

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

**Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no estado do Espírito Santo;
Avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esse vírus;
Caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (*Carica papaya*) em campo**

Adriana Gonçalves Moreira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de Concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Adriana Gonçalves Moreira
Engenheira Agrônoma

Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no estado do Espírito Santo; Avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esse vírus; Caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (*Carica papaya*) em campo

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

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de Concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2009**

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

Moreira, Adriana Gonçalves

Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no estado do Espírito Santo; Avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esse vírus; Caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (*Carica papaya*) em campo / Adriana Gonçalves Moreira. - - Piracicaba, 2009.
162 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Abóbora moranga 2. Abobrinha 3. Mamão 4. Mosaico (Doença de Planta) 5. Nucleotídeos
- Sequência 6. Potyvirus 7. Sequência de aminoácidos 8. Virose vegetal - Controle 9. Vírus de
plantas I. Título

CDD 634.651
M839c

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

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho tão significativo em minha vida, primeiramente agradeço, sensibilizada:

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, pela orientação segura e profissional e ao ser humano especial pelo incentivo e apoio que sempre me ofereceu.

Pela sequência, o entorno de instituições e de pessoas que possibilitaram local, tempo e condições para experiências fundamentais aos estudos realizados, também agradeço:

Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, em especial ao Setor de Fitopatologia e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Dr. José Aires Ventura, do INCAPER/Vitória-ES, pela confiança no trabalho, pelo incentivo, pelas inúmeras sugestões e pela grande parceria aqui realizada;

Aos pesquisadores Dr. Hércio Costa, INCAPER/Vitória-ES, M.Sc. Marlon V. V. Martins, M.Sc. Inobert de Melo Lima, ao técnico agrícola Clair Barbosa do INCAPER/Linhares-ES. Ao M.Sc. Carlos H. Rodrigues da GAIA Papaya Importação e Exportação/Linhares-ES, pelo auxílio fundamental na coleta de amostras e implantação do experimento em campo no estado do Espírito Santo;

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto sobre o vírus do mosaico do mamoeiro.

Por ajudas preciosas, tanto materiais, como científicas, sugestões e críticas, também continuo agradecendo:

Ao professor Dr. Elliot W. Kitajima do NAP/MEPA, ESALQ/USP, pelos trabalhos de microscopia eletrônica, pelas críticas e ensinamentos, mesmo com pouco convívio;

Ao Dr. Valdir A. Yuki, do Instituto Agronômico de Campinas pelas colônias de afídeos;

Ao professor Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo pela concessão de uso do sequenciador automático;

Ao professor Dr. Ivan Paulo Bedendo pela concessão de uso do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos;

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla, pelo grande auxílio nos trabalhos realizados;

Ao Sr. Pedro C. Arthuso, pelo auxílio na instalação e manutenção dos trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação e em campo do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP.

E, ainda, do ponto de vista pessoal como acadêmico, continuo agradecendo, neste espaço público, destaques merecidos e inesquecíveis:

Ao Grupo de Estudos da Fitopatologia, GEFITO;

A Associação dos Pós-Graduandos da ESALQ/USP;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP;

Aos amigos do programa de pós-graduação em Fitopatologia, em especial aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP e “agregados”, Dra. Adriana Salomão Jadão, M.Sc. Ana Carolina Firmino, M.Sc. Renata Faier Calegario, M.Sc. Débora M. Sansini Freitas, M.Sc. Estela Bonilha, M.Sc. Ana Carolina C. de N. Alves, M.Sc. Júlio C. Barbosa, Dr. José Segundo Giampan, Dra. Marília Della Vechia, Dra. Scheila C. M. Silva, Evelyn Moretti (principalmente pelo auxílio nos estudos de estabilidade e premunização em casa de vegetação), Joice Kim Banim, Engo. Agro. Daniel Nakano, Bruna A. Galoppini e Rogério Pazim;

Aos amigos do programa de pós-graduação em Fitopatologia, em especial aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos: Luciano, Ana Paula, Daniela, Bárbara, Isolda, Maria Cristina, Raquel, Eliane e “Renatas”;

A todos os meus amigos, “petrolinenses”, “viçosenses” e “piracicabanos” que sempre me apoiaram, incentivaram, compartilharam comigo sugestões, críticas, ensinamentos, risos, excelentes conversas e bons momentos vividos. Obrigado por ser a extensão da minha família.

