

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

**Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de
quatro variedades de *Cucurbita pepo***

Estela Bonilha

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

Piracicaba
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Estela Bonilha
Engenheiro Agrônomo

Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de quatro variedades de *Cucurbita pepo*

Orientador:

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

Dissertação apresentada para obtenção do 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**

Bonilha, Estela

Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de quatro variedades de *Cucurbita pepo* / Estela Bonilha. - - Piracicaba, 2007.
67 p. : il.

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

1. Abobrinha 2. Doenças de plantas – Controle 3. Inoculação 4. Insetos vetores
5. Mosaico (Doença de planta) 6. Potyvirus 7. Pulgão I. Título

CDD 635.62

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

A meus pais André e Célia, e meus irmãos
Eduardo e Erik, pela compreensão,
Dedico

Ao meu noivo e companheiro de todas as
horas, Luciano, pelo carinho,
Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação profissional; especialmente ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola pela oportunidade de realização do mestrado e estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela valiosa orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores do Setor de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

À Professora Dra. Sônia M. S. Piedade pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados.

À Sakata Seed Sudamerica LTDA pela oportunidade de realização dos experimentos de campo; e a todos os funcionários que colaboraram para o êxito destes trabalhos.

Aos funcionários do Setor de Fitopatologia, em especial José Edivaldo Buriolla e Pedro Arthuso pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos companheiros do Laboratório de Virologia Vegetal: Adriana Moreira, Adriana Jadão, Ana Carolina Alves, Ana Carolina Firmino, Carla Richieri, Daniel Nakano, Débora Freitas, Evelyn, Guilherme Fracarolli, José Giampan, Marília Vecchia e Scheila Maciel pelo companheirismo, amizade, auxílio nos trabalhos e bons momentos compartilhados.

Aos amigos Ana Paula, Denise, Eliane, Isolda, Júlio, Maria Cândida, Raquel, Ricardo e Luciano pelos bons momentos.

Aos colegas do curso de mestrado, Davi, Fátima e Maria Cristina e demais alunos do Setor de Fitopatologia pelo convívio.

À minha sobrinha Larissa pelas alegrias que sempre me traz.

Ao meu noivo Luciano Faria pelo incentivo, paciência e ajuda durante este período de curso.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus pela vida, saúde e disposição para concluir mais uma etapa da minha caminhada.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Generalidades sobre o PRSV-W e sobre o ZYMV	17
2.1.2 Controle por premunização	23
2.2 Materiais e Métodos	23
2.2.1 Estirpes dos vírus	23
2.2.2 Avaliação do efeito das estirpes premunizantes em abobrinha de moita	23
2.2.2.1 Variedades de <i>Cucurbita pepo</i>	24
2.2.2.2 Obtenção das plantas	24
2.2.2.3 Inoculação das mudas	24
2.2.2.4 PTA-ELISA	24
2.2.2.5 Escalas de notas de sintomas	25
2.2.2.6 Teste do efeito das estirpes premunizantes em quatro variedades de abobrinha de moita	26
2.2.2.7 Teste do efeito da estirpe premunizante PRSV-W-1 em plantas em estufa e em campo	27
2.2.3 Determinação de hospedeiras para multiplicação das estirpes fracas premunizantes	27
2.2.3.1 Teste sorológico de Dot-Blot	28
2.2.4 Transmissão do ZYMV-M por afídeos	29
2.2.4.1 RT-PCR	39
2.3 Resultados e Discussão	30
2.3.1 Escala de notas de sintomas em frutos	30

2.3.2 Efeito das estirpes premunizantes em quatro variedades de abobrinha de moita	34
2.3.2.1 Variedade Samira	35
2.3.2.2 Variedade Novita Plus	36
2.3.2.3 Variedade AF-2847	38
2.3.2.4 Variedade Yasmin	40
2.3.3 Efeito do local de cultivo sobre sintomas causados pela estirpe PRSV-W-1	45
2.3.4 Hospedeiras para a multiplicação das estirpes fracas premunizantes	51
2.3.5 Transmissão por afídeos	57
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Samira, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes	31
Figura 2 -	Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Novita Plus, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes	32
Figura 3 -	Escala de notas de sintomas em frutos da variedade AF 2847, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes	33
Figura 4 -	Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Yasmin, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes	34
Figura 5 -	Frutos da variedade Samira infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)	36
Figura 6 -	Frutos da variedade Novita Plus infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)	37
Figura 7 -	Frutos da variedade AF 2847 infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados à frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)	39
Figura 8 -	Frutos da variedade Yasmin infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)	42
Figura 9 -	Plantas de abobrinha de moita em campo (A); e em estufa (B)	45

- Figura 10 - Frutos da variedade Samira infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B) 48
- Figura 11 - Frutos da variedade Novita Plus infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B) 48
- Figura 12 - Frutos da variedade AF 2847 infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B) 49
- Figura 13 - Frutos da variedade Yasmin infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B) 49
- Figura 14 - Teste de RT-PCR para a detecção da estirpe ZYMV-M. M – marcador molecular; 1-6 plantas inoculadas com a estirpe ZYMV-M por meio do afídeo *Myzus nicotianae*; 7 – controle positivo (ZYMV) 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Samira sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	35
Tabela 2 -	Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Samira sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	36
Tabela 3 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Novita Plus sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	37
Tabela 4 -	Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Novita Plus sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	38
Tabela 5 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita AF2847 sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	39
Tabela 6 -	Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita AF 2847 sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	40
Tabela 7 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	41
Tabela 8 -	Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura	42

Tabela 9 -	Notas médias de sintomas apresentados por plantas de abobrinha de moita Caserta inoculadas no teste de recuperação da estirpe fraca PRSV-W-1 e mantidas em quatro condições diferentes	44
Tabela 10 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Samira sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa	46
Tabela 11 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Novita Plus sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa	46
Tabela 12 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita AF 2847 sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa	47
Tabela 13 -	Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa	47
Tabela 14 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca ZYMV-M em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação	52
Tabela 15 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca ZYMV-M em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação	52
Tabela 16 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do ZYMV em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação	53
Tabela 17 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do ZYMV em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação	53

Tabela 18 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca PRSV-W-1 em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação	54
Tabela 19 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca PRSV-W-1 em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação	55
Tabela 20 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do PRSV-W em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação	55
Tabela 21 -	Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do PRSV-W em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação	56
Tabela 22 -	Eficiência de duas espécies de afídeos na transmissão de uma estirpe fraca e uma estirpe severa do <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	57

RESUMO

Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de quatro variedades de *Cucurbita pepo*

Entre as cucurbitáceas cultivadas no Brasil, a abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) apresenta grande importância econômica, notadamente no Estado de São Paulo, a maior área de plantio. No Brasil, já foram encontrados nove vírus capazes de infectar esta espécie. Os mais frequentes e responsáveis por prejuízos significativos à produção da abobrinha de moita são os do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type W – PRSV-W) e do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV), devido principalmente à sua alta sensibilidade. A premunização das plantas com estirpes fracas vem sendo investigada há mais de 10 anos no Brasil e surge como uma alternativa interessante para controle destas viroses. A premunização de abobrinha de moita só foi estudada até o momento em plantas da variedade Caserta. O presente trabalho teve o objetivo de dar continuidade a estes estudos avaliando o efeito de estirpes premunizantes PRSV-W-1 e ZYMV-M na produção quantitativa e qualitativa de quatro variedades comerciais de *C. pepo*: Samira, Novita Plus, AF-2847 e Yasmin. Os resultados obtidos em experimentos conduzidos em estufa plástica mostraram que as plantas destas variedades infectadas com a estirpe fraca ZYMV-M, não exibiram sintomas foliares acentuados e não apresentaram alterações na produção quantitativa e qualitativa de frutos, quando comparada com a produção das plantas saudáveis. No entanto, as plantas dessas mesmas variedades infectadas com a estirpe PRSV-W-1, só ou em mistura com a estirpe ZYMV-M, exibiram sintomas acentuados de mosaico foliar e alteração significativa na qualidade dos frutos, caracterizada pelo escurecimento da casca. Não houve alteração significativa na quantidade de frutos produzidos por essas plantas e no peso médio dos frutos. Quando plantas dessas variedades foram infectadas somente com a estirpe fraca PRSV-W-1 e conduzidas paralelamente em condições de campo e estufa plástica, constatou-se intensificação dos sintomas nos frutos e nas folhas das plantas infectadas conduzidas principalmente em estufa, porém a produção quantitativa mais uma vez não foi alterada. A variedade Samira mostrou-se a mais sensível ao PRSV-W-1 em ambas as condições. Os resultados sugerem que fatores ambientais, além da interação da estirpe fraca com a variedade de abobrinha, parecem interferir na expressão de sintomas nos frutos das plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1. Também foi objeto de estudo desse trabalho a identificação da melhor hospedeira, entre algumas cucurbitáceas, para a multiplicação e manutenção das duas estirpes fracas, e a avaliação da eficiência dos afídeos *Myzus nicotianae* e *M. persicae* na transmissão da estirpe ZYMV-M. Os resultados mostraram que a estirpe ZYMV-M parece atingir as maiores concentrações em *C. pepo* cv. Caserta e em *C. melo* cv. Casca-de-Carvalho. Para a estirpe PRSV-W-1, as melhores hospedeiras foram *C. pepo* cv. Caserta, seguida de *C. lanatus* cv. Crimson Sweet e *C. sativus* cv. Safira. *M. nicotianae* e *M. persicae* transmitiram a estirpe fraca ZYMV-M para 11,7% e 0% das plantas de abobrinha de moita cv. Caserta, respectivamente. Enquanto a estirpe severa foi transmitida para 47,0% e 80% das plantas teste, respectivamente.

Palavras-chave: Premunização; Controle; Potyvirus; Transmissão.

ABSTRACT

Effect of protective mild strains of PRSV-W and ZYMV on the yield of four varieties of *Cucurbita pepo*

Zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) is widely cultivated in Brazil, especially in the State of São Paulo, which is the major producer. Nine viruses capable to infect this species have already been described in Brazil. The most frequent and responsible for significant yield losses are the potyviruses *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), for which zucchini squash is highly susceptible and intolerant. Preimmunization with mild strains of both viruses have been investigated in Brazil for the last 10 years and appears as an interesting option for the control of these viruses. As preimmunization have been evaluated only for zucchini squash cv. Caserta, the purpose of the present work was to investigate the effect of the mild strains PRSV-W-1 and ZYMV-M on the quantitative and qualitative yield of four other commercial zucchini squash varieties: Samira, Novita Plus, AF-2847 e Yasmin. The results of an experiment carried out under plastic-house showed that mild strain ZYMV-M induced mild symptoms on the leaves of the plants of all varieties, but did not affect the yield of marketable fruits, as compared to those from the respective healthy controls. On the other hand, plants from all varieties exhibited accentuated mosaic and leaf malformation when infected with mild strain PRSV-W-1, alone or in mixture with ZYMV-M. The amount of fruits harvested (number and average weight) from these plants was similar to that from the respective healthy controls. However, the quality of the fruits was severely affected, since the mild strain PRSV-W-1 induced alteration on the texture and color of the skin. When plants infected only with mild strain PRSV-W-1 were grown simultaneously under field and plastic-house conditions, it was noticed that leaf and fruit symptoms were more intense on those maintained in the plastic-house. Once more the quantitative fruit yield was not affected by this mild strain. Zucchini squash cv. Samira was the most sensitive to PRSV-W-1 under both conditions. Together these results suggest that environmental variables, besides the interaction between the variety and the mild strain, might influence the expression of symptoms shown by plants infected with PRSV-W-1. In addition to this, the present work also tried to identify the most appropriate host, among some cucurbit species/varieties, for multiplication of both mild strains, and the efficiency of two species of aphids (*Myzus nicotianae* and *M. persicae*) on the transmission of the mild strain ZYMV-M. The mild strain ZYMV-M attained the highest concentration in *C. pepo* cv. Caserta and *Cucumis melo* cv. Casca-de-Carvalho. The most appropriate hosts for multiplication of mild strain PRSV-W-1 were *C. pepo* cv. Caserta followed by *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet and *C. sativus* cv. Safira. *M. nicotianae* and *M. persicae* transmitted the mild strain ZYMV-M to 11.7% and 0% of the test-plants of zucchini squash cv. Caserta. The transmission of the severe strain of ZYMV by both species of aphids occurred for 47% and 80% of the test-plants, respectively.

Keywords: Preimmunization; Cross protection; Control; Potyvirus; Transmission.

1 INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae é constituída de aproximadamente 118 gêneros e cerca de 825 espécies. No Brasil, as espécies com maior expressão econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). Segundo Lopes (1991), o cultivo das cucurbitáceas, além do valor econômico e alimentar, também tem grande importância social, na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda um grande número de mão de obra desde o cultivo até a comercialização.

Entre essas cucurbitáceas, a abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) apresenta importância econômica, notadamente no Estado de São Paulo onde se concentram as áreas de maior plantio no país (KOCH, 1995).

As cucurbitáceas em geral estão sujeitas a várias doenças causadas por vírus, que podem reduzir substancialmente a sua produtividade. Na natureza já foram encontrados mais de 20 vírus diferentes infectando plantas dessa família (LOVISSOLO, 1980). Desses, nove foram encontrados no Brasil (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005; LIN; KITAJIMA; MUNHOZ, 1983; KITAJIMA et al., 1991; NAGATA et al., 2005). Dentre os vírus encontrados no país, os mais importantes são os do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* - type W – PRSV-W) (ALBUQUERQUE et al., 1972) e do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) (VEGA et al., 1992, 1995; CANER et al., 1992), pois são predominantes em diversas regiões produtoras de cucurbitáceas no país e causam prejuízos significativos à produção. As plantas afetadas produzem menos e os frutos são de baixíssima qualidade (LIMA; FERNANDES; MENDES, 1980; PAVAN; CARVALHO; FERNANDES, 1989; YUKI, 1990; LIMA; VIEIRA, 1992).

