

Ludiana Canton

**ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR
EM CULTIVARES DE ABOBRINHA INFECTADAS POR PRSV**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de mestre em Ciências.
Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
Através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Canton, Ludiana

ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
E QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR EM CULTIVARES DE
ABOBRINHA INFECTADAS POR PRSV / Ludiana Canton ;
orientador, Robson Marcelo Di Piero, 2018.
107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Papaya
ringspot virus - type Watermelon. 3. Alterações
metabólicas. 4. Enzimas antioxidantes. 5. RT-qPCR.
I. Marcelo Di Piero, Robson. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Ludiana Canton

**ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR
EM CULTIVARES DE ABOBRINHA INFECTADAS POR PRSV**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa Recursos
Genéticos Vegetais

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018.

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Robson Marcelo Di Piero, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marciel João Stadnik, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jorge Alberto Marques Rezende, Dr.
Escola Superior de Agricultura “Luiz de queiroz”
Universidade de São Paulo

*Com amor, aos meus
queridos pais,
Ivair Canton e Elizete
Brustolin Canton
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pelos meus dons.

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelo conhecimento repassado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo apoio financeiro;

Ao professor e amigo Dr. Robson Marcelo Di Piero, pelos ensinamentos, pela dedicação, paciência, e principalmente, pela confiança;

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende que disponibilizou o isolado do PRSV-W e abriu as portas para os trabalhos realizados na ESALQ além de participar desde o princípio do percurso para chegar até aqui;

Aos professores Dr. Marciel João Stadnik, Dr.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi e ao Dr. Jorge Alberto Marques Rezende que aceitaram participar da banca examinadora;

À minha família, meus queridos pais Ivair e Elizete, por me ensinarem a caminhar, pelo exemplo de vida e meus valores, por cada gota de suor derramada na agricultura para a realização dos meus sonhos. Por me ensinarem a agronomia. À minha irmã Leila Cristina Canton pelos cuidados e exemplo de superação e humildade;

Aos bravos e corajosos amigos que o mestrado me deu, David Marques de Almeida Spadotti e Tiago Camponogara Tomazetti, que encararam comigo o desafio das análises de ELISA e RT-qPCR até altas horas da madrugada;

Ao IC Eduardo Gainete, que me acompanhou na jornada e me ajudou com as coletas, irrigações, enzimas, etc.

Ao Mateus Brusco de Freitas e Caroline Luiz por me ensinarem as enzimas e trabalhar no leitor de microplacas;

Ao meu querido Cledimar Rogério Lourenzi pela amizade, pelos mates e prozas, pela ajuda na estatística, gráficos e planejamento.

Ao LabFitop pela amizade construída nessa jornada, querido Argus pelas conversas, aos mestrandos Bruna e Paulo pelo percurso, Juliana, as doutorandas Aline, Tarsis, Zamira, Juliane e Josiane, aos IC Camila, Rafael, Júlia e Paula.

À minha amiga Uruguaia Eloisa Arrarte, por ter me recebido em sua casa durante o intercâmbio na UDELAR e me apresentado o seu lindo país.

Aos amados amigos Marlon Cristiano de Borba e Luiza Giacomolli Polesi pelas ajudas, pela culinária, pelas festas, pelas caminhadas, pelo ombro amigo e por acompanharem a minha jornada.

A todos que de alguma maneira contribuíram para minha formação e superação dos obstáculos para que fosse possível chegar até aqui! Meu muito obrigada.

*"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo
dos céus:
tempo para nascer, e tempo para morrer; tempo para plantar, e tempo
para arrancar o que foi plantado; [...] tempo para chorar, e tempo para rir; [...], tempo para dar abraços, e
tempo para apartar-se.
Tempo para procurar, e tempo para perder; tempo para guardar, e
tempo para jogar fora;
tempo para rasgar, e tempo para costurar; tempo para calar, e tempo
para falar;
tempo para amar, e tempo para odiar; [...] Que proveito tira o trabalhador de sua obra?
todas as coisas que Deus fez são boas, a seu tempo. [...] Aquilo que é, já existia, e aquilo que há de ser, já existiu; Deus
chama de novo o que passou. [...].
Todos caminham para um mesmo lugar, todos saem do pó e para o
pó voltam. [...] E verifiquei que nada há de melhor para o homem do que alegrar-se
com o fruto de seus trabalhos. Esta é a parte que lhe toca. Pois, quem
lhe dará a conhecer o que acontecerá com o volver dos anos?"*

(Eclesiastes, 3: 1-22)



RESUMO

Cucurbita pepo representa uma das mais importantes espécies dentro da família das Cucurbitáceas. Embora essas plantas encontrem clima muito favorável na maior parte das regiões brasileiras, as doenças, principalmente as de etiologia viral, surgem como fator limitante para o crescimento e reduzem substancialmente a produtividade dessa família. Dentre os vírus de maior ocorrência em regiões produtoras está o *Papaya ringspot virus* – type Watermelon (PRSV-W). Os vírus colonizam sistemicamente as plantas, o que pode resultar em diferentes respostas fisiopatológicas. A replicação viral e o desenvolvimento da doença podem promover alterações envolvendo componentes enzimáticos relacionados à defesa, como as enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD). O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações que ocorrem no metabolismo (atividade de enzimas antioxidantes) de duas cultivares de abobrinha de moite (*Cucurbita pepo*) infectadas por PRSV-W e determinar o título viral ao longo da evolução da doença. O PRSV-W promoveu aumento na atividade de todas as enzimas estudadas, principalmente na cultivar Caserta, o que sugere que esta cultivar, por ser suscetível ao vírus, precisa de maior atividade enzimática para reduzir o efeito das EROs e na tentativa de eliminar o vírus. Comparando-se as cultivares, a atividade das enzimas GPX e GR na cultivar Adele (resistente) aumentou antes do que na Caserta (susceptível) nas folhas inoculadas (mais novas). A nível sistêmico, todas as enzimas apresentam maior atividade na Caserta, com exceção à APX. As cultivares não se diferenciaram quanto à concentração viral nas folhas inoculadas, entretanto, sistemicamente, a carga viral foi 5 vezes maior na cultivar suscetível. Com o passar do tempo, ocorreu estabilização da carga viral em Caserta aos 12 dias após a inoculação, já para a Adele, esta estabilização ocorreu mais tarde, após 20 dias da inoculação. O fato da Adele ter uma resposta mais rápida à infecção viral poderia contribuir para a redução da carga viral nesta cultivar. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a Adele apresenta resistência à replicação do vírus nas folhas novas.

Palavras-chave: PRSV-W; alterações metabólicas; quantificação relativa (RT-qPCR).

ABSTRACT

Cucurbita pepo represents one of the most important and diverse species within the Cucurbitaceae family. Although these plants find a very favorable climate in most Brazilian regions, diseases, especially those of viral etiology, appear as a limiting factor for growth and substantially reduce the productivity of cucurbitaceae. The *Papaya ringspot virus* - type Watermelon (PRSV-W) is the virus with higher occurrence in producing regions. Viruses systemically colonize plants, which may result in different pathophysiological responses. Viral replication and disease development may promote changes involving defense-related enzymatic components such as ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD). The objective of the present study was to evaluate the alterations that occur in the metabolism (antioxidant enzyme activity) of two cultivars of zucchini (*Cucurbita pepo*) infected by PRSV-W and to determine the relative amount of viral load throughout the evolution of the disease. The activity of the GPX and GR enzymes in the Adele (resistant) cultivar increases earlier than in Caserta (susceptible) in inoculated leaves. At the systemic level, all the enzymes present greater activity in Caserta, except for the APX, which has higher activity in Adele in most of the evaluated times. The cultivars did not differentiate as to the viral concentration in the inoculated leaves, however, systemically, the viral load was 5 times higher in the susceptible cultivar than in the resistant cultivar. Over time, stabilization of the viral load occurred in Caserta at 12 days after inoculation, for Adele, this stabilization occurred later, after 20 days of inoculation. The fact that Adele has a rapid response to the viral infection from the beginning may contribute to the reduction of viral load in this cultivar. Through the results, it is suggested that Adele presents resistance to virus replication in younger leaves.

Keywords: PRSV-W; metabolic alterations; relative quantification (RT-qPCR).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Escala de notas dos sintomas das plantas infectadas com PRSV-W. (0) sem mosaico, sem deformação e sem bolhas; (1) mosaico leve, sem deformação e sem bolhas; (2) mosaico, deformação e leve aparência de bolhas; (3) mosaico severo, deformação e bolhas. ... 43

Figura 2 - Folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele (a) e Caserta (b) com sintomas de PRSV-W, aos 30 dias após inoculação. ... 50

Figura 3 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local). 52

Figura 4 - Atividade da enzima catalase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local). 54

Figura 5 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local). 56

Figura 6 - Atividade da enzima glutationa redutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local). 58

Figura 7 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local). 60

Figura 8 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI). 62

Figura 9 - Atividade da enzima catalase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas

mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).....64

Figura 10 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).66

Figura 11 - Atividade da enzima glutatona redutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).....68

Figura 12 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).70

Figura 13 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).72

Figura 14 - Atividade da enzima catalase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).74

Figura 15 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).76

Figura 16 - Atividade da enzima glutatona redutase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares

apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico)..... 78

Figura 17 - Atividade da enzima superóxido dismutase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico). 80

Figura 18 - Quantidade relativa de carga viral em duas cultivares de *Cucurbita pepo*, Adele e Caserta, infectadas com PRSV-W. As análises foram realizadas através de RTq-PCR em folhas inoculadas com o vírus (efeito local) ou sistemicamente. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers desenhados para a quantificação de PRSV-W através de RT-qPCR de em <i>Cucurbita. pepo</i>	47
Tabela 2 - Resultado da avaliação dos sintomas (severidade) e da incidência de PRSV-W em duas cultivares de abobrinha inoculadas mecanicamente.	49
Tabela 3 - Resultado da avaliação dos sintomas (severidade) e da incidência de PRSV-W em duas cultivares de abobrinha inoculadas mecanicamente.	71
Tabela 4 - Resumo das alterações no metabolismo de enzimas antioxidantes promovidas por PRSV-W em folhas inoculadas (efeito local) ou sistemicamente, em duas cultivares de abobrinha.....	81
Tabela 5 - Comparação de duas cultivares de abobrinha, Adele e Caserta, com relação às atividades de enzimas antioxidantes, em plantas infectadas com PRSV-W, em folhas inoculadas (efeito local) ou sistemicamente.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APX – Ascorbato peroxidase;
CAT – Catalase;
CMV - *Cucumber mosaic virus*;
CTV - *Citrus tristeza virus*;
CVYV - *Cucumber vein yellowing virus*;
DAI – Dias após a inoculação;
DHA – Ácido docosa-hexaenóico;
DHAR - Dehidroascorbate redutase;
DO – Densidade óptica;
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*;
EROs – Espécies reativas de oxigênio;
GPX – Guaiacol peroxidase;
GR – Glutaciona redutase;
GSSG - Glutaciona oxidada;
GSH - Glutaciona reduzida;
GST - Glutaciona S-transferase;
MDMV - *Maize dwarf mosaic virus*;
MDHAR - Monodehidroascorbate redutase;
NADPH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato;
PLRV - *Potato leafroll*;
PRSV-W – *Papaya ringspot virus – type watermelon*;
PPV - *Plum pox virus*
PVY - *Potato virus Y*;
RT-qPCR - *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*;
SOD – Superóxido dismutase;
TMV - *Tobacco mosaic virus*;
WMV – 1 – *Watermelon mosaic virus – 1*;
WMV – 2 – *Watermelon mosaic virus – 2*;
ZYMV - *Zucchini yellow mosaic virus*;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	27
1.1	OBJETIVOS	30
1.1.1	Objetivo geral	30
1.1.2	Objetivo específico	30
1.2	HIPÓTESE	30
2	CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	A CULTURA DA ABOBRINHA (<i>Cucurbita pepo</i>)	31
2.1.1	Características taxonômicas	31
2.1.2	História e importância econômica	31
2.1.3	Doenças viróticas com importância para a cultura	32
2.2	ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE DEFESA DAS PLANTAS PROMOVIDAS PELO ATAQUE DE PATÓGENOS	35
3	CAPÍTULO 2. ATIVIDADE METABÓLICA E EVOLUÇÃO DO TÍTULO VIRAL EM DUAS CULTIVARES DE ABOBRINHA INFECTADAS POR PRSV-W	39
3.1	INTRODUÇÃO	39
3.2	METODOLOGIA	41
3.2.1	Local de condução e obtenção das plantas	41
3.2.2	Obtenção, manutenção e inoculação mecânica do vírus ..	41
3.2.3	Teste sorológico de PTA-ELISA	42
3.2.4	Escala de notas de sintomas	43
3.2.5	Determinação da atividade de enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha	44
3.2.5.1	Preparo do extrato para determinação da atividade enzimática	44
3.2.5.2	Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)	44
3.2.5.3	Determinação da catalase (CAT)	45
3.2.5.4	Determinação da glutatona redutase (GR)	45
3.2.5.5	Determinação da guaiacol peroxidase (GPX)	45
3.2.5.6	Determinação da superóxido dismutase (SOD)	46

3.2.5.7	Dosagem de proteínas totais	46
3.2.5.8	Detecção e quantificação de PRSV-W por RT-qPCR	47
3.2.6	Análises estatísticas	49
3.3	RESULTADOS.....	49
3.3.1	Primeiro experimento	49
3.3.1.1	Teste serológico de PTA-ELISA	49
<i>Determinação da atividade das enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha</i>		51
<i>Efeito Local</i>		51
3.3.1.2	Atividade da ascorbato peroxidase (APX).....	51
3.3.1.3	Atividade da catalase (CAT).....	53
3.3.1.4	Atividade da guaiacol peroxidase (GPX).....	55
3.3.1.5	Atividade da glutathione redutase (GR).....	57
3.3.1.6	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	59
<i>Efeito local versus sistêmico</i>		61
3.3.1.7	Atividade da ascorbato peroxidase (APX).....	61
3.3.1.8	Atividade da catalase (CAT).....	63
3.3.1.9	Atividade da g uaiacol peroxidase (GPX)	65
3.3.1.10	Atividade da glutathione redutase (GR).....	67
3.3.1.11	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	69
3.3.2	Segundo experimento.....	71
3.3.2.1	Teste serológico de PTA-ELISA	71
<i>Determinação da atividade das enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha</i>		71
3.3.2.2	Atividade da ascorbato peroxidase (APX).....	71
3.3.2.3	Atividade da catalase (CAT).....	73
3.3.2.4	Atividade da guaiacol peroxidase (GPX).....	75
3.3.2.5	Determinação da glutathione redutase (GR).....	77
3.3.2.6	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	79

Resumo dos resultados	81
3.3.3 Avaliação do título viral em cultivares resistente e suscetível de <i>Cucurbita pepo</i> por meio de RT-qPCR.....	83
3.4 DISCUSSÃO.....	85
3.4.1 Alterações locais e sistêmicas no metabolismo de plantas de <i>Cucurbita pepo</i> infectadas com PRSV-W	85
3.4.2 Sintomas e título viral em duas cultivares de abobrinha com diferentes níveis de resistência ao PRSV-W.....	91
3.5 CONCLUSÃO	94
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

Plantas da família Cucurbitaceae apresentam uma grande gama de características de frutos e são cultivadas em todo o mundo em diferentes condições ambientais. Esta família, uma das maiores e mais diversas dentro do Reino Vegetal, contém as primeiras espécies de plantas domesticadas tanto no Antigo como no Novo Mundo (BISOGNIN, 2002). No Brasil, representa importante fonte alimentar e econômica tanto para os pequenos quanto para os grandes produtores, além de ser responsável pela geração de emprego, renda e permanência do homem no campo (ZHAO et al., 2014).

A abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) é uma das espécies mais importantes dessa família (FERREIRA et al., 2006). Apresenta uma alta variabilidade (PARIS, 2001), responsável por uma grande diversificação de nomes como abóbora estrela, abóbora italiana, zuchetti, mogango e abóbora de coco (HEIDEN et al., 2007). No Brasil, os agricultores ainda mantêm suas variedades crioulas de abóboras realizando a conservação *in situ/on farm* e, nesse aspecto, a região Sul ganha destaque em comparação às demais regiões brasileiras e os agricultores atuam como guardiões das sementes (BARBIERI, 2012).

Embora encontrem clima muito favorável na maior parte das regiões brasileiras, as cucurbitáceas são acometidas por patógenos que limitam o seu desenvolvimento. Dentre os agentes causadores das doenças, diferentes vírus são reportados em todo o mundo (ZITTER et al., 1996) causando grandes problemas e podendo reduzir substancialmente a produtividade das cucurbitáceas. As infecções causadas por estes vírus podem ser isoladas ou mistas e são encontradas com relativa frequência em condições naturais (CARDOSO & PAVAN, 2013).

Os vírus da família Potyviridae, do gênero *Potyvirus*, como o *Papaya ringspot virus* – type Watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) estão presentes no mundo todo e são responsáveis pela queda na produção de melão, pepino, melancia e abóboras (LECOQ et al., 1998). Esses três vírus e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) são transmitidos por afídeos de maneira não persistente e dentre eles, o mais frequentemente detectado nas lavouras de cucurbitáceas é o PRSV-W (MOLNAR & SCHMELZER, 1964; LIMA, 2011). Pela dificuldade em serem controladas e pelos prejuízos ocasionados, as viroses são consideradas o objetivo mais importante do melhoramento genético de *Cucurbita pepo* (WHITAKER & ROBINSON, 1986).

O PRSV-W é o vírus de maior frequência e importância para as cucurbitáceas no Brasil, causando reduções qualitativas e quantitativas, podendo ser fator limitante para a produção e causar perdas de 100%. As perdas ocorrem independente do estágio em que a planta é infectada, mas são mais acentuadas em infecções nos estágios iniciais. Plantas de *C. pepo* infectadas com o vírus apresentam sintomas de mosaico, atrofia, distorção e estreitamento da lâmina foliar que fica reduzida às nervuras principais, folhas que apresentam bolhas e os frutos, além da má formação, ficam com a coloração alterada. Não existem produtos viricidas, por isso são recomendadas medidas preventivas como o manejo de pragas, (principalmente vetores da família Aphididae), a escolha do local e época de plantio (evitando semear próximo ou em sequência a outras cucurbitáceas), a eliminação de daninhas, a rotação de culturas, entre outras (LIMA, 2001; KUROSAWA et al., 2005).

Diversos métodos podem ser empregados para avaliar a infecção viral, desde a indexação biológica, a qual usa plantas indicadoras de acordo com o vírus a ser identificado, testes sorológicos como por exemplo o *Western blot* e ELISA, que utilizam anticorpos específicos para cada vírus capazes de reconhecer proteínas capsidiais, até o uso de métodos mais sofisticados como é o caso de RT-qPCR, o qual amplifica e detecta o RNA do vírus (ou DNA usando apenas PCR) em amostras vegetais infectadas (FAJARDO & NICKEL, 2015). Essas técnicas são muito úteis para a determinação da presença de vírus em plantas e são ferramentas fundamentais inclusive para o melhoramento genético.

