

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA

NARA HELENA TAVARES DA PONTE

OCCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE
CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ

BELEM
2015

NARA HELENA TAVARES DA PONTE

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE
CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA



NARA HELENA TAVARES DA PONTE

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE
CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ**

Defesa apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária: área de concentração em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Alessandra de Jesus Boari
Co-orientadora: Dra. Kenny Bonfim

BELÉM
2015

Ponte, Nara Helena Tavares da

Ocorrência e caracterização molecular de vírus de cucurbitáceas no Estado do Pará. / Nara Helena Tavares da Ponte.
- Belém, 2015.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada a agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Alessandra de Jesus Boari

1. Cucurbitáceas – ocorrência – Pará 2. Cucurbitáceas - viroses
3. RT-PCR 4. ELISA 5. Filogenia I. Boari, Alessandra de Jesus
(Orient.) II. Título

CDD 583.632.3

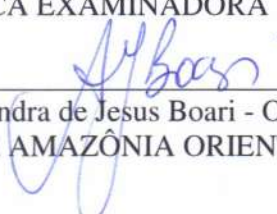
NARA HELENA TAVARES DA PONTE

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE
CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ

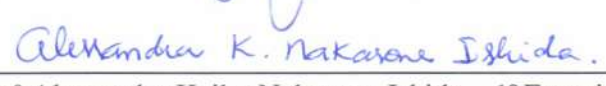
Aprovada em 30 de abril de 2015.

Defesa apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária: área de concentração em caracterização, conservação e uso de recursos genéticos, para obtenção do título de Mestre.

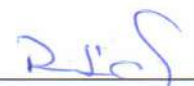
BANCA EXAMINADORA



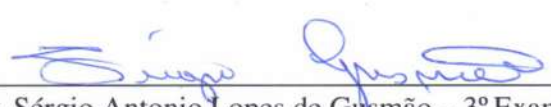
Prof.^a Dr.^a Alessandra de Jesus Boari - Orientadora
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL



Prof.^a Dr.^a Alessandra Keiko Nakasone Ishida – 1º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL



Dr.^a Ruth Linda Benchimol – 2º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL



Prof. Dr. Sérgio Antonio Lopes de Gusmão – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

DEDICATÓRIA

**A Deus;
A meus pais, Benedito e Luiza;
Meu filho, Francisco Rafael;
por todo amor e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus sem o qual nada disso seria possível;

Á minha orientadora Doutora Alessandra de Jesus Boari por todo empenho e conhecimento repassado;

Á minha co-orientadora Doutora Kenny Bonfim pelo o suporte intelectual e científico para execução das minhas análises;

Á FAPESPA pela concessão de bolsa de estudos durante o curso de mestrado;

Á EMATER pela ajuda nas coletas das amostras nos municípios visitados;

Aos funcionários do laboratório de fitopatologia da EMBRAPA, IDA, MANOEL, ALINE, Sr. Nivaldo, que sempre estiveram à disposição quando necessário.

Aos meus pais, Benedito e Luiza, que me deram todo o suporte para eu conseguir chegar até o final desse trabalho;

Ao meu marido Rodrigo que soube me entender nos momentos em que estive ausente para me dedicar única e exclusivamente ao meu trabalho;

Ao filho amado Francisco Rafael por entender a minha ausência e me amar sem reclamar;

Aos meus amigos e parentes que sempre acreditaram no meu potencial.

“Bem - aventurado o homem que tem seu prazer na lei do Senhor, e na sua lei medita de dia e noite. Pois será como a árvore plantada junto às correntes de águas, a qual dá o seu fruto na estação própria, e cuja folha não cai; e tudo quanto fizer prosperará”

Salmo 1: 2-3

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Abóbora (<i>Cucurbita</i> sp.)	16
2.2. Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>).....	17
2.3. Maxixe (<i>Cucumis anguria</i> L.).....	17
2.4. Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	18
2.5. Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)	18
2.6. Os vírus mais importantes das cucurbitáceas.....	19
2.6.1. <i>Papaya ringspot virus</i> – type watermelon - PRSV-w	19
2.6.2. <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> - ZYMV	19
2.6.3. <i>Watermelon mosaic virus</i> - WMV.....	20
2.6.4. <i>Cucumber mosaic virus</i> - CMV	21
2.6.5. <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> - ZLCV	21
2.6.6. <i>Squash mosaic virus</i> - SqMV	22
2.6.7. <i>Melon yellowing-associated virus</i> - MYaV	22
2.7. Técnicas de diagnose	23
2.7.1. Método sorológico.....	23
2.7.2. Método molecular	24
2.8. Medidas de controle.....	24
3. OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ.....	25
3.1. Introdução.....	25
3.2. Material e métodos	25
3.2.1. Coleta e preservação das amostras	25
3.2.2. Teste PTA-ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	26

3.2.3. RT-PCR e sequenciamento	27
3.3. Resultados e discussão.....	28
3.3.1. Teste PTA-ELISA	28
3.3.2. RT-PCR e sequenciamento	32
3.4. Considerações finais	42
3.5. Conclusões.....	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de cucurbitáceas comerciais resistentes ou tolerantes a alguns vírus.....	24
Tabela 2. Amostras de cucurbitáceas provenientes de regiões produtoras do Estado do Pará, submetidas ao teste PTA-ELISA, para os seguintes vírus: CMV, ZYMV, PRSV-W, WMV, ZLCV.....	29
Tabela 3. Lista de isolados de PRSV-w, ZYMV e WMV obtidas no <i>GenBank</i> (NCBI) utilizadas na análise filogenética.....	34
Tabela 4. Lista de isolados utilizados na análise filogenética dos vírus PRSV-w, ZYMV e WMV encontrados em lavouras de cucurbitáceas no estado do Pará.....	35
Tabela 5. Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados de PRSV-w.....	41
Tabela 6. Tabela Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados de ZYMV.....	41
Tabela 7. Tabela Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados de WMV.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas de mosaico e deformação foliar em folhas em abóbora cv. Caserta inoculadas com extrato de abóboras infectadas dos municípios de Tomé-açu (A) positiva para PRSV-w e de Baião (B) positiva para ZYMV... 31
- Figura 2.** Sintomas de (C) deformação foliar e bolhosidade (D) mosaico em folhas de abóbora no município de Ananindeua com infecção de SqMV..... 32
- Figura 3.** Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para os *primers* MJ1 e MJ2, para identificação do gênero *potyvirus*.....33
- Figura 4.** Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para os *primer* PV1 e WCIEN, para identificação de ZYMV.....33
- Figura 5.** Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para o par de *primer* MJ1 e MJ2. Amostras positivas para os vírus PRSV-w e WMV34
- Figura 6.** Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.....36
- Figura 7.** Árvore filogenética utilizando neighbour-joining construída baseada no alinhamento das sequências aminoácidos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.....37

Figura 8. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento de nucleotídeos da parte do gene de proteína capsidial dos isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.....38

Figura 9. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos do gene da proteína capsidial dos isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.....39

Figura 10. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da proteína dos isolado de WMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.....40

Figura 11. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos de parte do gene da proteína dos isolado de WMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.040

RESUMO

A família das cucurbitáceas tem distribuição predominantemente tropical e compreende cerca de 118 gêneros e 825 espécies, com destaque para as abóboras (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita argyrosperma*), chuchus (*Sechium edule*), melancias (*Citrulus lanatus*), melões (*Cucumis melo* L.), pepinos (*Cucumis sativus*), bucha-vegetal (*Luffa cylindrica*) e porongo (*Lagenaria siceraria*). Os vírus mais importantes que ocorrem infectando cucurbitáceas no Brasil são: *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Melon yellowing-associated virus* (MYaV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Squash mosaic virus* (SqMV). No estado do Pará, até o momento, tendo apenas relatos de ocorrência dos vírus ZYMV e PRSV-w na cultura da melancia. Deste modo, este trabalho propôs registrar a ocorrência e a caracterização molecular das espécies virais prevalentes em alguns municípios produtores de cucurbitáceas no estado do Pará. Amostras de folhas de cucurbitáceas com suspeitas de viroses foram coletadas em 14 municípios do estado do Pará. A detecção das espécies virais foi feita pelo teste sorológico PTA-ELISA. A caracterização molecular foi feita por meio da análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no *GenBank* utilizando os programas BLAST, ClustalW e MEGA 5.0. De 101 amostras cucurbitáceas coletadas, 68 estavam infectadas. O PRSV-w foi detectado infectando 10 amostras de abóbora, 10 de melancia, 6 de pepino e 4 de maxixe. O ZYMV foi detectado em 8 amostras de abóboras, 5 de melancia, 5 de pepino e 5 de maxixe. O SqMV foi encontrado em 10 amostras abóboras e 5 melancias. Já o CMV foi diagnosticado apenas 6 amostras de abóboras. O WMV foi encontrado em 1 amostra na cultura do maxixe. A identidade entre os isolados de o PRSV-W apresentou identidade variando entre 88 a 99% entre os aminoácidos variou entre 92 e 100%. O ZYMV apresentou a identidade de 93 a 94% entre os nucleotídeos, e de 97 a 99% entre os aminoácidos. Já o WMV apresentou identidade de 84 a 90% entre os nucleotídeos, e de 94 a 95% entre aminoácidos comparados. Estes foram os primeiros relatos de SqMV, CMV e WMV infectando cucurbitáceas no estado do Pará.

Palavras-Chaves: Viroses, RT-PCR, ELISA, Filogenia.

ABSTRACT

The family of Cucurbitaceae has, prevailing, tropical distribution and comprises about 118 genres and 825 species, especially pumpkins (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita ficifolia* and *Cucurbita argyrosperma*), cucumbers (*Sechium edule*), watermelons (*Citrulus lanatus*), melon (*Cucumis melo* L.), cucumbers (*Cucumis sativus*), vegetable sponge (*Luffa cylindrica*) and bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). The most important viruses infecting cucurbits occurring in Brazil are: *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Melonyellowing-associated virus* (MYaV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) and *Squash mosaic virus* (SqMV). In State of Pará, so far, there were only occurrence reports of the virus ZYMV and PRSV-w in the watermelon culture. Thus, this paper proposes to record the occurrence and molecular characterization of predominant viral species in some municipalities that produce cucurbits in the state of Pará. Samples of cucurbitaceae leaves under viruses suspicion were collected in 14 municipalities of the state of Pará. The detection of viral species was taken by serological test PTA-ELISA. The molecular characterization was done by analyzing the nucleotide sequences from the isolated ones. The nucleotide sequences were compared with the entries in *GenBank* using the softwares BLAST, ClustalW and MEGA 5.0. Among 101 cucurbits samples collected, 68 were infected. The PRSV-W was detected infecting 10 samples of pumpkin, 10 of watermelon, 6 of cucumber, and 4 of gherkin. The ZYMV was detected in 8 samples of pumpkin, 5 of watermelon, 5 of cucumber, and 5 of gherkin. The SqMV was found in 10 pumpkin samples and in 5 of watermelon. Meanwhile the CMV was diagnosed with only 6 samples of pumpkin. The WMV was found in one sample in a gherkin culture. The identity among the isolated of PRSV-W showed variety ranged between 88 and 99%, among the amino acids varied from 92 to 100%. The ZYMV showed 93-94% identity among nucleotides 97-99%, and among amino acids varied between 97-99%. WMV showed identity ranged 84 to 90% among the nucleotides, 94 to 95% among the amino acids compared. The occurrence of SqMV, CMV and WMV infecting cucurbitaceae was reported for the first time in the state of Pará.

Key Words: Viruses, RT-PCR, ELISA, Phylogeny

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As cucurbitáceas estão entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil, são utilizadas principalmente para fins alimentares, aromáticos, medicinais, ornamentais ou como fonte de matérias-primas para diversos produtos. Para a dieta humana, as plantas desta família são importante fonte de minerais e vitaminas, especialmente vitaminas A e C, encontrados na polpa dos frutos na forma de carotenoides e ácido ascórbico (ROMANO *et al.*, 2008). Esta família tem distribuição predominantemente tropical e compreende cerca de 118 gêneros e 825 espécies, com destaque para as abóboras (*C. maxima*, *C. pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia* e *C. argyrosperma*), chuchus (*S. edule*), melancias (*C. lanatus*), melões (*C. melo*), pepinos (*C. sativus*), bucha-vegetal (*L. cylindrica*) e porongo (*L. siceraria*) (ROMANO *et al.*, 2008).

Entre essas as abóboras, melancia, pepino e melão são as de maior expressão econômica no mercado mundial, enquanto que chuchu, bucha e maxixe são cultivados regionalmente em menor escala (SANTOS, 2011). Segundo dados da FAO (2014), a produção mundial de abóboras em 2010, foi de 22,4 milhões de toneladas, cultivadas em área de 1,67 milhão de hectares, proporcionando uma produtividade média de 13,4 toneladas/hectare.

A produção de melancia alcançou 2,0 milhões toneladas, 9 mil hectares em uma área cultivada, no Brasil. Os principais estados produtores de melancia são Rio Grande do Sul, Bahia, Goiás, São Paulo, Tocantins, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Pará (MAROUELLI *et al.*, 2012). Segundo dados do IBGE (2012) o estado Pará possui uma área plantada de 80 hectares desta cucurbitácea. Destacaram-se na produção dessa cucurbitácea no estado, os municípios de Santa Maria do Pará e Curuçá com produção de 1.600 toneladas e 1.360 toneladas de frutos em 2012, respectivamente. Seguido dos municípios de Paragominas, Igarapé-açu e Castanhal no ano de 2011.