Tanto o PRSV-W quanto o ZYMV são transmitidos com eficiência, de maneira não persistente, não circulativa, por diversas espécies de afídeos (LISA; LECOQ, 1984; PURCIFULL et al., 1984). Esses dois vírus, individualmente ou em infecções duplas, causam danos em diversas espécies de cucurbitáceas, mas os prejuízos são geralmente maiores em variedades de abobrinha de moita (*C. pepo*), em função da alta sensibilidade das plantas às doenças causadas por esses potyvirus. O controle das

viroses causadas por esses potyvirus não é tarefa fácil. As fontes de resistência disponíveis ainda não estão incorporadas em todas as espécies de cucurbitáceas, ou a resistência existente não é completa. Além disso, o controle dessas doenças por meio do combate aos vetores ou através de práticas culturais que minimizem a incidência desses vírus, no geral tem se mostrado ineficiente. Isso faz com que outras alternativas de controle sejam investigadas. O uso da premunização das plantas com estirpes fracas dos vírus, que não afetam a produção e o desenvolvimento, e protegem-nas contra os efeitos dos isolados normais em campo, vem sendo investigado há mais de 10 anos no Brasil e mostrou-se eficiente para o controle dos mosaicos comum e amarelo em abobrinha de moita (RABELO; REZENDE, 2004).

Até o presente momento a premunização de abobrinha de moita com as estirpes fracas do ZYMV e do PRSV-W, só ou em dupla premunização, só foi estudada em plantas da variedade Caserta, em experimentos em casa de vegetação e em campo. Torna-se, portanto, necessário avaliar o efeito dessas estirpes premunizantes, tanto em premunização simples como dupla, em outras variedades de abobrinha de moita.

O presente trabalho teve como principal objetivo dar continuidade a estes estudos avaliando o efeito de estirpes premunizantes do PRSV-W e do ZYMV na produção quantitativa e qualitativa de outras quatro variedades comerciais de *C. pepo*. Além disso, o trabalho também objetivou determinar a melhor hospedeira para a multiplicação dessas estirpes premunizantes, e avaliar a transmissão da estirpe fraca ZYMV-M por afídeos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Generalidades sobre o PRSV-W e o ZYMV

Levantamento recente sobre a incidência de viroses em cucurbitáceas no Estado de São Paulo, mostrou que o PRSV-W e o ZYMV foram os vírus predominantes, sendo constatados, respectivamente, em 48,3% e 24,5% das amostras analisadas (YUKI et al., 2000). Stangarlin; Dias e Rezende (2000), em um primeiro estudo realizado com amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas, também constataram que o PRSV-

W e o ZYMV foram os vírus de maior incidência no estado do Mato Grosso do Sul. Posteriormente, avaliando a incidência de viroses em ensaios de genótipos de abóboras e pepino nesse mesmo Estado, Stangarlin et al. (2001) verificaram que os vírus mais comuns foram o PRSV-W, o *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e o ZYMV, com incidências médias de 63,4%, 56,1% e 41,4%, respectivamente. No Estado do Maranhão também foi verificada a predominância do PRSV-W (64,4%) em amostras de diferentes espécies de cucurbitáceas, enquanto o ZYMV foi detectado em apenas 3,4% das amostras analisadas (MOURA et al., 2001). Na região do sub médio do São Francisco, entretanto, estudos sobre a incidência de viroses em melão (*Cucumis melo* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) mostraram que o *Watermelon mosaic virus* (WMV) (sin: *Watermelon mosaic virus 2* – WMV-2) foi encontrado em 68,7% das amostras analisadas, enquanto o PRSV-W foi detectado em 31,2% das amostras (CRUZ et al., 1999).

O PRSV-W e o ZYMV são classificados taxonomicamente como espécies do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*. Suas partículas são alongadas, flexuosas, medindo aproximadamente 760 - 800 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro. O genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples senso positivo, que sintetiza uma poliproteína que após clivagens dá origem à proteína capsidial e à diversas proteínas não estruturais com diferentes funções (LISA; LECOQ, 1984; PURCIFULL et al., 1984; DESBIEZ; LECOQ, 1997).

Estes potyvirus são facilmente transmitidos experimentalmente por inoculação mecânica. Na natureza são transmitidos por diversas espécies de afídeos, sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente, não circulativa. Karl e Schmelzer, citados por Purcifull et al. (1984), listaram 15 gêneros, totalizando 24 espécies de afídeos envolvidas na transmissão do PRSV-W. No caso do ZYMV, Perring et al. (1992) relataram 9 espécies de afídeos vetoras. Dentre os vetores de ambos os vírus encontram-se as espécies *Aphis gossypii* Glover, que é praga de algumas cucurbitáceas (GALLO et al., 2002) e *Myzus persicae* Sulzer, considerada uma das espécies mais eficientes na transmissão de vírus de plantas.

Duas proteínas virais estão envolvidas na transmissão de potyvirus por afídeos: a proteína da capa protéica e uma proteína não estrutural, denominada componente

auxiliar (“helper component” – HC-Pro) (PIRONE, 1991). Dessa maneira, a perda de transmissibilidade de uma determinada estirpe de um vírus pode estar relacionada tanto com mutações na proteína HC-Pro como com falhas na interação entre a proteína capsidial e a HC-Pro (FROISSART; MICHALAKIS; BLANC, 2002).

Não há evidências de que o PRSV-W seja transmitido pelas sementes de diferentes espécies de cucurbitáceas. Já os relatos sobre a transmissão do ZYMV pelas sementes são conflitantes. Greber; Perley e Herrington (1988) e Schrijnwerkers; Huijberts e Bos (1991), mostraram que o ZYMV foi transmitido por sementes de *C. pepo*, com taxas de 1,0% e 0,047%, respectivamente. Schrijnwerkers; Huijberts e Bos (1991) sugeriram que o vírus estava presente apenas externamente nas sementes. Ausência de transmissão pela semente foi relatada em testes com *Cucurbita maxima* Duch. Ex Lam., *C. moschata* Duch., *Cucumis melo* L. e *C. sativus* L. (DESBIEZ; LECOQ, 1997).

O PRSV-W, em todos os países onde ocorre, causa doença do tipo mosaico em diversas cucurbitáceas e a severidade dos sintomas depende da espécie afetada. As plantas afetadas mostram uma redução drástica no limbo foliar e no desenvolvimento vegetativo. Redução na produção e na qualidade dos frutos, resultando em prejuízos de até 100%, podem ocorrer em função da rápida disseminação do vírus nas áreas onde ele ocorre (GREBER; PERLEY; HERRINGTON, 1988).

O ZYMV causa doença do tipo mosaico amarelo em diversas espécies da família Cucurbitaceae, induzindo a malformação foliar, deformação e escurecimento dos frutos e podendo causar danos da mesma magnitude do PRSV-W (LECOQ; LEMAIRE; WIPF-SCHEIBEL, 1991; LISA; LECOQ, 1984). As plantas infectadas, especialmente abobrinha de moita, cessam a produção de frutos uma a duas semanas após a infecção, resultando em danos significativos na produção. Esses danos são maiores quanto mais cedo as plantas são infectadas.

Domingues et al. (2004) não obtiveram produção de frutos comerciais em plantas de abobrinha de moita Caserta inoculadas com o PRSV-W e com o ZYMV, isoladamente ou em conjunto, aos 5, 15 e 20 dias após a emergência das plantas. Yuki; Costa e Nagai (1991), avaliando o efeito do PRSV-W na produtividade de abobrinha de moita Caserta, inoculada aos 10 dias de idade, observaram uma redução de 99,7%

tanto no número quanto no peso dos frutos. Quando as plantas foram inoculadas aos 25 dias, esta redução foi de 80,6% e 86,9% no número e no peso dos frutos, respectivamente. Fletcher; Wallace e Rogers (2000) avaliaram a produção de plantas de *Cucurbita maxima* inoculadas com o ZYMV, o WMV e a mistura deles, em três diferentes épocas (logo após o plantio, próximo ao florescimento e próximo ao fim do ciclo). A infecção com o ZYMV causou reduções de 71% e 56% no peso médio dos frutos comerciais, para a primeira e segunda época de inoculação, respectivamente. A produção não diferiu da testemunha na terceira época. As plantas inoculadas com o WMV tiveram reduções na produção de 63%, 11% e 10%, para a primeira, segunda e terceira época de inoculação, respectivamente. A inoculação combinada do ZYMV + WMV reduziu a produção em 48%, 46% e 14% para a primeira, segunda e terceira época de inoculação, respectivamente.

Como os sintomas de infecção dos dois vírus são muito semelhantes, e a dupla infecção não é incomum, torna-se difícil fazer a diagnose visual precisa destas viroses, sendo necessário a utilização de métodos serológicos (ELISA) ou moleculares (RT-PCR) para uma diagnose exata, ou ainda a inoculação em plantas indicadoras. Esses métodos nem sempre estão facilmente disponíveis aos produtores.

As recomendações para o controle dos mosaicos causados pelo PRSV-W e pelo ZYMV em cucurbitáceas incluem, de modo geral, a eliminação de hospedeiras contidas na vegetação espontânea, destruição de plantios velhos e/ou abandonados de qualquer cucurbitácea, programas de controle químico de afídeos, usos de plásticos coloridos ou substâncias refletoras no solo e uso de variedades resistentes ou tolerantes, quando disponíveis (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

O uso de premunização para o controle dessas viroses em abobrinha de moita em campo tem sido considerada uma alternativa viável devido à pequena disponibilidade de variedades resistentes à essas viroses ou ao fato da resistência encontrada não ser completa, e pela falta de outras medidas de controle que sejam eficientes e econômicas (LECOQ; LEMAIRE; WIPF-SCHEIBEL, 1991; WANG et al., 1991; WALKEY et al., 1992; REZENDE; PACHECO, 1998).

2.1.2 Controle por premunização

A premunização de plantas é uma prática que pode ser aplicada a qualquer cultura de propagação vegetativa ou por semente, desde que a estirpe premunizante seja fraca, estável, de valor protetor e tenha efeito negligível no desenvolvimento e produção das plantas (MÜLLER; REZENDE; COSTA, 1991). No Brasil, a premunização tem sido utilizada com sucesso há mais de trinta e cinco anos, no controle da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) em laranja “Pêra” (MÜLLER; CARVALHO, 2001).

O controle do mosaico amarelo da abobrinha por premunização foi proposto inicialmente por Lecoq et al. (1991), na França. Um variante que induzia sintomas fracos de mosaico nas folhas de melão e de abobrinha e nenhum sintoma nos frutos foi selecionado a partir de uma estirpe obtida por Lecoq (1986). Resultados experimentais obtidos em testes em casa de vegetação, conduzidos em Taiwan, mostraram que a estirpe fraca introduzida da França protegia as plantas de abobrinha de moita, de pepino e de melão contra a infecção por isolados severos originários dos Estados Unidos (Connecticut e Flórida), da França e de Taiwan. No entanto, a proteção em geral era mais eficiente contra o isolado originário da França, a partir do qual foi obtida a estirpe fraca premunizante (WANG et al., 1991). Experimentos de campo realizados em Taiwan e na França mostraram que a premunização permitiu o controle satisfatório da doença, bem como um aumento da produção de até 14,7 vezes, quando esta foi comparada com a das plantas não premunizadas. Em Taiwan, Wang et al. (1991) mostraram que a estirpe ZYMV-WK, selecionada por Lecoq; Lemaire e Wipf-Scheibel (1991) controlou a doença em campos de abobrinha de moita, com ganhos na produção da ordem de 116% e 1256%, no primeiro e no segundo ano, respectivamente. Walkey et al. (1992), na Inglaterra, também relataram resultados positivos no controle do mosaico amarelo da abobrinha de moita por premunização, com ganhos significativos na produção de frutos comerciais.

A premunização para o controle do mosaico amarelo em abobrinha de moita já vem sendo utilizada comercialmente no Havaí (CHO et al., 1992) e em Israel (YARDEN et al., 2000). Nesse último país, essa tecnologia vem sendo aplicada desde 1998 para o controle do mosaico amarelo em abobrinha de moita, abóbora, melão e melancia, atingindo mais de 20% das cucurbitáceas comercializadas no país (BIO-OZ, 2006).

Testes realizados em casa de vegetação, no Brasil, por Rezende e Pacheco (1998) demonstraram que duas estirpes fracas do PRSV-W, denominadas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 (REZENDE et al., 1992, 1994), não afetaram o desenvolvimento de plantas de abobrinha de moita cvs. Caserta e Clarinda, de abóbora cv. Menina Brasileira e de um híbrido de Tetsukabuto, e protegeram-nas eficientemente contra os efeitos de isolados normais superinoculados. Em campo, a proteção oferecida pelas estirpes fracas foi quase total em plantas de abobrinha de moita 'Caserta' e de abóbora 'Menina Brasileira', sendo que se verificou um aumento no número e no peso de frutos comerciais de 'Caserta' de 511% e de 633%, respectivamente. A premunização das plantas de abóbora 'Menina Brasileira', considerada tolerante ao mosaico causado pelo PRSV-W, teve um efeito aditivo no controle da doença, que foi medido através da produção de frutos comerciais. Plantas premunizadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 produziram, respectivamente, 24% e 42,8% mais frutos comerciais do que plantas inicialmente sadias e que foram naturalmente infectadas com o isolado normal do vírus.

