984.

PURCIFUL, D.E.; EDWARDSON, J.R.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D.. *Papaya ringspot potyvirus*. In: BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J., WATSON, L.; ZURCHER, E. J. (Ed.). **Viruses of Plants** – descriptions and lists from the VIDE database. Wallingford: CAB International, 1996, p. 874-877.

RABELO, L.C. **Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot virus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita**. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

RAST, A.T.B. Variability of *Tobacco mosaic virus* in glasshouse tomato crops by resistance breeding and cross protection. **Agricultural Research Reports**, Wageningen, v. 834, p.1-76, 1975.

RATCLIFF, F.G.; MACFARLANE, S.A.; BAULCOMBE. Gene Silencing without DNA: RNA – Mediated Cross protection between viruses. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 1207-1215, 1999.

REZENDE, J.A.M. ; SHERWOOD, J. L. Breakdown of cross protection between strains of *tobacco mosaic virus* due to susceptibility of dark green areas to superinfection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 3, p. 1490-1496, 1991.

REZENDE, J.A.M.; MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 3, p. 185-226, 1995.

REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of *papaya ringspot virus* - type W in zucchini squash by cross protection in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p.171-175, 1998.

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.; URBAN, L.; SHERWOOD, J.L.; MELCHER, U. Host effect of cross protection between two strains of *Tobacco mosaic virus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n. 2, p. 147-153, 1992.

REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEJA, J.; SCAGLIUSI, S. M. M.; BORBA, L.F. ; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 55-61, 1994.

ROBERTS, A.G.; SANTA CRUZ, S.; ROBERTS, I.M.; PRIOR, A.M.;TURGEON, R.; OPARKA, K.J. Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p.1381-1396, 1997.

ROSS, A.F. Interactions of viruses in the host. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 36, p. 247-260, 1974.

SHERWOOD, J.L. Mechanisms of cross-protection between plant virus strains. In: EVERED, D.; HARNET, S. (Ed.). In: **Plant resistance to viruses**, Chichester: John Wiley, p. 136-150, 1987.

SHERWOOD, J.L.; FULTON, R.W. The specific involvement of coat protein in *Tobacco mosaic virus* cross protection. **Virology**, London, v. 119, p. 150-158, 1982.

SHERWOOD, J.L.; FULTON, R.W. Competition for infection sites and multiplication of the competing strain in plant virus interference. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 1363-1365, 1983.

SIMONDS, J. H. Mild strain protection as a means of reducing losses from the *Queensland woodiness virus* in the passion vine. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, Brisbane, v. 16, p. 371-380, 1959.

SOUZA JR., M. T. **Analysis of the resistance ingenetically engineered papaya against *Papaya ringspot potyvirus*, partial characterization of the PRSV Brazil Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil**. 1999. 277 p. Tese (PhD in Plant Pathology) - Cornell University, Ithaca. 1999.

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**, Jaboticabal, v. 26, p. 132, 2000. Resumo.

SUMMERS, C.G.; STAPLETON, J.J.; NEWTON, A.S.; DUNCAN, R.A.; HART, D. Comparison of sprayable and film mulches in delaying the onset of aphid-transmitted virus diseases in zucchini squash. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 1126-1131, 1995.

TIEN, P.; WU, G. Sattellite RNA for biological control of plant disease. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 39, p. 321-339, 1991.

TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSEL, P.F.; MCMASTER, J.R.; GROFF, D.W.; HADDEN, K.C.; HIMMEL, P.T.; HUBBARD, J.P.; BOESHORE, M.L.; QUEMADA, H.D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus 2*, and *Zucchini yellow mosaic virus*. **Bio/Technology**, New York, v. 13, p. 1458-1465, 1995.

URBAN, L.A.; SHERWOOD, J.L.; MELCHER, U. The use of *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia in plant virus interactions studies. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1586, 1988.

URBAN, L.A.; SHERWOOD, J.L.; REZENDE, J.A.M.; MELCHER, U. Examination of mechanisms of cross protection with non-transgenic plants. In: FRASER, R.S.S. (Ed.). **Recognition and response in plant-virus interactions**, New York: Springer-Verlag, 1989, p. 415-426.

VAN DER KROL, AR; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, p. 291-299, 1990.

VON BROEMBSSEN, L.A; LEE, A.T.C. South Africa's Citrus Improvement Program. In: CONFERENCE ICTV, 10., 1988, Riverside, 1988. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1988. p. 407- 416.

WALKEY, D.G.A.; LECOQ, H.; COLLIER, R.; DOBSON, S. Studies on the control of *Zucchini yellow mosaic virus* in courgettes by mild strain protection. **Plant Pathology**, Edinburgh, v. 41, p. 762-771, 1992.

WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by a mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucumber, melon and squash. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 203-207, 1991.

WONG, S.M.; CHONG, C.V.; CHONG, P.L. Characterization of isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 141, n. 4, p. 355-368, 1994.

YARDEN, G.; HEMO, R.; LIVNE, H.; MAOZ, E.; LEV, E.; LECOQ, H.; RACAH, B. Cross protection of cucurbitaceae from *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 510, p. 349-356, 2000.

YEH, S.D.; GONSALVES, D. Practices and perspectives of control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. In: HARRIS, K.F. (Ed). **Advances in disease vector research**, New York: Springer-Verlag, 1994, v. 10, p. 237-257.

YEH, S. D., GONSALVES, D., WANG, H.L., NAMBA, R.; CHIU, R.J. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 5, p. 375-380, 1988.

YOSHIDA, K., GOTO, T., IIZUKA, M. Attenuated isolates of *Cucumber mosaic virus* produced by satellite RNA and cross protection between attenuated and virulent ones. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 51, p. 238-242, 1985.

YUAN, C. ; ULLMAN, D.E. Comparison of efficiency and propensity as measure of vectors importance in *Zucchini yellow mosaic potyvirus*, transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 7, p. 698-703, 1996.

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., KUNIYUKI, 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.

ZAITLIN, M. Viral cross-protection: more understanding in needed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 382-383, 1976.

ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 191- 244, 2005.

ZINNEN, T.M.; FULTON, R.W. Cross protection between sunnhemp mosaic and tobacco viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 1679-1687, 1986.

ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L. (Ed.). **Compendium of cucurbit diseases**. 3rd ed. Saint Paul: APS Press, 1996. 87 p.