Já o pepino produzido principalmente nas regiões Sudeste e Sul, a produtividade média é de 40 a 50 toneladas de frutos por hectare, para os tipos aodai, japonês e caipira; e 20 a 40 toneladas por hectare, para o tipo indústria (APHORTESP, 2014). A produção de melão em 2012, foi de 575,4 mil toneladas, a região norte produziu 20,6 t/ha (ORTH, 2014).

Como as demais espécies cultivadas, as cucurbitáceas estão sujeitas a problemas fitossanitários, sendo estes de origem fúngica, bacteriana ou viral (SANTOS, 2011). As viroses situam-se no grupo das doenças consideradas mais importantes para as cucurbitáceas no Brasil, podendo afetar a produção e a qualidade dos frutos (LIMA e ALVES, 2011). Os graus de dispersão e de severidade dos vírus são bastante diferenciados, em função da espécie

de vírus e suas estirpes, espécie e variedade vegetal cultivada, proximidade da fonte de inóculo e população dos vetores correspondentes (MOURA *et al.*, 2001). Os vírus mais importantes que infectam cucurbitáceas no Brasil são: *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) (LIMA e ALVES, 2011). No estado do Pará, até o momento, não havia estudos sobre as viroses nessas culturas, tendo apenas relatos de ocorrência dos vírus ZYMV e PRSV (POLTRONIERI, 2000; HAYASHI *et al.*, 2013).

Assim, os objetivos deste trabalho foram realizar o levantamento da ocorrência e caracterizar molecularmente as espécies virais prevalentes nas principais regiões produtoras de cucurbitáceas no estado do Pará. Os resultados deste estudo darão subsídios para o estabelecimento de estratégias de manejo das viroses.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As espécies da família Cucurbitaceae é uma das mais importantes famílias de plantas utilizadas e comercializadas no mundo. Além do uso alimentar, as espécies da família podem ser utilizadas como medicinal, ornamental e forrageiro. Elas estão entre as plantas mais antigas usadas pelo homem. A família tem distribuição predominantemente tropical e compreende cerca de 118 gêneros e 825 espécies, com destaque para as abóboras, chuchus, melancias, melões, pepinos (ROMANO *et al.*, 2008).

2.1. ABÓBORA (*Cucurbita* sp.)

A abóbora é uma olerícola originária do continente americano, pertencente à ordem *Violales*, família *Cucurbitaceae*, gênero *Cucurbita* sendo as espécies *Cucurbita moschata*, *C. máxima* Duch (Duchesne ex Poir), *C. pepo* (Duchesne ex Lam.) e *C. argyrosperma* hort. ex L.H. (Bailey) as mais comumente cultivadas (KERNICK, 1961; WHITAKER; ROBINSON, 1986). Apresenta uma produção nacional em torno de 555.135 toneladas. Os principais produtores encontram-se na região Nordeste, sendo eles a Bahia com uma produção de 233.454 toneladas, seguido do Rio Grande do Norte com 92.385 toneladas e Pernambuco com 86.840 toneladas (IBGE, 2009). A produção mundial de abóboras no ano de 2010 foi de 22,4 milhões de toneladas, proporcionando uma produtividade média de 13,4 toneladas por hectare (FAO, 2014).

No agronegócio brasileiro a abóbora ocupa uma posição de destaque, sendo uma das hortaliças mais consumidas no País. No ano de 2010, foi comercializado um volume de

71.615 toneladas, na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (Ceagesp) (AGRIANUAL, 2012).

2.2. MELANCIA (*Citrullus lanatus*)

A melancia *Citrullus lanatus* ((Thunb.) Matsum & Nakai) é cultivada em todo o mundo, sendo classificada na divisão Magnoliophyta, da classe Magnoliopsida, da subclasse Dilleniidae, da ordem Violales. No gênero *Citrullus* estão incluídas quatro espécies: *Citrullus lanatus*, *C. colocynthis*, *C. ecirrhosuse* *C. rehmii*. A cultura da melancia era conhecida dos egípcios há cerca de 2.000 anos A.C. e por causa da diversidade de formas silvestres, atualmente, é mais aceito que o gênero *Citrullus* tenha origem na África. Foi introduzida no continente americano pelos escravos e colonizadores europeus no século dezesseis. A espécie se difundiu pelo mundo inteiro e é cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. A variabilidade genética trazida do continente africano aliado ao processo de manejo da cultura na agricultura tradicional da região, tornou o Nordeste brasileiro um centro secundário de diversificação da melancia (DIAS & REZENDE, 2010).

A área cultivada de melancia no Brasil de cerca de nove mil ha/ano, com produção em torno de 2,0 milhões de toneladas de frutos. Os principais estados produtores são Rio Grande do Sul, Bahia, Goiás, São Paulo, Tocantins, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Pará (MAROUELLI *et al.*, 2012). O estado Pará possui área plantada de 80 hectares de melancia (IBGE, 2012).

2.3. MAXIXE (*Cucumis anguria* L.)

O maxixeiro (*C. anguria* L.) é uma hortaliça do tipo fruto, de hábito rasteiro e é originária da África. Possui frutos de tamanhos diversos, com cor verde amarelada e casca com espículas de tamanho variável, os quais são muito apreciados na culinária, principalmente das regiões Norte e Nordeste do Brasil (MICHHEREFF FILHO *et al.*, 2010).

Ocorre uma variação na produtividade dessa hortaliça de acordo com a região do país e com a época de plantio, alcançando 16 toneladas por hectare na região Norte e cerca de 10 toneladas por hectare em São Paulo, nos meses de setembro a fevereiro. Por outro lado, é na região Nordeste que se concentra a maior parte das áreas produtoras dessa hortaliça, sendo plantada para fins de subsistência, em solo arenoso, e sem maiores cuidados no cultivo (MICHHEREFF FILHO *et al.*, 2010).

2.4. MELÃO (*Cucumis melo* L.)

O melão é uma planta polimórfica, cujo centro de origem é a África, entretanto, foi na Índia onde ocorreu sua dispersão, espalhando-se deste país para todas as direções. Hoje encontramos cultivares de melão em diversas regiões do mundo, desde os países mediterrâneos, centro e leste da Ásia, sul e centro da América e também o centro e sul da África. Esta amplitude de regiões de cultivo é consequência de uma grande variabilidade genética que tem permitido a adaptação de diferentes tipos de melão em condições agronômicas diversas, de tal maneira que hoje podemos encontrar em todos os mercados do mundo melão com diferentes cores, formato e aroma (DEULOFEU, 1997).

A produção de melão no Brasil, em 2012, foi de 575,4 mil toneladas, gerando aproximadamente, R\$ 475 milhões para quase 220 mil produtores. A maior parte dessa produção, cerca de 70%, foi destinada ao mercado externo. Embora exista produção de melão em todos os estados brasileiros, o cultivo para exportação se concentra na região Nordeste. Essa região produz em torno de 27,9 toneladas por hectare, seguida das regiões Sudeste e Norte, com rendimento de 23,5 e 20,6 toneladas/hectare, respectivamente (ORTH, 2014).

2.5. PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

O pepino tem seu centro de origem na Índia, tendo sido posteriormente levado para a China, Filipinas e Ilhas Formosas. Da região Norte da China originou-se uma linhagem ou grupo de pepinos com frutos mais alongados e diâmetro reduzido. Outro grupo, que se desenvolveu no sul da Ásia, chegou às Ilhas Formosas e depois à Ilha de Okinawa, no arquipélago de Rui Kyu, e em 1923, introduzido o Japão dando origem ao pepino do grupo "Aodai" e "Aonaga", hoje conhecidos no mercado como pepinos Comum e Japonês, respectivamente. O pepino é uma hortaliça fruto, de clima tropical. As regiões produtoras são bem distintas, conforme o grupo do pepino. Nas proximidades da Região Metropolitana de São Paulo, o "Japonês" é o mais cultivado e tem a preferência dos consumidores paulistanos. Para o mercado mais voltado para o interior paulista e demais estado brasileiro, o "Caipira" é predominante (HORTIBRASIL, 2014).

2.6. OS VÍRUS MAIS IMPORTANTES DAS CUCURBITÁCEAS

As viroses são as principais doenças que afetam espécies da família *Cucurbitaceae*, principalmente melão, melancia, abóbora e pepino que são culturas economicamente importantes para o mercado interno e/ou externo. Estas doenças podem resultar em perdas na produção e afetar a qualidade dos frutos, principalmente quando a infecção viral ocorre no estágio inicial de desenvolvimento das plantas (LIMA *et al.*, 2011).

Os vírus mais importantes que acometem as cucurbitáceas no Brasil são: PRSV-w, ZYMV, WMV, CMV (LIMA e ALVES, 2011), *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) (NAGATA *et al.*, 2003), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (REZENDE *et al.*, 1997) e *Squash mosaic virus* (SqMV) (LIMA *et al.*, 2009).

2.6.1. *Papaya ringspot virus* – type watermelon - PRSV-w

O PRSV-w pertence à família *Potyviridae* e um dos vírus mais importantes do gênero *Potyvirus*, composto de partícula filamentosa e flexuosa, que está entre 760-800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro senso positivo, com material genético do tipo RNA. É transmitido de maneira não-persistente por várias espécies de afídeos e é de difícil controle, causando prejuízos quantitativos e qualitativos na produção (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os sintomas iniciais das doenças são observados nas folhas mais novas da planta, ocorrendo amarelecimento entre as nervuras. Posteriormente, surgem sintomas de mosaico verde escuro e verde mais claro, bolhosidade e deformação foliar (LIMA *et al.*, 2011).

No Brasil, mais especificamente no estado de São Paulo, esse vírus foi encontrado causando danos na cultura abobrinha de moita (PEREIRA *et al.*, 2007; GIAMPAN *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2013) e no pepino (CARDOSO *et al.*, 2008).

2.6.2. *Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV

O ZYMV pertence ao gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, é composto de partículas alongadas e flexuosas, de aproximadamente, 750 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro, contendo RNA de fita simples chegando até 9600 nucleotídeos. O RNA viral é protegido por uma capa proteica, cujas proteínas, têm peso molecular de 30KDa (LISA e LECOP, 1984; VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000) é transmitido de maneira não-persistente, sendo *Myzus persicae* e *Aphis* spp. seus principais vetores (LOPES *et al.*, 2008). Possui grande importância econômica, tendo sido registrado no Brasil em 1992, nas culturas da melancia e do pepino, nos estados de São Paulo e Santa Catarina, respectivamente.

Este vírus pode causar severos danos em cucurbitáceas, como já relatado em outros países (LECOQ *et al.*, 1991).

Folhas de plantas infectadas exibem inicialmente, descoloração internerval e, com o avanço da doença, surgem sintomas de mosaico, caracterizado por áreas verdes e áreas amareladas, bolhosidade, necrose, redução e deformação do limbo foliar. Há severa redução no desenvolvimento da planta e na produção de frutos. Estes podem ser malformados e apresentar rachaduras, tornando-se inviáveis para a comercialização (LIMA *et al.*, 2011). Há registros de ZYMV no Distrito Federal e nos estados de Pernambuco, Bahia, Tocantins (LIMA e ALVES, 2011), Roraima na cultura da melancia (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004) e no Pará, na cultura da bucha-vegetal (HAYASHI *et al.*, 2013).

2.6.3. Watermelon mosaic virus - WMV

O WMV pertence à família *Potyviridae* do gênero *Potyvirus*, possui partículas alongadas, flexuosas, com 690-760 nm de comprimento por 11-16 nm de diâmetro e seu genoma é composto por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (SHUKLA *et al.*, 1994). É disseminado por cerca de 38 espécies de afídeos pertencentes à 19 gêneros, de maneira não-persistente, sendo *Myzus persicae* e *Aphis* sp. seus principais vetores (LOPES *et al.*, 2008).

Os sintomas induzidos por WMV em plantas infectadas são bastante semelhantes aqueles causados pelo PRSV-W como mosqueado, mosaico, rugosidade e deformação foliar. Plantas afetadas pela doença apresentam ainda redução na produtividade e na qualidade dos frutos (LIMA *et al.*, 2011). No Brasil, esse patógeno foi encontrado mais especificamente em espécies de abóbora, melancia, maxixe e pepino no Maranhão (MOURA *et al.*, 2001), na Bahia (SILVEIRA *et al.*, 2014) e em Roraima na cultura da melancia (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004).

2.6.4. Cucumber mosaic virus - CMV

O CMV pertencente ao gênero *Cucumovirus*, da família *Bromoviridae*, é um vírus que causa a doença conhecida como mosaico do pepino (MOURA *et al.*, 2001). Sua partícula possui dimensão isométrico com diâmetro entre 28 e 30 nanômetros, composto por 180 subunidades protéicas idênticas que formam o capsídeo. Seu genoma é composto por três segmentos de RNA de fita simples positiva, além de um quarto segmento sub-genômico, que codifica a proteína capsidial (GIBBS e HARRISON, 1970; PALUKAITIS *et al.*, 1992).

É o vírus mais severo em cucurbitáceas cultivadas em regiões de clima temperado, podendo infectar mais de 1.000 espécies distribuídas em diferentes famílias (LOPES *et al.*, 2008). OCMV é transmitido por diversas espécies de afídeos, de maneira não persistente, por mais de 60 espécies de pulgões já foram relatadas transmitindo esse vírus (KUROSAWA *et al.*, 2005).