Dias e Rezende (2000), estudando a premunização da abóbora híbrida Tetsukabuto para o controle do PRSV-W, em campo, demonstraram que a proteção foi eficiente e as plantas premunizadas de dois experimentos independentes mostraram ganhos quantitativos e qualitativos na produção. Em um primeiro experimento as plantas premunizadas produziram aproximadamente 3,1 vezes mais frutos/planta (peso) do que as infectadas com estirpes comuns do vírus. As plantas infectadas com estirpes comuns produziram apenas 25% de frutos comerciais, enquanto que as premunizadas produziram 83,7% de frutos comerciais. No segundo experimento, as plantas premunizadas produziram 2,3 vezes mais frutos do que as plantas infectadas com as estirpes comuns do PRSV-W. Desses frutos, 97,1% foram classificados como comerciais, para as plantas premunizadas, enquanto que apenas 2,1% dos frutos das plantas infectadas com estirpes comuns do vírus foram classificados como comerciais.

Experimentos de campo realizados por Giampan (2002) para avaliar o efeito protetor de três estirpes fracas do PRSV-W em plantas de melancia, também apresentaram resultados satisfatórios. Todas as plantas premunizadas com qualquer uma das estirpes fracas ficaram protegidas contra a estirpe severa. Não foi observada

diferença significativa na produção de frutos das plantas premunizadas quando comparadas às plantas sadias. As plantas premunizadas com as estirpes PRSV-W-1 e PRSV-W-3 apresentaram reduções de 14,6% e 13,8%, respectivamente, na produção de frutos comerciais em relação à produção das plantas não premunizadas. Enquanto que plantas premunizadas com a estirpe PRSV-W-2 apresentaram um acréscimo de 6,7% na produção de frutos. A qualidade dos frutos produzidos foi semelhante em todos os tratamentos avaliados. A qualidade foi avaliada verificando-se a aparência externa e interna dos frutos e através da quantificação do conteúdo de açúcares (brix) da polpa dos frutos.

Rabelo e Rezende (2004), também no Brasil, após obter uma estirpe fraca premunizante de ZYMV, denominada ZYMV-M, observaram que plantas de abobrinha de moita 'Caserta' ficaram protegidas contra estirpes severas do vírus originárias de três localidades. Em testes de proteção em campo, com plantas de abobrinha de moita 'Caserta' que foram duplamente premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, obteve-se um ganho de produção de 85% em relação às plantas inoculadas com as estirpes severas desses vírus (RABELO, 2002).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Estirpes dos vírus

Foram utilizadas uma estirpe fraca do PRSV-W, denominada PRSV-W-1, selecionada por Rezende et al. (1994), e uma estirpe fraca do ZYMV, denominada ZYMV-M, obtida por Rabelo (2002). Também foram utilizadas estirpes severas do PRSV-W e do ZYMV. As estirpes severas do PRSV-W e do ZYMV empregadas foram as comumente encontradas em plantios de abobrinha de moita, sendo responsáveis por sintomas severos em *C. pepo*. Essas estirpes foram mantidas em plantas de abobrinha de moita, em estufas separadas.

2.2.2 Avaliação do efeito das estirpes premunizantes em variedades de abobrinha de moita

2.2.2.1 Variedades de *Cucurbita pepo*

Foram utilizadas quatro variedades de *C. pepo*: uma do grupo Caserta (Novita Plus), uma do grupo Libanesa (Samira), uma do grupo Zucchini Verde-Escuro (AF 2847) e uma do tipo Amarelo Precoce (Yasmin). Todas essas variedades são provenientes da empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda.

2.2.2.2 Obtenção das plantas

As mudas foram produzidas em bandejas de isopor contendo substrato de casca de pinus para hortaliças. Foi semeada uma semente por célula. As bandejas foram posteriormente levadas a uma estufa, onde foram irrigadas diariamente. Essas bandejas permaneceram nessa estufa até as mudas atingirem o estágio cotiledonar, quando foram inoculadas.

2.2.2.3 Inoculação das mudas

Os inóculos do PRSV-W-1 e ZYMV-M foram obtidos de folhas de abobrinha de moita infectadas, macerando-as em almofariz de porcelana com tampão fosfato de potássio 0,02M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade. A diluição do inóculo utilizada foi de 1:10 (peso/volume).

As inoculações foram feitas nos cotilédones das mudas de *C. pepo*, previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício (Carborundum), e friccionadas com algodão umedecido na solução de inóculo. Logo em seguida as plantas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo. As estirpes foram inoculadas em grupos separados de plantas.

2.2.2.4 PTA-ELISA

Vinte dias após a inoculação em abobrinha de moita foi feito o teste serológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”), com algumas modificações da forma descrita por Mowat e Dawson (1987), para confirmar a infecção pelas estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV.

Para este teste foram utilizados antissoros específicos contra a proteína capsial do PRSV-W e do ZYMV. Foram colocados 100 µl das amostras, diluídas 1:20 em

tampão PBS (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,4) em placas de ELISA de 96 pocinhos e posteriormente incubadas por 16 horas, a 4°C. Foram utilizados dois pocinhos para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (1L PBS + 0,5 ml Tween). Na etapa seguinte, foram colocados em cada pocinho 100 µl do antissoro diluído (1:1000) em tampão Tris-HCl. As placas foram incubadas por 1:30 h, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como anteriormente. Foram colocados 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 em tampão Tris-HCl, e incubado novamente por 1:30 h a 37°C. As placas foram lavadas novamente e a seguir foram colocados em cada pocinho 100 µl de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorvância de cada um dos pocinhos foi medida em leitor de ELISA, utilizando-se um filtro de 405 nm. Extratos de plantas saudáveis e de plantas sabidamente infectadas com o PRSV-W e com o ZYMV foram usados como controles. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorvância foi superior a três vezes a média de absorvância do extrato da planta sadia.

2.2.2.5 Escalas de notas de sintomas

Foi elaborada uma escala de notas de sintomas nos frutos, para posterior uso na classificação destes durante os experimentos. Para isso, inicialmente foram obtidas mudas das quatro variedades de abobrinha de moita (Novita Plus, Samira, AF 2847 e Yasmin), conforme descrito anteriormente. Após a emergência, as mudas foram transplantadas para canteiros, em estufa plástica. Após o transplante e posterior desenvolvimento, as plantas foram inoculadas, de acordo com o método descrito no item 2.2.2.3, com estirpes severas do PRSV-W e do ZYMV e a mistura dessas duas estirpes. Plantas saudáveis foram mantidas como controle. As plantas foram inoculadas com os vírus em duas etapas. Uma planta de cada variedade foi inoculada 20 dias após a semeadura e a outra planta foi inoculada 21 dias após a primeira inoculação. Os frutos foram colhidos diariamente, em ponto comercial, e fotografados individualmente.

O fruto sadio, sem sintomas, recebeu nota um, as demais notas foram atribuídas de acordo com a intensidade de sintomas.

A escala de nota de severidade de sintomas em plantas foi baseada no trabalho de Rezende (1996). Foi dada nota 1 para as plantas sem sintoma de mosaico; nota 2 para plantas com sintomas de mosaico pouco evidentes, sem deformações foliares e bom desenvolvimento; nota 5 para as plantas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas, bolhas e desenvolvimento reduzido; e notas 3 e 4 para sintomas intermediários.

2.2.2.6 Teste do efeito das estirpes premunizantes em quatro variedades de abobrinha de moita

O teste para verificar o efeito das estirpes premunizantes na produção de quatro variedades de abobrinha de moita foi conduzido em estufas na estação experimental da Sakata Seed Sudamerica LTDA, localizada no município de Bragança Paulista – SP.

Foram comparados os seguintes tratamentos: (a) plantas infectadas com o PRSV-W-1; (b) plantas infectadas com o ZYMV-M; (c) plantas duplamente infectadas com o PRSV-W-1 e com o ZYMV-M; (d) plantas sadias. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições e seis plantas por parcela. A interação de cada variedade com as estirpes premunizantes foi avaliada em estufas individualizadas.

As plantas foram transplantadas para as estufas no dia 3 de setembro de 2004, um dia após a inoculação com as estirpes fracas. E seguiram todos os tratamentos culturais já adotados rotineiramente pela empresa. Na época de florescimento das plantas, a polinização das flores femininas foi realizada manualmente, garantindo assim um maior pegamento de frutos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: peso dos frutos comerciais e totais, número de frutos comerciais e não comerciais, qualidade dos frutos, baseada na escala de nota de sintomas, nota de sintomas de planta e peso fresco de planta.

A primeira colheita de frutos foi feita no dia 11 de outubro e a última no dia 11 de novembro de 2004. Foram realizadas 15 colheitas de frutos no período.

2.2.2.7 Teste do efeito da estirpe premunizante PRSV-W-1 em plantas em estufa e em campo

O teste para avaliar o efeito de fatores ambientais sobre a expressão de sintomas em plantas infectadas com o PRSV-W-1 também foi realizado na estação experimental da Sakata Seed Sudamerica LTDA.

O experimento foi conduzido no período de 12 de setembro a 11 de novembro de 2005. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 3 repetições e 4 plantas por repetição. Foram comparados os seguintes tratamentos: (a) plantas infectadas com o PRSV-W-1 e (b) plantas saudáveis. Esses dois tratamentos foram realizados simultaneamente em campo e em estufa, e foram utilizadas as mesmas quatro variedades de abobrinha de moita do experimento anterior (Novita Plus, Samira, AF 2847 e Yasmin).

Foram realizadas as mesmas avaliações do experimento anterior, exceto peso fresco das plantas. A colheita iniciou-se no dia 17 de outubro, terminando no dia 11 de novembro de 2005. Foram realizadas 10 colheitas de frutos.

2.2.3 Determinação de hospedeiras para multiplicação das estirpes fracas premunizantes

Para a identificação da melhor hospedeira para a multiplicação e manutenção das estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV foram comparadas cinco espécies da família Cucurbitaceae: *C. pepo* cv. Caserta, *C. moschata* cv. Menina Brasileira, *Cucumis sativus* L. cv. Safira, *C. melo* cv. Melão Gaúcho Melhorado Casca-de-Carvalho, *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet. As plantas foram semeadas em vasos de alumínio esterilizado contendo uma mistura de terra e matéria orgânica, previamente esterilizada. Foram colocadas três sementes por vaso, e foi feito o desbaste no estágio de folha cotiledonar, deixando duas plantas por vaso. As plantas foram inoculadas mecanicamente no estágio cotiledonar, com as duas estirpes fracas dos vírus, e com as estirpes severas, isoladamente. Foram então mantidas em casa de vegetação até o momento da indexação e determinação da concentração viral através de Dot-Blot. Os testes foram conduzidos no Setor de Fitopatologia da ESALQ.

O teste sorológico foi realizado aos 10 e aos 20 dias após a inoculação mecânica das plantas-teste. Em todos os testes foram incluídos controles negativos (plantas sadias) e positivos (plantas infectadas com as estirpes severas dos vírus), na diluição de 1:10. Foram realizados dois testes em datas diferentes. Cada teste foi realizado com três repetições de cada planta para cada estirpe fraca.

2.2.3.1 Teste sorológico de Dot-Blot

Apesar do Dot-Blot não fornecer a quantificação exata de vírus em uma amostra, ele pode ser indicativo da planta que tem maior concentração viral em seus tecidos. Para isso analisam-se diluições seriadas dos extratos das diferentes plantas-teste. Dessa maneira a detecção do vírus em extratos mais diluídos será indicativa de maiores concentrações de vírus nos seus tecidos, quando comparadas com extratos de plantas cuja detecção ocorrer somente nas menores diluições.

O procedimento para o teste foi o seguinte: as amostras foram maceradas individualmente, em tubos de eppendorf, em presença de tampão PBS (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,4), na diluição de 1:10 (g de folha: ml de tampão). Os extratos obtidos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos em centrífuga Eppendorf 5415C. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à diluições seriadas (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:600, 1:1000 e 1:1500). Membranas de nitrocelulose foram colocadas em aparelho Bio-Dot™ (Bio-Rad) que foi submetido à vácuo. Em cada pocinho foram aplicados 8 μl de extrato de cada amostra, nas diferentes diluições. Deixou-se a membrana secar ao ar por alguns minutos. A membrana foi incubada em tampão PBS + 1% de BSA (Albumina de Soro Bovino) por 30 minutos, sob agitação lenta. A membrana foi, posteriormente, transferida para solução com o antissoro específico diluído 1:500 + 1% de BSA e incubada a 4°C, overnight. Esta solução foi preparada 24 horas antes do uso, macerando-se 0,2 g de folhas sadias de cada espécie testada em 10 ml de tampão PBS e acrescentando-se 20 μl de antissoro e incubada à 4°C. No momento do uso a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, coletou-se o sobrenadante e foi adicionado o BSA. A membrana foi lavada 4 vezes com PBS-Tween (1L PBS + 0,5 ml Tween). Adicionou-se a imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina, diluída 1:34000 em tampão PBS.

Incubou-se à temperatura ambiente, sob agitação, por 4 horas. Foi feita lavagem 4 vezes com PBS-Tween, e incubou-se com uma solução preparada com 10 ml de tampão de substrato (0,1 M Tris-HCL [pH9.0], 0,1 M NaCl, 0,005 M MgCl₂), 25 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) e 50 µl de NBT (nitro blue tetrazolium). Lavou-se a membrana com água destilada para parar a reação, e os resultados foram observados. A identificação das amostras com maiores concentrações virais foi feita por meio de comparações visuais da intensidade das reações.