Finalmente agradeço à minha família, por ser meu porto seguro. Em especial meus pais, pelo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo permanente na busca de conhecimentos, mesmo à distância, sempre acreditando em mim, no meu trabalho e no meu potencial como ser humano.

Adriana G. Moreira

ADRIANA GONÇALVES MOREIRA, filha de Valdir Araújo Moreira e Elisabet Gonçalves Moreira, nasceu em 8 de março de 1979, na cidade de Petrolina, estado de Pernambuco, Brasil.

Concluiu o segundo grau na “Goshen High School”, na cidade de Goshen, Estado de Indiana, nos Estados Unidos da América em 1997. No ano seguinte, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Engenheira Agrônoma em março de 2003. Nesse mesmo ano, ingressou no programa de mestrado em Fitopatologia, na mesma universidade, com área de concentração em Fitovirologia sob a orientação do professor Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior. Em 2005, sob a orientação do professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, ingressou no programa de doutorado em Fitopatologia, área de concentração Fitovirologia, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Neste ano de 2009 submeteu-se à defesa da tese de doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
Referências	20
2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS FRACOS DO VÍRUS DO MOSAICO DO MAMOEIRO (<i>PAPAYA RINGSPOT VIRUS – TYPE P</i>) OCORRENDO NATURALMENTE EM POMARES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.....	27
Resumo	27
Abstract	28
2.1 Introdução	29
2.2 Desenvolvimento.....	31
2.2.1 Revisão Bibliográfica.....	31
2.2.2 Material e Métodos.....	44
2.2.3 Resultados	56
2.2.4 Discussão.....	82
2.3 Conclusões.....	90
Referências	90
Apêndices	105
3 AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO NATURAL DE <i>CUCURBITA PEPO</i> CV. CASERTA E <i>C. MAXIMA</i> CV. EXPOSIÇÃO COM O <i>PAPAYA RINGSPOT VIRUS - TYPE P</i> (PRSV-P).....	113
Resumo	113
Abstract	113
3.1 Introdução	114
3.2 Desenvolvimento.....	116
3.2.2 Material e Métodos.....	116
3.2.3 Resultados e Discussão.....	121
3.3 Conclusões.....	130

Referências.....	131
4 CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO <i>ALFALFA MOSAIC VIRUS</i> (AMV) EM INFECÇÃO NATURAL EM MAMOEIRO (<i>CARICA PAPAYA</i>) NO BRASIL.	135
Resumo	135
Abstract.....	136
4.1 Introdução.....	136
4.2 Desenvolvimento	140
4.2.2 Material e Métodos	140
4.2.3 Resultados e Discussão	146
4.3 Conclusões	158
Referências.....	158

RESUMO

Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no estado do Espírito Santo; Avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esse vírus; Caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (*Carica papaya*) em campo