A RT-qPCR possui diversas aplicações não só na quantificação viral, mas também na quantificação da expressão gênica, detecção de agentes patogênicos, quantificação de danos no DNA, certificações, etc. A técnica permite rapidez no diagnóstico com alta sensibilidade analítica e de diagnose com mínimos riscos de contaminação, além de não necessitar visualizar o resultado em gel de agarose (YEH et al., 2009; OLIVEIRA, 2010; FONSECA JÚNIOR, 2013).

Um dos pontos recorrentes nos estudos relacionados à virologia é a padronização de termos usados pelos autores. Uma planta imune a um determinado vírus é aquela que não é sua hospedeira e não pode ser infectada. De fato, a maioria das espécies de plantas são imunes à infecção pela maioria dos vírus (COOPER & JONES, 1983; WALKEY, 1991; HULL, 2014). De acordo com Cooper & Jones (1983), uma planta pode ser imune à infecção viral (não ser infectada) ou ser infectável, podendo ser resistente ou suscetível. Uma planta suscetível é aquela que o vírus infecta e se multiplica em seu interior (WALKEY, 1991). Por outro lado, a resistência pode ser quanto à infecção,

replicação e/ou invasão sistêmica do vírus. Tanto as plantas resistentes quanto as suscetíveis podem ser tolerantes ou sensíveis à doença. Na tolerância, ocorre a ausência de sintomas, ou se presentes, são pouco aparentes. Por outro lado, a sensibilidade ao vírus faz com que a planta apresente sintomas severos (COOPER & JONES, 1983).

A planta hospedeira pode ser resistente a partir do estabelecimento do vírus, restringindo sua multiplicação ou o movimento viral. Alguns mecanismos da resistência ainda não são claramente conhecidos, mas além da resistência bioquímica, existe a estrutural, em que as próprias barreiras físicas da planta interferem e dificultam a picada de vetores e uma posterior entrada do vírus, como por exemplo, a espessura da cutícula da folha ou a quantidade de pêlos epidérmicos (WALKEY, 1991).

O movimento sistêmico de um vírus pode ser retardado ou até impedido em algumas plantas como ocorre com o vírus Y em algumas cultivares de batata (PVY) (BEEMSTER, 1972) e com o vírus *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) em algumas cultivares de milho (JONES & TOLIN, 1972).

Independentemente do tipo de relação estabelecida entre uma planta e os patógenos, existem mecanismos usados pelos vegetais para se defenderem. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma das primeiras respostas das plantas quando em condição de estresse, seja ele abiótico ou biótico, mas podem causar danos à estrutura celular. Plantas infectadas com vírus, assim como diferentes patógenos, também produzem as EROs. Os primeiros estudos foram realizados por Doke (1983) e Doke & Ohashi (1988) com o vírus do mosaico do fumo (TMV) em que, quando infectadas, as plantas apresentavam produção de O_2^- (RESENDE et al., 2003).

Para que as EROs não danifiquem o sistema celular vegetal, a ponto de causar colapso, a planta ativa componentes antioxidantes do seu sistema de defesa, o qual envolve enzimas como ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), guaiacol peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), dentre outras.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar alterações no metabolismo antioxidante em duas cultivares de abobrinha infectadas pelo PRSV-W, avaliar os sintomas do vírus e quantificar a carga viral em ambas as cultivares.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações que ocorrem no metabolismo (atividade de enzimas antioxidantes) de duas cultivares de abobrinha (*Cucurbita pepo*) infectadas por PRSV-W e determinar a quantidade relativa da carga viral ao longo da evolução da doença.

1.1.2 Objetivo específico

- ✓ Avaliar alterações nas atividades enzimáticas de uma cultivar suscetível (Caserta) e outra resistente (Adele) ao PRSV-W, no local da infecção e sistemicamente;
- ✓ Verificar a correlação dos sintomas causados pelo vírus com a quantificação relativa da carga viral através de RT-qPCR;
- ✓ Observar o comportamento enzimático ao longo do estabelecimento do PRSV-W nas duas cultivares estudadas.

1.2 HIPÓTESE

Plantas infectadas por PRSV-W possuem maior atividade metabólica do que plantas sadias e, quanto mais suscetível a cultivar, alterações mais intensas ocorrem no metabolismo de defesa, por haver maior carga viral.

2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA ABOBRINHA (*Cucurbita pepo*)

2.1.1 Características taxonômicas

De ciclo anual, a abobrinha italiana (*Cucurbita pepo*) apresenta folhas frequentemente com manchas e acúleos, possui profundos recortes e ápice agudo, caule duro, anguloso e com presença de acúleos. As flores possuem androceu curto e espessado, os frutos contêm pedúnculo, possuem polpa branca, amarelada ou alaranjada. As sementes são de coloração branca a marrom-claro, superfície lisa e possuem porção mediana achatada com cicatriz reta ou arredondada no funículo (HEIDEN et al., 2007).

2.1.2 História e importância econômica

A abóbora pertence à família Cucurbitaceae, que é predominantemente tropical e possui aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies (TEPPNER, 2004). Já era cultivada nas Américas (região nordeste do México) há 2000 a.C.. Possivelmente, a palatabilidade das sementes foi um aspecto importante para que a cultura ganhasse relevância e fosse atrativa para os índios americanos que foram os coletores e domesticadores da espécie (HARLAN, 1975; NEE, 1990). É provável que a parte carnosa das abóboras se tornou fonte de alimentação apenas após o início da domesticação, a qual consistiu em reduzir a fibra resistente, a espessura e retenção de umidade (WHITAKER & CUTLER, 1965). No Brasil, os indígenas já cultivavam e consumiam espécies do gênero *Cucurbita* antes mesmo da sua colonização (FERREIRA, 2007).

O Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEM) em Brasília mantém em sua coleção de germoplasma 1.411 acessos de *Cucurbita*. A abóbora (*C. moschata*), a moranga (*C. maxima*) e a abobrinha italiana (*C. pepo*) são as espécies que apresentam maior importância e possuem elevadas concentrações de caroteno, ferro, cálcio, magnésio, potássio, fibras e vitaminas B e C principalmente (FERREIRA et al., 2006). As abóboras são muito cultivadas em pequenas propriedades rurais e são utilizadas para alimentação humana, animal e ornamentações. São de fácil armazenamento e alta durabilidade após colhidas (HEIDEN et al., 2007).

Além do valor nutricional, o cultivo das Cucurbitáceas mais especificamente abóboras, tem muita importância tanto social como econômica devido à geração de emprego e renda, pois demanda mão-de-obra desde o cultivo até a comercialização (RESENDE et al., 2013). No Brasil, as abóboras e as morangas ocupam o 7º lugar entre as hortaliças mais cultivadas (MARCELINO & MARCELINO, 2012), encontrando-se na Região Nordeste do país com um mercado bastante difundido para o cultivo das variedades locais de abóbora (HARLAN et al., 1975), o qual é considerada cultivo de subsistência. Bahia, Maranhão e Pernambuco são os maiores produtores desta região, representando aproximadamente 24,1% da produção nacional com 52,3% de toda área plantada (CARMO et al., 2011).

Na região Norte do país, assim como no Nordeste, também é um cultivo de subsistência, mas pode ser considerada uma importante fonte de renda se o objetivo for o comércio local (NASCIMENTO et al., 2012). No estado de São Paulo, devido ao clima, pode-se cultivar a maioria das espécies de *Cucurbita* o ano todo (YUKI et al., 2000).

Embora as cucurbitáceas sejam muito encontradas nas diversas regiões do Brasil, é na Região Sul do país onde se encontra a maior diversidade de *Cucurbita*, e dentro deste gênero, a *C. pepo* possui a maior variabilidade das espécies de abóboras cultivadas e as variedades conhecidas como mogango são as mais encontradas no Rio Grande do Sul (HEIDEN et al., 2007). Devido à pressão da agricultura vista como moderna, que traz a monocultura como padrão de produção, muitos agricultores acabam abandonando o cultivo tradicional das variedades crioulas. Embora a Embrapa Clima Temperado já possua um banco de Germoplasma de Cucurbitáceas do Sul do Brasil, constituído por acessos de cucurbitáceas encontrados nos estados do RS, SC e PR, ainda é necessário muito trabalho para coletar outras variedades que fazem parte da diversidade desta espécie encontradas nesta região (BARBIERI et al., 2012; FISCHER et al., 2016). Contudo, diversos fatores são responsáveis pela redução na produção, entre eles destacam-se as doenças causadas por vírus e fungos (SOARES et al., 2016).

As doenças viróticas são de difícil controle, causando prejuízos quantitativos e qualitativos na produção e são transmitidas por vetores principalmente insetos da família Aphididae (ZITTER et al., 1996).

2.1.3 Doenças viróticas com importância para a cultura

As doenças de etiologia viral são as mais problemáticas na produção de abóboras, dentre elas, as provocadas pelo gênero *Potyvirus*

ganham destaque por serem de difícil controle (LIMA et al., 2002). Os vírus deste gênero que mais causam perdas na produção são o PRSV-W, WMV (*Watermelon mosaic virus*) e o ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*).

No Brasil até 1992 não havia relatos de ZYMV. Após este ano, o vírus foi encontrado nos estados de Santa Catarina, em pepino, e São Paulo, em melancia. Este vírus provoca perdas sérias na cultura do melão e melancia, mas todas as Cucurbitáceas são suscetíveis. As folhas infectadas pelo vírus apresentam mosaico e deformações, além de serem amareladas nas nervuras centrais. As plantas infectadas com o vírus não produzem ou, se produzirem, esta produção estará comprometida com frutos malformados. Por ser da família *Potyviridae* é eficientemente transmitido de maneira não persistente predominantemente por pulgões pertencentes aos gêneros *Aphis* e *Myzus*. O vírus apresenta transmissão mecânica e plantas da família Cucurbitaceae representam fontes de inóculo (KIMATI et al., 1997).

O Mosaico Comum das Cucurbitáceas tinha inicialmente como agente causal o *Watermelon mosaic virus 1* (WMV-1) e, após a caracterização, foi verificado que o vírus consistia de dois tipos diferentes, os quais foram chamados de WMV-1 e WMV-2 (KUROSAWA & PAVAN, 1997; PROVVIDENTI, 1996). O WMV apresenta características similares ao PRSV-W, mas são distintos tanto sorologicamente como na gama de hospedeiros (KIMATI et al., 1997). Atualmente, o WMV-2 é referido como sendo o “verdadeiro” WMV e o WMV-1 é considerado como sendo o *Papaya ringspot virus*- type W (PRSV-W). Enquanto o PRSV-W infecta apenas plantas da família Cucurbitaceae, o WMV infecta a família das Euphorbiaceae, Chenopodiaceae e Poaceae (PROVVIDENTI, 1996).

O WMV é transmitido de maneira não persistente, apresenta transmissão mecânica, mas não é transmitido por sementes. Afídeos como *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* e *Uroleucon ambrosiae* são ótimos transmissores deste vírus (KIMATI et al., 1997). O vírus se distribui em regiões tropicais e ocasionalmente causa epidemias em regiões temperadas (PROVVIDENTI, 1996).

O PRSV-W afeta todas as cucurbitáceas, porém, os danos se acentuam principalmente em *C. pepo* devido a sua alta suscetibilidade. Quando infecta a planta, causa atrofia e sintomas de mosaico, folhas deformadas que apresentam bolhas e os frutos, além da má formação, ficam com a coloração alterada. Ainda, este vírus causa grandes problemas na cultura, uma vez que possui uma eficiente disseminação por diversas espécies de afídeos (mais de 20) de maneira não persistente,

o que dificulta o controle da doença no campo, ocasionando perdas totais na produção (KUROSAWA et al., 2005; REZENDE & PACHECO, 1998). No campo, espécies da família Aphididae são grandes transmissores do vírus (MOLNAR & SCHMELZER, 1964), especialmente *Aphis gossipy* e *Myzus persicae*. O vetor é capaz de adquirir o vírus da planta infectada e transmiti-lo para uma planta sadia durante picadas que duram alguns segundos. Além disso, a alta eficácia deste modo de transmissão permite que a doença possa se propagar de um cultivo a outro sem que se observe a presença de importantes populações de pulgões (BLANCARD et al., 1996). A transmissão ocorre também de maneira mecânica e não existem relatos da sua disseminação por sementes. Em regiões quentes, o PRSV-W sobrevive facilmente em Cucurbitas no campo devido à possibilidade de serem encontradas essas culturas ao longo de todo o ano (BLANCARD et al., 1996; PROVVIDENTI, 1996). Não existe meio curativo para o controle de viroses (CHAVES, 2002). No momento inicial do ataque, pode ser útil a eliminação das plantas sintomáticas. Porém, é importante ressaltar que os sintomas são expressos apenas após um período de incubação compreendido entre uma a duas semanas e, durante este tempo, as plantas podem atuar como fontes do vírus para novas infecções na lavoura. Portanto, quando se observam os primeiros sintomas, a doença pode já estar em fases avançadas (BLANCARD et al., 1996).

O controle através de pulverizações com inseticidas não tem se mostrado eficiente, aumentando ainda mais a incidência da virose devido ao aumento no número de picadas de prova por estes insetos. Os inseticidas não têm tempo de atuar sobre os vetores, uma vez que estes podem vir de fora da lavoura e transmitirem o vírus de maneira muito rápida (KUROSAWA et al., 2005).

Rezende & Muller (1995) destacam que a resistência genética é uma boa estratégia econômica e ambientalmente viável para o controle de viroses. Nascimento et al. (2012) relatam que o processo de desenvolvimento de cultivares resistentes às viroses apresenta grande complexidade pois, o plantio e seleção precisam ser realizados por várias gerações na região onde o genótipo será utilizado. Vieira et al. (2005) destacam ainda a importância desta seleção ser realizada nas épocas mais quentes do ano, onde o clima favorece o aparecimento dos sintomas. Portanto, chegar ao ponto de cultivar resistente não é tarefa fácil e exige anos de trabalho.

Algumas medidas podem ser tomadas no manejo da virose como evitar estabelecer cultivos tardios em proximidade de cultivos mais precoces que podem já estar contaminados, deixar um período de pelo

menos duas semanas sem o plantio de Cucurbitáceas a nível local, ou melhor ainda, a nível regional, para romper o ciclo biológico do vírus (KUROSAWA et al., 2005), empregar mudas certificadas, preferencialmente provenientes de cultivares tolerantes ou resistentes, eliminar ervas daninhas que podem ser hospedeiras de vetores, dentre outras que podem contribuir para evitar a entrada de vírus na lavoura.

2.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE DEFESA DAS PLANTAS PROMOVIDAS PELO ATAQUE DE PATÓGENOS

A capacidade de uma planta em retardar ou evitar a entrada de um patógeno define a resistência de um hospedeiro (GOODMAN et al., 1986). A planta pode modificar o funcionamento normal de seu metabolismo a partir do reconhecimento de um patógeno, na tentativa de impedir a entrada da doença (WALTERS et al., 2008). Esta modificação envolve enzimas-chave nos metabolismos primários e secundários, como por exemplo, mudança no grupo das peroxidases, β -1,3-glucanases, quitinases, etc, que são muito importantes para a defesa das plantas (ARAÚJO & MENEZES, 2009).

A resistência em plantas ocorre de maneira natural através de mecanismos bioquímicos (substâncias capazes de inibir ou gerar condições adversas ao desenvolvimento do patógeno) ou estruturais (barreiras físicas à penetração ou colonização do patógeno). Estes mecanismos podem ser ainda pré-formados (presentes nas plantas antes do contato com o patógeno) ou pós-formados (depois do contato) a partir da tentativa de penetração do patógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

As plantas possuem mecanismos para se defender do ataque de patógenos e quando isso se refere ao ataque de vírus, o melhor mecanismo de defesa é mediado por genes de resistência. Quando infectadas, as plantas podem sofrer ou não danos, isso vai depender da complexidade das interações estabelecidas (SOOSAAR et al., 2005). Os vírus colonizam as plantas sistemicamente, podendo resultar em diferentes respostas fisiopatológicas. As respostas que estão envolvidas com os mecanismos de defesa muitas vezes não são suficientes para impedir a entrada e estabelecimento das doenças, muito menos quando se tratam de doenças viróticas. Quando infectadas, as plantas ativam as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são prejudiciais às células vegetais, por isso, precisam ativar as enzimas antioxidantes para que promovam a eliminação das EROs excedentes, com redução do dano oxidativo (BARBOSA et al., 2014).

Os primeiros estudos sobre a produção de EROs em plantas atacadas por algum tipo de patógeno foram realizados com tubérculos de batatas infectados com *Phytophthora infestans* (DOKE, 1983). Outros estudos mostraram os efeitos das EROs na atividade das enzimas antioxidantes em diferentes espécies de plantas infectadas por diferentes fitopatógenos, como em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e pêra (*Pyrus communis*) infectadas por *Pectobacterium* (*Erwinia amylovora*) (VENISSE et al., 2001), plantas de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*C. pepo*) infectadas com CMV e ZYMV (RIEDLE-BAUER, 2000), algas infectadas por *Emiliania huxleyi* (Lohman) (EVANS et al., 2006).

Além dos estudos envolvendo as EROs e diferentes fitopatógenos, vários trabalhos foram realizados visando elucidar as formas de defesa das plantas contra infecções virais. Clarke et al. (2002) sugerem que a replicação viral e o desenvolvimento da doença são favorecidos pela diminuição da atividade enzimática nos tecidos das plantas infectadas. As enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD), dentre outras, estão envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas constituindo componentes enzimáticos (GILL & TUTEJA, 2010; GILL et al., 2011). Além disso, plantas infectadas com vírus exibem menores taxas de fotossíntese, pigmentos, conteúdo de açúcares solúveis e aumento nas taxas respiratórias (MILAVEC et al., 2001; SHALITIN & WOLF, 2000).

A APX participa do ciclo da ascorbato-glutathione e desenvolve o papel de eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do citosol e dos cloroplastos. O mesmo papel desenvolvido pela CAT, porém esta atua nos peroxissomos. A APX usa o ácido ascórbico para reduzir H_2O_2 em água (H_2O) e ácido docosa-hexaenóico (DHA). Esta enzima é mais eficiente na eliminação do peróxido quando a planta está em condições de estresse do que a CAT, uma vez que está muito bem distribuída e tem melhor afinidade com o H_2O_2 (SHARMA & DUBEY, 2004; DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

Em plantas cítricas infectadas pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), ocorreu ativação da APX para a desintoxicação de H_2O_2 , no entanto, dado o longo tempo em que o vírus permaneceu na planta, o mecanismo de defesa ficou sobrecarregado devido à pressão contínua do estresse biótico. Enquanto a APX aumentou sua atividade, o vírus provocou redução da CAT (PÉREZ-CLEMENTE et al., 2015).

A CAT é uma enzima com a função de dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , apresenta alta afinidade com H_2O_2 e baixa especificidade com

peróxidos orgânicos. A CAT tem uma alta taxa de rotatividade e é a única enzima antioxidante que não exige um equivalente de redução. Estudos afirmam que essa enzima atua nas mitocôndrias, citosol e cloroplastos, no entanto, maiores aprofundamentos ainda precisam ser feitos (MHAMDI et al., 2010).

Em plantas de soja infectadas por *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), a atividade da CAT aumentou até 100% e da APX 80%. Em feijoeiro infectado com o *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), as atividades das respectivas enzimas aumentaram 25% e 110% (MESSIAS, 2008).