2.2.4 Transmissão do ZYMV-M por afídeos

Para avaliar a transmissão da estirpe fraca ZYMV-M foram usadas as espécies *Myzus nicotianae* Blackman e *Myzus persicae* Sulzer. A colônia desses afídeos foi mantida em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.), respectivamente, acondicionadas em gaiolas à prova de insetos, em condição de casa de vegetação. As espécies foram identificadas pelo Dr. Valdir A. Yuki, do Instituto Agronômico de Campinas.

Para os testes de transmissão os afídeos foram removidos das folhas das plantas com o auxílio de um pincel fino e macio. Depois de coletados, foram mantidos em jejum, numa caixa plástica, por um período de aproximadamente 30 minutos. A seguir foram colocados sobre folhas das plantas infectada com o ZYMV-M e com o ZYMV severo, como controle. O período de aquisição foi de aproximadamente 20 minutos. Logo após os afídeos foram transferidos com o auxílio do pincel para as folhas das plantas-teste de abobrinha de moita 'Caserta', em número de dez afídeos por planta. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, do Setor de Fitopatologia da ESALQ, para posteriores avaliações de sintoma e indexação por RT-PCR.

2.2.4.1 RT-PCR

A extração de RNA total das plantas de abobrinha foi feita utilizando Trizol® LS (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas. Três microlitros de suspensão de RNA total foram misturados a 1 µl do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) anti-senso (concentração de 20 pmoles) originário do gene da

proteína capsial do ZYMV, ZY-3 (5'-TAGGCT TGCAAACGGAGTCTAATC-3') (THOMSON et al.,1995), que foi diluído em água destilada previamente tratada com 0,1% de Dietil Pirocarbonato (DEPC), 1 µl de mistura de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10 mM e 5 µl de água Milli Q. 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 ditioneitol (DTT) 0,1 M, 200 unidades da enzima Superscrit III, 4 µl de água Milli Q, misturados num volume final de 20 µL. Essa solução foi incubada por 25°C por 5 minutos, 50°C por 40 minutos e a 70°C por 15 minutos.

Esse cDNA sintetizado foi usado em uma reação de PCR ("polymerase chain reaction" – reação em cadeia da polimerase). Desse modo, 3 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), 0,75 µl de MgSO₄ 50 mM, 1 µl do *primer sense* 20 pmoles, 1 µl do *primer anti-sense* 20 pmoles, 0,5 µl de mistura de dNTP's 10 mM e 15,75 µl de água Milli Q. O *primer sense* utilizado para a detecção do ZYMV foi o ZY-2 (5'-GCTCCA TACATAGCTGAGACAGC-3') (THONSON et al., 1995). 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 foi de 2 minutos à 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento à 4°C. Uma alíquota do produto da RT-PCR foi visualizada em gel de agarose a 0,8%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) em 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Escala de notas de sintomas em frutos

As características fenotípicas dos frutos colhidos de cada variedade de abobrinha de moita, cujas plantas foram infectadas com estirpes severas do PRSV-W, do ZYMV e a mistura desses vírus, estão ilustradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Os frutos colhidos das plantas sadias, usadas como controles, receberam nota 1. Os frutos com sintomas mais intensos de infecção receberam nota 5. Frutos com sintomas intermediários receberam notas 2, 3 e 4, de acordo com a intensidade dos sintomas.

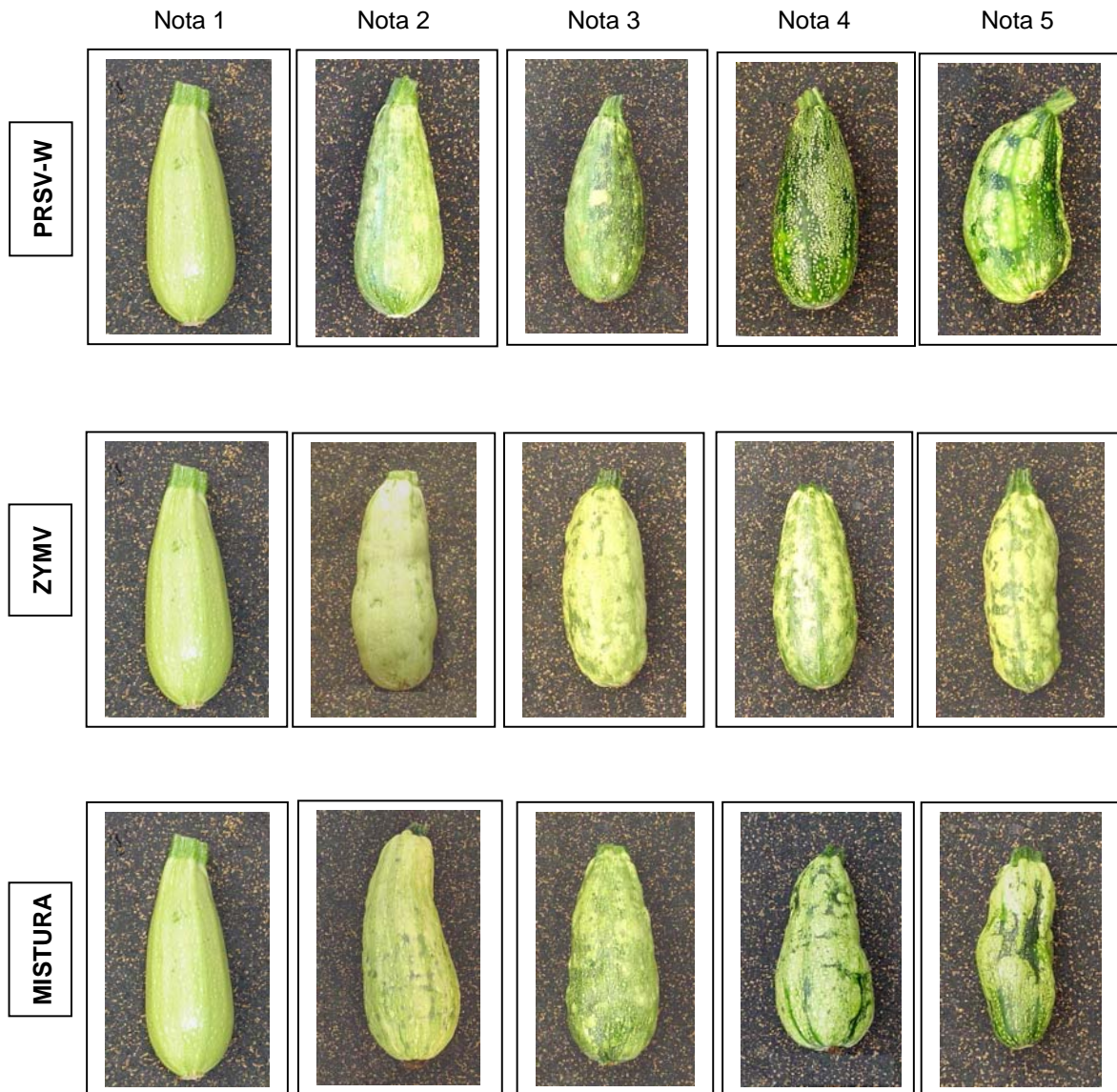


Figura 1 – Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Samira, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes

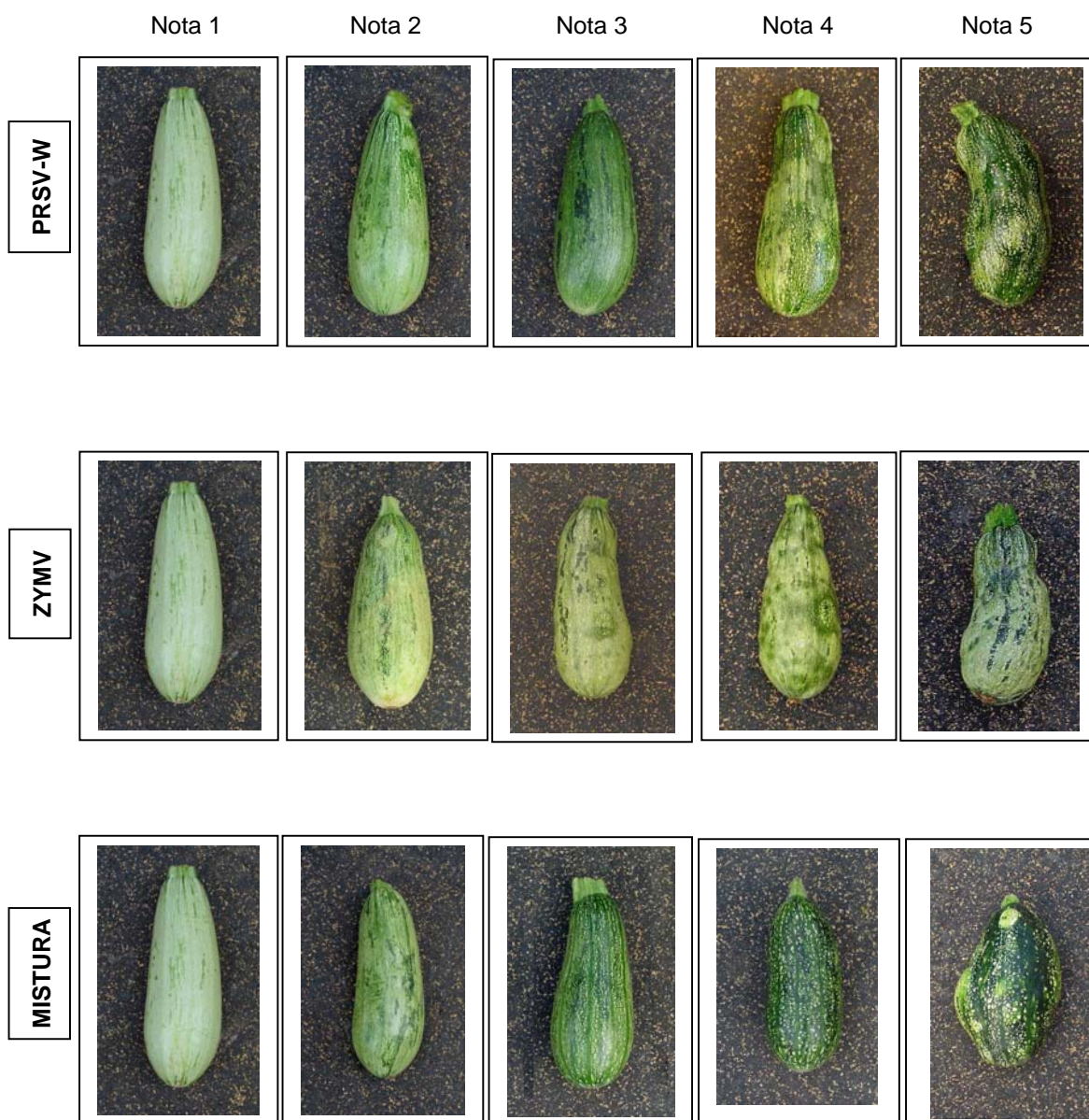


Figura 2 - Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Novita Plus, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes

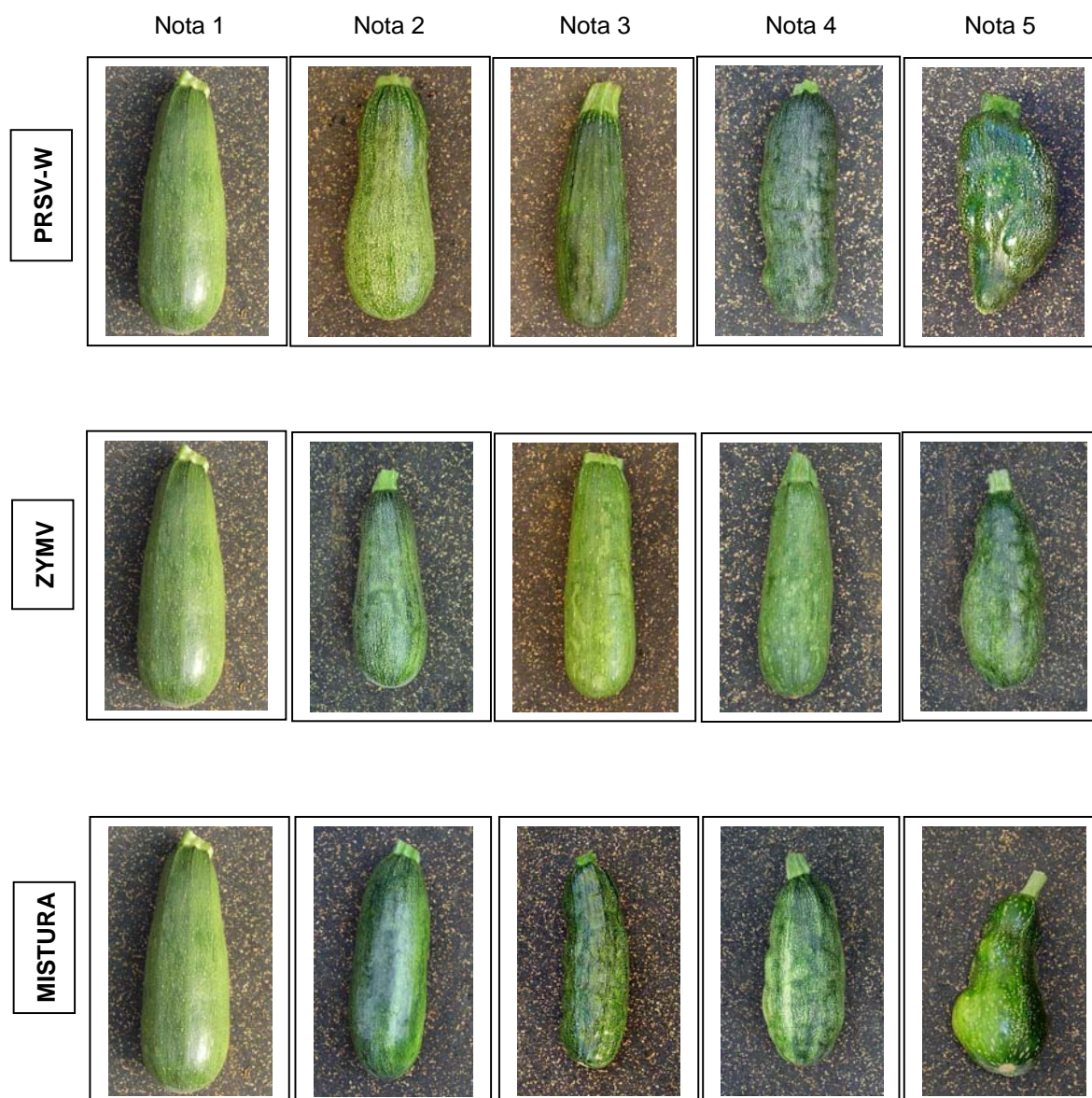


Figura 3 - Escala de notas de sintomas em frutos da variedade AF 2847, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes



Figura 4 - Escala de notas de sintomas em frutos da variedade Yasmin, colhidos de plantas sadias (Nota 1) e infectadas com o PRSV-W, o ZYMV e a mistura destes

2.3.2 Efeito das estirpes premunizantes em quatro variedades de abobrinha de moita

Os resultados obtidos nesse experimento estão apresentados a seguir, separadamente para cada variedade.