No estado do Espírito Santo (ES), uma das principais áreas produtoras de mamão do país, a eliminação sistemática de plantas doentes tem sido aplicada desde a década de 1980 para o controle do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* - type P; PRSV-P). O uso permanente dessa prática nos últimos 25 anos levou a uma aparente seleção e predominância de isolados fracos do vírus. Os objetivos deste trabalho foram: investigar a prevalência desses isolados fracos, bem como a estabilidade e o efeito protetor contra isolados severos do vírus; estudar a infecção natural de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) e abóbora moranga (*C. maxima* cv. Exposição) com o PRSV-P quando plantadas ao lado de mamoeiros infectados e caracterizar um isolado do *Alfalfa mosaic virus* (AMV) em infecção natural em mamoeiro. A detecção de possíveis isolados fracos do vírus foi realizada por PTA-ELISA, microscopia eletrônica e RT-PCR. Todos os isolados também foram inoculados mecanicamente em mamoeiro cv. Golden para avaliação de sintomas. Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial de alguns isolados fracos mostraram identidades superiores a 89% e 90%, respectivamente, com isolados do PRSV-P. De 119 amostras de mamoeiros analisadas, 86 estavam infectadas com o PRSV-P, mas somente 75 induziram sintomas fracos em mamoeiros. Quatro isolados fracos foram selecionados ao acaso para estudos de estabilidade, e de proteção em casa de vegetação. Apenas dois isolados fracos induziram sintomas estáveis em mamoeiros até a oitava transferência. A proteção total só foi obtida com plantas premunizadas com dois isolados fracos e desafiados com o isolado PRSV-P-ES. Plantas de mamoeiros cv. Golden premunizadas com vários isolados fracos do PRSV-P foram expostas em condições de campo na ESALQ/USP, Piracicaba, SP, em dois experimentos independentes. Poucas plantas permaneceram com sintomas fracos de mosaico até o final dos experimentos. Uma terceira exposição foi realizada em Linhares, ES, com mamoeiros cvs. Sunrise Solo e Golden premunizados com oito isolados fracos, coletados nos experimentos em campo na ESALQ/USP. Apenas uma planta premunizada com um isolado fraco permaneceu com sintomas leves da doença até a última avaliação. Tentativas de detecção de infecções naturais de cucurbitáceas com o PRSV-P foram realizados em dois plantios de abobrinha de moita e dois de abóbora moranga, na ESALQ/USP, Piracicaba, SP. A detecção do vírus foi feita por meio da inoculação de extratos foliares das cucurbitáceas em mamoeiros cv. Golden. Os mamoeiros foram avaliados por meio de sintomas, PTA-ELISA e RT-PCR. Nenhuma planta de mamoeiro inoculada com extratos foliares das duas cucurbitáceas exibiu sintomas de mosaico, embora o gene *ci*, mas não o *cp*, tenha sido detectado em uma amostra de folhas de mamoeiro, indicando que ao menos uma planta de abobrinha de moita estava infectada. Finalmente, no decorrer dos ensaios de campo na ESALQ/USP, constatou-se uma planta de mamoeiro apresentando sintomas severos de mosaico amarelo, deformação foliar e necrose sistêmica, diferente daqueles induzidos pelo

PRSV-P. Análises biológicas, sorológica e moleculares confirmaram tratar-se do AMV. Este é o primeiro relato de infecção natural de mamoeiro com esse vírus.

Palavras-chaves: *Potyvirus*; *Alfamovirus*; Cucurbitaceae; *Papaya ringspot virus* – type P; Diagnose; Transmissão; Controle de viroses; Fonte de inóculo; Caracterização molecular; Sequência de nucleotídeos; Sequência de amino ácidos

ABSTRACT

Characterization of new mild isolates of papaya ringspot virus naturally occurring in state Espirito Santo state; Evaluation of natural infection of cucurbits with this virus; Characterization of the alfalfa mosaic virus infecting papaya (*Carica papaya*) in the field

Papaya ringspot virus type P (PRSV-P) causes the major disease in Brazilian papaya orchards that result in significant yield losses. In Espírito Santo state systematic rouging of infected plants has been applied since early 1980's for the control of this disease. Its permanent use over the last 25 years has led to an apparent selection and predominance of mild strains throughout papaya orchards. The objectives of this work were to investigate the prevalence of mild isolates, as well the stability and protective effect against severe isolates of the virus; The aim of this work was to study the natural infection of zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) and pumpkin (*C. maxima* cv. Exposição) grown near to papaya trees infected with PRSV-P and characterize an isolate of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) in natural infection in papaya. The detection of possible mild isolates of the virus was performed by PTA-ELISA, electron microscopy and RT-PCR. All isolates were inoculated mechanically in papaya cv. Golden for symptoms evaluation. Nucleotides and deduced amino acids sequences of the coat protein gene of some mild isolates showed identities above 89% and 90%, respectively, with isolates of PRSV-P. Of 119 samples from papaya plants analyzed, 86 were infected with PRSV-P and 75 induced mild symptoms on papaya. Four mild isolates were randomly selected for stability and protection studies under greenhouse. Only two isolates induced mild symptoms on papaya and remained stables until the eighth transference. Full protection was obtained with preimmunized plants with two mild isolates and challenged with the isolate PRSV-P-ES. Plants of papaya cv. Golden preimmunized with several mild isolates of PRSV-P were exposed under field conditions at ESALQ/USP, Piracicaba,SP, in two independent experiments. Few plants remained with mild mosaic symptoms at the end of the experiments. A third field exposition was held in Linhares,ES, with papaya cvs. Golden and Sunrise Solo preimmunized with eight mild isolates, collected in field experiments at ESALQ/USP. Only one plant preimmunized with a mild isolate remained with mild symptoms of the disease until the last evaluation. Attempts of detection of natural infections of cucurbits with PRSV-P were carried out in two plantations of zucchini squash and pumpkin at ESALQ/USP, Piracicaba,SP. The detection of the virus was made by inoculation of leaf extracts of cucurbits in papaya cv. Golden. The papaya plants were assessed by symptoms, PTA-ELISA and RT-PCR. None of papaya plants exhibited symptoms of mosaic, while the *ci* gene, but not the *cp*, was detected in a sample of leaves of papaya, indicating that at least one clump of zucchini squash plant was infected. Finally, during the field test at ESALQ/USP, a papaya plant was found showing severe symptoms severe yellow leaf mosaic, leaf distortion and systemic necrosis, different from those induced by PRSV-P. Biological, serological and molecular tests confirmed the infection with AMV. This is the first report of natural infection of papaya with this virus.