Esse vírus provoca enfezamento da planta, mosaico e malformação de folhas que apresentam tamanho menor do que aquelas de plantas saudáveis. Os internódios são mais curtos, assumindo aspecto de roseta. Plantas infectadas podem produzir frutos pequenos e deformados (LOPES *et al.*, 2008).

Foi relatado em Roraima em abobrinha-italiana (GONÇALVES *et al.*, 2004) na cultura da melancia no estado do Tocantins (AGUIAR *et al.*, 2013) e em várias cucurbitáceas no estado do Maranhão (MOURA *et al.*, 2001).

2.6.5. *Zucchini lethal chlorosis virus - ZLCV*

O ZLCV pertencente ao gênero *Tospovirus*, da família *Bunyaviridae*, é o mais novo integrante do grupo de vírus que infectam espécies da família *Cucurbitaceae*. Apresenta partículas esféricas envelopadas, de aproximadamente 80 a 90 nm de diâmetro, constatadas no interior do retículo endoplasmático e do citoplasma (REZENDE *et al.*, 1997). O vírus é transmitido por insetos raspadores-sugadores, os tripses, de maneira persistente-propagativa. O tripses *Frankliniella zucchini* é a única espécie relatada até o momento como transmissora do vírus. Neste modo de transmissão, o tripses, no estágio larval, adquire as partículas virais que se multiplicam no vetor, tornando estes insetos capazes de transmitir o vírus durante todo seu ciclo de vida.

Os sintomas exibidos por plantas afetadas podem exibir tonalidade verde mais clara nas folhas, mosaico amarelo, clorose e encurvamento dos bordos das folhas mais novas e necrose nas mais velhas, rugosidade, internódios curtos, epinastia, deformação foliar e necrose da haste. Plantas doentes apresentam redução no desenvolvimento e queda na produtividade.

O ZLCV ocorre em vários estados brasileiros, entretanto, sua incidência tem aumentado, nos últimos anos, tendo sido relatado no Estado de São Paulo (YUKI *et al.*, 2000) e no Sub-médio do Vale do São Francisco (LIMA e NAGATA, 2008). Inicialmente, este vírus foi identificado em abobrinha-de-moita no estado de São Paulo (POZZER *et al.*, 1996; REZENDE *et al.*, 1997) e, posteriormente, em pepino no Distrito Federal (NAGATA *et al.*,

1998) e em outras cucurbitáceas no estado do Mato Grosso do Sul (STANGARLIN *et al.*, 2001).

2.6.6. *Squash mosaic virus* - SqMV

O SqMV pertencente ao gênero *Comovirus*, da família *Comoviridae*, possui partículas virais isométricas com 30 nm de diâmetro (FAUQUET *et al.*, 2005). A maior importância do SqMV é o fato de ser transmitido por sementes, propiciando a sua introdução em áreas onde este vírus ainda não ocorre.

Os sintomas apresentados são: mosaico, mosqueado, bolhosidade. Inicialmente, nas folhas novas são observadas manchas cloróticas. Ainda em folhas pode haver formação de projeções marginais das nervuras, devido à interferência da infecção no desenvolvimento normal dos tecidos do limbo foliar. Há produção de menor número de frutos, atraso na maturação e malformação (LIMA *et al.*, 2011). É frequentemente detectado no Brasil, em áreas produtoras de estados das regiões Norte e Nordeste e também no Distrito Federal (KUROSAWA *et al.*, 2005).

2.6.7. *Melon yellowing-associated virus* - MYaV

O MYaV pertence ao gênero *Carlavirus* da família *Betaflexiviridae* (NAGATA *et al.*, 2003). Em plantas afetadas pela doença, os sintomas são parecidos com aqueles resultantes de deficiência nutricional, sendo caracterizados por amarelecimento de folhas. Inicialmente, folhas situadas na base da haste (folhas mais velhas) apresentam amarelecimento, principalmente na região das nervuras, entre 30 a 40 dias após o plantio. Posteriormente, os sintomas surgem também nas folhas mais novas, resultando em amarelecimento generalizado da planta, em função do desenvolvimento da infecção (LIMA *et al.*, 2009).

O vírus foi detectado em áreas produtoras de melão da Região Nordeste, na segunda metade dos anos 90, inicialmente, infectando cultivos do Estado do Rio Grande do Norte. Posteriormente, foi identificado em plantios nos Estados do Ceará, Bahia e Pernambuco. Entretanto, a sua abrangência pode ser ainda maior (LIMA *et al.*, 2010).

2.7. Técnicas de diagnose

2.7.1. Método sorológico

A sorologia apresenta diversos métodos para detecção viral que se caracterizam pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais. Um dos métodos sorológicos mais comuns para detecção de vírus em material vegetal é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Neste método, os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção. Nesta reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizados como antígenos. O resultado do ELISA é determinado por uma reação enzimática (enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo) com um substrato específico e a avaliação é realizada pela leitura da absorbância em uma leitora de placas, utilizando-se filtro de 405 nm. As amostras são consideradas positivas quando o valor da sua leitura for pelo menos duas vezes superior aquele do extrato da planta sadia, utilizado como controle negativo. Este método apresenta como vantagens: ser rápido, podendo-se obter os resultados em um período relativamente curto, ser sensível e poder ser utilizado para a avaliação de um grande número de amostras (CLARK e ADAMS, 1977).

2.7.2. Método molecular

Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção do ácido nucléico, a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o método mais utilizado. A RT-PCR baseia-se na amplificação e detecção do material genético do vírus de RNA ou apenas PCR, no caso de DNA, em amostras vegetais infectadas. Neste método, pelo menos parte da sequência do genoma do vírus a ser detectado, precisa ser conhecida para dar origem aos oligonucleotídeos que serão utilizados na reação. O processo envolve as enzimas transcriptase reversa e Taq DNA polimerase e a reação é automatizada pela incubação em um termociclador programado para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e os múltiplos ciclos da PCR, que visam a produção de um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA. Dessa forma a amplificação seletiva de um fragmento do genoma do vírus compreendida entre dois oligonucleotídeos, é realizada a partir do RNA do vírus utilizado como molde (MULLIS *et al.*, 1986).

2.8. Medidas de controle

Considerando-se que não existe controle curativo para as viroses, as medidas recomendadas são de caráter preventivo visando evitar ou reduzir a incidência de infecção como, plantar cultivares resistentes ou tolerantes, como as listadas abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Espécies de cucurbitáceas comerciais resistentes ou tolerantes a vírus.

Espécies	PRSV-w	WMV	CMV
Pepino	Formosa e Aodai	-	Runner, Colônia, Indaial, Itapema e Prêmio
Abóbora	Piramoita, Menina brasileira e Duda	-	-
Melão	AF-522, Nice e Eldorado 300	-	-
Melancia	BT 8501	“Egusi”, PI 494528 e PI494532	-

Quando disponíveis, utilizar sementes certificadas e fazer o controle dos insetos-vetores (Lima *et al.*, 2011). Outra alternativa seria a inserção ou a indução de genes resistentes ao ataque desses patógenos (SASU *et al.*, 2009; TSUNG LIN *et al.*, 2013) e pré-imunização utilizando inoculação com estirpes fracas do vírus (BONILLA *et al.*, 2009).

Entretanto, para se estabelecerem estratégias de manejo é de crucial importância identificar as espécies virais prevalentes que ocorrem no estado do Pará utilizando-se os testes sorológicos e moleculares.

3. OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE CUCURBITÁCEAS NO ESTADO DO PARÁ

3.1. Introdução

As cucurbitáceas estão entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil por ser importante fonte de minerais e vitaminas, especialmente vitaminas A e C, encontrados na polpa dos frutos na forma de carotenoides e ácido ascórbico (ROMANO *et al.*, 2008).

As espécies de cucurbitáceas são frequentemente acometidas por doenças de origem viral. No Brasil já foram relatados dez vírus infectando cucurbitáceas. Entretanto, sete se destacam como os principais, devido à frequência de detecção em plantios comerciais de cucurbitáceas e às perdas que podem causar na produção e na produtividade (LIMA, 2011). Dentre esses, o vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type watermelon – PRSV-w), o vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) e o vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus* – WMV) do gênero *Potyvirus*, são os mais importantes (LIMA, 2011). No estado do Pará não há estudos sobre as viroses importantes na cultura, tendo apenas relatos de ocorrência dos vírus ZYMV e PRSV-w (POLTRONIERI, 2000; HAYASHI *et al.*, 2013).

Deste modo, este trabalho propôs registrar a ocorrência e a caracterização molecular das espécies virais prevalentes nas principais regiões produtoras de cucurbitáceas no estado do Pará. Os resultados deste estudo darão subsídios para estabelecimento de estratégias de manejo das viroses.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleta e preservação das amostras

Para realização dos testes sorológicos e moleculares foram coletadas de 101 amostras de folhas de cucurbitáceas com sintomas característicos de viroses como: mosaico, deformação foliar, amarelecimento e necrose, em 14 municípios do Pará, sendo as localidades visitadas: Ananindeua, Baião, Belém, Benevides, Curuçá, Moju, São Miguel do Guamá, São João da Ponta, Santo Antônio do Tauá, Santa Izabel do Pará, Santa Maria do Pará, Santarém, Paragominas e Tomé-açu. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos

dentro da caixa de isopor e levadas o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

Parte das amostras foliares foi dessecada, em dessecador contendo sílica gel a 4°C e armazenada em frascos em freezer -20°C, e a outra utilizada nos testes de diagnose PTA-ELISA e RT-PCR.

3.2.2. Teste PTA-ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Para execução do teste de diagnose foi utilizado o teste sorológico PTA-ELISA. Os vírus testados foram: CMV, PRSV-w, ZYMV, SqMV, WMV e ZLCV de acordo com o protocolo de Mowat e Dawson (1987) utilizando antissoros específicos para cada vírus e anticorpo anti-coelho. As avaliações de absorvância a 405nm foram feitas após a adição de substrato (p-nitrofenilfosfato), utilizando uma leitora de microplaca de UV.

Inicialmente, foi pesado 1g de folhas e macerado com 10 ml de tampão de carbonato de sódio (1,59 g Na_2CO_3 ; 2,93 g NaHCO_3 ; 1,00 L H_2O ; pH 9,6). Em seguida, foram pipetados 100 μL das amostras na placa de ELISA, e posta para incubação à 37 °C durante 60 min, logo após a incubação, as placas foram lavadas manualmente com o tampão de lavagem PBS-Tween, 8 g NaCl ; 0,20 g NaH_2PO_4 ; 1,15 g Na_2HPO_4 ; 0,20 g KCl ; 1,00 L H_2O ; 0,50 mL de Tween 20; pH 7,4). Após a lavagem foi pipetado na placa de ELISA o anticorpo específico para cada vírus diluído em Tris-HCl (0,20M Tris-HCl; 0,15M NaCl ; pH 7,2), e incubação por 60 min a 37 °C. Posteriormente, a placa foi novamente lavada com o tampão PBS-Tween. Após adição do conjugado anticorpo anti-coelho conjugado com (fosfatase alcalina) fez-se a incubação de 60 min a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada com o tampão PBS-Tween e, posteriormente adicionou-se p-nitrofenilfosfato diluído (0,5 mg/mL) em dietanolamina (97 mL dietanolamina; 1,0 L H_2O ;). As placas foram colocadas para incubar a temperatura ambiente por 15 a 30 min e levadas ao leitor de ELISA para medição da absorvância.

Os resultados foram analisados comparando amostras infectadas e sadias (I/S). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram o dobro do valor de absorvância do controle sadio. Extratos de folhas de abóbora foram usados como controles negativos. Foram utilizados extratos de folhas infectadas com cada vírus como controle positivo. O controle positivo de ZLCV foi cedido gentilmente pela Doutora Mirtes Freitas Lima da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

3.2.3. RT-PCR e sequenciamento

Para avaliar a diversidade genética dos isolados a serem selecionados de cada espécie encontrada foi realizado o teste de RT-PCR, sequenciamento de DNA e estudo filogenético.

A extração RNA total foi realizada para todas as amostras coletadas de acordo com Gibbs e Mackenzie (1997). 100mg de folhas com sintomas, foram maceradas em almofariz gelado, utilizando 1600 μ L do tampão de lavagem (tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0; NaCl 2M; 0,05% BSA) e 10 μ L de β - mercaptoetanol. Em seguida o material foi transferido para microtubos de 2 mL, e levados para agitação, em agitador de tubos, depois foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 800 μ L de tampão CTAB (2% de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio); 1,4 M de NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH8,0; 0,5% mercaptoetanol) e homogeneizado por 2 min. A suspensão foi incubada a 55 °C por 30 min. Logo após, foram adicionados 800 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi homogeneizada por 2 min. E depois centrifugada a 13.200 rpm por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2mL. Esta última fase foi repetida e posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Acrescentou-se 600 μ L de isopropanol gelado e 60 μ L de acetato de amônio. Após a agitação da solução, o material foi posto para incubar a -20 °C por 20 min. Depois de submetido a centrifugação a 13.200 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de álcool etílico a 70% e centrifugação 13.200 rpm por 2 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco e ressuspensionado com 50 μ L de água ultrapura e armazenado a -20°C. Foram utilizadas amostras foliares como controles negativos (sadios) e positivos (infectados) para os vírus testados.