2.3.2.1 Variedade Samira

Os dados de produção das plantas sadias e infectadas da variedade Samira encontram-se na Tabela 1. As plantas inoculadas com as estirpes ZYMV-M, PRSV-W-1 e a mistura destas tiveram reduções da ordem de 6,4%, 29% e 16,1% na produção de frutos totais, respectivamente, em relação à produção das plantas sadias, embora esses valores não foram significativamente diferentes na análise estatística. Do total de frutos produzidos pelas plantas inoculadas com o ZYMV-M, 8,6% foram de frutos não comerciais. Por outro lado, de toda a produção das plantas inoculadas com o PRSV-W-1 e com a mistura deste com o ZYMV-M mais de 80% foi composta por frutos não comerciais.

É interessante observar que apesar de a maioria dos frutos colhidos das plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 e com a mistura desta com a estirpe ZYMV-M terem mostrado sintomas severos, colocando-os na categoria de não comerciais, a infecção com as estirpes fracas não parece ter afetado o tamanho (peso médio) dos frutos. Estes foram semelhantes aos daqueles colhidos de plantas sadias e infectadas apenas com a estirpe ZYMV-M. Na Figura 5 é possível observar as características dos frutos colhidos de plantas infectadas e sadias da variedade Samira.

Tabela 1 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Samira sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura.

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas de frutos
	Total	Comercial	Total	Comercial		
Sadia	6,2*A	5,7 A	1,55 A	1,36 A	0,24 A	1,0 A
ZYMV-M	5,8 A	5,3 A	1,48 A	1,36 A	0,26 A	1,1 A
PRSV-W-1	4,4 A	0,6 B	0,94 A	0,15 B	0,21 A	3,1 C
MISTURA	5,2 A	0,9 B	1,24 A	0,24 B	0,24 A	2,6 B

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 5 - Frutos da variedade Samira infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos saudáveis (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)

A Tabela 2 trás os dados de desenvolvimento das plantas baseado no peso fresco ao final do experimento, bem como a nota média de sintomas foliares. Nota-se que as plantas inoculadas com a estirpe PRSV-W-1 e a mistura das estirpes fracas (PRSV-W-1 + ZYMV-M) também tiveram o peso fresco inferior ao daquelas saudáveis e inoculadas com a estirpe ZYMV-M. Também apresentaram sintomas severos de mosaico (notas médias = 4,0 e 3,8, respectivamente), enquanto que as plantas inoculadas apenas com a estirpe ZYMV-M apresentaram sintomas foliares mais fracos (nota média = 1,8).

Tabela 2 - Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Samira saudáveis e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Peso fresco/planta (Kg)	Nota média de sintomas ¹
Sadia	2,47*A	1,0 A
ZYMV-M	2,16 AB	1,8 B
PRSV-W-1	1,58 AB	4,0 C
MISTURA	1,36 B	3,8 C

¹: avaliação realizada no dia 05/11/2004.

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2.2 Variedade Novita Plus

Os resultados referentes à produção e qualidade dos frutos colhidos das plantas da variedade Novita Plus estão apresentados na Tabela 3, e ilustrados na Figura 6.

Tabela 3 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Novita Plus sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas de frutos
	Total	Comercial	Total	Comercial		
Sadia	12,4*A	10,6 A	3,16 A	2,57 A	0,24 A	1,2 A
ZYMV-M	11,1 A	9,2 A	2,78 A	2,18 A	0,23 AB	1,5 B
PRSV-W-1	9,7 A	1,4 B	2,10 A	0,30 B	0,21 B	3,0 C
MISTURA	10,0 A	2,2 B	2,19 A	0,53 B	0,2 1B	2,9 C

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 6 - Frutos da variedade Novita Plus infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)

Mais uma vez observa-se que a infecção com as estirpes fracas não ocasionou redução muito acentuada na produção total de frutos por planta, quando comparada com a das plantas sadias. A redução variou de 10,5%, para as plantas infectadas com o ZYMV-M a 21,7% para aquelas infectadas com o PRSV-W-1. No entanto, os resultados revelaram também para essa variedade uma grande diminuição na quantidade de frutos comerciais produzidos pelas plantas inoculadas com a estirpe PRSV-W-1 só e em mistura com a estirpe ZYMV-M. Oitenta e cinco e 78%, respectivamente, dos frutos colhidos das plantas inoculadas com o PRSV-W-1 e PRSV-W-1 + ZYMV-M foram classificados como não comerciais. As plantas infectadas somente com a estirpe ZYMV-M tiveram uma produção quantitativa e qualitativa um pouco inferior à das plantas sadias, com 82,8% da produção constituída por frutos comerciais.

Novamente os resultados são semelhantes aos obtidos com a variedade Samira, ou seja, a inoculação com a estirpe fraca PRSV-W-1 só e em mistura com a estirpe

ZYMV-M afetou significativamente a qualidade dos frutos produzidos nas condições em que foi realizado o experimento, resultando em queda drástica na produção de frutos comerciais. Porém não afetou de forma acentuada o peso médio dos frutos, semelhante ao constatado com a variedade Samira.

Na Tabela 4 são apresentados os dados relativos ao desenvolvimento das plantas da variedade Novita Plus nos quatro tratamentos testados no experimento. O peso fresco das plantas foi reduzido naquelas infectadas com a estirpe PRSV-W-1, sozinha e em mistura com a estirpe ZYMV-M, quando comparado com os das plantas não infectadas e infectadas somente com a estirpe ZYMV-M. Além disso, as plantas inoculadas com a estirpe PRSV-W-1 e a mistura desta com a estirpe ZYMV-M apresentaram sintomas severos de mosaico (notas médias = 4,2 e 4,4 respectivamente), enquanto que as plantas inoculadas apenas com a estirpe ZYMV-M apresentaram sintomas mais fracos (nota média = 1,8), se assemelhando mais a uma planta sadia.

Tabela 4 - Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Novita Plus sadias e inoculadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Peso fresco/planta (Kg)	Nota média de sintomas ¹
Sadia	3,74*A	1,0 A
ZYMV-M	3,38 A	1,8 B
PRSV-W-1	2,35 B	4,2 C
MISTURA	2,12 B	4,4 C

¹: avaliação realizada no dia 05/11/2004.

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2.3 Variedade AF-2847

Na Tabela 5 estão apresentados os dados referentes à produção qualitativa e quantitativa dos frutos da variedade AF 2847, e a Figura 7 ilustra estes dados.

Tabela 5 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita AF 2847 sadias e inoculadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas de frutos
	Total	Comercial	Total	Comercial		
Sadia	9,7*A	8,6 A	2,39 A	2,07 A	0,25 A	1,1 A
ZYMV-M	9,4 A	6,5 A	2,34 A	1,61 A	0,25 A	1,9 B
PRSV-W-1	8,1 A	2,5 B	2,03 A	0,71 B	0,25 A	2,6 C
MISTURA	7,6 A	2,1 B	1,72 A	0,51 B	0,23 A	2,6 C

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de produção de plantas da variedade AF-2847 seguiram a mesma tendência daqueles obtidos com as variedades Samira e Novita Plus. As plantas infectadas, mais uma vez, tiveram reduções na produção total de frutos variando de 3,1% a 21,6%. Sessenta e nove e 72,4%, dos frutos produzidos pelas plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 e com a mistura das estirpes fracas, respectivamente, foram classificados como não comerciais. O peso médio (Kg) de cada fruto, por outro lado não diferiu entre os tratamentos. A infecção com a estirpe fraca ZYMV-M teve um efeito um pouco mais acentuado na redução da qualidade dos frutos colhidos dessa variedade do que naqueles das variedades Samira e Novita Plus. Foram classificados como não comerciais 30,8% dos frutos colhidos das plantas infectadas com essa estirpe.



Figura 7 - Frutos da variedade AF 2847 infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados à frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)

Os dados relativos ao desenvolvimento das plantas da variedade AF 2847 infectadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura, e das plantas saudias estão apresentados na Tabela 6. A nota média de sintomas das plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 e com a mistura das estirpes fracas (3,9 e 4,3, respectivamente) foi superior a das plantas infectadas com a estirpe ZYMV-M (1,6). A infecção com a estirpe PRSV-W-1 e PRSV-W-1 + ZYMV-M mais uma vez reduziu o desenvolvimento das plantas de forma significativa.

Tabela 6 - Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita AF 2847 saudias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Peso fresco/planta (Kg)	Nota média de sintomas ¹
Sadia	3,24*A	1,0 A
ZYMV-M	2,89 A	1,6 B
PRSV-W-1	2,04 B	3,9 C
MISTURA	2,03 B	4,3 C

¹: avaliação realizada no dia 05/11/2004.

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2.4 Variedade Yasmin

Na Tabela 7 estão apresentados os dados de produtividade e qualidade de frutos colhidos da variedade Yasmin infectada com as estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura, e das plantas saudias. A Figura 8 ilustra a qualidade dos frutos colhidos dessas plantas.

Tabela 7 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos e nota média de sintomas de frutos de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas de frutos
	Total	Comercial	Total	Comercial		
Sadia	9,3*A	7,0 A	1,71 A	1,39 A	0,18 A	1,4 A
ZYMV-M	12,0 A	6,8 A	2,10 A	1,35 A	0,17 A	2,1 B
PRSV-W-1	10,3 A	0,0 B	1,82 A	0,00 B	0,18 A	3,5 C
MISTURA	9,3 A	0,6 B	1,70 A	0,13 B	0,17 A	3,4 C

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como foi verificado para as outras variedades, a infecção com as estirpes fracas separadamente ou em mistura, não alterou significativamente a produção total de frutos. Pelo contrário, em alguns casos as plantas infectadas produziram até mais do que aquelas sadias. No entanto, as plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 só ou em mistura com a estirpe ZYMV-M tiveram a maior produção de frutos não comerciais, quando comparadas às produções das outras três variedades nos mesmos tratamentos. Todos os frutos produzidos pelas plantas infectadas com o PRSV-W-1 e 93,5% daqueles obtidos das plantas infectadas com a mistura das estirpes fracas foram classificados como não comerciais. As plantas infectadas somente com a estirpe ZYMV-M também tiveram uma produção acentuada de frutos não comerciais (43,3%). O mesmo foi constatado com a produção das plantas não infectadas, onde 24,7% dos frutos foram não comerciais. Para as outras três variedades, as porcentagens de frutos não comerciais produzidos pelas plantas sadias foram de 8,1% ('Samira'), 14,5% ('Novita Plus') e 11,3% ('AF 2847').



Figura 8 - Frutos da variedade Yasmin infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1 (A), ZYMV-M (B) e duplamente infectadas (C), comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas)

O peso fresco final das plantas da variedade Yasmin infectadas com a estirpe PRSV-W-1, sozinha e em mistura com a estirpe ZYMV-M, foi inferior ao das plantas infectada com a estirpe ZYMV-M e ao das plantas sadias. Da mesma forma, as plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 e com a mistura das estirpes fracas obtiveram maiores notas de sintomas foliares quando comparadas com aquelas infectadas com a estirpe ZYMV-M (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios de peso fresco e notas médias de sintomas foliares de plantas de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com as estirpes PRSV-W-1 e ZYMV-M, sós e em mistura.

Tratamento	Peso fresco/ planta (Kg)	Nota média de sintomas ¹
Sadia	4,89*A	1,0 A
ZYMV-M	4,10 A	1,8 B
PRSV-W-1	3,25 B	3,5 C
MISTURA	3,12 B	3,3 C

¹: avaliação realizada no dia 05/11/2004.