Outra enzima antioxidante que está muito presente nos processos de defesa vegetal é a peroxidase (principalmente as isoformas ascorbato e guaiacol). A GPX é responsável pela eliminação do peróxido tanto em condições normais como em condições de estresse. Esta enzima é considerada chave na remoção do peróxido e desempenha um importante papel na defesa contra estresses bióticos usando H_2O_2 e degradando o ácido indolacético.

Esta enzima foi estudada por Schons (1997) no metabolismo de três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) infectadas pelo principal vírus da cultura, o *Potato leafroll virus* (PLRV). As plantas infectadas apresentaram maior atividade da peroxidase, concluindo-se que o vírus causa um estresse nas plantas e altera o seu metabolismo.

A atividade da enzima GPX bem como da APX sofreu aumento em cultivares resistentes e suscetíveis de pessegueiro infectados pelo *Plum pox virus* (PPV) no trabalho de Diaz-Vivancos et al. (2006), em soja e feijoeiro em estudos feitos por Messias (2008) e em plantas de fumo no estudo de Fodor et al. (1997).

Assim como a APX, CAT e GPX, a GR é outra enzima muito importante nos processos antioxidantes. Esta é uma flavoproteína oxidoreductase que usa Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (NADPH) para reduzir glutatona oxidada (GSSG) até glutatona reduzida (GSH), essa é usada para regenerar o ácido ascórbico a partir da monodehydroascorbate reductase (MDHA) e ácido docosahexaenoico (DHA) e como resultado é convertido para a sua forma oxidada (GSSG). A GR é encontrada principalmente nos cloroplastos e em menor quantidade na mitocôndria e no citosol (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

Em condições de estresse, a SOD forma a primeira linha de defesa contra as EROs. Essa enzima catalisa a remoção de superóxido (O_2^-) fazendo a dismutação deste em oxigênio (O_2) e H_2O_2 , e possui diferentes formas, que se localizam em diferentes locais na célula como

Mn-SOD localizada na mitocôndria, Fe-SOD localizada nos cloroplastos e Cu/Zn-SOD localizada no citosol, peroxissomos e cloroplastos (MITTLER, 2002).

A atividade da SOD em feijoeiro não apresentou diferença entre plantas infectadas e sadias, e o autor concluiu que esta enzima não estaria envolvida nas respostas de defesa contra a infecção viral (MESSIAS, 2008). Outras enzimas além das já citadas foram estudadas por Fodor et al. (1997) como por exemplo dehidroascorbate redutase (DHAR), GR e glutathione S-transferase (GST) em plantas de fumo inoculadas com *Tobacco mosaic virus* (TMV). Os autores encontraram que após o aparecimento dos sintomas ocasionados pela infecção com o TMV, ocorreu declínio na atividade das enzimas APX, GR, GST e SOD nas folhas de fumo inoculadas. Nas folhas acima da inoculada, os autores encontraram aumento na atividade das enzimas GR, GST e SOD após o aparecimento dos sintomas. A atividade da CAT não sofreu alterações. Os autores concluíram que o processo de ativação das enzimas antioxidantes contribuiu para a supressão do desenvolvimento de sintomas necróticos.

3 CAPÍTULO 2. ATIVIDADE METABÓLICA E EVOLUÇÃO DO TÍTULO VIRAL EM DUAS CULTIVARES DE ABOBRINHA INFECTADAS POR PRSV-W

3.1 INTRODUÇÃO

Cucurbita pepo é uma dicotiledônea e uma das mais antigas espécies domesticadas, havendo relatos sobre sua existência já em 8750 a.C. (CPRA, 2014). A espécie pertence à família das Cucurbitáceas, a qual possui aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies (TEPPNER, 2004). No Brasil, as abóboras e as morangas ocupam o 7º lugar entre as hortaliças mais cultivadas e apresentam grande importância por fazer parte da alimentação em várias regiões, além do cultivo ser bastante difundido (RAMOS & QUEIROZ, 2005; MARCELINO & MARCELINO, 2012). Entre os anos 2011 a 2014, a média da produção de abóbora foi de 44.703 toneladas (AGRIANUAL, 2016).

As regiões tropicais permitem o cultivo da espécie o ano todo, mas o clima é também propício para a ocorrência de doenças (CARDOSO & PAVAN, 2013). Diversos patógenos afetam a produtividade das cucurbitáceas, dentre os quais, destacam-se o *Papaya ring spot virus*– type Watermelon” (PRSV-W) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), encontrados em 48,3 e 24,5% das amostras analisadas no estado de São Paulo, respectivamente (YUKI et al., 2000). As infecções causadas por estes vírus podem ser isoladas ou mistas e são encontradas com relativa frequência em condições naturais (CARDOSO & PAVAN, 2013).

O PRSV-W é transmitido de maneira não persistente por várias espécies de afídeos como *Myzus persicae* e *Aphis* spp. (MOLNAR & SCHMELZER, 1964; ZAMBOLIN & DUSI, 1995). Esse fato é limitante para o cultivo de cucurbitáceas em países tropicais como o Brasil, uma vez que as plantas apresentam alta suscetibilidade ao vírus, e os afídeos podem facilmente sobreviver ao longo dos anos, dificultando o controle da doença no campo, ocasionando perdas totais na produção (BEDENDO, 1995; PROVVIDENTI, 1996). Ao infectar a planta, o PRSV-W causa atrofia e sintomas de mosaico, folhas deformadas que apresentam bolhas e os frutos, além da má formação, apresentam coloração alterada (REZENDE & PACHECO, 1998; KUROSAWA, et al., 2005).

As plantas submetidas a condições de estresse biótico ou abiótico ativam os mecanismos de defesa. Uma primeira linha de resposta vegetal é a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) para

combater o agente provocador do estresse. As EROs são produzidas principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (JUBANY-MARÍ et al., 2008; ROYCHOUDHURY & BASU, 2012). No entanto, essas EROs em elevada quantidade são responsáveis pelos danos oxidativos nas células vegetais.

Para que esses danos não ocorram, precisa haver uma regulação, entrando em ação os mecanismos antioxidantes (DAT et al., 2000; MITTLER, 2002). Em condições normais, as enzimas antioxidantes controlam a produção de EROs, no entanto, quando há condição de estresse em que as espécies reativas são elevadas e o sistema protetor antioxidante da organela (mitocôndria, cloroplasto, peroxissomo, etc) está em declínio, podem ocorrer sérios problemas na célula e comprometer os mecanismos de defesa (DEL RÍO et al., 2006).

Para garantir a sobrevivência mesmo em condições de estresse, as plantas atuam por meio da ativação de componentes enzimáticos (ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), monodehidroascorbato redutase e dehidroascorbato redutase), e/ou componentes não enzimáticos (ácido ascórbico, glutathione reduzida, α -tocopherol, carotenoides e flavonoides) (GILL & TUTEJA, 2010; GILL et al., 2011).

Diversos trabalhos foram realizados buscando elucidar as alterações no metabolismo antioxidante de plantas infectadas por vírus. Em citros, o *Citrus tristeza virus* (CTV) provocou redução na atividade da CAT e a APX teve habilidade em reduzir a concentração de H_2O_2 (PÉREZ-CLEMENTE et al., 2015). Em três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.), Schons (1997) encontraram que as plantas infectadas apresentaram maior atividade da peroxidase quando comparadas às sadias, independente da variedade, concluindo-se que o vírus causa um estresse nas plantas e altera o seu metabolismo. A atividade das enzimas APX, CAT e GPX também sofreu aumento em plantas de soja infectadas pelo *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e em plantas de feijoeiro infectadas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (MESSIAS, 2008). Fodor et al. (1997) estudaram o efeito da inoculação de TMV e concluíram que o processo de ativação das enzimas antioxidantes contribuiu para a supressão do desenvolvimento de sintomas necróticos.

Em relação ao PRSV-W, alterações metabólicas foram avaliadas por Missiura (2005) em quatro cultivares de melancia (*Citullus lanatus* Schrad) infectadas com o vírus. Houve diminuição dos teores de proteínas solúveis e de açúcares totais em plantas infectadas em todas as

cultivares analisadas, e maior atividade da β -1,3 glucanases e de peroxidases, em comparação às plantas sadias. Em abóbora, por outro lado, as alterações bioquímicas ocorridas em função da interação com esse vírus, as respostas de diferentes genótipos desta espécie e a evolução da carga viral não foram elucidadas.

Devido ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações que ocorrem nas atividades de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase) em duas cultivares de abobrinha (*Cucurbita pepo*) em resposta ao PRSV-W, bem como, quantificar o título viral dessas cultivares ao longo da evolução da doença.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Local de condução e obtenção das plantas

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, CCA/UFSC. As mudas de *Cucurbita pepo* foram produzidas em bandejas de poliestireno contendo substrato Germina Planta. As sementes das cultivares híbridas utilizadas foram Caserta e Adele, adquiridas das empresas Horticeres sementes LTDA e Sakata Seed Sudamerica, respectivamente. Foi semeada uma semente por célula e as bandejas permaneceram em casa de vegetação, recebendo irrigação diariamente. Assim que as plântulas atingiram o estágio cotiledonar, 6 a 8 dias após a semeadura, foram transplantadas para vasos de plástico de 400 ml contendo substrato Germina Planta.

3.2.2 Obtenção, manutenção e inoculação mecânica do vírus

A estirpe do vírus PRSV-W foi oriunda da ESALQ, disponibilizada pelo professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende e mantida em plantas de *C. pepo*, bem como na forma de material desidratado em placas de Petri contendo cloreto de cálcio, e armazenadas a -20 °C.

Folhas de *C. pepo* infectadas com PRSV-W (exibindo mosaico) foram utilizadas como fonte de inóculo para os experimentos. Foram maceradas em almofariz de porcelana com tampão fosfato de sódio e potássio 200 mM, pH 7,0 na diluição de 1:20. As inoculações do vírus foram realizadas mecanicamente, com auxílio de abrasivo carbureto de silício (carborundum), nas primeiras folhas verdadeiras de plantas

contendo uma folha (experimento 1 - quantificação de enzimas a nível local) ou nos cotilédones de plantas com três folhas (experimento 2 - quantificação de enzimas a nível sistêmico) em duas cultivares, uma resistente (Adele) e outra suscetível (Caserta) ao PRSV-W. Como controles, as plantas foram pulverizadas com água destilada ou inoculadas mecanicamente com tampão + carborundum (sem vírus). Posteriormente, as plantas foram aspergidas com água destilada para retirar o excesso de abrasivo (FREITAS & RESENDE, 2008).

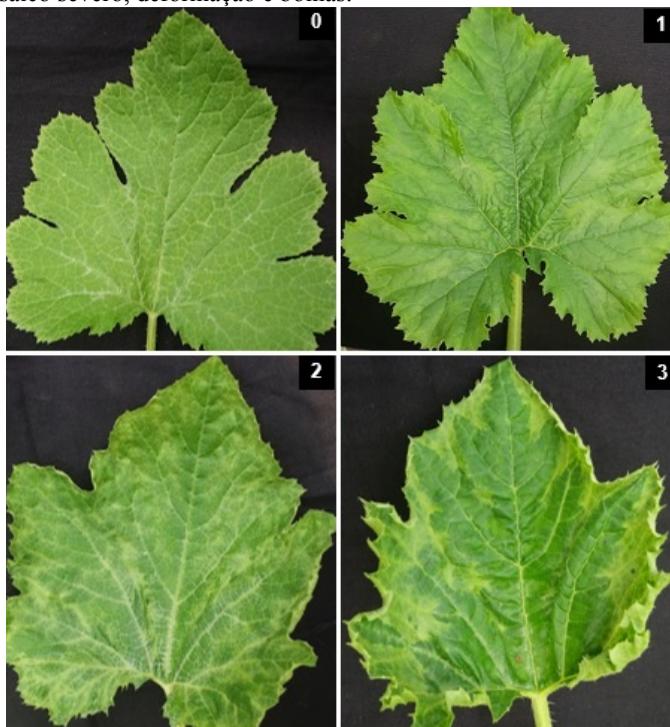
3.2.3 Teste sorológico de PTA-ELISA

A confirmação da infecção das plantas pelo PRSV-W foi efetuada através do teste de PTA-ELISA (Plate Trapped Antibody - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a partir de 20 plantas inoculadas para cada cultivar em cada um dos dois experimentos. As amostras foliares foram coletadas 30 dias após a inoculação, maceradas em nitrogênio líquido e levadas ao freezer -80 °C até o momento da realização do teste. O teste foi feito de acordo com a metodologia de Bonilha (2007), utilizando-se o antissoro específico com a proteína capsidial do PRSV-W. Para tanto, 100 µl das amostras diluídas 1:20 (p:v) em tampão carbonato PBS (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4) foram colocadas em placas de ELISA de 96 poços e em seguida incubadas por 16 horas, a 4 °C. Foram utilizados dois poços para cada amostra. Então, PBS-Tween (1L PBS + 0,5 ml Tween) foi utilizado para lavar as placas por 3 vezes consecutivas. Na etapa seguinte, foram colocados em cada pocinho 100 µl do antissoro diluído (1:1000) em tampão Tris-HCl. As placas foram incubadas por 1:30 h, a 37 °C, e então lavadas assim como descrito anteriormente. Foram colocados 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 em tampão Tris-HCl, e incubado novamente por 1:30 h a 37 °C. As placas foram lavadas novamente, em seguida colocados em cada pocinho 100 µl de fosfato de p-nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8. Durante 30 minutos as placas foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro. Foi utilizado leitor de ELISA para ler a absorbância de cada um dos pocinhos com um filtro de 405 nm. Como controle, foram utilizados extratos de plantas saudáveis e de plantas infectadas com a estirpe forte de PRSV-W. Quando o valor médio da absorbância de uma amostra foi superior a três vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia, considerou-se a amostra positiva.

3.2.4 Escala de notas de sintomas

As plantas utilizadas para análise de severidade do PRSV-W foram avaliadas 3 vezes, com intervalo de 7 dias, iniciando a primeira avaliação no décimo quarto dia após a inoculação do vírus. Para tal, foi adotada uma escala de notas da severidade dos sintomas adaptada de Freitas (2007) a qual varia de 0 a 3 (Figura 1). Plantas assintomáticas receberam nota 0; nota 1 foi atribuída às plantas com folhas apresentando mosaico fraco, sem deformação e sem bolhas; nota 2, para plantas com mosaico evidente, mas folhas com pouca deformação e bolhas; e nota 3 para plantas apresentando mosaico severo, deformação foliar, bolhas e crescimento reduzido. Foram avaliadas 20 plantas por cultivar, em cada experimento.

Figura 1- Escala de notas dos sintomas das plantas infectadas com PRSV-W. (0) sem mosaico, sem deformação e sem bolhas; (1) mosaico leve, sem deformação e sem bolhas; (2) mosaico, deformação e leve aparência de bolhas; (3) mosaico severo, deformação e bolhas.



3.2.5 Determinação da atividade de enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha

A metodologia para a determinação da atividade enzimática foi a mesma para ambos os experimentos, tanto do efeito local como do efeito sistêmico.

3.2.5.1 Preparo do extrato para determinação da atividade enzimática

No primeiro experimento, de efeito local, as primeiras folhas verdadeiras de cada planta (que haviam sido inoculadas com o PRSV-W) foram coletadas aos 1, 2, 4 e 8 dias após inoculação para análises enzimáticas ao nível local e as terceiras folhas verdadeiras foram coletadas aos 8 dias após inoculação para análise de efeito sistêmico. A amostra foi constituída por uma folha proveniente de uma planta, para ambas cultivares (Adele e Caserta). Foram feitas 5 repetições por tratamento para cada enzima em cada tempo amostrado.

Em um segundo experimento, de efeito sistêmico, as plantas das cultivares Adele e Caserta, contendo 3 folhas verdadeiras, tiveram seus cotilédones inoculados. A terceira folha verdadeira de cada planta foi coletada aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação para a determinação das atividades enzimáticas ao longo do tempo a nível sistêmico. Neste experimento, a amostra foi constituída por duas terceiras folhas provenientes de duas plantas diferentes. Foram feitas 5 repetições por tratamento para cada enzima em cada tempo amostrado.

As amostras foram coletadas com uso de tesoura e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido em uma caixa de poliestireno até serem maceradas com nitrogênio líquido, guardadas em tubos Eppendorf e armazenadas em freezer a -80 °C. Para o preparo do extrato, a 50 mg de tecido foliar previamente macerado foram adicionados 1,5 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. O macerado foi centrifugado a 14.000 rpm e coletado o sobrenadante.

3.2.5.2 Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)

Para a determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX), utilizou-se a metodologia adaptada de Parida et al. (2004) e Freitas & Stadnik (2015). Na microplaca Greiner (UV) foram adicionados 20 µl de amostra e 280 µl de tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,25 mM, ácido

ascórbico 0,5 mM e EDTA 0,2 mM). O declínio na absorbância foi visualizado durante 1 minuto em leitor de microplacas a 290 nm a 25 °C. Os resultados foram expressos em unidades de ascorbato peroxidase por minuto por mg de proteína (Unidade de APX/min/mg de proteína) no qual uma unidade de APX foi considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

3.2.5.3 Determinação da catalase (CAT)

Para análise da atividade da catalase, adicionaram-se 10 µl de amostra e 280 µl de tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo H₂O₂ 15 mM) em pocinhos da microplaca Greiner (UV), sob incubação à temperatura de 30 °C. A absorbância foi observada durante 3 minutos em leitor de microplacas a 240 nm e 30 °C (adaptado de Parida et al., 2004). Os resultados foram expressos em unidades de catalase por minuto por mg de proteína (Unidade de CAT/min/mg de proteína) na qual uma unidade de CAT foi considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorbância.

3.2.5.4 Determinação da glutatona redutase (GR)

A glutatona redutase (GR) foi determinada adaptando-se a metodologia descrita por Freitas & Stadnik (2015). Para a reação foi utilizado tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 2 mM, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,75 mM e fosfato de dinucleotídeo de adenina (NADPH) 0,1 mM. Em 250 µl de tampão de reação (mantido em banho maria 35 °C), foram adicionados 30 µl de amostra e 20 µl de glutatona oxidada (GSSG) 1 mM (mantida em gelo). A reação foi determinada durante 3 minutos em leitor de microplacas à temperatura de 35 °C no comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em unidades de glutatona redutase por minuto por mg de proteína (Unidade de GR/min/mg de proteína) na qual uma unidade de GR foi considerada a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidades de absorbância.

3.2.5.5 Determinação da guaiacol peroxidase (GPX)

A reação da enzima GPX foi determinada de acordo com Luiz et al. (2017) na qual foi utilizado tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 contendo 0,125% de H₂O₂ e 0,250% de guaiacol. Para a reação

foram adicionados 20 μl de extrato e 280 μl do tampão de reação (incubado a 30 °C em banho maria). Posteriormente, a absorbância das amostras foi determinada durante 3 minutos em leitor de microplacas no comprimento de onda de 470 nm. Os resultados foram expressos em unidades de guaiacol peroxidase por minuto por mg de proteína (Unidade de GPX/min/mg de proteína) na qual uma unidade de GPX foi considerada a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 unidades de absorbância.