Para a síntese do cDNA, a transcrição reversa foi realizada em um microtubo empregando-se 0,25 μ L do *primer reverse*, 3,0 μ L do RNA extraído e 5,0 μ L de água ultrapura. O microtubo foi incubado à 70 °C por 10 min, foi imediatamente transferido para o gelo por 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 2,0 μ L de tampão da transcriptase reversa (M-MLV), 0,5 μ L de dNTP (10mM), 0,15 μ L da enzima RT e 1,8 μ L de água ultrapura. Posteriormente, fez-se a incubação da reação por 50 min a 37 °C, e em seguida por 15 min a 70 °C.

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando de cDNA (DNA complementar), 5 μ L de tampão 5X, 3 μ L de MgCl₂ (25mM), 0,25 μ L de primers (10mM), 0,15 L de Taq Polimerase, 0,5 μ L de dNTP (10mM), 12,85 μ L de água ultra-pura.

Para as espécies do gênero *Potyvirus* foi utilizado o par de *primer* universal PV1 e WCIEN para detecção do ZYMV. O ciclo consistiu em 94 °C/30 segundos, 60 °C/45

segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 57 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, e polimerização final de 68 °C durante 7 minutos. Por não ocorrer a amplificação dos vírus PRSV-w e WMV com o par de primer citado, foi utilizado o par de *primer* (MJ1 e MJ2).

A amplificação consistiu de 35 ciclos de amplificação; desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento a 50 °C por 1 min; e extensão de 1 min a 72 °C. Posteriormente, fez-se uma extensão final a 72 °C por 3 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e analisado em fotodocumentador.

Os fragmentos de DNA produzidos por PCR foram purificados utilizando o kit Wizard PCR (Promega) e quantificados. O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa Helixxa DNA for Life (Campinas-SP). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram comparadas com os acessos depositados no *GenBank* utilizando os programas o BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), ClustalW (THOMSON *et al.*, 1994) e MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Teste PTA-ELISA

Os resultados sorológicos indicaram que PRSV-w, ZYMV e SqMV foram os vírus mais frequentes nos municípios visitados, seguidos do CMV e WMV. O ZLCV não foi detectado nas amostras coletadas (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras de cucurbitáceas provenientes de municípios produtores do Estado do Pará, submetidas ao teste PTA-ELISA, para os seguintes vírus: CMV, PRSV-w, ZYMV e WMV.

Município	Amostra	Cultura	Nº de amostra negativa	Nº amostra c/ infecção mista	CMV	PRSVw	ZYMV	SqMV	WMV
Ananindeua	2	Abóbora	0	0	0	0	0	2	0
Baião	1	Abóbora	2	0	0	0	1	0	0
	1	Melancia							
	1	Maxixe							
Benevides	6	Abóbora	4	6	1	2	4	0	0
	1	Melancia							
	4	Pepino							
Belém	1	Abóbora	6	1	1	1	0	0	0
	3	Melancia							
Curuçá	8	Abóbora	13	0	0	5	0	5	0
	5	Melancia							
	3	Maxixe							
	7	Pepino							
Moju	2	Abóbora	0	0	0	0	2	0	0
Paragominas	4	Abóbora	0	10	3	7	3	0	0
	3	Maxixe							
	6	Pepino							
Stº Antônio do Tauá	5	Pepino	0	0	0	0	5	0	0
Stª Izabel do Pará	9	Abóbora	0	9	0	9	9	0	0
São João da Ponta	2	Abóbora	3	0	1	1	0	0	0
	1	Melancia							
	2	Maxixe							
Stª Maria do Pará	2	Abóbora	4	0	0	3	0	8	1
	10	Melancia							
	3	Maxixe							
	1	Pepino							
São Miguel do Guamá	1	Abóbora	1	0	0	0	2	0	0
	2	Pepino							
Santarém	1	Maxixe	0	0	0	1	0	0	0
Tomé-açu	2	Abóbora	0	0	0	2	0	0	0
Total	101		33	26	6	30	26	15	1

Das 40 amostras de *Cucurbita* sp. coletadas, 6 estavam infectadas como o CMV, 10 com PRSV-w, 8 com ZYMV e 10 com SqMV. No entanto das 21 amostras de *C. lanatus* coletadas 10 foram positivas para PRSV-w, 5 para ZYMV e 5 para SqMV. Já as 25 amostras de *C. sativus*, 6 foram positivas para PRSV-w e 5 para ZYMV. Todavia as 15 amostras de *C. anguria* coletadas, 4 foram positivas para o PRSV-w e 8 para ZYMV.

O PRSV-w foi um dos vírus de maior incidência nas amostras coletada estando presente em dez amostras de abóbora, dez de melancia, seis de pepino e quatro de maxixe. Essas amostras foram provenientes das localidades de Belém, Curuçá, Santa Maria do Pará, Santa Izabel do Pará, São João da ponta, Santarém e Tomé-açu, em infecção simples. Em

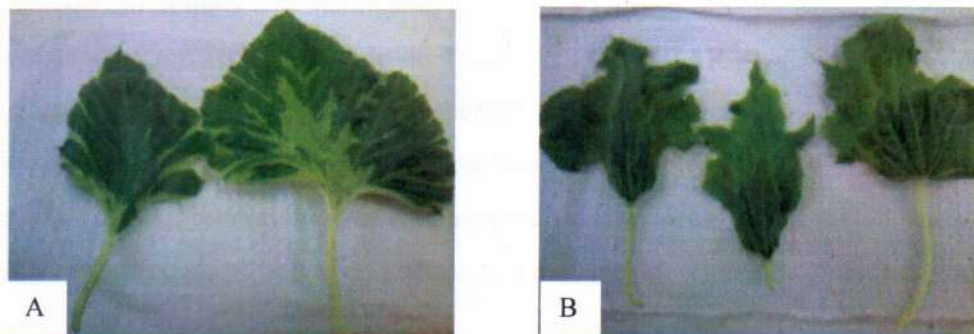
Benevides, Paragominas e Santa Izabel do Pará esse vírus foi constatado em infecção mista com o ZYMV. O PRSV-W encontra-se distribuído em escala mundial e é de grande importância econômica onde estão presentes as lavouras de cucurbitáceas (PURCIFULL *et al.*, 1984). Perdas na produção e a incidência já foram estimadas por outras regiões do País, inclusive no Nordeste brasileiro (NELSON *et al.*, 1962; OLIVEIRA *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2003).

No Brasil, grande atenção tem sido dada ao PRSV-W, por ser o vírus de maior abrangência geográfica detectado em cucurbitáceas. O mesmo já foi identificado em vários estados, causando grandes prejuízos à produção de diversas espécies de cucurbitáceas (LIMA *et al.*, 1980; PAVAN *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2000). O PRSV-w também é de ocorrência predominante em regiões produtoras de melão de Belém (ALBUQUERQUE *et al.*, 1972) e em abóbora e melancia em Igarapé-açu (POLTRONIERI *et al.*, 2000), em várias cucurbitáceas no Maranhão (MOURA *et al.*, 2001) na cultura da melancia em Roraima (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004) no Tocantins (NASCIMENTO *et al.*, 2011) e em acessos de abóboras de Brasília-DF (LIMA e COSTA, 2011).

O ZYMV foi o segundo vírus de maior frequência, sendo detectado em oito amostras de abóboras, cinco de melancia, cinco de pepino e oito de maxixe (Tabela 2). Essas amostras são provenientes dos municípios de Benevides, Paragominas e Santa Izabel do Pará, Baião, São Miguel do Guamá, Santo Antônio do Tauá, Moju, Santa Maria do Pará. Este vírus já foi relatado por Poltronieri *et al.*, (2000) no estado do Pará no município de Igarapé-açu, e na bucha (HAYASHI *et al.*, 2013). Foi registrado infectando melancia e abóboras nos estados do Tocantins (NASCIMENTO *et al.*, 2011; ALENCAR *et al.*, 2012), Ceará e em Brasília (LIMA *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2014) e em diferentes cucurbitáceas no estado de São Paulo (CÓRDOVA, 2010; SANTOS, 2011).

As amostras abóbora de Baião, abobrinha de Tomé-açu e maxixe de Curuçá foram positivas para os vírus ZYMV e PRSV-w respectivamente, ao serem inoculadas em abóbora cv. Caserta mostrando sintomas de mosaico e deformação foliar (Figura 1).

Figura 1. Sintomas de mosaico e deformação foliar em folhas em abóbora cv. Caserta inoculadas com extrato de abóboras infectadas dos municípios de Tomé-açu (A) positiva para PRSV-w e de Baião (B) positiva para ZYMV.



O WMV foi detectado em uma amostra de maxixe proveniente do município de Santa Maria do Pará (Tabela 2). Este vírus também foi encontrado em abóbora, melancia, maxixe e pepino no Maranhão (MOURA *et al.*, 2001). Em amostras de melancia em infecção tripla com PRSV-W e ZYMV no estado de Roraima (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004) e infecção simples nos estados de Tocantins e Bahia (RODRIGUES, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2011; AGUIAR *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2014) e em outras cucurbitáceas no estado de Manaus (LIMA *et al.*, 2010).

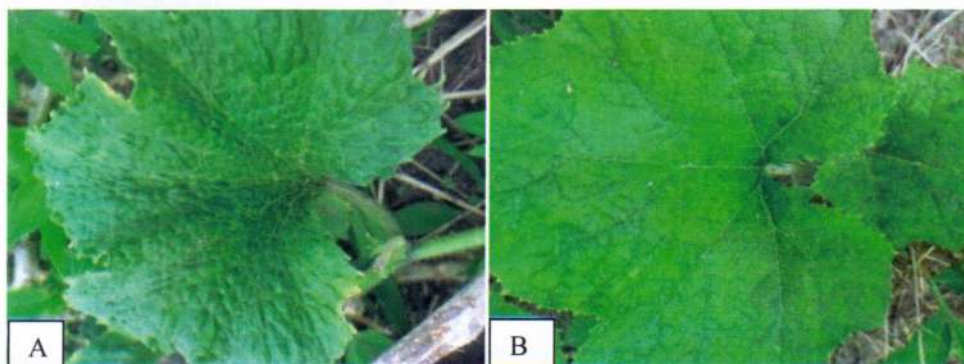
As espécies de *Potyvirus* estão amplamente disseminadas no Brasil. Lima e Alves (2011) registraram a presença do gênero em diversas cucurbitáceas em vários estados como Minas Gerais, Amapá, Pernambuco, Rio de Janeiro, Pernambuco e Manaus. Silveira (2008) verificou que em amostras de melancia coletadas na região do Sub-médio do São Francisco, os *Potyvirus* predominaram em 99% das coletas nas áreas amostradas e ocorreram de forma simultânea e consistentemente em todos os anos considerados.

O CMV foi encontrado em seis amostras de abóboras coletadas em propriedades localizadas em Belém, Benevides, Paragominas e São João da Ponta. A amostra de Belém mostrou infecção mista do vírus CMV com o PRSV-w. Silveira (2008) detectou a presença de CMV em amostras de melancia provenientes Petrolina - PE e Juazeiro- BA. Resultado semelhante foi detectado por (RODRIGUES, 2011; AGUIAR *et al.*, 2014) no estado do Tocantins na cultura da melancia, e em uma amostra cucurbitácea proveniente do estado de Manaus (LIMA *et al.*, 2010b). A baixa incidência do CMV nas localidades avaliadas pode ser explicada pela inibição ou interferência na sua transmissão pela presença de outros vírus (SILVEIRA, 2008). Pinto (2003) ao analisar a cultura de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*

L.) observou a interferência dos potyvírus PRSV-W e ZYMV na transmissão do CMV por *Aphis gossypii* e *M. persicae*.

O SqMV foi detectado em dez amostras abóboras e cinco de melancias (Tabela 2) trazidas dos municípios de Ananindeua (Figura 2), Curuçá e Santa Maria do Pará. Este vírus foi detectado na melancia no estado do Tocantins (ALENCAR *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2014). Sua ocorrência foi detectada também no Distrito Federal e nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, onde há maior ocorrência desse patógeno (ALENCAR *et al.*, 2012). Nolan e Campbell (1984) observaram que a transmissão desse vírus pela semente varia de 0,4% a 12,1% de acordo com a cultivar de abóbora e a presença do vírus nos tecidos das sementes.