Keywords: *Potyvirus*; *Alfamovirus*; Cucurbitaceae; *Papaya ringspot virus* – type P; Diagnose; Transmission; Control of viruses; Source of inoculum; Molecular characterization; Nucleotide sequence; Amino acid sequence

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma fruteira da família *Caricaceae*, de alto valor nutricional e econômico, cultivada em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América tropical. A planta é herbácea, de ciclo semi-perene, com pico de produção de três a cinco anos e com centro de origem na bacia Amazônica Superior. A base genética do mamoeiro é estreita, sendo limitado o número de cultivares plantadas nas principais regiões produtoras. No Brasil, as principais cultivares de mamoeiro, atualmente exploradas, são classificadas em dois grupos, de acordo com o tipo de fruto: Solo e Formosa (DANTAS, 2000)

De acordo com a FAO, o Brasil é o maior produtor mundial de mamão, seguido da México, Nigéria, Índia e Indonésia. O México, Malásia e Brasil são, respectivamente, os maiores exportadores dessa fruta. Os principais países importadores são: Holanda, Estados Unidos, Reino Unido, Portugal e Espanha; por bloco econômico, o destaque é o Nafta e a União Européia (BOTEON, 2005; FAO, 2006). O Brasil é o maior produtor de frutas tropicais do mundo com uma produção estimada de 32 milhões de toneladas anuais e uma área cultivada de aproximadamente 2 milhões de hectares (ha) e um PIB superior a US\$ 11 bilhões. Apesar de ser o maior produtor mundial de mamão, a participação brasileira no mercado externo não é muito expressiva, com apenas 7,7% do volume total exportado no mundo em 1998. Após 1998, na balança comercial de frutas frescas, a exportação de mamão tem crescido consideravelmente e representou aproximadamente 8,9% do valor exportado em 2002, ocupando a cultura uma área de 36.500 mil hectares, com a maior produtividade mundial, estimada em 45,2 t/ha e 1,650 milhões de toneladas produzidas de mamão em 2006 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2003; COSTA et al., 2005; FAO, 2006).

No Brasil, a região norte do Espírito Santo (ES) e a microrregião do extremo Sul da Bahia, são as maiores produtoras de mamão, responsáveis por 85,7% da produção nacional, sendo a região sul da Bahia (BA) o maior pólo produtor de mamão do país (FNP, 2006). O estado do Espírito Santo é o segundo maior produtor nacional de mamão e o principal pólo exportador do país. A área cultivada é de aproximadamente 11.500 ha, envolvendo 11 municípios, principalmente no norte do estado, com uma

produção anual superior a 650 mil toneladas e com a maior produtividade do país com 46 t/ha, devido ao alto nível tecnológico adotado pelos produtores e à utilização de práticas fitossanitárias eficientes com destaque para o “roguing”, ou erradicação de plantas doentes, no manejo das viroses que incidem sobre a cultura (COSTA et al., 2005). A estrutura fundiária é de, principalmente, pequenas propriedades com áreas de aproximadamente 50 ha. As principais regiões produtoras do ES estão localizadas nos municípios de Linhares e Pinheiros, com aproximadamente 6.400 ha, sendo as cultivares Solo e Formosa as mais plantadas em Linhares e Pinheiros, respectivamente (BOTEON, 2005).