3.2.5.6 Determinação da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada utilizando-se 50 μl de amostra e adicionou-se tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo L-metionina 13 mM, NBT 75 μM , EDTA 100 nM e riboflavina 100 μM (adicionada ao tampão apenas no momento da reação) (adaptação da metodologia de Broetto, 2014). Para tal enzima foram preparados dois tubos de ensaios, um para o branco e outro para a amostra. O tubo constituindo o branco recebeu a amostra e o tampão, e foi mantido no escuro para *zerar* o espectrofotômetro. No tubo de reação, foram adicionados a amostra e o tampão, sendo mantido na luz para determinar a taxa de inibição da fotoredução do NBT. Um terceiro tubo foi preparado servindo como controle, no qual foi adicionado apenas o tampão, o qual foi submetido à luz para determinar a fotoredução total do NBT. Após a incubação dos tubos sob luz ou escuro por 10 minutos, foram determinadas as absorbâncias a 560 nm. Os cálculos para a atividade específica da SOD foram feitos considerando-se o volume da amostra, a porcentagem de inibição obtida e a quantidade de proteína presente na amostra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Uma unidade de SOD é considerada a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT. Os resultados foram expressos em unidades de SOD. μg de proteína⁻¹.

3.2.5.7 Dosagem de proteínas totais

Para a determinação da quantidade de proteína presente nas amostras, utilizou-se o método de Bradford (1976). Foram adicionados em uma placa Elisa de 96 pocinhos 6 μl de amostra e 294 μl de Bradford diluído, a placa foi agitada suavemente e depois de 15 minutos a absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas a 595 nm. O valor obtido foi convertido em concentração de proteína

através dos valores conhecidos de soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA), que originou uma curva padrão.

3.2.5.8 Detecção e quantificação de PRSV-W por RT-qPCR

Para realizar a quantificação da carga viral, via qPCR, foi necessário o desenho de primers específicos que amplifiquem com boa eficiência para o vírus. Assim, foram utilizados fragmentos de sequencias depositadas no GeneBank para a região da proteína capsidial (acessos: KX385117.1; GU586789.1; KC768854.1; JN979405.1; JN979403.1) e da poliproteína (acessos: JN132463.1; JN132464.1; JN132465.1; JN132466.1; JN132467.1; JN132469.1; JN132468.1; JN132471.1; JN132470.1).

As sequencias após obtidas foram alinhadas, com auxílio do software BioEdit, também utilizado para construção da fita consenso, que foi utilizada para o desenho dos primers, com o auxílio da ferramenta *on line* PrimerQuest (IDT). Assim, foram obtidos cinco possíveis primers para identificação e quantificação do PRSV-W (Tabela 1).

Tabela 1- Primers desenhados para a quantificação de PRSV-W através de RT-qPCR de em *Cucurbita. pepo*

ORF ¹	Primer	Seq. 5'-3'	
Coat Protein	PRSVtW CP1	Foward:	TCGCAGAATGTTTGGTATGGA
		Reverse:	ATGCACTCTCTCTGGGTAT
	PRSVtW CP2	Foward:	TAACGCGGCAGAAGCATA
		Reverse:	AAACACCTGATAGGGCTCG
	PRSVtW CP3	Foward:	GCTTTCGATTCTATGAGGTGAA
		Reverse:	CCGTCCATACCAACATTCTG
Polyprotein	PRSVtW PP1	Foward:	GGAGACTCACCCGAACTACT
		Reverse:	AGCAACAATACACAGTGTTTC
	PRSVtW PP2	Foward:	TGAGTTAACACACCAGATTCCG
		Reverse:	GTGAACCTGGATCAATGGATGA

¹- ORF: Open Read Frame

O primer escolhido para as reações foi o PRSVtW CP3 da capa proteica por conta da melhor eficiência.

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit comercial SV Total RNA Isolation System, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, “SV Total RNA Isolation System”). O RNA extraído foi avaliado em espectrofotômetro NanoDrop2000 para averiguar a sua qualidade e quantidade em leituras de absorvância em 260 nm (A260) e a relação (A260/A280). Posteriormente, o RNA obtido na extração foi utilizado na para reação de RT-qPCR em placa de 96 poços (Bio-Rad, California, USA), na qual foram utilizados os seguintes reagentes e concentrações: GoTaq mastermix (1x), primer CP3 senso (0,3 μ M), primer CP3 antisenso (0,3 μ M), GoScript (1x), MgCl₂ [25mM] (10 mM), CXR reference dye [30 μ m] (0,03 μ l), template (1 ng) e água (2,7 μ l).

O protocolo de reação para a RT-qPCR foi o mesmo para ambos os experimentos, tanto do efeito local como do efeito sistêmico. O mesmo material coletado para análise enzimática que ficou armazenado a -80 °C foi utilizado para as reações de RT-qPCR. No entanto, somente 3 repetições de cada cultivar para cada tempo de coleta foram utilizadas. As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata.

As reações de RT-qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 37 °C durante 15 minutos para obtenção do cDNA, 95 °C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos que consistiram na desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento e síntese em 60°C durante 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Para o controle negativo foi utilizado água nucleasse free water e a especificidade dos produtos obtidos foi determinada com uso do software StepOne™ Software v2.3 através da análise da curva de melting a 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos.

No ensaio de RT-qPCR foi realizado a diluição em série de 10 vezes para determinar o limite de detecção final e a linearidade do ensaio. A curva foi feita a partir de uma amostra com maior concentração de RNA quantificado via espectrofotômetro NanoDrop2000. As diluições foram: 0,01; 0,1; 1; 10 e 100. Foi utilizado o primer EF1 α para detecção do respectivo gene na planta para o cálculo do $\Delta\Delta$ Ct.

Uma das plantas da Cultivar Adele, da 2ª coleta (2 dias após os tratamentos – efeito local) e uma das plantas da Cultivar Adele, da 2ª coleta (12 dias após os tratamentos – efeito sistêmico) foram selecionadas como amostras referências por demonstrar o maior valor de CT. Plantas tratadas com água destilada foram usadas como controle negativo. Para análise e elaboração do gráfico foram utilizados valores de quantificação relativa (QR) em escala Log₁₀.

Além disso, foi realizada a corrida em gel de agarose 3%, 85 volts por 160 minutos corado com gelred para certificar-se da presença do fragmento desejado. Posteriormente, o gel foi revelado em fotodocumentador sob luz ultravioleta.

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados da atividade enzimática no tempo para cada cultivar foram submetidos à análise de variância e quando significativo, as médias foram contrastadas através do teste Tukey ($\alpha=0,05$). O mesmo procedimento foi utilizado para analisar dados dos tratamentos dentro da mesma cultivar. Para comparar as cultivares utilizou-se o teste t-student. As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Primeiro experimento

3.3.1.1 Teste serológico de PTA-ELISA

A tabela 1 mostra o resultado dos sintomas apresentados pelas plantas infectadas com PRSV-W de duas cultivares de *C. pepo*, Adele e Caserta. As avaliações iniciaram-se aos 14 dias após a inoculação (DAI). A cultivar Adele apresentou notas muito inferiores às exibidas pela Caserta, embora 100% das plantas utilizadas no experimento tenham sido infectadas. A Caserta que é suscetível ao PRSV-W apresentou sintomas característicos e de fácil identificação do vírus, ao contrário da Adele, a qual exibiu leves sintomas da virose até o final das avaliações (30 DAI), mesmo estando infectada com o vírus, o que foi comprovado pelo teste ELISA.

Tabela 2 - Resultado da avaliação dos sintomas (severidade) e da incidência de PRSV-W em duas cultivares de abobrinha inoculadas mecanicamente.

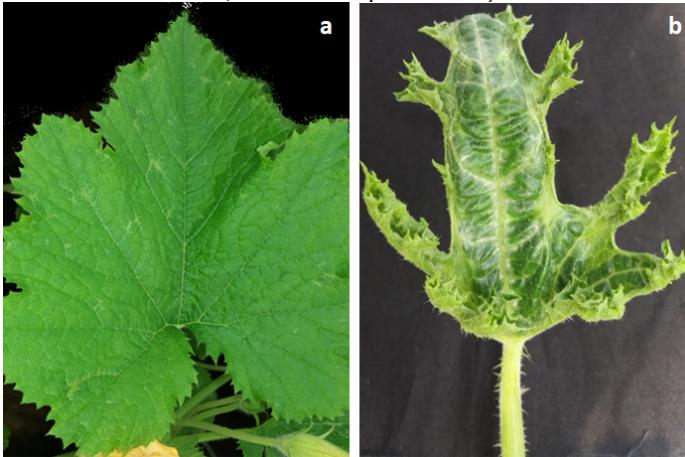
Cultivar	Notas (Dias após inoculação)			Média	Incidência ²
	14°	21°	28°		
Adele	0,15 ¹	0,35	0,65	0,38	20/20
Caserta	3,00	3,00	3,00	3,00	20/20

¹Médias de 20 plantas. ²Incidência da virose: número de plantas positivas no teste PTA-ELISA/número total de plantas avaliadas. Para a severidade, foram

realizadas 3 avaliações a cada 7 dias a partir do 14º dia após inoculação do vírus. As notas atribuídas variaram de 0 a 3 sendo (0) sem mosaico, sem deformação e sem bolhas; (1) mosaico, sem deformação e sem bolhas; (2) mosaico, deformação e leve aparência de bolhas; (3) mosaico severo, deformação e bolhas.

Os sintomas inicialmente são formados por mosaico fraco, leve deformação e início de bolhas evoluindo para mosaicos bem definidos, grande deformação e bolhas por toda a folha e problemas com o desenvolvimento da planta em geral (Figura 2b). A Caserta apresentou início dos sintomas do vírus já na primeira semana após a infecção, estes que no decorrer do tempo são característicos do PRSV-W. A Adele, quando infectada, apresentou apenas alguns pontos mais claros e deprimidos nas folhas, mas não muito expressivos como os característicos da Caserta (Figura 2a).

Figura 2 - Folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele (a) e Caserta (b) com sintomas de PRSV-W, aos 30 dias após inoculação.



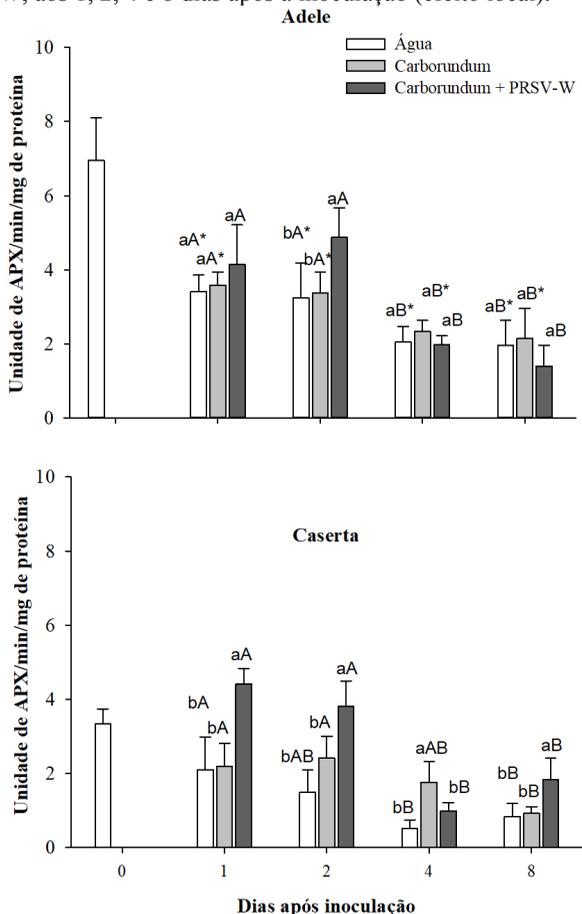
Determinação da atividade das enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha

Efeito Local

3.3.1.2 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A figura 3 representa a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em diferentes tempos de coleta após os tratamentos nas duas cultivares estudadas, Adele e Caserta. De maneira geral, as plantas da cv. Caserta submetidas a estresses de inoculação com o vírus exibiram atividade maior do que aquelas tratadas apenas com água destilada. Na cv. Adele, este comportamento ocorreu apenas aos 2 dias após inoculação. As plantas de Adele apresentaram maior atividade quando tratadas com água e carborundum e comparadas com a Caserta. Conforme apresentado, a atividade desta enzima diminui ao longo do tempo, independente da inoculação com o vírus.

Figura 3 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local).

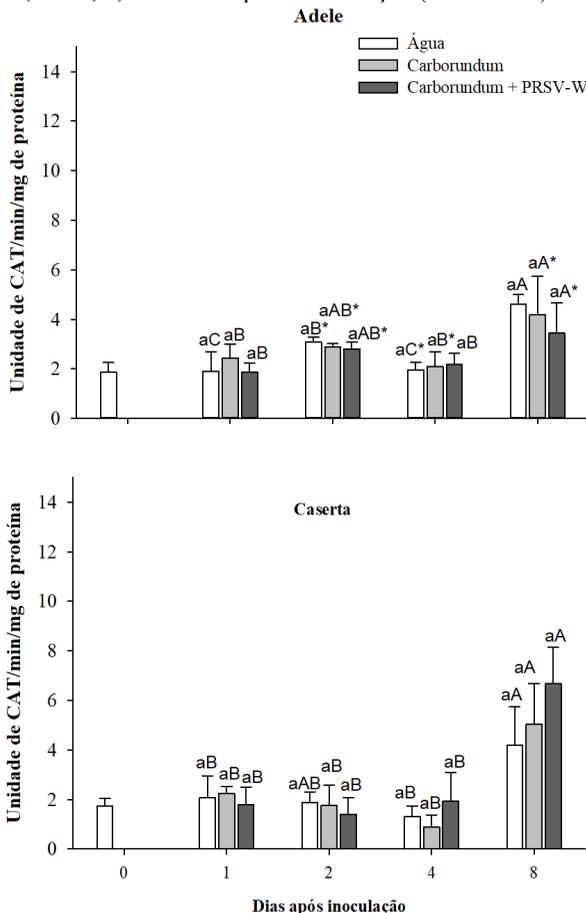


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos em um determinado tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo para um mesmo tratamento, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.1.3 Atividade da catalase (CAT)

Com relação à catalase, não houve diferença entre os tratamentos em ambas as cultivares, com exceção da Caserta aos 8 DAI, no qual as plantas tratadas com carborundum apresentaram maior atividade em relação aos demais tratamentos (Figura 4). No decorrer do tempo houve diferença apenas aos 8 DAI, onde a atividade da enzima foi maior para todos os tratamentos para as duas cultivares. As plantas apresentaram diferenças entre cultivares a partir do segundo dia após a inoculação no qual a Adele teve maior atividade enzimática do que a Caserta até 4 DAI. Aos 8 DAI, a Caserta teve a atividade da catalase maior do que a Adele.

Figura 4 - Atividade da enzima catalase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local).

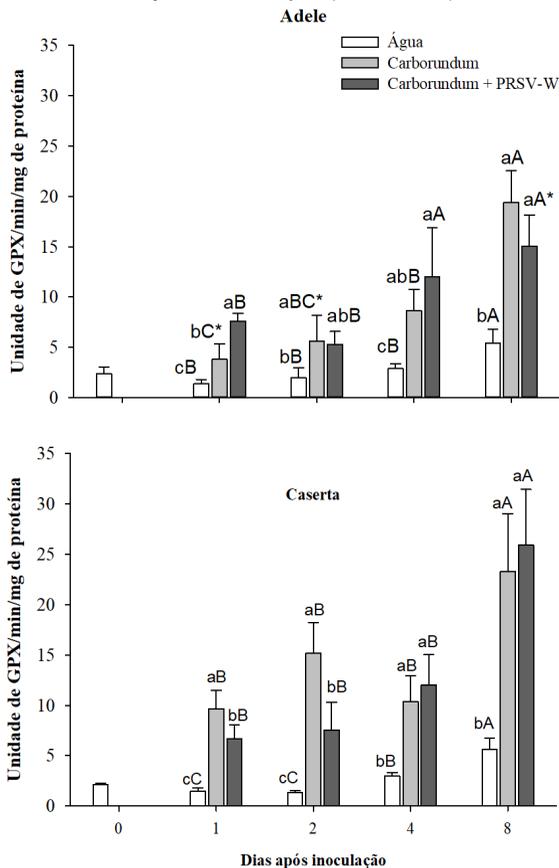


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos em um determinado tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo para um mesmo tratamento, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.1.4 Atividade da guaiacol peroxidase (GPX)

A figura 5 apresenta a atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) em diferentes tempos após os tratamentos em duas cultivares de *C. pepo*. Observa-se que as plantas de ambas as cultivares inoculadas com carborundum ou carborundum + vírus pouco se diferenciaram entre si, mas exibiram aumento na atividade em comparação com a testemunha (plantas tratadas com água). A atividade da GPX aumentou progressivamente com o tempo. A Caserta apresentou maior atividade em relação à Adele aos 1 e 2 DAI nas plantas tratadas com carborundum e aos 4 e 8 DAI nas inoculadas com vírus.

Figura 5 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local).

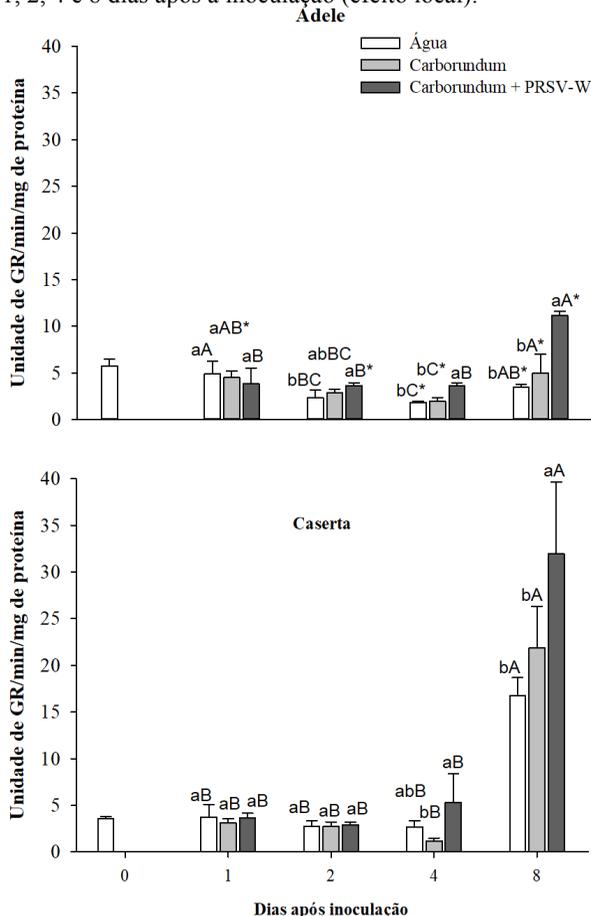


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos em um determinado tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo para um mesmo tratamento, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.1.5 Atividade da glutathiona redutase (GR)

Em comparação com os tratamentos sem vírus, a atividade da enzima glutathiona redutase foi maior nas plantas inoculadas a partir do quarto dia na Adele e apenas no oitavo dia na Caserta (Figura 6). Na cultivar Adele, a atividade da enzima diminuiu para todos os tratamentos até o quarto dia, voltando a aumentar aos 8 DAI, ao contrário da Caserta, na qual a atividade se mantém relativamente estável até 4 DAI e exibe um grande aumento aos 8 DAI. As cultivares se diferenciam principalmente aos 4 e 8 DAI onde as plantas da cv. Caserta apresentaram atividade enzimática superior em relação à Adele.