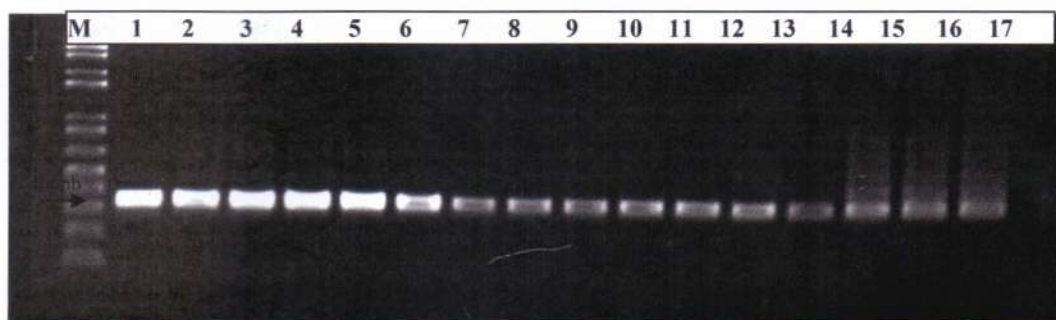
Figura 2. Sintomas de (A) deformação foliar e bolhosidade (B) mosaico em folhas de abóbora no município de Ananindeua com infecção de SqMV



3.3.2. RT-PCR e sequenciamento

Para a diagnose utilizando o teste molecular RT-PCR foram selecionadas as amostras positivas para *Potyvirus* no teste PTA-ELISA. Foram obtidos fragmentos de DNA do tamanho esperado de 321pb (Figura 3), quando se utilizou *primers* específicos para o gênero *Potyvirus* (MJ1 e MJ2). Houve amplificação para as amostras de abóbora provenientes de Santa Izabel do Pará, Baião, Moju, Tomé-Açu, Belém (Embrapa), São João da Ponta; para as amostras de pepino de Benevides, Paragominas, Santo Antônio do Tauá, São Miguel do Guamá, Santa Maria do Pará; para as amostras de maxixe provenientes de Curuçá, Santarém, Santa Izabel do Pará; e amostra de melancia de Santa Maria do Pará.

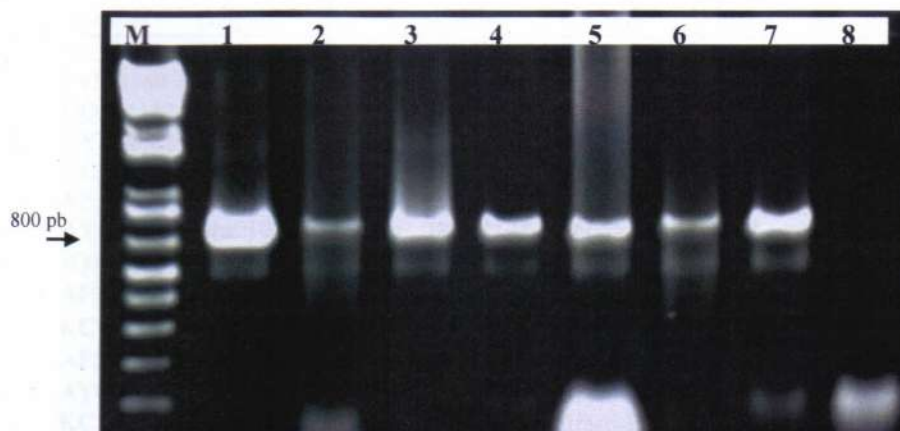
Figura 3. Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em cucurbitáceas do estado do Pará para o *primer* MJ1 e MJ2, para identificação do gênero *Potyvirus*. M - marcador 1kb; 1 - abóbora de Santa Izabel do Pará; 2 - pepino de Benevides; 3 - Pepino de Paragominas; 4 - abóbora de Baião; 5- pepino de Santo Antônio do Tauá; 6 - abóbora de Moju; 7 - abobrinha de Tomé-açu; 8 - Maxixe de Curuçá; 9 - abóbora Belém (Embrapa); 10- maxixe de Santarém; 11- melancia de Santa Maria do Pará; 12 - maxixe de Santa Izabel do Pará; 13 - pepino de São Miguel do Guamá; 14 - abóbora de Tomé-açu; 15 - abóbora de São João da Ponta; 16 - pepino de Santa Maria do Pará; 17 - controle negativo.



Fonte: Nara Ponte

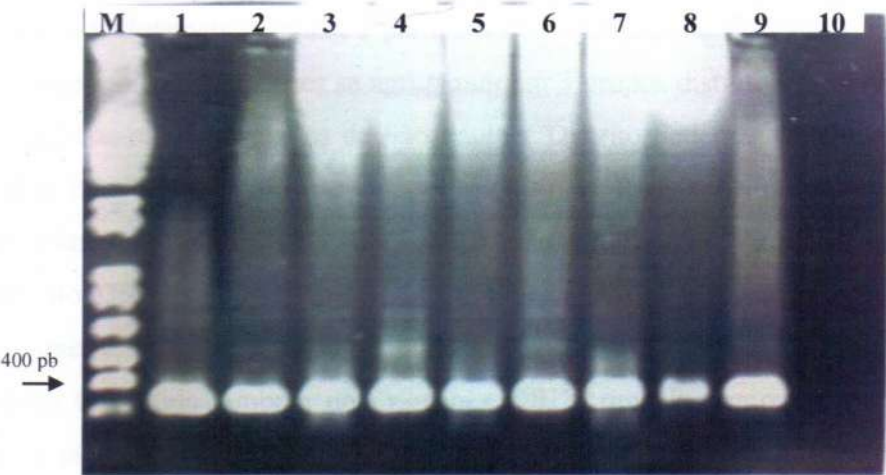
O ZYMV foi detectado pelo par de *primer* PV1 e WCIEN que permitiu a amplificação de um fragmento de cerca de 800 pb (Figura 4). Para as amostras infectadas obteve-se a concentração necessária de DNA para realização do sequenciamento nucleotídico. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no GenBank utilizando os programas *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), Clustal W e MEGA 5.0 (Tabela 4).

Figura 4. Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para os *primer* PV1 e WCIEN, para identificação de ZYMV. M - marcador 1kb; 1 - controle positivo; 2 - pepino de Santa Maria do Pará; 3 - abóbora de Baião; 4 - pepino de Santo Antônio do Tauá; 5- abóbora de Moju; 6 - pepino de São Miguel do Guamá; 7 - abóbora de Santa Izabel do Pará; 8 - controle negativo.



Os vírus PRSV-w e WMV não amplificaram quando se utilizou o par de *primer* PV1 e WCIEN, devido a este motivo foi utilizado o par de *primer* MJ1 e MJ2 na (Figura 5) para o sequenciamento. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com os acessos depositados no *GenBank* utilizando os programas *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), Clustal W e MEGA 5.0 (Tabela 3).

Figura 5. Análise em gel de agarose 0,8% de isolados de vírus coletados em Cucurbitáceas do estado do Pará para o par de *primer* MJ1 e MJ2. Amostras positivas para os vírus PRSV-w e WMV. .M - marcador 1kb; 1 - controle positivo; 2 - abóbora de São João da Ponta; 3 - abóbora de Santa Izabel do Pará; 4 - maxixe de Santarém; 5 - abobrinha de Tomé-açu; 6- abóbora de Tomé-açu; 7 - melancia de Santa Maria do Pará; 8 - maxixe de Santa Maria do Pará; 9 - maxixe de Curuçá, 10 - controle negativo.



Fonte: Nara Ponte

Tabela 3. Lista de isolados de PRSV-w, ZYMV e WMV obtidas no *GenBank* (NCBI) utilizadas na análise filogenética.

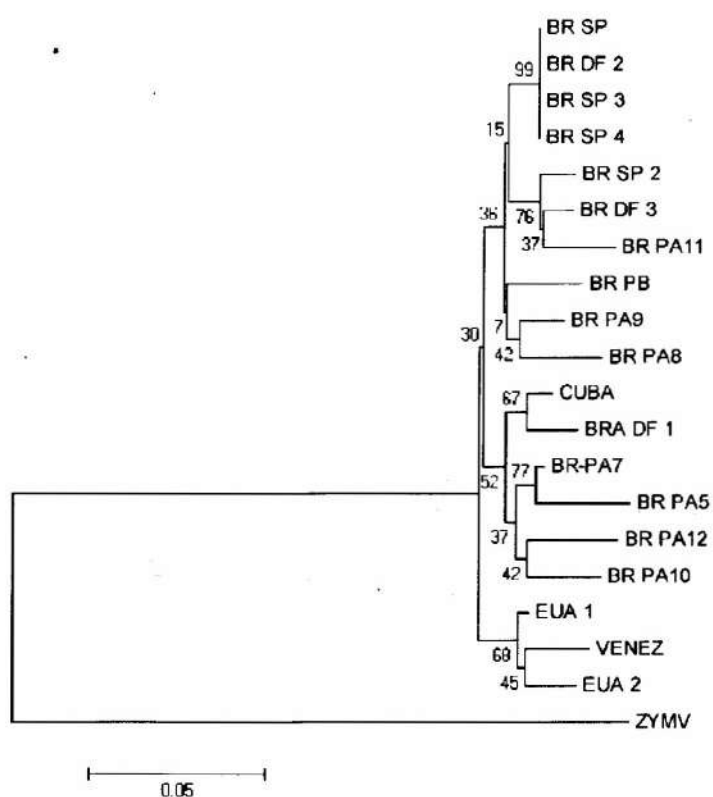
Vírus	Acessos	Origem	Vírus	Acessos	Origem	Vírus	Acessos	Origem
PRSV-w	N132451	EUA	ZYMV	JX502670	Brasil-SP	ZYMV	JX502677	Brasil-DF
PRSV-w	JN132469	EUA	ZYMV	JX502675	Brasil-SP	ZYMV	JX502668	Brasil-RN
PRSV-w	DQ374153	Brasil-SP	ZYMV	JX502667	Brasil-DF	ZYMV	JX502669	Brasil-PA
PRSV-w	AY238881	Índia	ZYMV	JX502671	Brasil-SP	WMV	EU660580	Chile
PRSV-w	KC345589	Venezuela	ZYMV	JX502673	Brasil-PR	WMV	AB218280	Paquistão
PRSV-w	AF344649	Brasil-DF	ZYMV	JQ026020	Iraque	WMV	FJ628395	Polônia
PRSV-w	AY094986	Brasil-SP	ZYMV	JX262125	Sérvia	WMV	KP406640	China
PRSV-w	JQ755426	Brasil-PE	ZYMV	KJ614229	Índia	WMV	AJ579504	Espanha
PRSV-w	AF344649	Brasil-DF	ZYMV	HM76820	EUA	WMV	AY437609	França
PRSV-w	KC768854	Cuba	ZYMV	HM76822	EUA	WMV	AB693979	Japão
PRSV-w	AF530089	Brasil-SP	ZYMV	JX502672	Brasil-RS	WMV	JF273468	França
PRSV-w	AY094987	Brasil-SP	ZYMV	JX502676	Brasil-MT			
PRSV-w	KC748221	Brasil-PB	ZYMV	JX502674	Brasil-ES			

Tabela 4. Lista de isolados utilizados na análise filogenética dos vírus PRSV-w, ZYMV e WMV obtidos em lavouras de cucurbitáceas no estado do Pará.

Vírus	Acesso	Origem	Cultura
PRSV-w	BR_PA5	Santa Maria do Pará	melancia
PRSV-w	BR_PA7	Curuçá	maxixe
PRSV-w	BR_PA8	Tomé-açu	abóbora
PRSV-w	BR_PA9	São João da Ponta	abóbora
PRSV-w	BR_PA10	Tomé-açu	abobrinha
PRSV-w	BR_PA11	Embrapa	abóbora
PRSV-w	BR_PA12	Santarém	maxixe
ZYMV	ZYMV_PA1	Baião	abóbora
ZYMV	ZYMV_PA2	Moju	abóbora
ZYMV	ZYMV_PA3	Santo Antônio do Tauá	pepino
WMV	WMV_PA	Santa Maria do Pará	maxixe

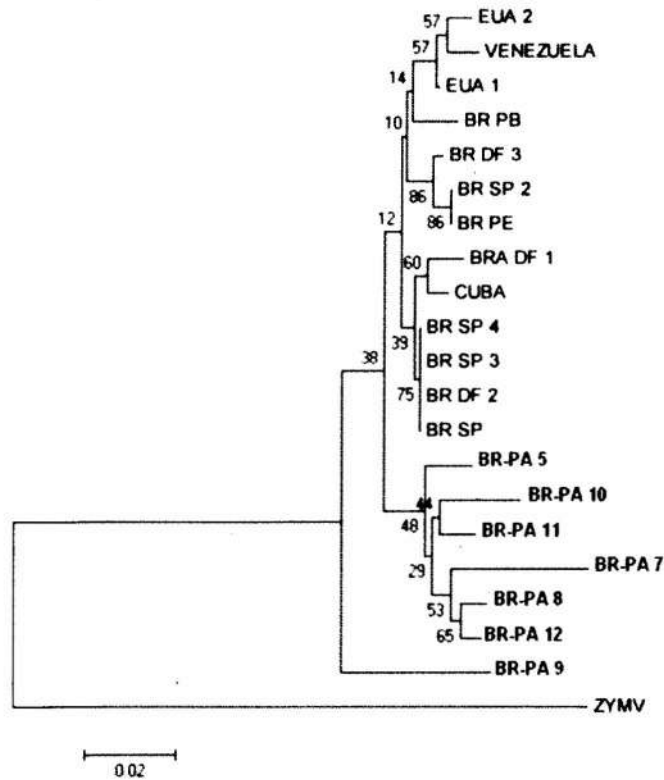
A árvore filogenética gerada a partir de 21 sequências de nucleotídeos para PRSV-w mostrou que os isolados paraenses se agruparam em 3 grupos distintos. No grupo 1 o isolado BR_PA11 agrupa-se com isolados de São Paulo e Distrito Federal. No grupo 2 os isolados BR_PA 8 e BR_9 agrupam-se ao acesso oriundo da Paraíba. No entanto, o grupo 3 é composto pelos isolados BR_PA5, BR_PA7, BR_10 e BR_PA12 (Tabela 4) juntamente com um isolado do Distrito Federal e de Cuba, evidenciando a proximidade genética entre os isolados paraenses com os acessos brasileiros (Figura 6). Essa formação de grupos diferenciados foi obtida também por Martínéz (2012) quando comparou isolados e PRSV brasileiros e estrangeiros. No entanto, árvore filogenética que relaciona os aminoácidos, os isolados do Pará de PRSV-w agruparam-se em um mesmo clado, mostrando um alto grau de identidade genética entre os isolados, mesmo sendo de municípios diferentes (Figura 7).