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A premunização de abobrinha de moita já foi testada com sucesso no Brasil, em plantas da variedade Caserta, em condições de campo aberto (REZENDE; PACHECO, 1998). Nestas condições verificou-se um aumento de 511% no número de frutos e 633% no peso de frutos comerciais dessa variedade comparado a produção de plantas infectadas naturalmente com estirpes severas do PRSV-W. Foi observado também que

as plantas não protegidas e que foram infectadas naturalmente pelo vírus no campo apresentaram uma produção de 75,5% de frutos não comerciais, enquanto as plantas premunizadas apresentaram uma produção média de 13,5% de frutos classificados como não comerciais. A dupla premunização, com estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV, também foi realizada com sucesso por Rabelo (2002), que obteve um ganho de produção de 85% em relação às plantas inoculadas com as estirpes severas desses vírus. Nesse caso as plantas duplamente premunizadas produziram uma pequena quantidade de frutos não comerciais (3,8%), já as plantas que foram inoculadas com estirpes severas do ZYMV e do PRSV-W apresentaram uma produção de 26,8% de frutos não comerciais. Nos dois casos, onde os experimentos foram realizados em campo aberto com a variedade Caserta não foi observada intensificação dos sintomas foliares nas plantas, e a qualidade dos frutos produzidos não foi prejudicada. A produção de frutos não comerciais atingiu um máximo de 13,5% da produção total de frutos.

No presente trabalho, no entanto, que foi desenvolvido em condição de ambiente protegido (estufa), os resultados obtidos não foram totalmente semelhantes aos obtidos por Rezende; Pacheco (1998) e Rabelo (2002), especialmente no aspecto da qualidade dos frutos colhidos de algumas plantas premunizadas. Embora não tenham sido observadas alterações acentuadas no peso e na textura da casca dos frutos colhidos dessas plantas, a qualidade deles foi bastante afetada, devido ao aparecimento de sintomas caracterizados principalmente pelo escurecimento da casca dos frutos, colocando-os na qualidade de frutos não comerciais.

As alterações de sintomas foliares e na casca dos frutos colhidos das plantas das quatro variedades infectadas com a estirpe fraca PRSV-W-1 não parecem estar associadas com mutação da estirpe, visto que 100% das plantas inoculadas com ela apresentaram intensificações nos sintomas, que ocorreram de maneira sincronizada. O mesmo foi verificado nas plantas infectadas com a mistura das estirpes fracas (PRSV-W-1 + ZYMV-M), onde o efeito da primeira parece ter sido predominante. Dois fatos apóiam a hipótese de que a intensificação dos sintomas não parece estar associada com mutação na estirpe fraca PRSV-W-1, mas sim a uma provável interação ambiental (luminosidade, temperatura ou outra). Primeiro, foi realizado um teste de recuperação

dessa estirpe, a partir de algumas plantas infectadas das quatro variedades, que apresentaram sintomas severos. Extratos foliares de 12 plantas foram mecanicamente inoculados em plantas de abobrinha de moita 'Caserta', que foram mantidas em quatro condições ambientais diferentes, em ambiente protegido. Extrato da planta fonte de inóculo da estirpe fraca PRSV-W-1 que foi utilizada na inoculação das mudas também foi inoculada em 'Caserta'. Após vinte dias de observações constatou-se que apenas uma planta exibiu sintomas severos de mosaico (Tabela 9). A confirmação da infecção das demais plantas com sintomas fracos foi feita por PTA-ELISA. Segundo, plantas das variedades Novita Plus, AF-2847 e Yasmin, infectadas com a estirpe fraca PRSV-W-1 e plantadas em campo aberto na mesma Estação Experimental da Sakata, vinte dias após o início dos testes do presente trabalho, não exibiram intensificação dos sintomas foliares e não produziram frutos com sintomas de escurecimento na casca.

Tabela 9 - Notas médias de sintomas apresentados por plantas de abobrinha de moita Caserta inoculadas no teste de recuperação da estirpe fraca PRSV-W-1 e mantidas em quatro condições diferentes

Isolado	Nota de sintoma			
	Câmara de crescimento (17 a 20°C)	Casa de vegetação (22 a 28°C)	Estufa Plástica (22 a 36°C)	Estufa Plástica/ ESALQ (21 a 46°C)
PRSV-W-1	1.0	2.0	1.5	1,0
2844-4	1.0	4.5	2.5	1,0
2844-9	3.0	5.0	2.5	1,2
2844-16	1.0	4.5	2.5	1,0
2847-1	1.0	4.0	1.5	1,0
2847-9	1.0	4.0	2.0	1,0
2847-13	1.0	3.0	1.5	1,0
3259-11	1.0	3.5	1.5	1,0
3259-16	1.5	3.0	1.5	1,0
3259-22	1.0	3.5	1.5	1,0
2821-5	1.0	4.0	1.5	1,0
2821-9	1.0	4.0	1.5	1,0
2821-15	1.5	4.0	1.5	1,0

Com base nos resultados observados nesse experimento tornou-se necessário realizar outro experimento para tentar identificar o(s) provável(is) fator(es) ambiental(is) que poderiam estar atuando na interação planta-estirpe fraca PRSV-W-1 e ocasionando alterações nos sintomas foliares e nos frutos colhidos das plantas infectadas com essa estirpe fraca.

2.3.3 Efeito do local de cultivo sobre sintomas causados pela estirpe PRSV-W-1

Os resultados obtidos nesse experimento estão apresentados a seguir. A Figura 9 ilustra as condições nas quais o experimento foi conduzido.

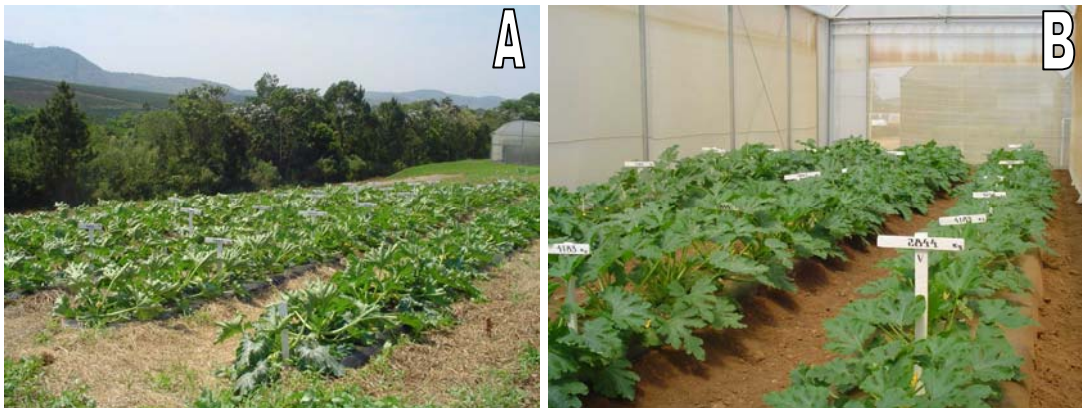


Figura 9 – Plantas de abobrinha de moita em campo (A); e em estufa (B)

Os dados de produção e qualidade dos frutos produzidos pelas plantas das variedades Samira, Novita Plus, AF 2847 e Yasmin cultivadas paralelamente em campo e em estufa plástica estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12, respectivamente. Nas figuras 10, 11, 12 e 13 estão ilustradas a qualidade dos frutos colhidos das plantas dessas quatro variedades.

É importante destacar que as plantas saudáveis, principalmente aquelas que permaneceram em campo aberto, ficaram expostas à infecção natural pela própria estirpe fraca PRSV-W-1, por estirpes severas do PRSV-W e por outros vírus, devido à presença de afídeos na área experimental. Não foi realizada a análise das viroses que infectaram as plantas ao final do experimento em campo. Mas as colheitas foram encerradas, simultaneamente no campo e na estufa, assim que as plantas saudáveis em campo começaram a apresentar sintomas evidentes de infecção viral, para não ocorrer

interferências nos resultados. Dessa maneira, o número de colheitas (10 colheitas) neste experimento foi menor que o do experimento anterior (15).

Tabela 10 – Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Samira sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas frutos	Nota média de sintomas planta
	Total	Comercial	Total	Comercial			
Sadia campo	6,3* A	6,3 A	1,45 A	1,45 A	0,22 A	1,1 A	1,1 A
PRSV-W-1 campo	6,4 A	3,7 A	1,42 A	0,70 A	0,22 A	2,0 C	2,2 B
Sadia estufa	6,4 A	6,2 A	1,76 A	1,59 A	0,27 A	1,0 A	1,0 A
PRSV-W-1 estufa	4,8 A	3,4 A	1,10 A	0,74 A	0,21 A	1,8 B	2,1 B

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Novita Plus sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas frutos	Nota média de sintomas planta
	Total	Comercial	Total	Comercial			
Sadia campo	7,3* A	6,7 AB	1,49 AB	1,43 AB	0,20 A	1,2 A	1,2 A
PRSV-W-1 campo	8,3 A	7,8 A	1,79 A	1,70 A	0,22 A	1,2 A	2,3 B
Sadia estufa	6,7 AB	6,2 AB	1,37 AB	1,24 AB	0,20 A	1,1 A	1,0 A
PRSV-W-1 estufa	4,9 B	4,7 B	1,11 B	1,05 B	0,23 A	1,4 B	2,0 B

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 12 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita AF 2847 sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas frutos	Nota média de sintomas planta
	Total	Comercial	Total	Comercial			
Sadia campo	6,7* A	6,0 A	1,50 A	1,45 A	0,23 A	1,0 A	1,0 A
PRSV-W-1 campo	6,4 A	5,8 A	1,39 A	1,29 A	0,22 A	1,2 B	2,0 B
Sadia estufa	6,4 A	6,2 A	1,56 A	1,46 A	0,24 A	1,0 A	1,0 A
PRSV-W-1 estufa	4,9 A	4,7 A	1,21 A	1,09 A	0,24 A	1,2 B	2,0 B

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Número e peso de frutos totais e comerciais por planta, peso médio de frutos, nota média de sintomas de frutos e de plantas de abobrinha de moita Yasmin sadias e infectadas com a estirpe PRSV-W-1, em campo e em estufa

Tratamento	Nº de frutos/planta		Peso de frutos (Kg)/planta		Peso médio de frutos (Kg)	Nota média de sintomas frutos	Nota média de sintomas planta
	Total	Comercial	Total	Comercial			
Sadia campo	5,5* A	5,3 A	0,90 A	0,88 A	0,16 A	1,0 A	1,1 A
PRSV-W-1 campo	5,9 A	5,7 A	1,02 A	0,96 A	0,18 A	1,2 A	2,1 B
Sadia estufa	5,7 A	4,9 A	1,03 A	0,81 A	0,18 A	1,1 A	1,0 A
PRSV-W-1 estufa	4,7 A	1,5 B	0,78 A	0,31 B	0,16 A	2,3 B	2,0 B

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que para as variedades Samira, AF 2847 e Yasmin, tanto o número total de frutos quanto o peso de frutos totais não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Somente plantas da variedade Novita Plus apresentaram menor produtividade de frutos totais para as plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 e mantidas em estufa. O peso médio de frutos também não diferiu significativamente dentro das quatro variedades de abobrinha de moita avaliadas, repetindo os resultados obtidos em estufa no experimento anterior.

Com relação à produção de frutos comerciais, plantas da variedade Novita Plus infectadas e mantidas em campo apresentaram um pequeno acréscimo na produção (16,4%) comparadas às plantas sadias, enquanto as plantas infectadas da estufa

produziram 24,2% menos frutos comerciais que as plantas sadias mantidas na mesma condição (Tabela 10). Já para a variedade Samira, as plantas infectadas tiveram uma queda de 41,2% e 45,2% na produção de frutos comerciais para as plantas do campo e da estufa, respectivamente, quando comparadas às plantas sadias sob as mesmas condições (Tabela 9). Essa queda na produtividade de frutos comerciais das plantas infectadas também ocorreu, com menor intensidade, nas plantas da variedade AF 2847. Nessa variedade as plantas infectadas do campo produziram 3,3% menos frutos comerciais e as infectadas da estufa tiveram uma queda na produção de frutos comerciais de 24,2% (Tabela 11). Para as plantas da variedade Yasmin que permaneceram na estufa, a queda na produção de frutos comerciais em relação às plantas sadias foi bem mais acentuada (69,4%), enquanto que as plantas infectadas do campo apresentaram um acréscimo de 7,5% na produção de frutos desta categoria.