Figura 6 - Atividade da enzima glutationa redutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local).

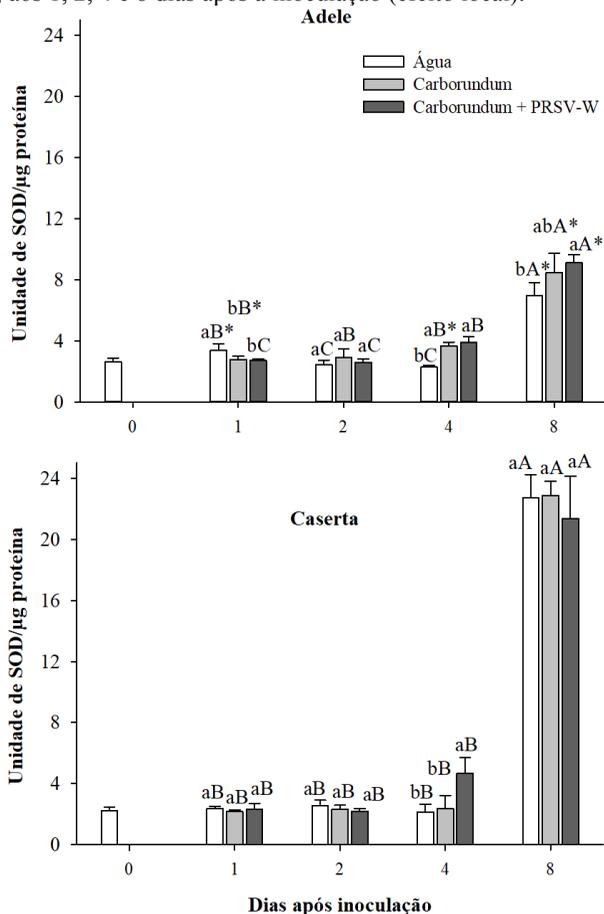


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos em um determinado tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo para um mesmo tratamento, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.1.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A figura 7 apresenta a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) para os tratamentos realizados nas duas cultivares estudadas em diferentes tempos de coleta. Os tratamentos basicamente não se diferenciaram entre si, no entanto, ao se analisar o comportamento da enzima no tempo, percebe-se que a atividade aumentou aos 8 DAI, independente do tratamento. Nesse tempo, a cv. Caserta apresentou maior atividade da SOD em relação à Adele.

Figura 7 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W, aos 1, 2, 4 e 8 dias após a inoculação (efeito local).



Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos em um determinado tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo para um mesmo tratamento, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

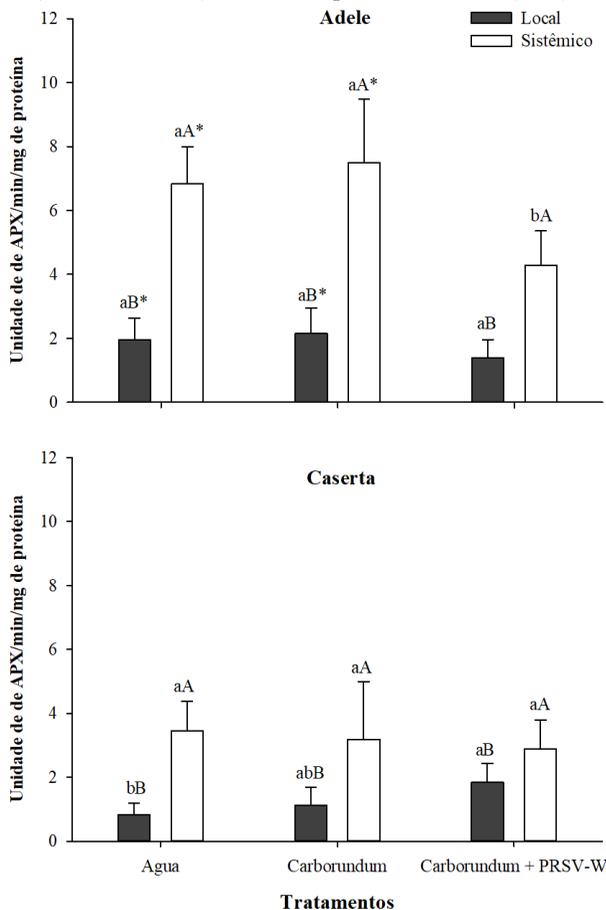
Efeito local versus sistêmico

Para verificar se havia efeito sistêmico nas plantas tratadas, no oitavo DAI foi coletada a terceira folha (duas folhas acima da inoculada) e foram realizadas as avaliações para determinação das atividades enzimáticas.

3.3.1.7 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

Ambas as cultivares apresentaram maior atividade de ascorbato peroxidase sistemicamente, na terceira folha (comparado às folhas tratadas ou inoculadas, isto é, as primeiras folhas). As plantas de Adele infectadas com vírus apresentaram menor atividade da APX sistemicamente em comparação aos demais tratamentos. A Caserta teve maior atividade enzimática no local da infecção quando inoculada com vírus. Com relação às cultivares, a Adele exibiu maior atividade enzimática tanto local como sistemicamente nos tratamentos com água e carborundum (Figura 8).

Figura 8 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).

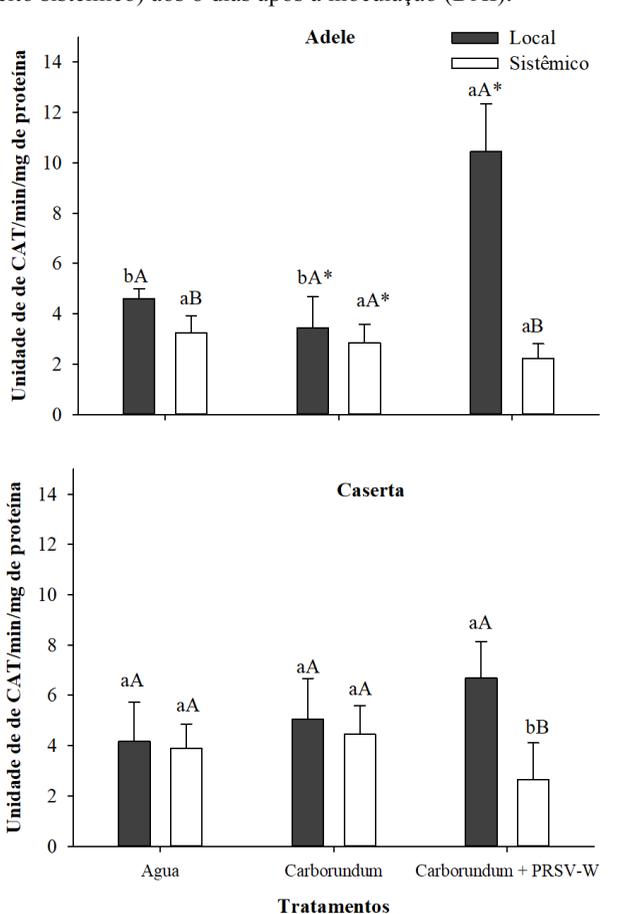


Legenda. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, para o mesmo tipo de folha coletada. Letras maiúsculas indicam diferenças entre tipos de folhas coletadas para o mesmo tratamento e cultivar ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Quando as letras estão acompanhadas de asterisco indicam diferença entre cultivares ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de T-student.

3.3.1.8 Atividade da catalase (CAT)

A figura 9 representa a atividade da catalase local e sistemicamente aos 8 DAI. A nível local a Adele apresentou maior atividade enzimática quando infectada com vírus e a nível sistêmico, as plantas da cultivar suscetível inoculadas com o PRSV-W apresentaram menor atividade da CAT. Quando inoculada com vírus e comparada com a Caserta, a Adele apresentou maior atividade enzimática no local da infecção.

Figura 9 - Atividade da enzima catalase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).

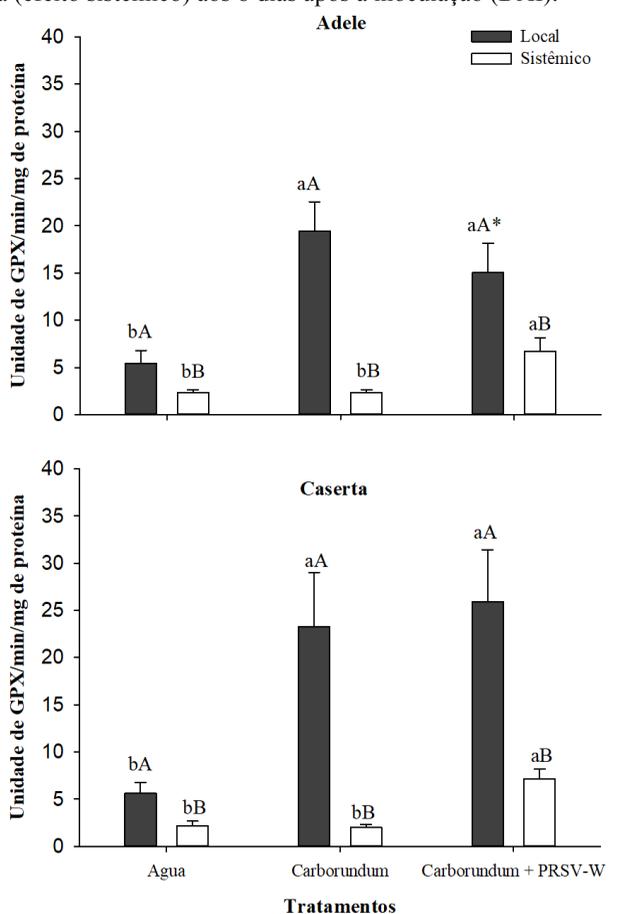


Legenda. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, para o mesmo tipo de folha coletada. Letras maiúsculas indicam diferenças entre tipos de folhas coletadas para o mesmo tratamento e cultivar ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Quando as letras estão acompanhadas de asterisco indicam diferença entre cultivares ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de T-student.

3.3.1.9 Atividade da guaiacol peroxidase (GPX)

Em relação à guaiacol peroxidase, a atividade da enzima foi maior nas folhas inoculadas para ambas as cultivares em relação ao efeito sistêmico (Figura 10). As plantas de ambas as cultivares inoculadas com PRSV-W tiveram aumento na atividade a nível sistêmico. Houve diferença no local da infecção entre as cultivares inoculadas com o vírus, no qual a Caserta apresentou maior atividade enzimática.

Figura 10 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).

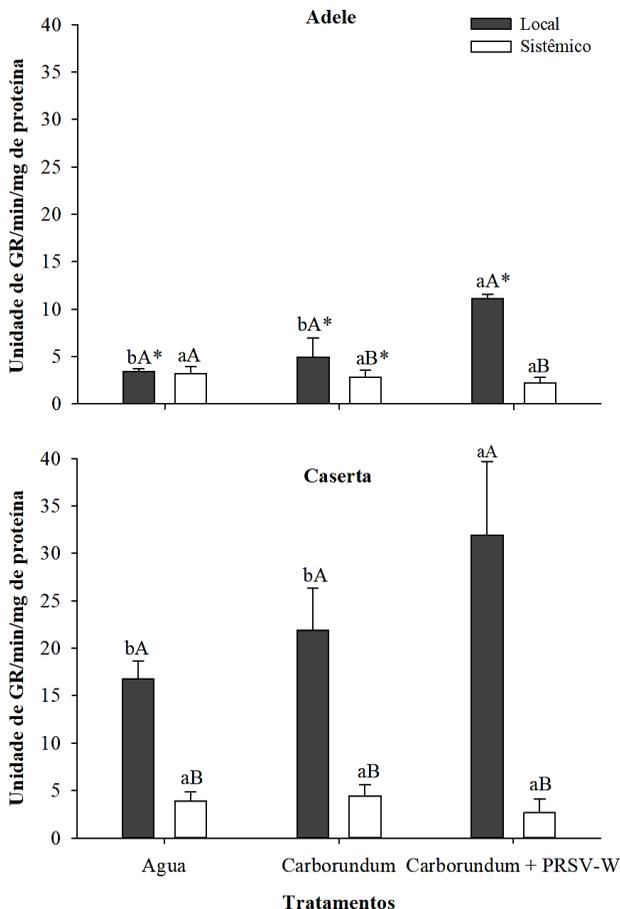


Legenda. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, para o mesmo tipo de folha coletada. Letras maiúsculas indicam diferenças entre tipos de fohas coletadas para o mesmo tratamento e cultivar ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Quando as letras estão acompanhadas de asterisco indicam diferença entre cultivares ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de T-student.

3.3.1.10 Atividade da glutathione redutase (GR)

A Adele apresentou menor atividade de glutathione redutase, a nível local da inoculação para todos os tratamentos. Não houve diferença entre tratamentos para ambas as cultivares a nível sistêmico, porém, plantas inoculadas com vírus apresentaram maior atividade enzimática a nível local, independente da cultivar (Figura 11).

Figura 11 - Atividade da enzima glutationa redutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).

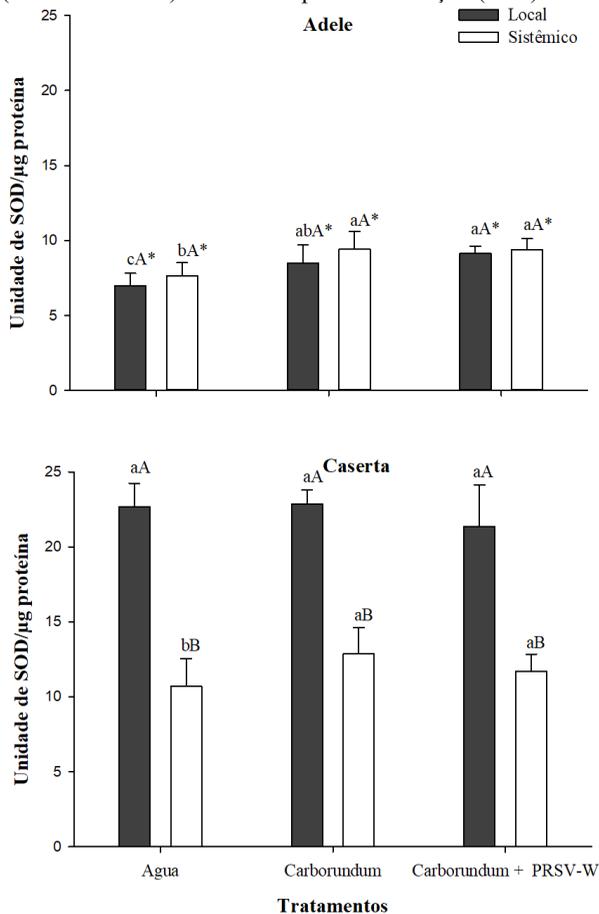


Legenda. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, para o mesmo tipo de folha coletada. Letras maiúsculas indicam diferenças entre tipos de folhas coletadas para o mesmo tratamento e cultivar ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Quando as letras estão acompanhadas de asterisco indicam diferença entre cultivares ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de T- student.

3.3.1.11 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A caserta apresentou maior atividade da enzima superóxido dismutase tanto no efeito local da infecção quanto sistêmico (Figura 12). As plantas tratadas apenas com água tiveram menor atividade do que aquelas tratadas com carborundum ou PRSV-W, com exceção do efeito local na Caserta.

Figura 12 - Atividade da enzima superóxido dismutase em folhas de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, tratadas apenas com água, inoculadas mecanicamente apenas com carborundum ou inoculadas com carborundum e PRSV-W. Avaliação na folha inoculada (efeito local) ou na 2ª folha acima da inoculada (efeito sistêmico) aos 8 dias após a inoculação (DAI).



Legenda. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, para o mesmo tipo de folha coletada. Letras maiúsculas indicam diferenças entre tipos de folhas coletadas para o mesmo tratamento e cultivar ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de Tukey. Quando as letras estão acompanhadas de asterisco indicam diferença entre cultivares ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste de T-student.

3.3.2 Segundo experimento

3.3.2.1 Teste serológico de PTA-ELISA

Da mesma maneira como no primeiro experimento, a Cultivar Adele apresentou notas das avaliações dos sintomas inferiores àquelas da Caserta, e também ocorreu infecção de 100% das plantas. Neste experimento, a avaliação começou aos 5 DAI, e assim como no primeiro, a Caserta apresentou sintomas característicos e de fácil identificação do vírus, e a Adele não apresentou sintomas típicos da virose até o final da avaliação (30 DAI), mesmo estando comprovadamente infectada com o vírus (teste ELISA).

Tabela 3 - Resultado da avaliação dos sintomas (severidade) e da incidência de PRSV-W em duas cultivares de abobrinha inoculadas mecanicamente.

Cultivar	Notas (Dias após inoculação)			Média	Incidência ²
	5°	12°	19°		
Adele	0,45 ¹	0,45	0,55	0,48	20/20 ²
Caserta	1,75	3,00	3,00	2,58	18/20

¹Médias de 20 plantas. ²Incidência da virose: número de plantas positivas no teste PTA-ELISA/número total de plantas avaliadas. Foram realizadas 3 avaliações a cada 7 dias a partir do 5° dia após inoculação do vírus. As notas atribuídas variaram de 0 a 3 sendo (0) sem mosaico, sem deformação e sem bolhas; (1) mosaico, sem deformação e sem bolhas; (2) mosaico, deformação e leve aparência de bolhas; (3) mosaico severo, deformação e bolhas.

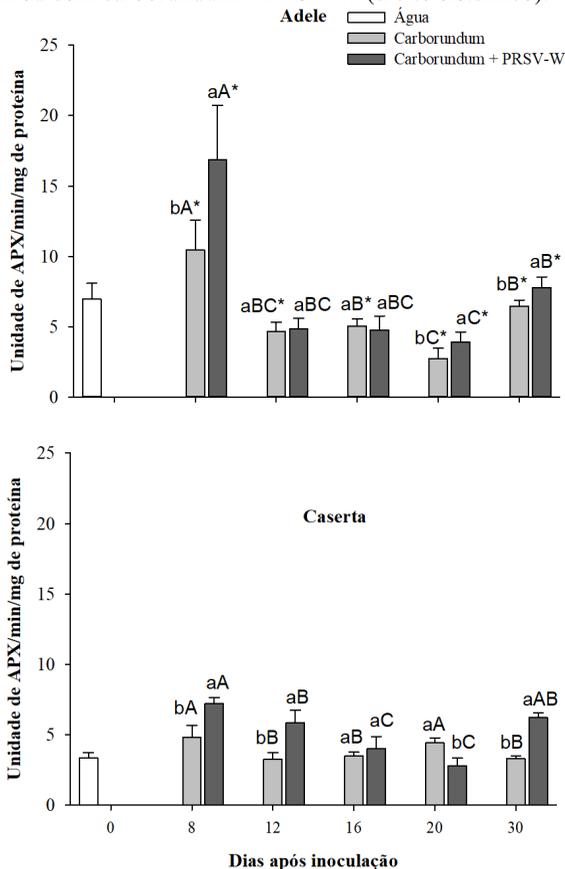
Determinação da atividade das enzimas de defesa a partir de plantas de abobrinha

3.3.2.2 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

Ambas as cultivares infectadas com PRSV-W tiveram maior atividade da ascorbato peroxidase aos 8, 20 e 30 DAI, aos 12 DAI plantas de Caserta infectadas também apresentaram maior atividade (Figura 13).