Figura 6. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.



Fonte: Nara Ponte

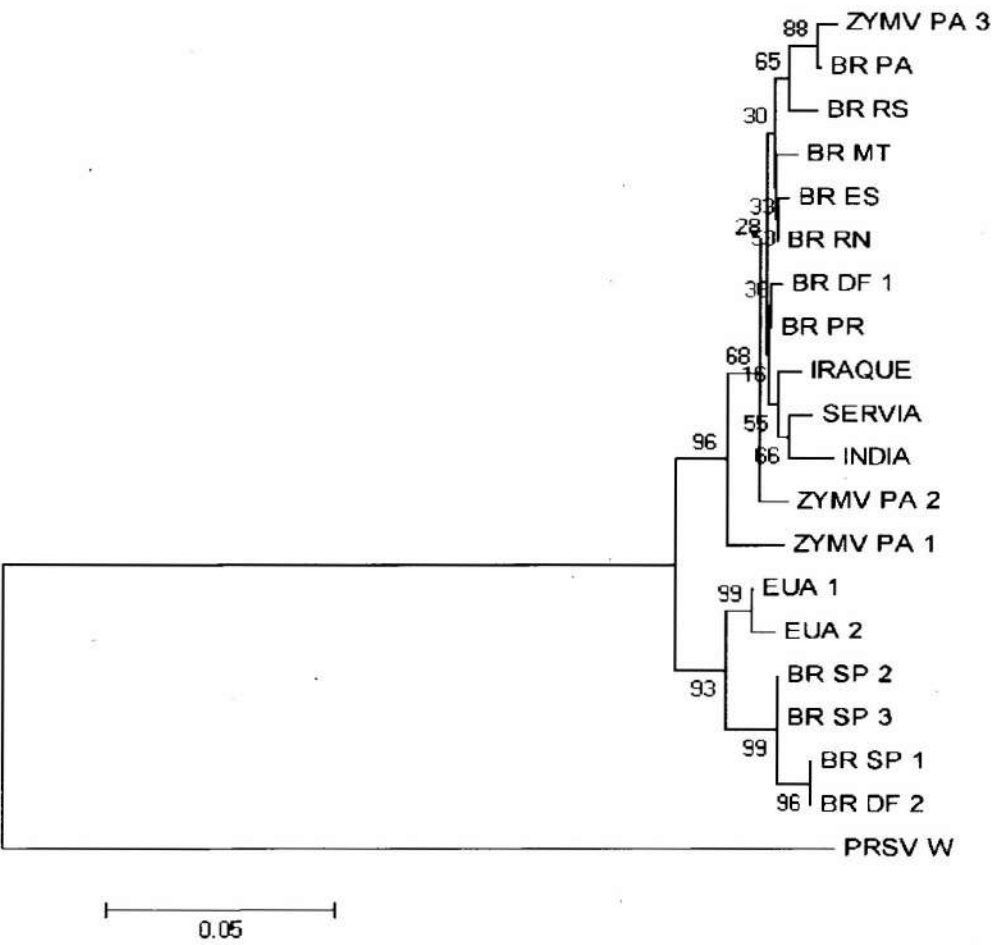
Figura 7. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento das sequências aminoácidos de parte do gene da capa protéica de isolados de PRSV-w. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.



Fonte: Nara Ponte

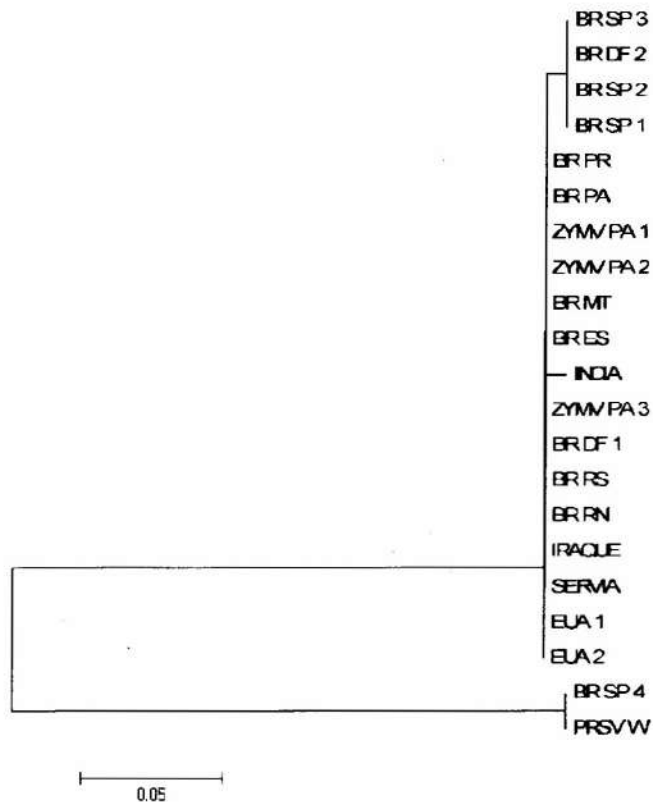
As sequências de nucleotídeos de ZYMV do estado do Pará mostraram diferenças nucleotídicas entre si, evidenciando variabilidade genética entre isolados de ZYMV (Figura 8). No entanto, a árvore filogenética dos aminoácidos agrupou os isolados paraenses em um mesmo clado, juntamente com acessos brasileiros oriundos do Paraná, Pará, Distrito Federal, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Rio grande do Norte e também com acessos estrangeiros provenientes dos Estados Unidos, Sérvia, Índia e Iraque. Porém, se diferenciaram de outro acesso vindo do Distrito Federal e dos isolados oriundos do estado de São Paulo (Figura 9).

Figura 8. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento de nucleotídeos da parte do gene de proteína capsidial dos isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 5.0.



Fonte: Nara Ponte

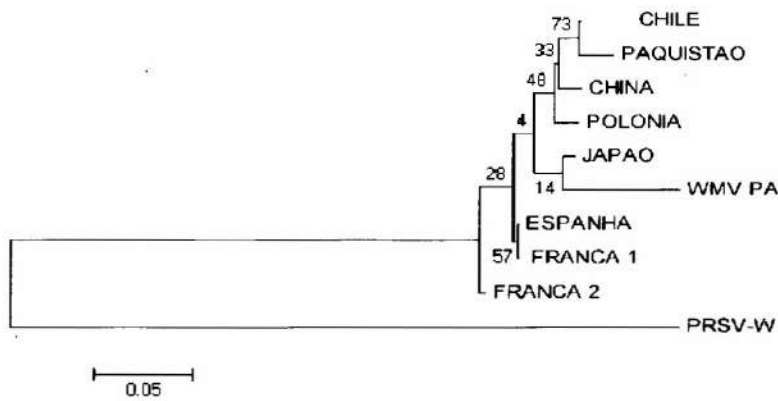
Figura 9. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos de parte do gene da capa proteica de isolados de ZYMV. A árvore foi gerada utilizando o *software* MEGA 5.0.



Fonte: Nara Ponte

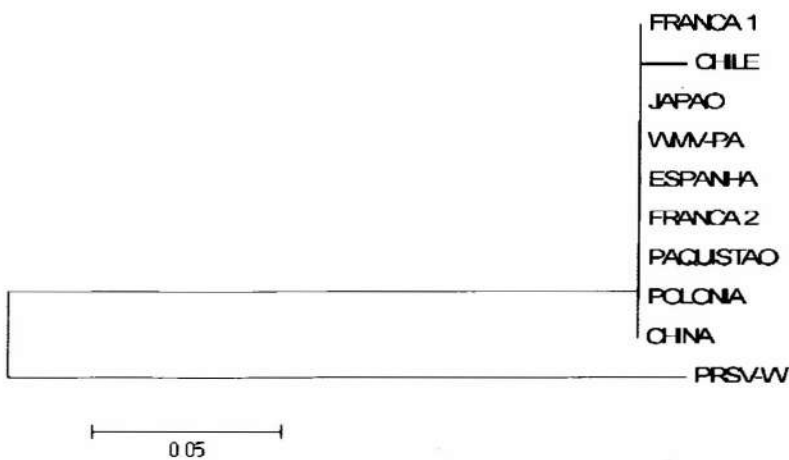
Por não haver acessos de WMV brasileiros depositados no *genbank* a árvore filogenética que relaciona a sequência de WMV paraense foi feita apenas com acessos estrangeiros. O isolado paraense mostrou alto grau de identidade nucleotídica com o acesso proveniente do Japão (Figura 10). Essa identidade foi confirmada quando se fez a comparação entre os aminoácidos de WMV do estado do Pará com o isolado japonês e também com os outros acessos estrangeiros (Figura 11).

Figura 10. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte do gene da proteína dos isolado de WMV. A árvore foi gerada utilizando o *software* MEGA 5.0



Fonte: Nara Ponte

Figura 11. Árvore filogenética utilizando *neighbour-joining* construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos de parte do gene da capa protéica de isolados de WMV. A árvore foi gerada utilizando o *software* MEGA 5.0.



Fonte: Nara Ponte

A porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos dos isolados de PRSV-w do Pará variou entre 88 e 99%. Enquanto que a porcentagem de identidade entre os

aminoácidos deduzidos variou entre 92 e 100% (Tabela 5). A identidade entre os nucleotídeos de ZYMV variou de 93 a 94%, e entre os aminoácidos deduzidos variou de 97 a 99% entre os isolados. Resultado similar foi encontrado por Spadotti (2012) quando comparou isolados de ZYMV inoculados em abobrinha de moita. As amostras de ZYMV mostraram proximidade genética com o acesso BR_PA também proveniente do estado do Pará com identidade variando entre 60 e 63% (Tabela 6). A identidade dos nucleotídeos do isolado WMV PA com os acessos estrangeiros variou de 84 a 90%. No entanto a identidade entre os aminoácidos variou de 94 a 95% (Tabela 7).

Tabela 5. Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsial entre os isolados de PRSV-w.

Isolados	PA5	PA7	PA8	PA9	PA10	PA11	PA12	SP1	SP4	DF1	DF2	DF3	PE	PB	C	EUA1	EUA2	V
PA 5	-	99	93	93	94	91	90	91	91	91	91	88	90	87	92	91	90	90
PA 7	100	-	93	93	94	91	90	91	91	91	91	91	88	87	92	91	90	90
PA 8	95	93	-	96	93	90	88	94	94	92	94	92	93	92	92	93	93	91
PA 9	96	95	98	-	93	92	88	95	95	92	95	92	94	91	93	93	92	91
PA 10	95	93	98	98	-	89	90	93	93	93	93	91	92	89	96	94	92	93
PA 11	94	94	93	94	93	-	88	91	91	88	91	90	92	89	89	90	89	89
PA 12	92	92	92	92	95	93	-	88	88	89	88	85	86	85	90	89	87	87
SP1	95	92	97	97	98	93	91	-	100	94	92	94	95	94	95	75	92	92
SP3	95	92	97	97	98	93	91	100	100	94	92	94	95	94	95	75	92	92
SP4	95	92	97	97	98	93	91	100	-	94	92	94	95	94	95	75	92	92
DF1	95	92	97	97	98	93	90	96	94	-	95	94	95	94	97	95	92	93
DF2	95	92	97	97	98	93	91	94	100	96	-	87	88	86	95	94	76	91
DF3	94	91	96	96	98	92	91	100	94	95	94	-	97	94	95	75	93	92
PE	95	92	97	96	98	92	91	94	96	97	97	97	-	95	96	76	93	93
PB	94	91	96	96	97	93	91	95	95	95	95	95	97	-	95	75	92	92
C	95	92	97	97	98	93	91	96	96	97	96	97	98	98	-	84	94	93
EUA1	95	92	97	97	98	93	91	96	96	98	96	97	98	96	97	-	79	82
EUA2	95	92	97	97	98	93	91	93	93	95	94	94	96	95	97	98	-	95
V	95	92	97	97	98	93	91	95	95	96	95	95	97	96	97	98	98	-

Tabela 6. Tabela Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsial entre os isolados de ZYMV.