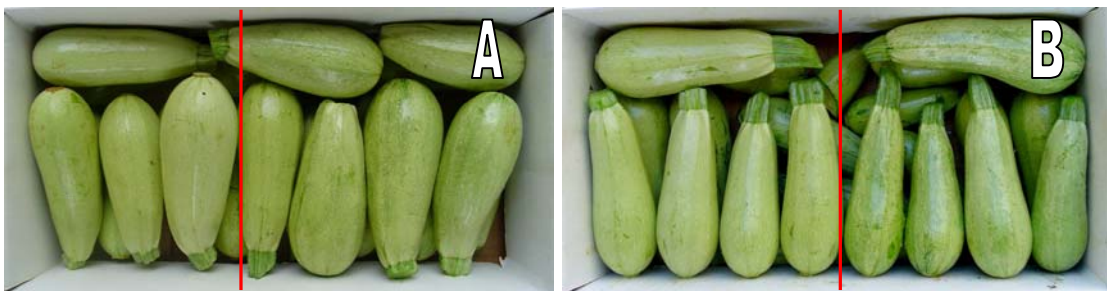


Figura 10 - Frutos da variedade Samira infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B)



Figura 11 - Frutos da variedade Novita Plus infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos sadios (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B)

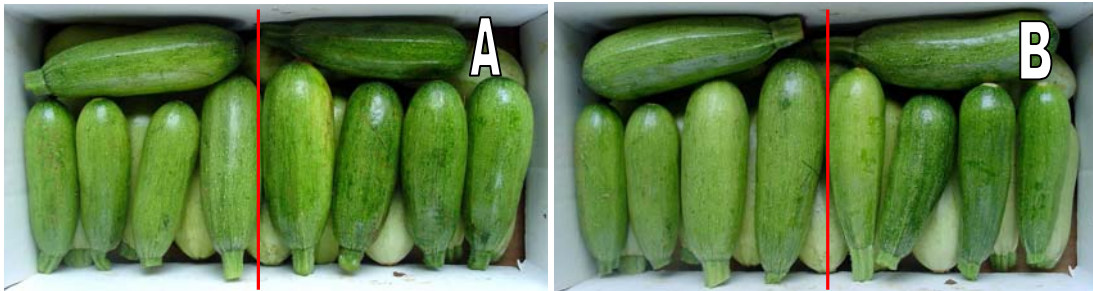


Figura 12 - Frutos da variedade AF 2847 infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos saudáveis (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B)



Figura 13 - Frutos da variedade Yasmin infectada (à direita da linha vermelha dentro das caixas) com a estirpe PRSV-W-1, comparados com frutos saudáveis (à esquerda da linha vermelha dentro das caixas). Frutos colhidos de plantas do campo (A) e da estufa (B)

Mais uma vez constatou-se intensificação dos sintomas nos frutos e nas folhas das plantas infectadas com a estirpe PRSV-W-1 conduzidas em ambas as condições, porém muito menos acentuada que aquela constatada no experimento anterior em estufa (Tabelas 9, 10, 11 e 12). Exceto para a variedade Yasmin, onde os frutos colhidos das plantas infectadas e mantidos em estufa receberam nota média de sintomas (2,3) significativamente diferente daquela dos frutos controles (Tabela 12). Mesmo assim, a intensidade dos sintomas (Figura 13) foi inferior àquela observada no experimento anterior (Figura 8). O peso médio dos frutos, dentro de cada variedade, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Tabelas 9, 10, 11 e 12). É importante salientar que mais uma vez constatou-se que as plantas saudáveis das quatro variedades, mantidas em estufa e em campo, também produziram frutos não comerciais. A percentagem desses variou de 3,1% a 14%, exceção apenas da variedade Samira cultivada em campo que só produziu frutos comerciais (Tabelas 9, 10, 11 e 12).

A produção de frutos não comerciais de abobrinha provenientes de plantas não premunizadas foi observada anteriormente por Wang et al. (1991) em Taiwan. Nesta ocasião foram realizados dois experimentos no mesmo local, em épocas diferentes. A produção de frutos não comerciais nas parcelas que não foram premunizadas, ficando sujeitas à infecção natural, foi de 18% e 69% do total de frutos em cada experimento, respectivamente. Enquanto que nas parcelas premunizadas com a estirpe fraca ZYMV-WK a produção de frutos não comerciais foi de 8,9% e 13,5%. Desta maneira, mesmo obtendo-se frutos não comerciais nas parcelas premunizadas a qualidade dos frutos destas plantas foi bem melhor do que nas plantas não premunizadas. Além disso, a produtividade de frutos comerciais foi 2,2 e 40 vezes superior nas plantas premunizadas quando comparadas às plantas controle (não premunizadas), sob moderada e alta pressão da doença, respectivamente. Em experimentos realizados em campo no Reino Unido, por Spence et al. (1996), utilizando a mesma estirpe fraca do ZYMV (ZYMV-WK), todos os frutos colhidos das plantas premunizadas foram visualmente indistinguíveis dos frutos obtidos de plantas não inoculadas. Perring et al. (1995) também observaram que a premunização com a estirpe fraca ZYMV-WK não reduziu a produção de frutos de melão 'TopMark' quando comparada às parcelas não inoculadas, na Califórnia. Além disso, as plantas premunizadas apresentaram 75% da produção total de frutos composta por frutos classificados como comerciais.

Em dois experimentos de campo, em dois locais diferentes, utilizando-se plantas de abóbora híbrida do tipo Tetsukabuto (Takayama) premunizadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 e plantas não premunizadas obteve-se uma grande produção de frutos não comerciais (pequenos, mal formados e/ou de coloração desuniforme) nas plantas não premunizadas (68,7% em Piracicaba e 24,6% em Anhembi), que foram infectadas naturalmente. Plantas que foram premunizadas somente com a estirpe fraca PRSV-W-1 apresentaram 16,2% de sua produção total composta por frutos não comerciais. E plantas que foram protegidas com as duas estirpes produziram 5,4% de frutos não comerciais, mostrando que mesmo as plantas protegidas contra as estirpes severas produzem frutos desta categoria (DIAS;REZENDE, 2000).

Os dados obtidos não permitem identificar a causa da intensificação dos sintomas em folhas e frutos dessas variedades infectadas com a estirpe PRSV-W-1. Outros estudos ainda são necessários para se identificar o(s) provável(is) fator(es) ambiental(is) que podem estar atuando na interação planta-estirpe fraca PRSV-W-1 e ocasionando alterações nos sintomas foliares e nos frutos colhidos das plantas infectadas. Esse conhecimento é importante para poder recomendar com segurança as condições em que a premunização da abobrinha de moita pode ser usada com eficiência para o controle do mosaico causado pelo PRSV-W e a conseqüente produção de frutos comerciais.

Mesmo com esses resultados, a dupla premunização ainda mostra-se como uma alternativa viável para o controle dessas duas viroses em abobrinha de moita já que a grande maioria da produção é realizada em campo aberto e não em estufa plástica. Além disso, mesmo as variedades que mostraram maior sensibilidade às estirpes premunizantes apresentam uma boa produção de frutos comerciais, o que provavelmente não ocorreria se essas plantas fossem infectadas com uma ou ambas as estirpes severas desses vírus conforme relatado nos trabalhos de Domingues et al. (2004) e Yuki et al. (1991), onde os danos na produção foram praticamente de 100%.

2.3.4 Hospedeiras para a multiplicação das estirpes fracas premunizantes

A soma dos resultados de dois experimentos independentes para a identificação da melhor hospedeira para a multiplicação e manutenção da estirpe fraca ZYMV-M, através da estimativa da concentração do vírus, por meio do teste dot-blot aos 10 e 20 dias após a inoculação, estão nas Tabelas 14 e 15. Os resultados da estimativa da concentração da estirpe severa do ZYMV, usada como controle em cada experimento, estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 14 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca ZYMV-M em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	83%	83%	50%	50%	17%	17%	0%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	100%	33%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	100%	83%	50%	50%	17%	0%	0%	0%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	100%	33%	0%	0%	0%	0%	0%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 15 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca ZYMV-M em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	67%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	100%	83%	50%	33%	0%	0%	0%	0%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	67%	50%	33%	0%	0%	0%	0%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	100%	67%	50%	17%	0%	0%	0%	0%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	83%	67%	33%	0%	0%	0%	0%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 16 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do ZYMV em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	100%	100%	83%	67%	50%	50%	17%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	83%	83%	83%	67%	50%	50%	17%	0%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	100%	100%	100%	100%	83%	33%	0%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	100%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	100%	83%	33%	33%	17%	0%	0%

*percentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 17 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do ZYMV em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	100%	100%	83%	50%	17%	0%	0%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	83%	83%	83%	67%	33%	0%	0%	0%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	100%	50%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	100%	83%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	100%	50%	0%	0%	0%	0%	0%

* percentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Aos 10 dias após a inoculação, constatou-se que a estirpe fraca ZYMV-M parece atingir maior concentração em *C. pepo* 'Caserta', uma vez que foi possível a sua detecção na diluição de até 1:1000 em 17% das plantas testadas. Em seguida aparece *C. melo* 'Casca-de-Carvalho' onde a estirpe ZYMV-M foi detectada até a diluição de 1:300 (17%), após o mesmo tempo de inoculação. *C. sativus* 'Safira' mostrou-se a menos favorável para a multiplicação dessa estirpe no período de 10 dias após a

inoculação (Tabela 14). No entanto, 10 dias mais tarde, a concentração dessa estirpe em *C. pepo* 'Caserta' parece ter reduzido drasticamente, pois sua detecção por dot-blot só foi possível até a diluição de 1:100. O mesmo foi constatado em *C. melo* 'Casca-de-Carvalho', porém em menor proporção. Nas demais espécies, de uma maneira geral, parece ter ocorrido um ligeiro aumento na concentração da estirpe ZYMV-M, com destaque para *C. sativus* 'Safira', onde a detecção foi possível na diluição de 1:200 (Tabela 15), sugerindo que em algumas espécies/variedades essa estirpe fraca demora um pouco mais para atingir concentrações mais elevadas.

A estirpe severa do ZYMV, usada como controle, multiplicou-se melhor na maioria das espécies e parece ter atingido maiores concentrações aos 10 dias após a inoculação, pois sua detecção foi possível em diluições entre 1:600 e 1:1500. Exceção para *C. melo* 'Casca-de-Carvalho' que mostrou-se menos favorável para essa estirpe, que foi detectada até a diluição de 1:50 em apenas 17% das plantas analisadas (Tabela 16). Com o passar do tempo a concentração da estirpe severa mostrou a mesma tendência observada para a estirpe fraca ZYMV-M (Tabela 17).

Os resultados relativos à estimativa da estirpe fraca PRSV-W-1 em diferentes cucurbitáceas estão apresentados nas Tabelas 18 e 19. As Tabelas 20 e 21 apresentam os resultados da estimativa da concentração da estirpe severa do PRSV-W usada como controle. Esses resultados representam a soma de dois experimentos independentes.

Tabela 18 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca PRSV-W-1 em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	100%	100%	67%	33%	17%	17%	17%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	100%	50%	50%	50%	50%	50%	0%	0%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	83%	33%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	67%	17%	17%	17%	17%	17%	17%	17%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	50%	50%	33%	33%	0%	0%	0%	0%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 19 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe fraca PRSV-W-1 em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	83%	67%	50%	50%	50%	50%	50%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	100%	67%	50%	50%	50%	50%	50%	33%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	83%	50%	50%	50%	33%	33%	17%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	67%	50%	33%	17%	17%	17%	0%	0%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	67%	50%	17%	0%	0%	0%	0%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 20 - Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do PRSV-W em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 10 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	67%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	33%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	67%	67%	50%	50%	50%	33%	17%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	17%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	50%	50%	50%	50%	50%	50%	17%	0%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

Tabela 21- Análise de dot-blot para a detecção da estirpe severa do PRSV-W em extratos de diferentes cucurbitáceas, em diversas diluições, 20 dias após a inoculação

Plantas teste	Diluições das amostras							
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:600	1:1000	1:1500
<i>C. pepo</i> Caserta	100% *	100%	100%	100%	100%	100%	83%	50%
<i>C. lanatus</i> Crimson Sweet	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	67%
<i>C. sativus</i> Safira	100%	100%	100%	100%	83%	67%	17%	17%
<i>C. melo</i> Casca-de-carvalho	100%	100%	83%	83%	67%	67%	67%	33%
<i>C. moschata</i> Menina Brasileira	100%	100%	100%	100%	100%	67%	50%	33%

* porcentagem de plantas com resultado positivo no teste de dot-blot.

A estirpe fraca PRSV-W-1 parece atingir as maiores concentrações em *C. pepo* 'Caserta' e *C. melo* 'Casca-de-Carvalho' aos 10 dias após a inoculação, pois foi possível a sua detecção na diluição de 1:1500 em 17% das plantas destas duas espécies. Em seguida aparece *C. lanatus* 'Crimson Sweet' onde a estirpe PRSV-W-1 foi detectada até a diluição de 1:600 (50%) após o mesmo tempo de inoculação. Neste período de 10 dias após a inoculação, *C. sativus* 'Safira' mostrou-se a espécie menos favorável à multiplicação desta estirpe, visto que só foi detectada até a diluição de 1:100 em 33% das plantas (Tabela 18). Aos 20 dias após a inoculação notou-se que em três espécies aumentou o número de plantas onde foi possível detectar a estirpe PRSV-W-1, sugerindo um aumento na concentração viral. Enquanto que em duas espécies o número de plantas onde essa estirpe foi detectada diminuiu. A estirpe fraca foi detectada na diluição de 1:1500 em *C. pepo* 'Caserta', *C. lanatus* 'Crimson Sweet' e *C. sativus* 'Safira', em 50%, 33% e 17% das plantas, respectivamente, enquanto que em *C. melo* 'Casca-de-Carvalho' e *C. moschata* 'Menina Brasileira' foi detectada apenas nas diluições de 1:600 (17%) e 1:200 (17%), respectivamente.

A estirpe severa do PRSV-W atingiu maiores concentrações do que a estirpe fraca em todas as espécies de cucurbitáceas estudadas e parece atingir as maiores concentrações aos 20 dias após a inoculação (Tabelas 20 e 21), pois foi detectada em um maior número de plantas nas maiores diluições.

De maneira geral, a estirpe ZYMV-M atingiu as maiores concentrações na maioria das espécies aos 10 dias após a inoculação, com posterior diminuição da concentração (Tabelas 14 e 15). Já a estirpe PRSV-W-1 não apresentou esta tendência de diminuição durante o período de avaliação (Tabelas 18 e 19)

Estes resultados podem auxiliar em um programa de premunização, pois as estirpes fracas poderão ser mantidas e multiplicadas nas espécies que apresentaram as maiores concentrações virais. Além disso, foi possível identificar a melhor época para a coleta do inóculo, quando tem-se a maior concentração viral nas folhas das plantas com elas inoculadas.