No decorrer do tempo, a enzima teve a atividade reduzida em ambas as cultivares. A Adele apresentou maior atividade do que a Caserta.

Figura 13 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).

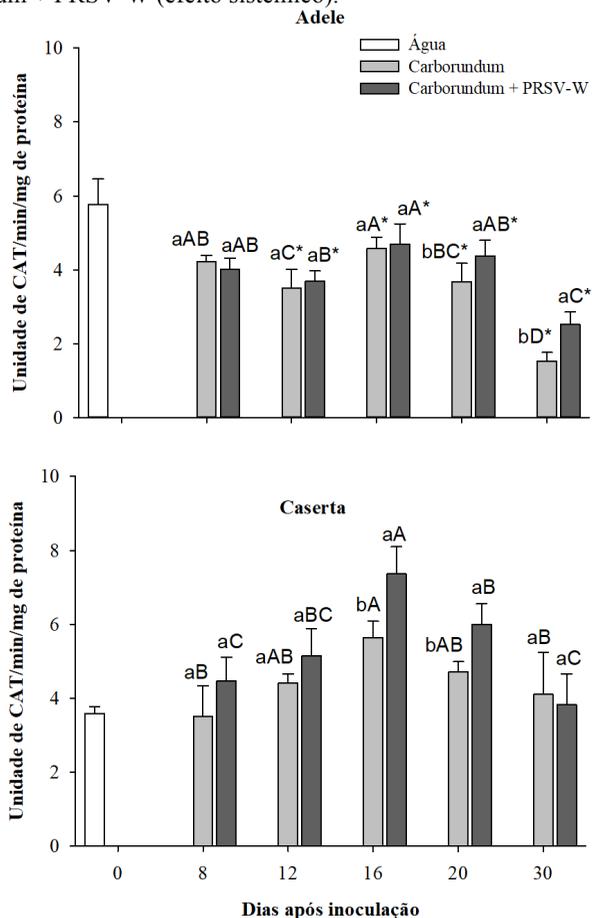


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.2.3 Atividade da catalase (CAT)

De maneira geral, a catalase na cultivar Adele não apresentou diferença no tempo e a Caserta têm a atividade mais elevada aos 16 DAI tanto em plantas inoculadas com PRSV-W quanto para aquelas tratadas apenas com carborundum. Aos 20 e 30 DAI a atividade da enzima foi maior em plantas de Adele inoculadas e na Caserta este comportamento ocorre aos 16 e 20 DAI. A partir dos 12 DAI a cultivar Caserta apresenta maior atividade da catalase em relação à Adele para ambos tratamentos.

Figura 14 - Atividade da enzima catalase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotilédonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).

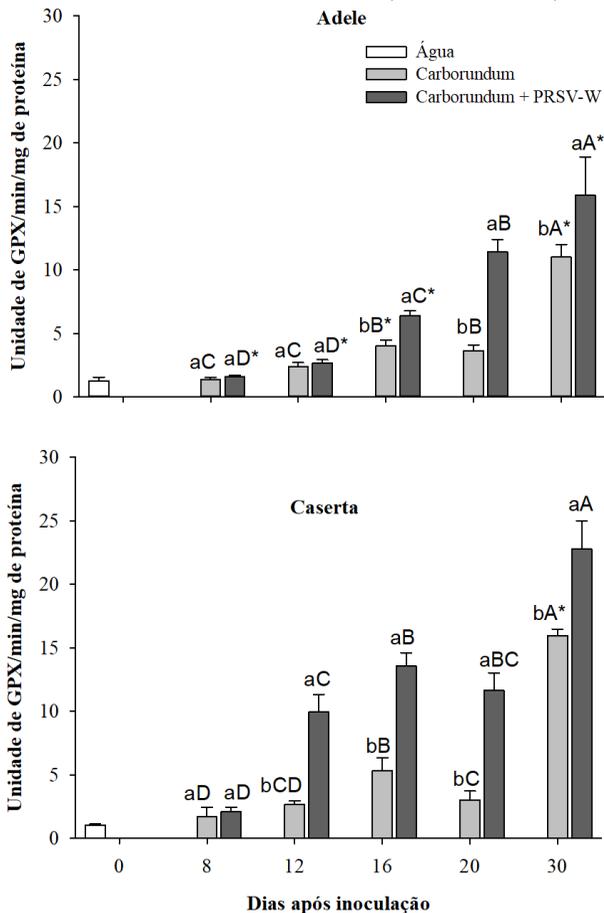


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.2.4 Atividade da guaiacol peroxidase (GPX)

As plantas da Adele inoculadas com o vírus tiveram maior atividade da enzima guaiacol peroxidase a partir dos 16 DAI quando comparadas com a testemunha. Já para a Caserta, com exceção dos 8 DAI, em todos os tempos as plantas inoculadas com PRSV-W apresentaram maior atividade em relação às não inoculadas (Figura 15). No decorrer do tempo, a enzima teve aumento da atividade, independente do tratamento realizado, tanto para a Adele quanto para a Caserta. A atividade da GPX foi maior na Caserta do que na Adele.

Figura 15 - Atividade da enzima guaiacol peroxidase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).

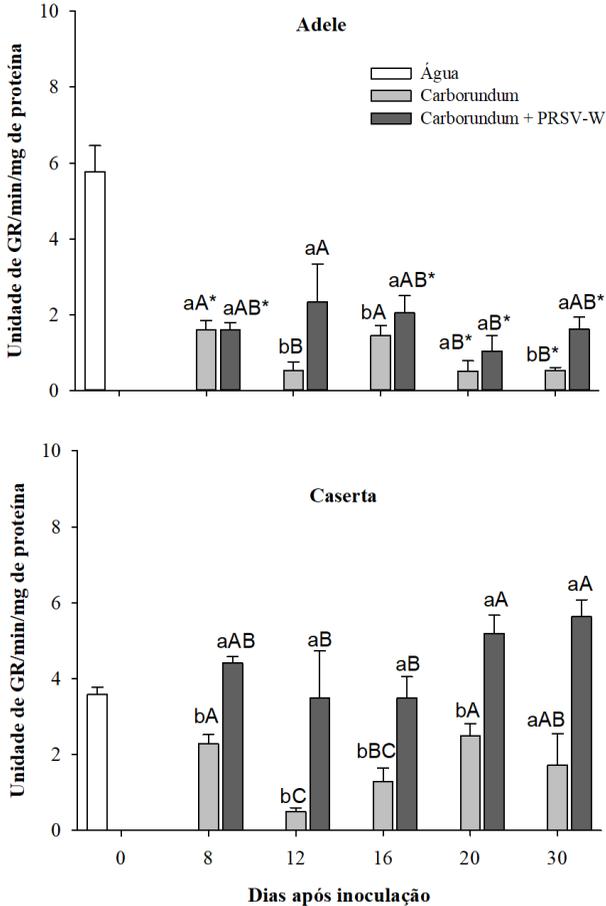


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.2.5 Determinação da glutathiona redutase (GR)

As plantas da Cultivar Adele inoculadas com o vírus tiveram maior atividade enzimática da glutathiona redutase aos 12, 16 e 30 após a inoculação em relação às testemunhas (Figura 16). Na cv. Caserta as plantas inoculadas sempre tiveram maior atividade enzimática em comparação àquelas tratadas com carborundum. Em geral, para ambas as cultivares inoculadas, não houve diferença no tempo. A Caserta quando não inoculada com o vírus apresentou queda na atividade enzimática aos 12 e 16 dias aumentando novamente aos 20 e 30 dias após inoculação, as plantas de Adele infectadas com vírus apresentaram maior atividade aos 12 DAI e quando sadias aos 8 e 16 DAI.

Figura 16 - Atividade da enzima glutationa redutase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).

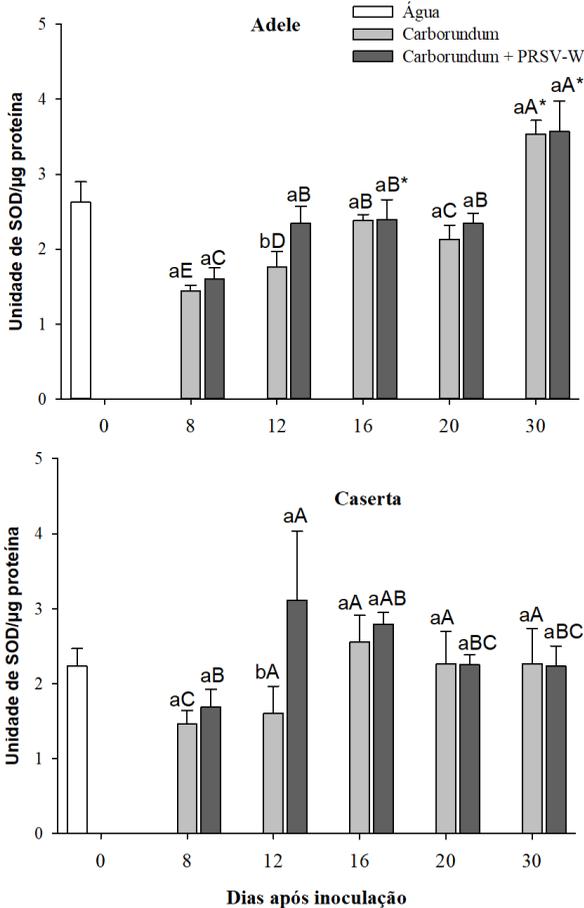


Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

3.3.2.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Nas duas cultivares não houve diferença na atividade da superóxido dismutase entre plantas inoculadas ou não com PRSV-W, com exceção das amostras do 12º dia, nas quais houve aumento da atividade da SOD em plantas inoculadas. Na Adele, a atividade enzimática aumentou no decorrer do tempo e na Caserta, não houve mudança significativa, mantendo-se mais estável (Figura 17). As cultivares se diferiram apenas aos 30 dias, no qual quando a Adele apresentou maior atividade da enzima.

Figura 17 - Atividade da enzima superóxido dismutase nas terceiras folhas verdadeiras de *Cucurbita pepo*, cultivares Adele e Caserta, aos 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica das folhas cotiledonares apenas com carborundum ou com carborundum + PRSV-W (efeito sistêmico).



Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre tratamentos, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença no tempo, para a mesma cultivar (teste tukey a 5%); asterisco indica diferença entre cultivares num determinado tempo e tratamento, ao nível de 5 % de significância de acordo com o teste t-student.

Resumo dos resultados

Tabela 4 - Resumo das alterações no metabolismo de enzimas antioxidantes promovidas por PRSV-W em folhas inoculadas (efeito local) ou sistemicamente, em duas cultivares de abobrinha.

Enzima	Efeito local		Efeito sistêmico	
	Adele	Caserta	Adele	Caserta
APX	Aumento na atividade aos 2 DAI	Aumento na atividade aos 1, 2 e 8 DAI	Aumento aos 8, 20 e 30 DAI	Aumento aos 8, 12 e 30 DAI
CAT	Não houve alteração	Não houve alteração	Aumento aos 20 e 30 DAI	Aumentos aos 16 e 20 DAI
GPX	Aumento na atividade aos 1 DAI	Não houve alteração	Aumento aos 16, 20 e 30 DAI	Aumento aos 12, 16, 20 e 30 DAI
GR	Aumentos aos 4 e 8 DAI	Aumentos aos 8 DAI	Aumentos em 12, 16 e 30 DAI	Aumento em todos os tempos
SOD	Sem alterações significativas	Aumento aos 4 DAI	Aumento apenas aos 12 DAI	Aumento apenas aos 12 DAI

A tabela 4 reúne informações sobre alterações promovidas pelo PRSV-W nas atividades das enzimas dos diferentes experimentos, tanto a nível local, como sistemicamente. A nível local, o vírus promoveu aumento na atividade da APX na Adele apenas aos 2 DAI, enquanto que na Caserta o aumento ocorre logo no primeiro dia e depois aos 2 e 8 DAI. Sistemicamente, aos 8 e 30 DAI, ambas cultivares sofreram aumento da enzima, na Adele a atividade aumentou também aos 20 DAI e na Caserta aos 12 DAI.

A atividade da CAT não foi modificada pela presença do vírus a nível local, mas quando avaliamos o efeito viral sistemicamente, a Adele apresentou maior atividade da enzima aos 20 e 30 DAI e a Caserta mais cedo, aos 16 e 20 DAI. Aparentemente, na cultivar suscetível, o aumento sistêmico na atividade da enzima ocorreu muito antes do que na cultivar resistente.

A GPX teve sua atividade aumentada na Adele no local da inoculação apenas no primeiro, não apresentando alterações na Caserta. Já a nível sistêmico, a Caserta teve aumentos na atividade da GPX em todos os tempos avaliados, com exceção aos 8 DAI. Na Adele esse aumento foi mais tardio, aos 16, 20 e 30 DAI. Ambas as cultivares

tiveram aumentos na atividade da GR após 8 DAI nas folhas inoculadas e a Adele nesse caso apresentou aumento também aos 4 DAI. Sistemicamente, a GR teve maior atividade em todos os tempos nas plantas de Caserta infectadas e a Adele apenas aos 12, 16 e 30 DAI. Assim como para GPX, a Adele teve a atividade da GR ativada antes do que na Caserta em resposta ao vírus nas folhas diretamente inoculadas. Por outro lado, sistemicamente, o aumento na atividade de ambas as enzimas ocorreu mais cedo em Caserta.

A SOD apresentou aumento aos 4 DAI nas folhas de Caserta inoculadas e não teve alteração na Adele sistemicamente, a enzima teve maior atividade aos 12 DAI para ambas as cultivares.

Tabela 5 - Comparação de duas cultivares de abobrinha, Adele e Caserta, com relação às atividades de enzimas antioxidantes, em plantas infectadas com PRSV-W, em folhas inoculadas (efeito local) ou sistemicamente.

Enzima	Efeito local		Efeito sistêmico	
	Adele	Caserta	Adele	Caserta
APX	Sem diferenças expressivas		Maior atividade aos 8, 20 e 30 DAI	
CAT	Maior aos 2 DAI	Maior aos 8 DAI		Maior atividade a partir de 12 DAI
GPX		Maior aos 8 DAI		Maior aos 8, 12 e 16 e 30 DAI
GR	Maior aos 2 DAI	Maior aos 8 DAI		Maior em todos os tempos
SOD		Maior aos 8 DAI	Maior aos 30 DAI	Maior aos 16 DAI

A tabela 5 apresenta o comportamento da atividade das enzimas comparando-se as duas cultivares de abobrinha infectadas com PRSV-W. As cultivares não apresentaram diferenças na atividade da APX a nível local, mas sistemicamente na Adele, o vírus provocou maior atividade da enzima aos 8, 20 e 30 DAI.

A CAT em folhas inoculadas de Adele apresentou o dobro de atividade do que na Caserta aos 2 DAI. Aos 8 DAI as folhas inoculadas da Caserta tiveram 47% a mais de atividade em relação à Adele.

Sistemicamente, a Caserta apresentou maior atividade da CAT em resposta ao vírus em praticamente todos os tempos analisados. A cultivar suscetível (Caserta) apresentou em média 83% a mais de atividade em relação à resistente.

A atividade da GPX no local da inoculação foi maior na Caserta aos 8 dai. Já, quando se avalia o efeito sistêmico nas plantas inoculadas, a atividade da enzima na Caserta é em média 45% maior do que na Adele na maioria dos tempos avaliados.

A atividade da GR foi 20% maior nas folhas inoculadas de Adele aos 2 DAI e na a Caserta aos 8 DAI na qual apresentou 65% a mais de atividade em comparação a cultivar resistente. Sistemicamente a atividade da enzima em Caserta foi em média 66% superior em comparação às plantas de Adele na maioria dos tempos avaliados.

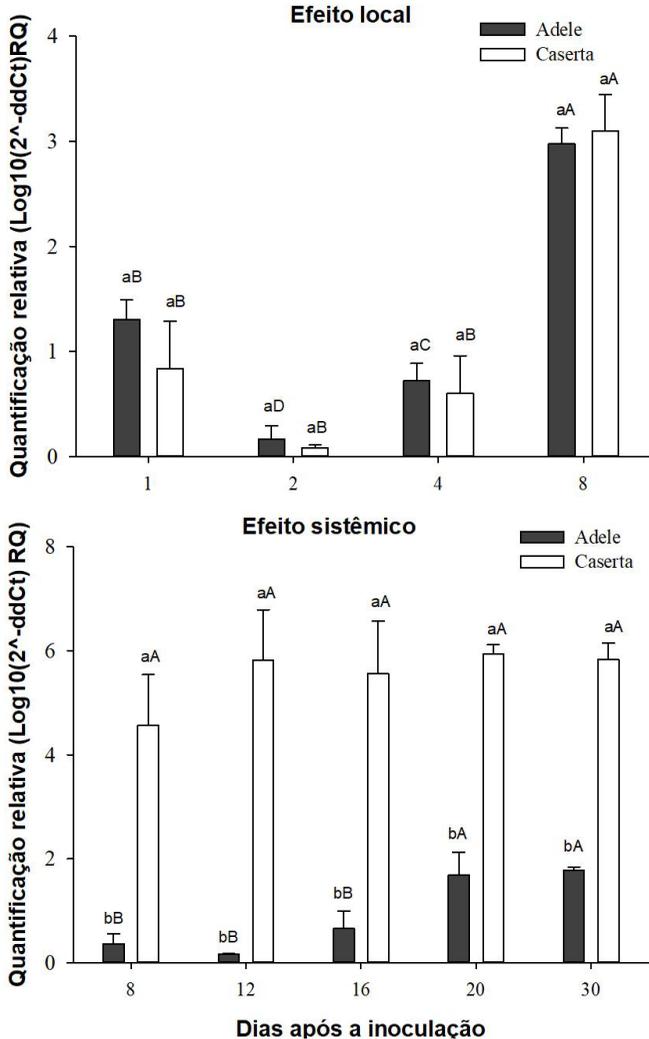
A SOD apresentou maior atividade nas folhas inoculadas da Caserta aos 8 dias e menor atividade aos 30 dias sistemicamente.

3.3.3 Avaliação do título viral em cultivares resistente e suscetível de *Cucurbita pepo* por meio de RT-qPCR

No ensaio de RT-qPCR foi obtido o slope de -3.2558 e a eficiência de 102,84 %. A figura 18 mostra a concentração do vírus nas cultivares Adele e Caserta, em folhas inoculadas (efeito local) e na terceira folha acima da inoculada (efeito sistêmico). Nas folhas inoculadas, não há diferença estatística entre as cultivares para todos os tempos avaliados. No decorrer do tempo, houve uma diminuição aos 2 e 4 DAI para ambas as cultivares, voltando a aumentar de maneira expressiva aos 8 dias.

A cv. Caserta apresentou maior concentração viral do que a Adele a partir do primeiro tempo analisado (8 dias após a inoculação) nas folhas de abobrinha infectadas sistemicamente por PRSV-W. Com o passar do tempo, ocorreu estabilização da carga viral em Caserta a partir dos 12 dias após inoculação, já para a Adele, esta estabilização ocorreu mais tarde, após 20 dias da inoculação. No último tempo analisado, a concentração viral nas folhas novas da cultivar Caserta foi pelo menos 3 vezes maior que nas da Adele (Figura 18).