Isolados	BR_PA1	BR_PA2	BR_PA3	BR_PA	SP1	MT	SP2	DF1	ES	PR	RS	SP3	RN	DF2	IR	SE	IN	EU	EU
BR_PA1	-	93	93	60	58	60	59	60	60	60	60	59	60	58	90	79	88	59	59
BR_PA2	99	-	94	62	57	60	57	60	60	61	60	57	60	57	90	80	89	58	58
BR_PA3	99	97	-	63	57	60	58	60	60	60	60	58	60	57	90	80	89	58	58
BR_PA	99	97	97	-	93	98	93	98	96	98	98	93	98	93	97	97	97	93	93
BR_SP1	99	97	97	99	-	94	98	94	95	93	93	98	93	100	93	93	93	95	95
BR_MT	99	97	97	100	99	-	93	98	96	98	98	93	98	94	97	97	97	94	94
BR_SP2	93	97	97	98	98	98	-	93	95	93	93	99	93	98	93	93	93	94	94
BR_DF1	99	97	97	99	98	99	98	-	97	99	98	93	99	94	98	97	97	94	94
BR_ES	99	97	97	99	98	99	98	99	-	97	96	95	97	95	96	96	96	94	94
BR_PR	99	97	97	99	98	99	97	98	99	-	98	93	98	93	98	97	97	94	94
BR_RS	99	97	97	100	99	100	97	99	99	99	-	92	98	93	97	97	97	93	93
BR_SP3	99	97	97	98	98	98	98	97	97	97	98	-	93	98	93	93	93	94	94
BR_RN	99	97	97	99	98	99	99	99	99	98	99	97	-	93	97	97	97	93	93
BR_DF2	99	97	97	99	100	99	98	98	98	98	99	98	98	-	93	93	93	93	95
IRAQ	99	97	97	97	97	97	96	97	97	97	97	96	97	97	-	97	97	94	93
SERV	99	97	97	98	97	98	97	98	98	97	98	96	98	97	97	-	97	94	94
IND	99	97	97	98	97	98	97	98	98	97	98	96	98	97	97	97	-	93	51
EU A1	99	97	97	99	98	99	97	98	99	98	99	97	98	98	98	98	98	-	100
EU A2	99	97	97	99	98	99	98	99	99	99	99	98	99	98	98	99	99	99	-

Tabela 7. Tabela Porcentagens de identidade de nucleotídeos (acima da diagonal) e de aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) na região codificadora para a proteína capsial entre os isolados de WMV.

Isolados	Jp	Esp	Fr1	Fr2	Chil	Paq	Pol	Chi	Wmw_pa
Japão	-	90	92	99	91	93	94	93	90
Espanha	96	-	98	92	92	77	93	93	87
França1	96	100	-	92	93	95	93	94	87
França2	100	96	97	-	92	93	93	93	90
Chile	94	96	97	96	-	95	90	92	86
Paquistão	96	99	99	92	96	-	77	78	84
Polônia	98	96	96	98	94	96	-	93	88
China	97	97	97	97	94	96	97	-	88
Wmv_pa	95	95	95	95	94	95	95	95	-

3.4. Considerações finais

Os estudos sorológico, molecular e o sequenciamento comprovaram a presença das principais viroses que acometem as cucurbitáceas no estado do Pará. Os resultados obtidos mostraram a abrangência dos *Potyvirus* no estado, pois todas as espécies investigadas foram detectadas nas análises. O PRSV-w, como já relatado em outros estados, é o vírus mais frequente na cultura das cucurbitáceas, seguido dos vírus ZYMV e do WMV.

Outro vírus encontrado foi o CMV que tem grande importância por possuir uma ampla gama de plantas hospedeiras.

O SqMV tem sido avaliado como um vírus de baixa importância no território nacional. Entretanto, os resultados obtidos mostram que essa não é a mesma realidade no estado do Pará, onde grande parte das amostras coletadas se apresentavam infectadas com o SqMV. Isso mostra que o vírus encontrou na região condições ideais para se disseminar e infectar hospedeiras locais. Esses relatos serão de grande importância para estudos de melhoramento genético e elaboração de uma estratégia de manejo adequada para as espécies de cucurbitáceas infectadas por esse vírus. Justificando, assim os estudos acerca desses vírus no estado.

3.5. Conclusões

O PRS-w foi um dos vírus de maior ocorrência nas áreas visitadas. Este vírus foi detectado em abóbora, melancia, pepino e maxixe. Essas amostras foram provenientes das localidades de Belém, Curuçá, Santa Maria do Pará, Santa Izabel do Pará, São João da ponta, Santarém e Tomé-açu.

O ZYMV a segunda espécie de maior ocorrência nas localidades amostradas, sendo detectado em abóboras, melancia, pepino e maxixe. Essas amostras foram provenientes dos municípios de Benevides, Paragominas e Santa Izabel do Pará, Baião, São Miguel do Guamá, Santo Antônio do Tauá, Moju, Santa Maria do Pará.

O WMV foi registrado pela primeira vez no estado do Pará, em maxixe, proveniente do município de Santa Maria do Pará.

O CMV foi detectado pela primeira vez em lavouras de cucurbitáceas no Pará, em abóboras coletadas em propriedades localizadas em Belém, Benevides, Paragominas e São João da Ponta. A amostra de Belém (Embrapa) mostrou infecção mista do CMV com o PRSV-w.

O SqMV foi registrado pela primeira vez infectando cucurbitáceas no estado do Pará. O SqMV foi um dos vírus mais presentes em amostras de abóboras e melancia, dos municípios de Ananindeua, Curuçá e Santa Maria do Pará. Diferente do que é visto em outras regiões do País, onde este vírus é de baixa importância.

As sequências nucleotídicas de isolados do PRSV-w distribuíram-se em 3 grupos distintos. A porcentagem de identidade entre os isolados de PRSV-w do Pará variou entre 88 e 99%. Enquanto que a porcentagem de identidade de aminoácidos variou entre 92 e 100%. Para o vírus ZYMV as sequências de nucleotídeos dos isolados do estado do Pará mostraram diferenças nucleotídicas entre si. A identidade de nucleotídeos entre os isolados de ZYMV variou de 93 a 94%, e as de aminoácidos variou de 97 a 99%. A sequência de WMV agrupou-se na árvore filogenética com o acesso proveniente do Japão. A identidade de nucleotídeos do isolado WMV-PA com os acessos estrangeiros variou de 84 a 90%. No entanto, a identidade de aminoácidos variou de 94 a 95%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2012.

AGUIAR, R.W. S.; EVANGELISTA, M. P.; RAMOS, A. C. C.; PASCOAL, P. V.; BARROS, H. B.; SANTOS, M. M. dos Danos e sintomatologia de vírus associado à cultura da Melancia no estado do Tocantins. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1632-1639, Nov. 2013.

AGUIAR, R. W. S.; RODRIGUES, A.; PORTELLA, A. C. F.; LOPES, M. M.; LIMA, M. F.; RESENDE, R. O.; NAGATA, T. Serological identification of virus in watermelon production fields in the Tocantins State. **Brazilian archives of Biology and technology**, Tocantins, 2014.

ALENCAR, N. E.; FIGUEIRA, A. R.; ALMEIDA, J. E. M.; LUCAS, M. A.; SANTOS, L. B., NASCIMENTO, I. R. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, N.1: pp. 32-37, Fev. 2012.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1997.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE DISTRIBUIDORES DE HORTI-FRUTI DO ESTADO DE SÃO PAULO-APHORTESP. Acessado em 10/10/2014 disponível em: <http://www.aphortesp.com.br/pepino.html>.

BARBOSA, G.S.; NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA, F. R.; LIMA J. A. A.; DIAS R. C. S. Reação de acessos de Cucurbita spp. a vírus do gênero *Potyvirus*. **Horticultura Brasileira**, v. 30: S2161- S2168, 2012.

BONILLA, E.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; DELLA VECCHIA, P.T.; PIEDADE, S.M.S.; REZENDE, J.A.M. 2009. Yield of varieties of *Cucurbita pepo* preimmunized with mild strains of PRSV-W and ZYMV. **Scientia Agrícola**, v.66, p.419-424. 2009.

CARDOSO, A.I.; PAVAN M.A.; SAKATE, R.K.; FATTORI, K. Herança da tolerância ao ZYMV em pepino. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 311-315, 2008.

CARDOSO, A. I. I.; PAVAN, M. A. Premunização de plantas afetando a produção de frutos e sementes de abobrinha-de-moita. **Horticultura Brasileira**, v.31, p. 45-49, 2013.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immune sorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**. v. 34, p. 475,n.483, 1977.

CÓRDOVA, P. J. M. **Infecção natural e experimental de cucurbitáceas com o vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe mamoeiro e implicações epidemiológicas**. Dissertação de mestrado-Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2010.

- DEULOFEU, C. Situación y perspectivas del melon ven el mundo. In: VALLESPÍR, A. N., coord. Melones. **Horticultura**, Cap.2, p.21-24. (Compendios de Horticultura), 1997.
- DIAS, R. C. S.; REZENDE G. M. Sistema de Produção de Melancia. **Embrapa Semiárido**, Sistemas de Produção 6, ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica, Ago/2010.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALI, L. A. A Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press**. 2005.
- FAO. Agricultural production, primary crops. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 08/08/ 2014.
- GIAMPAN, J. S.; REZENDE, J. A.M.; PIEDADE, S. M. S. Danos causados pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita 'Caserta'. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.223-225, 2009.
- GIBBS, A.J.; HARRISON, B. D. *Cucumber mosaic virus*. **Descriptions Plant Viruses**, 1970.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 63, p.9-16, 1997.
- GONÇALVES, M.F.B.; RABELO FILHO, F.A.C.; RAMOS, N.F.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L.; PEREIRA, P.R.V.S.; LIMA, J. A. A. Identificação sorológica de *Cucumber mosaic virus* em melão e abobrinha 'Caserta', no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, (suplemento), p.S91, 2004.
- HAYASHI, E. A. I.; BOARI, A. J.; CARVALHO, T. P. Detecção de *Potyvirus* em bucha (*Luffa cylindrica* (L.) roem.) no estado do Pará. In: **17º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 1º seminário de pós-graduação da EMBRAPA Amazônia Oriental**. 21 A 23 DE AGOSTO DE 2013, BELÉM-PA. 2013, Belém. Resumo. Belém: Pará, 2013,5p.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; RAMOS, N. F.; RABELO FILHO, F. A. C.; GONÇALVES, M. F. B.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; LIMA, J. A. A. Identificação sorológica de espécies de *potyvirus* em melancia, no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.687-689, 2004.
- HORTIBRASIL. Pepino. 2014. Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/jnw/classificacao/pepino/arquivos/norma.html>. Acesso em 26/10/2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21/10/2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2012. Produção Agrícola Municipal. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br> Acesso em 08/08/2014.

KERNICK, M. D. Producción de semillas de determinados cultivos. In: LAS SEMILLAS AGRICOLAS Y HORTICOLAS: PRODUCCIÓN, CONTROL Y DISTRIBUICIÓN. FAO. Roma, p.203-545, 1961.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas, 4. ed., São Paulo, **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 293-310, 2005.

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

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

LIMA, M. F.; INOUE-NAGATA, A. K. Report of *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) infecting cucurbits in the Northeast Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 19. Caxambu, MG. Virus: **Review sand Research/** Sociedade Brasileira de Virologia, v. 13-Suplemento 2, Caxambu, MG, p. 283, 2008.

LIMA, M. F.; NAGATA T.; NEVES, F. M.; INOUE-NAGATA, A.K.; MOITA, A.W.; SOUSA, C.; DELLA VECCHIA, M.; RANGEL, M. G.; DIAS, R. C. S.; DUTRA, L. S.; ÁVILA, A.C. Detecção por sorologia do *Melon yellowing associated virus* (MYaV) em áreas produtoras de melão no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.27, p. 478-483, 2009.

LIMA, M.F.; LASTRO, M.; ALVES, R.C. Identificação de potyviroses e do *Melon Yellowing associated virus* (MYaV) em amostras de cucurbitáceas coletadas no Estado do Amazonas. **Horticultura Brasileira**, v. 28, S1183-S1186, 2010.

LIMA, M. F.; ALVES, R. C. Levantamento de vírus em cucurbitáceas no Brasil, no período 2008-2010. **Boletim de pesquisa técnica e desenvolvimento** 76. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2011.

LIMA, M. F.; NAGATA, T.; NEVES, F.M.; INOUE-NAGATA, A. K.; MOITA, A. W. Vírozes de cucurbitáceas. **Circular Técnica 95**, Brasília/DF, 2011.

LIMA, M. F.; COSTA, J. R.; AMARO, G. **Reação de 55 genótipos de abóboras e morangas à infecção natural com *Papaya rings potvirus* – type watermelon (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZyMV) em campo.** In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, (Suplemento) 36, 2011, Bento Gonçalves, RS. Tropical Plant Pathology, Bento Gonçalves, RS: 2011.

LISA, V.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus* .CMI/ABB. **Descriptions of Plant Viruses**, n.282, p.4. 1984.

LOPES, C. A.; REIS, A.; LIMA, M. F. **Principais Doenças da Cultura da Melancia no Brasil.** Circular Técnica 61, Brasília/DF, 2008.

MAROUELLI, W. A.; BRAGA, M. B.; ANDRADE Jr, A. S. de. **Irrigação na cultura da melancia**. EMBRAPA, circular técnica 18, Brasília, 2012.

MARTÍNEZ, D. R. **Caracterização de isolados do *Papaya ringspot virus* procedentes de regiões do Brasil e de Cuba**. 2012. 121p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, 2012.

MICHEREFF FILHO, M. Recomendações técnicas para o controle de pragas do maxixeiro. **Circular Técnica 93**. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2010.

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

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

MULLIS, K. F.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Quantitative Biology, Cold Spring Harbor**, v. 51, p. 263-273, 1986.

NAGATA, T.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, W. E.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A. K.; AVILA, A. C. First report on natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis tospovirus* in cucumber and *Chrysanthemum stem necrosis tospovirus* on tomato in Brazil. **Plant Disease**, v. 82, n. 12, p. 143. Dec. 1998.