2.3.5 Transmissão por afídeos

Os resultados obtidos em três experimentos independentes, quando avaliou-se a eficiência de duas espécies de afídeos na transmissão de duas estirpes do ZYMV (fraca e severa), estão apresentados na Tabela 22. A estirpe fraca ZYMV-M foi transmitida com uma baixa eficiência por *M. nicotianae*. Das 17 plantas de abobrinha de moita inoculadas, apenas duas (11,8%) foram infectadas pelo ZYMV-M. A detecção foi feita por RT-PCR, conforme ilustrado na Figura 14. A eficiência de transmissão da estirpe severa do ZYMV por esse afídeo foi de 47,1%, ou seja, oito das 17 plantas testadas. Nesse caso a detecção do vírus foi realizada através da expressão de sintomas. Já a espécie *M. persicae* não foi capaz de transmitir a estirpe fraca do ZYMV nas 20 plantas testadas, enquanto que transmitiu a estirpe severa para 16 plantas (80%), entre as 20 usadas nos ensaios.

Tabela 22 – Eficiência de duas espécies de afídeos na transmissão de uma estirpe fraca e uma estirpe severa do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

Espécies de afídeos	Estirpes do vírus	Plantas infectadas (%)
<i>Myzus nicotianae</i>	ZYMV-M	11,8%
	ZYMV severo	47,1%
<i>Myzus persicae</i>	ZYMV-M	0%
	ZYMV severo	80,0%

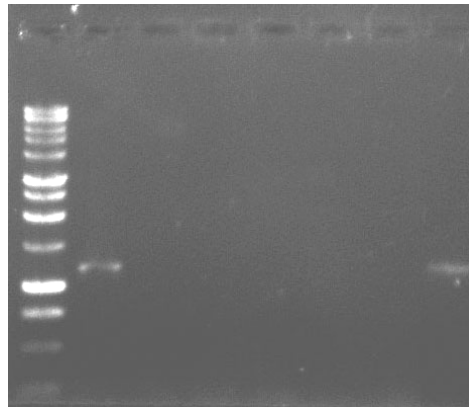


Figura 14 - Teste de RT-PCR para a detecção da estirpe ZYMV-M. M – marcador molecular; 1-6 plantas inoculadas com a estirpe ZYMV-M por meio do afídeo *Myzus nicotianae*; 7 – controle positivo (ZYMV)

Giampan e Rezende (2001) estudando a transmissão de duas estirpes fracas do PRSV-W (PRSV-W-1 e PRSV-W-2) por afídeos, observaram que tanto estas como duas estirpes severas do vírus (PRSV-W-C e PRSV-W-P) foram transmitidas pelas quatro espécies de afídeos estudadas. *Myzus persicae* foi a mais eficiente, seguida por *Aphis gossypii*, *Toxoptera citricidus* e *Lipaphis erysimi*.

Por outro lado, uma estirpe fraca do ZYMV (ZYMV-WK) selecionada na França, apresentou baixa transmissibilidade por afídeos (LECOQ; LEMAIRE; WIPF-SCHEIBEL, 1991). Estudos posteriores (HUET et al., 1994), comparando a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região proteína HC-Pro desta estirpe fraca com estirpes severas do mesmo vírus e outros potyvírus, mostraram três mudanças de aminoácidos. Uma dessas mutações (Treonina para Alanina) em uma região conservada da proteína (PTK) foi responsável por diminuir a transmissibilidade dessa estirpe fraca por afídeos. Isto é reforçado pelo fato da estirpe ZYMV-WK ser transmitida por afídeos quando ocorre coinfeção com outros potyvírus (LECOQ; LEMAIRE; WIPF-SCHEIBEL, 1991).

A transmissão da estirpe fraca do ZYMV por afídeos pode ser vantajosa, pois pode permitir que mudas não infectadas na inoculação massal o sejam através da transmissão pelos vetores. Esse fato foi observado por Dias e Rezende (2000), em plantas de abóbora híbrida Tetsukabuto premunizadas com uma estirpe fraca do PRSV-W (PRSV-W-1), em condições de campo. Apesar da inoculação massal ter atingido apenas 75% das mudas, a maioria das plantas que permaneceram sadias foram

naturalmente infectadas com a estirpe fraca, através da ação de vetores durante o ciclo da cultura.

Por outro lado, alguns autores (KOSAKA et al., 2006; FULTON, 1986) apontam alguns possíveis riscos da transmissão de estirpes fracas por afídeos, entre eles a transmissão para outra espécie vegetal, originando doenças de importância econômica. Para avaliar o risco da estirpe fraca PRSV-W-1 causar doença em outras plantas Giampan e Rezende (2001) inocularam 51 espécies de plantas cultivadas e daninhas com essa estirpe fraca. Com exceção de *C. pepo*, nenhuma das espécies inoculadas foi infectada com a estirpe PRSV-W-1. No presente trabalho demonstramos também que outras espécies de cucurbitáceas foram infectadas por essa estirpe. Mesmo assim, a probabilidade da estirpe fraca em questão infectar outra espécie vegetal, além de espécies da família Cucurbitaceae parece reduzida.

A possibilidade de ocorrência de algum problema deve ser analisada por aqueles que estão estudando a premunização. Por outro lado a premunização apresenta diversas vantagens, podendo ser incluída em qualquer programa de manejo integrado de doenças. Não apresenta riscos aos agricultores, consumidores e ao meio ambiente, não interfere com outras práticas culturais, é de simples aplicação e relativamente baixo custo. Pode ser aplicada em cultivares resistentes à outras doenças (MÜLLER; REZENDE, 2004; REZENDE; DIAS; NOVAES, 2000).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas das quatro variedades testadas, quando premunizadas com a estirpe fraca do ZYMV-M, não exibiram sintomas acentuados de mosaico foliar e não apresentaram alterações na produção quantitativa e qualitativa de frutos, quando comparadas com as plantas controles, tanto no campo quanto nas estufas plásticas.

As plantas dessas mesmas variedades, quando premunizadas com a estirpe fraca PRSV-W-1, só ou em mistura com a estirpe ZYMV-M, exibiram sintomas acentuados de mosaico foliar, acompanhado por produção de frutos não comerciais, tanto em campo quanto em estufa.

As alterações nos sintomas foliares e dos frutos das plantas premunizadas com a estirpe PRSV-W-1 parecem estar relacionadas com variáveis ambientais.

A estirpe fraca ZYMV-M parece atingir as maiores concentrações em *C. pepo* cv. Caserta e em *C. melo* cv. Casca-de-Carvalho. Para a estirpe PRSV-W-1, as melhores hospedeiras foram *C. pepo* cv. Caserta, seguida de *C. lanatus* cv. Crimson Sweet e *C. sativus* cv. Safira.

A transmissão da estirpe fraca ZYMV-M é menos eficiente que a estirpe severa pelas espécies de pulgões avaliadas (*M. nicotianae* e *M. persicae*). Estudos complementares, utilizando outras espécies de afídeos, devem ser realizados para melhor entender a eficiência de transmissão dessa estirpe por afídeos.

REFERÊNCIAS

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

BIO-OZ. Disponível em: <<http://www.bio-oz.co.il/products/boc/>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

CANER, J.; GALLET, S.R.; LOTZ, I.P.M.; OLIVEIRA, J.M. Natural infection of cucumber (*Cucumis sativus*) by zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in Santa Catarina, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 6, 1992, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1992. p.180.

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

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.

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

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.

DOMINGUES, F.; SUSSEL, A.A.B.; KUHN, O.J.; SILVA, R.F.; PEREIRA, M.J.Z.; REZENDE, J.A.M. Avaliação de danos causados pelo *Papaya ringspot virus* type W (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em abobrinha de moita. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.30, n.1, p.98, 2004. Resumo.

FLETCHER, J.D.; WALLACE, A.R.; ROGERS, B.T. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV-2 virus infections. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v.28, n.1, p.17-26, 2000.

FROISSART, R; MICHALAKIS, Y; BLANC, S. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.92, n.6, p.576-579, 2002.

FULTON, R.W. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 67-81, 1986.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

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

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.

GREBER, R.S.; PERLEY, D.M.; HERRINGTON, M.E. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.39, n.6, p.1085-1094, 1988.

HUET, H.; GAL-ON, A.; MEIR, E.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Mutations in the helper component protease gene of Zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. **Journal of General Virology**, London v.75, p.1407-1414, 1994.

KITAJIMA, E.W.; SÁ, P.B.; RITZINGER, C.H.S.P.; RODRIGUES, M.G.R. Detecção de partículas do tipo rhabdovirus em algumas compostas, abóboreira e mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, n.1, p.141-144, 1991.

KOCH, P.S. **Análise genética de um cruzamento dialélico em abobrinha (*Cucurbita pepo* L.)**. 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

KOSAKA, Y.; RYANG, B.; KOBORI, T.; SHIOMI, H.; YASUHARA, H.; KATAOKA, M. Effectiveness of an attenuated *Zucchini yellow mosaic virus* isolate for cross-protecting cucumber. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 67-72, 2006.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

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

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.

LIMA, J.A.A.; VIEIRA, A.C. Distribuição do vírus do mosaico da abóbora em municípios cearenses e gama de hospedeiro de um isolado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.112-114, 1992.

LIMA, J.A.A.; FERNANDES, E.R.; MENDES, M.L. Identificação sorológica de “watermelon mosaic virus 1” em cucurbitáceas cultivadas e nativas do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, n.3, p.414, 1980. Resumo.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W; MUNHOZ, J.O. Isolamento e propriedades do vírus da necrose da abóbora, um possível membro do grupo “Tobacco Necrosis Virus”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.3, p.622, 1983.

LISA, V.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. CMI/AAB. **Descriptions of Plant Viruses**, Kew, n.282, 1984.

LOPES, J.F. Palestra de Abertura. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CUCURBITÁCEAS, 1990, Campo Grande. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.9, n.2, 1991.p.98-99.

LOVISSOLO, O. Virus and viroid diseases of cucurbits. **Acta Horticulturae**, Bari, n.88, p.33-71, 1980.

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

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.

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

MÜLLER, G.W.; REZENDE, J.A.M. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004, chap. 9, p. 361-396.

MÜLLER, G.W.; REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Premunização no controle de fitoviroses: situação atual, problemas e perspectivas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, p.9, 1991. Resumo.

NAGATA, T.; ALVES, D.M.T.; INOUE-NAGATA, A.K.; TIAN, T.-Y.; KITAJIMA, E.K.; CARDOSO, J.E.; ÁVILA, A.C. de. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, New York, v.150, n.2, p.379-387, 2005.

PAVAN, M.A.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, J.J. Distribuição do vírus do mosaico da melancia (*Papaya ringspot virus – W*), nas principais regiões produtoras de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, n.1, p.84-85, 1989.

PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; MAYBERRY, K.; BLUA, M.J. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. **California Agriculture**, Oakland, v.46, p.35-40, 1992.

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**, Guildford, v. 14, n.7, p.601-606, 1995.

PIRONE, T.P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, London, v.2, p.81-87, 1991.

PURCIFULL, D.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. Papaya ringspot virus. CMI/AAB. **Description of Plant Viruses**, Kew, n. 292, 1984.

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. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

RABELO, L.C.; REZENDE, J.A.M. Seleção de uma estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* com potencial para uso na premunização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.340-345, 2004.

REZENDE, J.A.M. **Premunização de duas espécies e um híbrido de *Cucurbita* para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia**. 1996. 88 p. Dissertação (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

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, n.2 p.171-175, 1998

REZENDE, J.A.M.; DIAS, P.R.P.; NOVAES, Q.S. Premunização: perspectivas e aplicações no controle de fitoviroses. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Manejo integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: Dept. de Fitopatologia, 2000. p. 209-243.

REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; COSTA, A.S. Bolhas podem fornecer isolados fracos também do potyvirus do mosaico da abobrinha de moita (VMM-Me). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.18, p.11, 1992. Resumo

REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.F.; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.55-61, 1994.

SCHRIJNWERKERS, C.C.F.M.; HUIJBERTS, N.; BOS, L. *Zucchini yellow mosaic virus*: two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.97, n.3, p.187-191, 1991.

SPENCE, N.J.; MEAD, A.; MILLER, A.; SHAW, E.D.; WALKEY, D.G.A. The effect on yield in courgette and marrow of the mild strain of Zucchini yellow mosaic virus used for cross-protection. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.129, n.3, p.247-259, 1996.

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, n.2, p.295, 2000. Resumo.

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

THOMSON, K.G.; DIETZGEN, R.G.; GIBBS, A.J.; TANG, Y.C. LIESACK, W.; TEAKLE, D.S.; STACKEBRANDT, E. Identification of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* by RT-PCR and analysis of sequence variability. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.55, n.1 p.83-96, 1995.

VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; NAGAI, H. Constatação do vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita ("*Zucchini yellow mosaic vírus*") no Brasil através de MEIAD e ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.188, 1992. Resumo.

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**, Oxford, v.41, p.762-771, 1992.

WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by mild strain of Zucchini yellow mosaic virus in cucumber, melon and squash. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, n.2, p.203-207, 1991.

YARDEN, G.; HEMO, R.; LIBEN, H.; MAOS, E.; LEV, E.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Cross-protection of Cucurbitaceae from *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. **Acta Horticulturae**, Brugge, n.510, p.349-356, 2000.

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

YUKI, V.A.; COSTA, A.S.; NAGAI, V. Avaliação de perdas induzidas pelo mosaico da abobrinha de moita, causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (VMM-Me). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.17, n.1, p.40, 1991. Resumo.

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, n.5, p.516-520, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)