Figura 18 - Quantidade relativa de carga viral em duas cultivares de *Cucurbita pepo*, Adele e Caserta, infectadas com PRSV-W. As análises foram realizadas através de RTq-PCR em folhas inoculadas com o vírus (efeito local) ou sistemicamente.



Legenda. Barras verticais acima das médias indicam o desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre cultivares em um mesmo tempo, enquanto maiúsculas distintas indicam diferença ao longo do tempo, para a mesma cultivar (teste tukey, $\alpha=0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Alterações locais e sistêmicas no metabolismo de plantas de *Cucurbita pepo* infectadas com PRSV-W

Vários estudos têm sido feitos para compreender as alterações metabólicas que ocorrem nas plantas devido ao ataque de patógenos. No presente estudo verifica-se que a atividade da maioria das enzimas antioxidantes avaliadas aumentou nas plantas infectadas com PRSV-W em ambas as cultivares estudadas, principalmente nas folhas mais novas. De acordo com Barbosa et al. (2014), as enzimas estão presentes em diferentes locais das células e são muito importantes para a manutenção dos organismos. Elas participam praticamente de todas as reações bioquímicas e ajudam no controle das EROs nas plantas. A exemplo dessas enzimas que atuam com efeito antioxidante estão a SOD, APX, GR e CAT.

Observando-se cada enzima separadamente, entretanto, a APX apresentou redução em sua atividade no decorrer do tempo (Figura 3). De acordo com Dabrowska et al. (2007), a APX é uma enzima que desenvolve um importante papel no controle da concentração de peróxido de hidrogênio dentro da célula.

Esta foi a única enzima que apresentou declínio no decorrer do tempo, principalmente nas folhas mais velhas, independente da presença ou não do vírus (Figura 3). Fodor et al. (1997) verificaram que o aparecimento dos sintomas de TMV em fumo foi precedido por um ligeiro declínio da APX, GR, GST e SOD. No entanto, depois do início da necrose, a atividade destas enzimas aumentou e a CAT não foi modificada pela infecção do vírus.

Quando as plantas sofrem algum tipo de estresse, seja ele de origem biótica ou abiótica, ocorre a indução da formação de espécies reativas a oxigênio (EROs). Essas EROs podem causar sérios danos à estrutura celular podendo acarretar na morte da planta. Por conta disso, as plantas desenvolveram um eficiente sistema de defesa antioxidante, dentre estes mecanismos estão componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que previnem o início das reações em cadeia dos radicais livres através da eliminação e redução do $\cdot\text{O}^{2-}$ e do H_2O_2 (GULLNER et al., 1995). Os mecanismos enzimáticos incluem algumas enzimas como a SOD, CAT, APX, etc (BARBOSA et al., 2014).

Em geral, a maioria das enzimas apresenta alta afinidade com o ascorbato, que é doador de elétrons e o substrato utilizado na redução do

peróxido de hidrogênio. Desta maneira, a APX é extremamente sensível à concentração de ascorbato e, se esta for muito baixa (<20 μM), a enzima perde sua estabilidade e por consequência ocorre diminuição da sua atividade (SHIGEOKA et al., 2002). Essa é possivelmente uma das causas pelas quais ocorreu a redução da atividade da enzima no decorrer do tempo. Quando a concentração viral aumentou dentro das plantas, ou mesmo com o processo de senescência natural das folhas, provavelmente tenha ocorrido elevação da presença de H_2O_2 e utilização de mais ascorbato para que ocorresse a redução deste composto oxidante. Por conta da redução do ascorbato, a APX perdeu estabilidade e diminuiu sua atividade ao longo do tempo, principalmente a nível local.

Outros estudos mostram os efeitos das EROs na atividade das enzimas antioxidantes, como em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e pêra (*Pyrus communis*) infectadas por *Pectobacterium* (*Erwinia amylovora*), que tiveram formação de O^{2-} , peroxidação lipídica, vazamento de conteúdo celular e consequente aumento de várias enzimas antioxidantes como APX, GR, GST e peroxidases (VENISSE et al., 2001).

Evans et al. (2006) estudou o efeito da infecção viral por *Emiliania huxleyi* (Lohman) na concentração de EROs, excreção de H_2O_2 e a capacidade fotossintética celular (CPC) em algas. Os autores encontraram que durante a infecção viral, os níveis de EROs nas células foram duas vezes mais elevados e os níveis de H_2O_2 foram cerca de 78% maiores do que na cultura não infectada. Os autores sugerem que o estresse oxidativo é muito maior em culturas infectadas.

Plantas de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*C. pepo*) infectadas com CMV e ZYMV apresentaram formação de EROs por meio do aumento na concentração de peróxido e ácidos graxos poli-insaturados indicando desintegração das membranas. Além disso, as plantas infectadas apresentaram aumento na síntese de SOD, CAT, peroxidase e APX. Todas as isoformas de peroxidases foram detectadas tanto no pepino como na abobrinha, não apenas funcionando como eliminadoras de radicais livres, mas também catalisadoras da formação de H_2O_2 . A formação de EROs nas plantas não foi suficiente para o colapso do tecido e restrição do patógeno, pois o aumento das enzimas antioxidantes impediu a morte celular (RIEDLE-BAUER, 2000).

De acordo com Noctor & Foyer (1998), a desintoxicação de H_2O_2 pela APX é seguida por uma série de reações catalisadas pelas enzimas monodehydroascorbate redutase (MDHAR), dehydroascorbate redutase (Dhar) e glutathione redutase (GR). Essas enzimas compõem um dos

principais sistemas antioxidantes nas plantas, o chamado ciclo ascorbato-glutationa. Nos cloroplastos, os níveis de H_2O_2 são controlados por este ciclo envolvendo inclusive a APX (WINSTON, 1990).

Através da Figura 3, verifica-se que a partir de 4 DAI (efeito local), as plantas de Adele inoculadas com PRSV-W têm sua atividade de APX reduzida, não se diferenciando das plantas que não foram inoculadas. A Caserta apresentou maior atividade nas folhas inoculadas em todos os tempos, exceto aos 4 DAI. A enzima na cultivar Adele (resistente) em comparação à Caserta, teve aumento de 58% aos 8 DAI, a nível sistêmico (Figura 13). Possivelmente, isso poderia retardar a replicação do vírus e por consequência o aumento da concentração viral nas folhas mais novas (Figura 18). A partir de 20 DAI, a atividade da APX sofreu uma queda (Figura 16) de 18% e a concentração viral sistêmica nesse mesmo período aumenta mais que o dobro. Os resultados mostram que a APX pode ter relação com a infecção viral, e pode ser um dos fatores que dificultaram a replicação do vírus na planta resistente.

A atividade da APX foi reduzida em ambas as cultivares ao longo do tempo, enquanto que na Caserta, a GR a nível local teve a atividade aumentada aos 8 DAI, na Adele o aumento aconteceu já aos 4 DAI. Analisando as Figuras 3 e 6, as quais apresentam a atividade da APX e GR a nível local da infecção, respectivamente, nota-se que quando a atividade da APX atinge um determinado nível de redução, ocorre aumento na GR em Caserta, principalmente aos 8 DAI. Provavelmente, as plantas compensam a queda de uma enzima (APX) com o aumento de outra (GR) na tentativa de reduzir a oxidação gerada pelo estresse. Essa possível compensação pode ter ocorrido também sistemicamente, onde a APX na Adele apresenta maior atividade do que na Caserta (Figura 13), ao contrário do que ocorre na GR, onde é a Caserta que apresenta maior atividade do que a Adele (Figura 16).

Assim como o ciclo ascorbato-glutationa, a CAT também desempenha um papel muito importante na eliminação do H_2O_2 (SHARMA et al., 2012). Neste estudo, a atividade da CAT não foi modificada pela presença do vírus no local da infecção (Figura 4), similar ao encontrado por Fodor et al. (1997). De acordo com Del Río et al. (1998), os peroxissomos desenvolvem um importante papel mediador de EROs nas reações oxidativas envolvidas na senescência. As mudanças ocorridas no metabolismo de reação do oxigênio dos peroxissomos por causa da senescência, são principalmente

caracterizadas pelo desaparecimento da atividade da CAT, superprodução de O_2 e H_2O_2 e uma forte queda nas atividades da APX.

Embora apresente uma atividade mais fraca frente aos peróxidos orgânicos e menor afinidade para o peróxido do que a APX, a CAT tem uma taxa de rotatividade dentro da célula muito rápida (SHARMA et al., 2012). Conforme visto, as plantas possuem diversas enzimas degradantes do peróxido, no entanto, a CAT é a única que não exige o equivalente de redução celular (SHARMA et al., 2012; DEL RÍO & PUPPO, 2009). Para sua atividade ser efetiva, é necessária a presença de H_2O_2 em altas concentrações (mM), fato este que explica a sua grande importância na eliminação de agentes oxidantes, principalmente quando estes estão em elevadas concentrações nas células de plantas em condições de estresse severo (DUBEY, 2011).

De acordo com a Figura 4, a CAT não apresentou diferença nas folhas inoculadas com o PRSV-W no decorrer do tempo para ambas as cultivares estudadas. Sistemicamente, as plantas de Adele infectadas com com vírus apresentaram aumento da CAT aos 20 e 30 DAI (Figura 14), enquanto a cv. Caserta teve aumento médio de 17% na atividade da CAT nas plantas inoculadas aos 16 e 20 DAI, quando ocorreu também aumento do título viral (Figura 18). Em termos de título viral, também havia menos vírus nas folhas inoculadas de ambas as cultivares e na Adele sistemicamente, conforme apresentado na Figura 18. Possivelmente, o estresse gerado nessas situações foi menor, e por consequência, menor produção de peróxido e menor ativação da CAT, uma vez que a enzima atua principalmente quando a concentração de peróxido é elevada. A Caserta, por ser mais suscetível ao vírus e apresentar maior título viral, possivelmente teve maiores concentrações de EROs (principalmente H_2O_2) e por consequência, ocorreu o aumento da atividade da CAT e de outras enzimas. Comparada com Adele inoculada, as plantas da cultivar Caserta com vírus apresentaram aumentos mais pronunciados nas atividades das enzimas, e esses ocorreram em maior número de tempos amostrados. Isso fica mais evidente nas folhas mais novas da Caserta (efeito sistêmico), onde a concentração viral foi bem elevada. Por meio dos resultados, pode-se perceber que há uma relação positiva entre o estresse gerado (título viral) e atividades de enzimas antioxidantes.

Outra enzima muito importante para eliminação de H_2O_2 do organismo é a GPX. De acordo com Das & Roychoudhury (2014), esta é uma enzima que elimina o peróxido presente nas células não só quando as plantas estão sob condições de estresse, mas inclusive em condições normais. Locato (2010) explica que as peroxidases utilizam o

peróxido como oxidante e os compostos fenólicos como doadores de elétrons auxiliando a CAT e a APX na eliminação do H₂O₂ gerado inclusive pela ação da SOD.

As Figuras 5 e 15 apresentam a atividade da GPX com efeito no local da infecção e sistêmico, respectivamente. O comportamento da atividade enzimática é crescente de acordo com o passar dos dias, independente do tratamento e da cultivar (no efeito local), indicando que a enzima está ativa mesmo em condições normais (sem estresse). No entanto, avaliando-se as folhas mais novas, as plantas de ambas as cultivares infectadas apresentaram atividade maior do que aquelas não infectadas, comprovando a ação da enzima não apenas nas folhas inoculadas, mas também nas folhas onde o vírus se estabeleceu sistemicamente. A Adele exibiu aumento a partir dos 16 DAI na atividade da GPX, mas assim como na Caserta e no experimento de efeito local, a atividade enzimática aumenta no decorrer do tempo. As plantas que sofreram estresse possuem maior atividade da GPX, isso porque a enzima, para manter a integridade das células vegetais, necessita de maior atividade para reduzir o peróxido gerado por causa da ação do vírus dentro da planta. De modo similar ao trabalho de Missiura (2005), onde a GPX teve maior atividade em quatro cultivares de melancia (*Citullus lanatus* Schrad) infectadas com o PRSV-W do que nas plantas sadias.

A Cultivar Adele apresentou aumento de 66% na atividade da GPX nas folhas inoculadas logo no primeiro dia após a inoculação, enquanto que na Caserta não ocorreu ativação da enzima. Na Caserta, a ativação da GPX ocorreu sistemicamente somente a partir de 12 dias após a infecção e segue com elevada atividade (em média 54% a mais nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas) nos demais tempos analisados, indo de acordo com o elevado título viral nesta cultivar (Figura 18). A Adele, que apresentou rápida resposta ao PRSV-W nas folhas inoculadas em termos de atividade de GPX, mostrou em média 26% a mais na atividade sistêmica dessa enzima em plantas inoculadas em relação às não inoculadas, e o título viral foi menor do que na Caserta. Possivelmente, a GPX desenvolve um papel importante na Adele, dificultando a replicação do vírus dentro da planta, o que não ocorre na Caserta, que aumenta a atividade da GPX apenas após o estabelecimento do vírus dentro da planta.

Schons (1997) estudou o efeito no metabolismo de três cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) infectadas pelo principal vírus da cultura, o *Potato leafroll* (PLRV). As plantas infectadas apresentaram maior atividade da peroxidase quando comparadas às sadias,

independente da variedade, concluindo-se que o vírus causa um estresse nas plantas e altera o seu metabolismo. Diaz-Vivancos et al. (2006) em estudo com diferentes cultivares de pessegueiro infectadas com *Plum pox virus* (PPV) também encontraram aumento na atividade de algumas enzimas como APX e GPX tanto na Cultivar suscetível como na resistente, no entanto, o aumento da atividade foi muito maior na cultivar suscetível.

Na Adele, a nível local as atividades da GPX e GR foram iniciadas antes do que na Caserta e a atividade da APX, de maneira geral, foi maior na Adele tanto a nível local como sistêmico. A nível sistêmico, na cv. Caserta, a atividade da GPX e da GR é ativada antes do que na Adele, provavelmente na tentativa de se livrar do vírus. O fato da Adele ter uma resposta rápida à infecção viral no início, poderia contribuir para a redução do título viral nesta cultivar e dificultar a translocação do vírus sistemicamente.

A SOD, igualmente à CAT, manteve-se inalterada durante o tempo, e quando ocorreu aumento em sua atividade, não houve diferença entre plantas inoculadas (efeito local) e não inoculadas (local x sistêmico) (figura 7 e figura 12, respectivamente). Apenas aos 12 DAI as plantas inoculadas com PRSV-W a nível sistêmico de ambas as cultivares apresentaram aumento da atividade enzimática. A SOD constitui a primeira linha de defesa contra as EROs (DINAKAR et al., 2012). De acordo com Matheson et al. (1975), a SOD e a CAT são as enzimas antioxidantes mais eficientes, pois, atuam na conversão do radical O_2^- e do H_2O_2 em água e oxigênio. A ação combinada dessas duas enzimas impede a formação de radicais de hidroxila, que são altamente reativos e com alto potencial oxidante. Assim como no presente trabalho, Messias (2008) estudou as modificações metabólicas ocasionadas por um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro por meio das enzimas SOD, CAT, APX, GPX e siringaldazina peroxidase. A SOD não se diferenciou nas plantas inoculadas e sadias, indicando que possivelmente esta enzima não estaria envolvida com a infecção viral.

No geral, algumas enzimas foram ativadas rapidamente na Adele em resposta ao vírus, na folha inoculada, e poderiam ajudar na restrição da replicação e movimentação viral. Por outro lado, em situações onde o vírus estabeleceu alta concentração (Caserta, sistemicamente), a elevação na atividade de algumas enzimas antioxidantes nas folhas mais novas pode ser uma tentativa da planta em reduzir os danos gerados por EROs, pouco contribuindo para conter a evolução do vírus.

3.4.2 Sintomas e título viral em duas cultivares de abobrinha com diferentes níveis de resistência ao PRSV-W

As tabelas 1 e 2 apresentam valores das notas atribuídas aos sintomas desenvolvidos em cada uma das cultivares de abobrinha. Através delas, pode-se observar que a cv. Adele apresenta notas muito inferiores à Caserta, cerca de 8 e 5 vezes menor para o primeiro e segundo experimento, respectivamente, indicando a resistência ou tolerância da Adele ao PRSV-W. Em estudo avaliando o controle genético da resistência ao PRSV-W na linhagem de *C. pepo* ‘Whitaker’ (resistente) e Caserta (suscetível), Menezes et al. (2015) também atribuíram notas de severidade inferiores para a linhagem resistente. Esta apresentou média de notas 30% inferior à da suscetível, com escala variando de 1 a 5. Os autores afirmaram que a resistência ao PRSV-W na linhagem ‘Whitaker’ é poligênica, ou seja, existe mais de um gene principal responsável em conferir resistência ao vírus.

Observando-se apenas as notas de severidade, baseadas em sintomas, é visível que a Adele apresenta algum tipo de resistência ao vírus. Considerando-se os resultados de RT-qPCR (Figura 18), percebe-se que as cultivares não se diferenciaram em termos de título viral presente nas folhas inoculadas, mas a cv. Caserta apresentou concentração viral 5 vezes maior do que a Adele sistemicamente, indicando que possivelmente na cultivar resistente o vírus encontra dificuldades para se replicar nas folhas mais novas. Em estudos com a expressão sistêmica dos sintomas de *Melon necrotic spot virus* (MNSV) em plantas de melão, Mallor et al. (2003) mostraram que em uma das variedades estudadas (“Doublon”) o vírus só foi encontrado nos cotilédones (local da inoculação) e concluíram que, nesse caso, ocorreu restrição à multiplicação viral e/ou ao movimento célula a célula.

No caso do presente estudo, a resistência provavelmente não ocorreu devido ao bloqueio na movimentação via floema (sistêmica), uma vez que, embora em menor quantidade, o vírus se encontra sistemicamente na planta resistente.

Nascimeto et al. (2012) estudaram a resistência fenotípica e os sintomas apresentados pela infecção de PRSV-W em genótipos de *Cucurbita* spp. Dentre 9 genótipos de abóbora estudados e inoculados com o vírus, dois apresentaram sintomas mais leves do que aqueles tidos como suscetíveis e um deles não apresentou sintomas, mostrando-se um genótipo promissor para programas de melhoramento genético visando a resistência ao PRSV-W. No presente estudo, a Adele também não apresentou os sintomas característicos do PRSV-W, ao contrário da cv.

Caserta, que é altamente suscetível e intolerante. O único sintoma apresentado pela Adele é um leve mosaico no final das avaliações, quando a Caserta já se apresenta completamente infectada e deformada pelo vírus (Figura 2).

Outros trabalhos com diferentes vírus foram realizados utilizando-se escalas de notas para sintomas em plantas resistentes e suscetíveis, como por exemplo estudos com plantas de melancia infectadas com três isolados do PRSV-W de três regiões brasileiras (VIEIRA et al., 2010) e com plantas de pepino infectadas com *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (GALIPIENSO et al., 2013). Neste último estudo, utilizou-se a RT-qPCR para verificar a infectividade de dois isolados de CVYV em dez cultivares comerciais de pepino com diferentes graus de resistência. Os autores observaram correlação negativa entre o nível de resistência e o título viral, o qual é menor para a cultivar resistente do que as cultivares de média resistência e suscetível, acordando com este trabalho e de Picó et al. (2005).