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

NASCIMENTO, I. R. dos.; SANTOS, L. B. dos.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, G. R. dos.; AGUIAR, R. W.S.; MALUF, W. R. GILBERTO IRIS SOUZA DE OLIVEIRA, G. I. S. DE. Identificação molecular de espécies de vírus e reação fenotípica de famílias de melancia a um isolado do vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia (*Papaya ringspot virus – strain watermelon - PRSV-W*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 1: p. 22-29, 2011.

NELSON, M.R.; ALLEN, R. M.; TUTTLE, D.M. Distribution, prevalence and importance of some cantaloup virus disease in Southwestern Arizona. **Plant Disease Reporter**, v. 46, p. 667-672, 1962.

NOLAN, P.A.; CAMPBELL, R.N. *Squash mosaic virus* detection in individual seeds and seed lots of cucurbits by Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay. **Plant Disease**, v.68, p.971-975, 1984.

OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J.A.A.; VALE, C.C. & PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 628-636, 2000.

ORTH, C. F. **Perfil Exportador de Melões Brasileiros**. Apex Brasil, 2014.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M. J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber mosaic virus*. **Advances in Virus Research**, v.41, n.2, p.281-341, 1992.

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*) e Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p.84-85. 1989.

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

PINTO, Z. V. **Efeito da origem dos isolados do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e da presença de dois potyvirus na transmissão do CMV para abobrinha de moita por meio de duas espécies de afídeos**. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

POLTRONIERI, L.S.; NOVAES, Q. S.; DIAS, P. R.; REZENDE, J. A. M.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; KITAJIMA, E. W. Constatação do *Zucchini yellow mosaic virus* em cucurbitáceas no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira** (Impresso) (Cessou em 2007. Cont. ISSN 1982-5676 **Tropical Plant Pathology** (Impresso)), Brasília, v. 25, n.4, p. 667, 2000.

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

PURCIFULL, D. E.; EDWARDSON, J. R.; HIEBERT, E.; GONÇALVES, D. *Papaya ringspot virus* (revised) Nº 292 In: Descriptions of plant viruses. CMI/AAB, Kew, Surrey, England, 1984.

RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de *potyvirus* em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.1999-203. 2003.

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

RODRIGUES, A. M. **Ocorrência, distribuição e diagnose de viroses associadas à cultura da melancia no estado do Tocantins**. 2011. (Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins): Gurupi, Tocantins, 2011.

ROMANO, C. M.; STUMPF, R.T; BARBIERI, R. L; BEVILAQUA, G. A.P; RODRIGUES, W.F. **Polinização Manual e Abóboras**. Documentos, 225, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

SASU, M. A.; FERRARI, M. J.; DU, D; WINSOR, J. A.; STEPHENSON, A.G. Indirect costs of a non target pathogen mitigate the direct benefits of a virus-resistant transgene in wild *Cucurbita*. China. **PNAS**, vol. 106, n. 45, p. 19067–19071, 2009.

SANTOS, V. C. dos. **Caracterização de resistência da moranga (*Cucurbita maxima*) “Exposição” ao *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e da não interferência de dois potyvirus na resistência das plantas**. 2011. 57f. Dissertação de mestrado-Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2011.

SECRETARIA DE ESTADO E AGRICULTURA (SAGRI, 2013). Disponível em <<http://www.sagri.pa.gov.br>>, acessado em 16/09/2013.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. *The Potyviridae*. **CAB International Wallingford, England**. p. 516, 1994.

SILVEIRA, L.M.; LIMA, J. A.A.; ALINE, K. Q.; NASCIMENTO; LIMA NETO, A. K. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, 2, p.123-126, 2008.

SILVEIRA, L. M.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, J. A. A.; NUNES, G. H. S.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA NETO. I. S. Herança da resistência a *Watermelon mosaic virus* em melancia. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n.4, p. 530-537, jul/ago, 2014.

SOUZA, T.; LIMA, M. F.; AMARO, G. B. Avaliação da incidência de cinco vírus em genótipos de abóboras e morangas (*cucurbita* spp.), em experimento a campo. **III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças**, 10 e 11 de junho, Embrapa Hortaliças, DF, 2013.

SPADOTTI, D. M. A. **Caracterização biológica, sorológica e molecular de isolados brasileiros do vírus do mosaico amarelo da abobrinha**. 2012. 66p. . Dissertação de mestrado-Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2012.

STANGARLIN, O. S.; DIAS, P. R. P.; BURIOLLA, J. R.; RESENDE, J. A. M.; Incidência de vírus em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e pepino na região de Dourados/MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 523, 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.L. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121, 2007.

TAVARES, A. T.; CHAVES, P. P. N.; AGUIAR, R. W. S.; SANTOS, M. F.; SARMENTO, R. A.; NASCIMENTO. I. R. Phenotypic response of pumpkin and melon plants to infection by simple isolates of ZYMV and mixed ZYMV+SQMV. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Vol. 5, n.1: p. 79-87, February, 2014.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TSUNG LIN, Y.; JAN, F.J.L.I.; CHIEN-HUNG CHUNG, C. C.W.; JO-CHU CHEN, J.C.; SHY-DONG YEH, S.D.; MEI KU, H. Differential Gene Expression in Response to Papaya ringspot virus Infection in *Cucumis metuliferus* Using cDNA- Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. Taiwan, **Plos One**, v. 8, n. 7, 2013.

WHITAKER, T.W.; ROBINSON, R. W. Squash Breeding. In: Basset, M.J. (Ed.) **Breeding Vegetable Crops**. Wesport: Avi, p.209-246, 1986.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FARCQUET, C.M.; BISHOP, D. H. C.; CARTENS, E. B.;ESTER, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MC GEOCH, D. J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. Virus taxonomy: classification an nomenclature of virus. San Diego, **Academic Press**, p.1162, 2000.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos 7 isoaldos de PRSV-w.

>PRSV-WBR_PA5

TTTTGGTTTGGTGTATAGAGAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTT
ATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATG
CTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCATTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATA
CATCGCAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAG
AAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATT
CRAAAACACCTGATAGGGGTCGCGAAAGTCACATTGTTATGAAAGCCCCAACAA
A

>PRSV-WBR_PA7

TTTTGGTTTGGTGTATAGAGAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTT
ATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATG
CTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCATTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATA
CATCGCAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAG
AAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATT
CRAAAACACCTGATAGGGGTCGCGAAAGTCACATTGTTATGAAAGCCCCAACAA
A

>PRSV-WBR_PA8

TTTGGTATGGTGTATAGAGAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTT
ATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATG
CTACTCCATCATTTAGGCAAATTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGCGTA
CATTGCAAAGAGAAATGCCACCGAAAGGTACATGCCGCGATATGGAATCAAGAG
AAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGGGAATT
CGAAAACACCTGATAGGGGTCGTGAAGCTCATATGCAAATGAAAGCCGCAGCAA

>PRSV-WBR_PA9

TTTTGGTATGGTGTATAGAAAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTT
ATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATG
CAACTCCGTCGTTTCGGCAAATTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATA
CATTGCAAAGCGAAATGCCACCGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAG
AAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATT
CGAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAGCGCCAGCAA

>PRSV-WBR_PA10

TTGGTATGGTGTATAGAGAACGGTACATCCCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTA
TGATGGATGGGGAAAACCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATGC
TACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCATTTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATAC
ATCGCAAAGAGAAATGCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGA
AATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTC
CAAAACGCCTGATAGGGCTCGCGAAGCGCACATGCAGATGAAAGCCGCAGCAA

>PRSV-WBR_PA11

TTTTGGTTTGGTGTATAGAGAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTT
ATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTGATTGAGCATG
CCACTCCGTCGTTTAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATA
CATAGCAAAGAGAAATGCCACCGAGAGATATATGCCGCGGTATGGAATCAAGAG
AAATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATATGCTTTTGATTTCTATGAGGTGAATC
GAAAACACCTGATACGGCCCAGGC

>PRSV-WBR_PA12

TTGGTATGGTGTATAGAGAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTA
TGATGGATGGAGAAACCCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATGC
TAATCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCATTTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATAC
ATTGCAAAGAGAAATTCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGA
AATTTAACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTC
GAAACTCTTGATTTGGACCCGCTAGTTT

>PRSV-WBR_PA5

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIAK
RN ATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRGRESHIVMKA

>PRSV-WBR_PA7

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIAK
RNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRGRESHIVMKAPTX

>PRSV-WBR_PA8

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIAK
RNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEGNSKTPDRAREAHMQMKAAAX

>PRSV-WBR_PA9

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIAK
RNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHMQMKAPAX

>PRSV-WBR_PA10

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGENQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIA
KRN ATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRAREAHMQMKAAA

>PRSV-WBR_PA11

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYIAK
RNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNRKHLIRPR

>PRSV-WBR_PA12

LVWCIENGTSPPDISGVWVMMDGETQVDYPIKPLIEHANPSFRQIMAHFSNAAEAYIA
KRNSTERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKLLIWTRF

APÊNDICE B- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos 7 isoaldos de ZYMV

>ZYMV_PA_1

AGGRTTATGATGGACGGGMATGAGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTC
GAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGACAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCG
GAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGT
TTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTTGGCACGATATGCTTTTGACTTTTACGA
AGTCAATTCCAAAACCTCTGAAAGAGCCCGTGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGC
AGCAGCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGCCA
CCACTAGCGAAGACACTGAACGGCATACTGCACGTGATGTTAATAGAAACATGC
ACACTTTACTAGGTGTGAATACAATGCAGTAAAGGGTAGGCCGCCTACCTAGGTT
ATCGCTTCGCTGCCGACGTAATTCTAATATTTACCGCTTTATTTGATATCTTAGAT
TTCTAGAGTGGGCCTCCACCTTTAAAGCGTAAAGTTTATGTTAGTTGTCCAGGA
GTGGCGTAGTCCTGTGCGGAAGCTTTAGTGTGAGCCTCTCACGAACAAGCTCGAGA
TTAGACTCCGTTTCCAAGCCYAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>ZYMV_PA_2

GTTACCGTAAATTAACGGGAGCATGGGTTATGATGGACGGGAATGAGCAGGTTG
AATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGACAAATAAT
GCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAGAGGC
ACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTTGGCA
CGATATGCTTTTGACTTCTACGAAGTCAACTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCCGCG
AAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTT
TGGCCTTGATGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCA
CGTGATGTTAATAGGAACATGCACACTTTGCTAGGTGTGAATACAATGCAGTAAA
GGGTGGGTGCGCTACCTAGGTTATCGCTTCGCTGCCGACGTAATTCTAATGTTTAC
CGCTTTATGTGATGTCTTTAGATTTCTAGAGTGGGCCTCCACCTTTAAAGCGTAA
AGTTTATGTTAGTTGTCCAGGAGTGCCGTAGTCCTGTGCGGAAGCTTTAGTGTGAG
CCTCTCACGTATAAGCTCGAGATTAGACTCCGTTTGCAAGCCCCAAAAAAAAAAAA
AAAAA

>ZYMV_PA_3

GGCCCTTAAATTATGGGAGTATGGGTATGATGGACGGGAATGAGCAGGTTGAAT
 ATCCTTTGAAACCAATAGTCGAAAATGCAAAGCCAACGCTGCGACAAATAATGC
 ATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGCAGAGGCAC
 CATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTTTGGCACG
 ATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTCAATTCCAAAACCTCCGGAAAGAGCCCGTGAA
 GCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTCAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTTTCG
 GCCTTGACGGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCAC
 GTGATGTTAATAGGAACATGCACACCTTGTTAGGTGTGAATACAATGCAGTAAAG
 GGTAGGTCGCCTACCTAGGTTATCGTTTCGCTGCCGACGTAATTCTAATATTTACC
 GCTTTATGTGATGTCTTTAGATTTCTAGAGTGGGCCTCCACCTTTAAAGCGTACA
 GTTTATGTTAGTTGTCCAGGAGTGCCGTAGTCCTGTGCGGAAGCTTTAGTGTGAGCC
 TCTCACGAATAAGCTCGAGATTAGACTCCGTTTGCAAGCCGAAAAAAAAAAAAAA
 AAAA

>ZYMV_PA_1

MMDGXEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPRYGLLRN
 LRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGLDGNVATTSED
 TERHTARD VNRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV_PA_2

LTGAWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPYMPR
 YGLLRNLRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGLDGNV
 ATTSEDTE RHTARDVNRNMHTLLGVNTMQ

>ZYMV_PA_3

GPIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNAEAPY
 MPRYGLLRNLRDRSLARYAFDFYEVNSKTPERAREAVAQMKAALSNVSSRLFGLD
 GNVATTSE DTERHTARDVNRNMHTLLGVNTMQ

APÊNDICE C- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial dos 7 isoaldos de WMV

>WMV_PA

TTTTGGTTGGTGATGAAAGGTACATCTCCAGATGTTAATGGAGTTTGGGTGATGA
TGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAGTACCCATTAAAGCCAATTGTCGAAAATGCAA
AGCCAACTTTGAGGCAAATCATGCACCATTTTTTCAGACGCAGCAGAAGCATATAT
TGAGATGAGAACTCTGAAAGTCCGTATATGCCTAGATACGGATTACTAAGAAAT
TTGAGAGACAGGGAATTAGCACGTTATGCTTTTGACTTCTATGAGGTACTCTAAA
ACACCAAACGGCA

>WMV_PA

WLVMKGTSPDVNGVWVMMDGEEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIE
MRNSE SPYMPRYGLLRNLRDRELARYAFDFYEV