No presente estudo, houve uma diminuição do título viral aos 2 e 4 dias após a infecção (em relação ao primeiro dia), voltando a aumentar de maneira expressiva aos 8 dias no local da inoculação, independente da cultivar (Figura 18). No momento da inoculação, ocorrem lesões promovidas pela abrasão do carborundum nas folhas de abobrinha. As lesões, após 24 horas, ainda não estão necrosadas a ponto de impedir a replicação viral. Depois desse período, possivelmente ocorreu a morte das células e por isso, as partículas virais que se encontravam nessa região tornaram-se inviáveis para a replicação, uma vez que vírus é biotrófico e necessita do tecido vivo para replicar-se. Isso explicaria a redução mencionada. As partículas que permaneceram viáveis continuaram a replicação no tecido que não foi lesionado e, com o passar dos dias, muitas células vegetais foram infectadas, com uma consequente elevação do título viral aos 8 dias após a inoculação.

Percebe-se que, nas folhas mais velhas (inoculadas), as cultivares não se diferenciam na replicação do vírus (Figura 18). Observando-se as folhas mais novas, onde o vírus se estabeleceu sistemicamente, pode-se perceber que a cultivar suscetível (Caserta) apresenta valores da quantificação relativa do título viral muito superiores à Adele. Até 16 dias após a inoculação (período no qual a Adele não apresentou elevação no título viral), a Caserta teve em média títulos virais 80% superiores à Adele. Mesmo depois da elevação do título viral aos 16 DAI, a Adele teve concentração viral 70% inferior à concentração da Caserta.

A resistência ao movimento sistêmico de diversos vírus foi demonstrada por Dufour et al. (1989). Os autores estudaram o movimento do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em cultivares de pimenta com diferentes níveis de resistência utilizando o teste ELISA para detecção viral e, no período de 7 a 10 dias após a inoculação, o vírus foi encontrado em todos os tecidos das plantas suscetíveis, apenas nas folhas inoculadas em plantas resistentes, e somente nos caules e raízes primárias nas parcialmente resistentes. Como na cv. Adele, o vírus foi encontrado, embora em menor concentração, também em folhas não inoculadas, a resistência dessa cultivar ao PRSV-W não parece estar ligada à restrição do movimento sistêmico.

No presente estudo, observando-se apenas o teste ELISA (qualitativo) e a avaliação sintomática é possível que a Adele apresente tolerância ao vírus. No entanto, estudos de produção deveriam ser realizados para confirmar a hipótese, conforme descrito por Vieira et al. (2010) que avaliaram genótipos de melancia infectados com isolados de PRSV-W e ressaltaram que, para ter-se uma conclusão definitiva a respeito da tolerância, é necessário a realização de testes de produção. Através dos resultados obtidos por meio de RT-qPCR, sugere-se que a Adele apresenta resistência à replicação do vírus em folhas mais novas, pois ambas as cultivares não se diferiram no título viral nas folhas inoculadas, mas, sistemicamente, esta cultivar têm menor título viral do que a Caserta.

3.5 CONCLUSÃO

Os sintomas observados nas cultivares de abobrinha têm relação com o título viral.

A cultivar Adele apresenta resistência à replicação do vírus em folhas mais novas. A resposta rápida à infecção viral a nível local, com a maior atividade das enzimas APX, GPX e GR nos primeiros dias após a inoculação, poderia contribuir para a redução do título viral nesta cultivar.

O maior estresse gerado na cultivar Caserta (suscetível), pelo elevado título viral estabelecido sistemicamente na planta, desencadeia pronunciados aumentos nas atividades de enzimas antioxidantes ao longo do tempo de evolução da doença.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2016, Anuário da Agricultura Brasileira. **Informa Economics**, FNP, South America. 2016.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5ª ed. Academic Press: 2005. 952p.

ARAÚJO, F. F. de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (*Acibenzolar-S-Metil*). **Summa phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BARBIERI, R. L. **A diversidade de abóboras no Brasil e sua relação histórica com a cultura**. 2012. Disponível em: <https://www.slowfoodbrasil.com/textos/alimentacao-e-cultura/501-aboboras-e-cultura>. Acesso em: 07 de dezembro de 2017.

BARBOSA, M. R.; MEDEIROS DE A. S. M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; & RANGEL C. T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

BEEEMSTER, A. B. R. (1972). Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants. **Viruses of potatoes and seed-potato production/edited by JA de Bokx and JPH van der Want**, 1987.

BEDENDO, I. P. Vírus. In: **Bergamin-Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L (Org). Manual de fitopatologia- princípios e conceitos. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2, 137-142. 1995.**

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated cucurbits. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 715-723, 2002.

BLANCARD, D.; LECOQ, H.; PITRAT, M. **Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar**. Madri: Mundi-prensa, 301 p. 1996.

BONILHA, E.; GIORIA, R.; KOBORI, R. F.; VECCHIA, P. T. D.; PIEDADE, S. M. D. S.; REZENDE, J. A. M. Yield of varieties of *Cucurbita pepo* preimmunized with mild strains of *Papaya ringspot*

virus-type W and Zucchini yellow mosaic virus. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 419-424, 2009.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BROETTO, F. Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas. **Coordenador: Fernando Broetto-Botucatu: IBB, Cultura. Acadêmica**, 2014.

CARDOSO, A. I. I.; PAVAN, M. A. **Premunização de plantas afetando a produção de frutos e sementes de abobrinha-de-moita.** *Horticultura Brasileira*. Vitória da Conquista, v. 31, n. 1, p. 45-49, 2013.

CARMO, G. A. DO; OLIVEIRA, F. R. DE; DE MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, F. D. A. DE; CAMPOS, M. D. S.; FREITAS, D. C. DE. Teores foliares, acúmulo e partição de macronutrientes na cultura da abóbora irrigada com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 15, n. 5, 2011.

CHAVES, A. L. R. Sintomas e danos causados por vírus em culturas de importância econômica. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 217-219, 2002.

CHOI, S. K.; YOON, J. Y.; RYU, K. H.; CHOI, J. K.; PALUKAITIS, P.; PARK, W. M. Systemic movement of a movement-deficient strain of Cucumber mosaic virus in zucchini squash is facilitated by a cucurbit-infecting potyvirus. **Journal of general virology**, v. 83, n. 12, p. 3173-3178, 2002.

CLARKE, S. F.; GUY, P. L.; BURRITT, D. J.; JAMESON, P. E. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 2, p. 157-164, 2002.

COOPER, J. I.; JONES, A. T. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 127-128, 1983.

CPRA – Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. **Abóboras**. 2014. Disponível em: <http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Abobora.pdf>. Acesso em: 07 de dezembro de 2017.

DĄBROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECZYŃSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biol Cracow Ser Bot**, v. 49, p. 7-17, 2007.

DAS, K; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 53, 2014.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU; M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 5, p. 779-795, 2000.

DEL RÍO, A.L.; PUPPO, A. Reactive oxygen species in plant signaling. Heidelberg: Springer, 2009. p.95-111.

DEL RIO, L. A.; PASTORI, G. M.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F. J.; HERNÁNDEZ, J. A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1195-1200, 1998.

DIAZ-VIVANCOS, P.; RUBIO, M.; MESONERO, V.; PERIAGO, P. M.; ROS BARCELÓ, A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; HERNÁNDEZ, J. A. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3813-3824, 2006.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. **Physiological Plant Pathology**, v. 23, n. 3, p. 345-357, 1983.

DOKE, N.; OHASHI, Y. Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 32, n. 1, p. 163-175, 1988.

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfi eld: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.

DUFOUR, O.; PALLOIX, A.; SELASSIE, K. G.; POCHARD, E.; MARCHOUX, G. The distribution of cucumber mosaic virus in resistant and susceptible plants of pepper. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 3, p. 655-660, 1989.

EVANS, C.; MALIN, G.; MILLS, G. P.; WILSON, W. H. Viral infection of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) leads to elevated production of reactive oxygen species. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 5, p. 1040-1047, 2006.

FAOSTAT, Food and Agricultural Organization of the United Nations. **Agricultural production, pumpkins, squash and gourds**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 02/07/2016.

FAJARDO, T. V. M; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas. **Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR v. 4.3 (Build 45). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2003.

FERREIRA, M. A. J. F. Abóboras, morangas e abobrinhas: estratégias para coleta, conservação e uso. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 127-131, 2007.

FERREIRA, M. A. J. F.; MELO, A. M. T.; CARMO, C. A. S.; SILVA, D. J. H.; LOPES, J. F.; QUEIROZ, M. A.; GONÇALVES, E. Mapeamento da distribuição geográfica e conservação dos parentes

silvestres e variedades crioulas de Cucurbita. **Parentes Silvestres das espécies de plantas cultivadas**, 2006.

FISCHER, S. Z.; BARBIERI, R. L.; PEIL, R. M. N.; STUMPF, E. R.; NEITZKE, R. S.; TREPTOW, R. Cultivo e uso de variedades crioulas de abóboras ornamentais no Rio Grande do Sul. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

FODOR, J.; GULLNER, G.; ÁDÁM, A. L.; BARNA, B.; KOMIVES, T.; KIRÁLY, Z. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). **Plant Physiology**, v. 114, n. 4, p. 1443-1451, 1997.

FONSECA JÚNIOR, A.; COTORELLO, A. C.; DIAS, N. L.; D'AMBROS, R.; LEITE, R. C.; HENEIMANN, M. B.; REIS, J. K. PCR em tempo real para detecção do vírus da doença de Aujeszky. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 65, n. 3, p. 801-808, 2013

FREITAS, D. M. S. **Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do Papaya ringspot vírus – tipe W e do Zucchini yellowmosaic vírus em plantas de abobrinha-de-moita**. 2007. 63f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2007.

FREITAS, M. B. de; STADNIK, M. J. Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 90, p. 49-56, 2015.

GALIPIENSO, L.; JANSSEN, D.; RUBIO, L.; ARAMBURU, J.; VELASCO, L. Cucumber vein yellowing virus isolate-specific expression of symptoms and viral RNA accumulation in susceptible and resistant cucumber cultivars. **Crop protection**, v. 43, p. 141-145, 2013.

GENBANK. 2017. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> . Acesso em: 28/01/2018.

GILL, S. S.; KHAN, N. A.; ANJUM, N. A.; TUTEJA, N. Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. **Plant Stress**, v. 5, n. 1, p. 1-23, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIL-SALAS, F. M.; COLYER, A.; BOONHAM, N.; CUADRADO, I. M.; JANSSEN, D. Resistance screening against Cucumber vein yellowing virus using a real-time (Taqman®) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). **Crop Protection**, v. 28, n. 1, p. 109-112, 2009.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press, 1986.

GULLNER, G.; FODOR, J.; KIRÁLY, L. Induction of glutathione S□ transferase activity in tobacco by tobacco necrosis virus infection and by salicylic acid. **Pest Management Science**, v. 45, n. 3, p. 290-291, 1995.

HARLAN, J. R. **Crop & man**. Wisconsin: American Society of Agronomy, 284 p. 1975. In: RAMOS, S. R. R. R.; LIMA, N. R. S.; ANJOS, J. L. dos; CARVALHO, H. A. L. de; OLIVEIRA, I. R. de; SOBRAL, L. F.; CURADO, F. F. **Aspectos técnicos do cultivo de abóbora na região nordeste do Brasil**. Documentos (154) - Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE:1 ed. 36 p. 2010.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S. Chave para a identificação das espécies de abóboras (*Cucurbita*, *Cucurbitaceae*) cultivadas no Brasil. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

HULL, R. **Plant virology**. Academic press, 2014.

JONES, R. K.; TOLIN, S. A. Concentration of maize dwarf mosaic virus in susceptible and resistant corn hybrids. **Phytopathology**, 1972.

JUBANY-MARÍ, T.; MUNNÉ-BOSCH, S.; LÓPEZ-CARBONELL, M.; ALEGRE, L. Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of

the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 1, p. 107-120, 2008.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo, Editora Agronomica Ceres, v. 2. cap.29, p. 307-319,1997.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M.A.; **Doenças das cucurbitaceas**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo, Editora Agronomica Ceres, v. 2. cap.29, p. 307-319,1997.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M; **Doenças das cucurbitaceas**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo, Editora Agronomica Ceres, cap.32, p. 293-294, 2005.

LECOQ, H.; WISLER, G.; PITRAT, M. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. In: **Cucurbitaceae**. 1998. p. 126-142.

LIMA, J. A. A.; QUEIROZ, M. A.; RAMOS, N. F.; GONÇALVES, M. F. B. Sintomas atípicos em frutos de meloeiro e de melancia ocasionados por Watermelon mosaic virus2. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 546, 2002.

LIMA, M. F. Viroses de cucurbitáceas. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

LIMA, M. F. Viroses de Hortaliças. **Cultivar Hortaliças e Frutas - Circular Técnica**, 2001.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfi eld: Science Publishers, p.45-64. 2010.

LUIZ, C.; DA ROCHA NETO, A. C.; FRANCO, P. O.; DI PIERO, R. M. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 370-381, 2017.

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

MARCELINO, J. S.; MARCELINO, M. S. **Cultivo de abóboras**. Dossiê técnico Instituto de Tecnologia do Paraná. 2012. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico?dossie=NjExOA==>>. Acesso em: 23/06/2016.

MATHESON, I. B.; ETHERIDGE, R. D.; KRATOWICH, N. R.; LEE, J. **The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins**. Photochem Photobiol, v.21, 165-171. 1975.

MENEZES, C. B.; MALUF, W. R.; FARIA, M. V.; AZEVEDO, S. M.; RESENDE, J. T.; FIGUEIRA, A. R.; GOMES, L. A. Inheritance of resistance to papaya ringspot virus-watermelon strain (PRSV-W) in 'Whitaker' summer squash line. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 203-209, 2015.

MESSIAS, U. Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H₂O₂ associados a infecção de um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro. 2008.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MILAVEC, M.; RAVNIKAR, M.; KOVAČ, M. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus Y NTN. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 891-898, 2001.

MISSIURA, F. B. **Alterações metabólicas promovidas pelo Papaya ringspot vírus – type W em plantas de melancia**. 2005. 60f.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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

NEE, M. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, New York, v. 44, p. 56-68, 1990.

NASCIMENTO, I. R. do; DOS SANTOS, L. B.; SARMENTO, R. D. A.; FIGUEIRA, A. D. R.; SOUSA DE OLIVEIRA, G. I.; de SOUZA AGUIAR, R. W. Phenotypic reaction of *Cucurbita* spp. genotypes to Pappaya ringspot virus, watermelon strain-PRSV-W. **Bioscience journal**, v. 28, n. 2, p. 191-197, 2012.

NOCTOR G; FOYER CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279. 1998.

OLIVEIRA, T. M. dos S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of plant physiology**, v. 161, n. 5, p. 531-542, 2004.

PARIS, H. S. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. **Horticultural Reviews-Westport then New York-**, v. 25, p. 71-170, 2001.

PÉREZ□CLEMENTE, R. M.; MONTOLIU, A., VIVES; V., LÓPEZ□CLIMENT; M. F.; GÓMEZ□CADENAS, A. Photosynthetic and antioxidant responses of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) plants to citrus tristeza virus infection. **Plant pathology**, v. 64, n. 1, p. 16-24, 2015.

PICÓ, B.; SIFRES, A.; NUEZ, F. Quantitative detection of Cucumber vein yellowing virus in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. **Journal of virological methods**, v. 128, n. 1, p. 14-20, 2005.

PROMEGA, Technical manual “SV Total RNA Isolation System”. Instructions for the use of products, Z3105, Z3100 and Z 3101.

PROVVIDENTI, R. IN: ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. **Compendium of Cucurbit Disease**. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 87 p. 1996.

RAMOS S. R. R.; QUEIROZ M. A. 2005. **Recursos genéticos de abóbora no Nordeste brasileiro**. In: LIMA CLM. Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 99-116.

RESENDE, G. M. de; BORGES, R. M. E.; GONCALVES, N. P. da S. Produtividade da cultura da abóbora em diferentes densidades de plantio no Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

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

REZENDE, J. A. M.; PACHECO, D. A. Control of papaya ringspot virus-type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, v. 82, n. 2, p. 171-175, 1998.

RIEDLE□BAUER, M. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 5, p. 297-302, 2000.

ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S. Ascorbate-glutathione and plant tolerance to various abiotic stresses. **Oxidative stress in plants causes**,

consequences and tolerance. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, p. 177-258, 2012.

SCHONS, J. Efeito do vírus do enrolamento da folha da batata sobre os teores de poliaminas, proteínas, açúcares e atividade da peroxidase em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) com diferentes níveis de resistência. **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, n. 2, p. 291-292, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, p.227-248. 2008.**

SHALITIN, D.; WOLF, S. Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. **Plant physiology**, v. 123, n. 2, p. 597-604, 2000.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 541-550, 2004.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SOARES, M. G. de O.; SOARES, J. de A.; CEZAR, M. A.; CARDOSO, T. A. de L.; LIMA, J. A. de A. Ocorrência de patógenos em cultivos de melancia e abóbora no sertão da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 1, p. 07-13, 2016.

SOOSAAR, J. L. M.; BURCH-SMITH, T. M.; DINESH-KUMAR, S. P. Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 789-798, 2005.

TEPPNER H. Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae). **Phyton**, v. 44, p. 245- 308, 2004.

VENISSE, J.; GULLNER, G.; BRISSET, M. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 2164-2172, 2001.

VIEIRA, J. V.; DE ÁVILA, A. C.; PINTO, M. N.; DA SILVA, B. M.; BORGES, C. L. Avaliação da coleção de germoplasma de melancia da Embrapa Hortaliças para tolerância a virose. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2005.

VIEIRA, J. V.; ÁVILA, A. C. de; SILVA, G. O. da. Evaluation of watermelon genotypes for resistance to Papaya ringspot virus, type watermelon. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 7-11, 2010.

WALKEY, D. G. A. Production of virus-free plants. In: **Applied plant virology**. Springer, Dordrecht, p. 270-292. 1991.

WALTERS, D.; NEWTON, A. C.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. John Wiley & Sons, 2008.

WINSTON, G. W. Physicochemical basis for free radical formation in cells. Production and defences. **Plant Biology**, p. 57-86, 1990.

WHITAKER, T. W.; CUTLER, H. C. Cucurbits and cultures in the Americas. **Economic Botany**, v. 19, n. 4, p. 344-349, 1965.

WHITAKER T.W. & ROBINSON R.W. Squash breeding. In: Basset M.J., editor. **Breeding vegetables crop**. Westport, CT: AVI publishing Co., Inc., p. 209-242. 1986.

YEH, H. Y.; YATES, M. V.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 49-54. 2009.

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

ZAMBOLIM, E. M.; DUSI, A. N. Doenças causadas por vírus em cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 182, 1995.

ZHAO, S.; LIU, D.; LING, N.; CHEN, F.; FANG, W.; SHEN, Q. Bio-organic fertilizer application significantly reduces the *Fusarium oxysporum* population and alters the composition of fungi communities of watermelon *Fusarium* wilt rhizosphere soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.50, n.5, p.1-10, 2014.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS, 87pp. 1996.