Como inúmeras outras espécies vegetais exploradas economicamente pelo homem, a cultura do mamoeiro pode ser prejudicada por pragas que reduzem a longevidade das plantas, bem como a produção quantitativa e qualitativa de frutos. Entre essas pragas encontram-se os vírus, cujo número ultrapassa dez espécies até então encontradas infectando mamoeiros em diferentes países (COOK; ZETTLER, 1960; WAN; CONOVER, 1981; LORETO et al., 1983; GONSALVES; TRUJILLO, 1986; KITAJIMA et al., 1991; REZENDE; FANCELLI, 1997; SAXENA et al., 1998; LIMA et al., 2001; ZAMBOLIM-MACIEL et al., 2003; PURCIFULL et al., 1984; WANG et al., 2004; SING et al., 2007). No Brasil, até o momento, os mamoeiros podem ser infectados naturalmente pelos vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus – type P*, PRSV-P), do amarelo letal (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV) (LORETO et al., 1983; KITAJIMA et al., 1992; LIMA, ; LIMA; MARQUES, 1994) e da meleira (*Papaya meleira virus*, PMeV) (ZAMBOLIM et al., 2003; ARAÚJO et al., 2007).

Contudo, o vírus causador do mosaico do mamoeiro é o principal vírus que infecta esta cultura e continua sendo um fator limitante da produção dessa frutífera em diversos países onde ocorre (TORRES; GIACOMETTI, 1966; HARKNESS, 1967; COSTA et al., 1969; CONOVER, 1976, PURCIFUL et al., 1984; REZENDE; FANCELLI, 1997), além de provocar o aparecimento de manchas nos frutos que depreciam sua qualidade junto ao consumidor. O PRSV-P parece ter sido relatado pela primeira vez em mamoeiros na Jamaica em 1928 (SMITH, 1929).

Historicamente, no Brasil, o cultivo do mamoeiro na década de 1970 era praticado principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Pará, com destaque para a

região de Monte Alto, SP. Com a constatação do PRSV-P nessa região em 1969 (COSTA et al., 1969), a cultura iniciou um processo migratório, indo para o oeste e norte do estado de São Paulo, passando por vários municípios próximos a São José do Rio Preto e Araçatuba. O deslocamento da cultura foi tão grande que ultrapassou os limites estaduais com o estabelecimento do cultivo do mamoeiro por cerca de oito anos no município de Inhumas, GO. Paralelamente, a cultura também estava se desenvolvendo no Pará. Nas décadas de 1980 e 90 a cultura continuou com a migração, na tentativa de escapar do mosaico do mamoeiro, e se deslocou para os estados da Bahia e Espírito Santo, onde se encontra até os dias de hoje (RUGGIERO et al., 2003; Informação pessoal J.A.M. Rezende¹).

Hoje é conhecida a característica endêmica dessa virose em diversos estados do país, além de ser comum a ocorrência de plantas infectadas em pequenos pomares de chácaras, fundos de quintais e beiras de estradas. Esses últimos aspectos fazem com que haja fontes constantes de vírus espalhadas por quase todo o território nacional.

O PRSV pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (FAUQUET et al., 2005) e está classificado em dois biótipos, diferenciados por suas características biológicas. O biótipo W, Watermelon (PRSV-W) infecta sistemicamente espécies da família *Cucurbitaceae*, constituindo fator de importância econômica para estas culturas no Brasil (BONILHA, 2007). Por outro lado, o biótipo P, Papaya (PRSV-P), é capaz de infectar sistemicamente espécies das famílias *Caricaceae* e *Cucurbitaceae*, sendo o mamoeiro seu hospedeiro natural de maior importância (HULL, 2002; REZENDE; FANCELLI, 1997).

Além da espécie cultivada *C. papaya*, o PRSV-P já foi transmitido experimentalmente para outras espécies do gênero *Carica*, hoje renomeado *Vasconcellea* (CONOVER, 1964; TORRES; GIACOMETTI, 1966; HOROVITZ; JIMÉNEZ, 1967). Outras hospedeiras do PRSV-P têm sido encontradas em diferentes espécies da família *Cucurbitaceae* em testes experimentais de inoculação mecânica e com afídeos, embora a suscetibilidade seja bastante variável em função da origem do isolado viral e das espécies/variedades avaliadas (ADSUAR, 1950; PINTO, 1972; SUREKA et al., 1977; LUQUE; LÓPEZ, 1977). No entanto, a importância dessas espécies como fonte de inóculo do vírus em campo ainda não está bem estabelecida.

¹ J. A. M. Rezende, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

Tentativas feitas por Conover (1964) e Barbosa e Paguio (1982), estes últimos no Brasil, para recuperar o PRSV-P de cucurbitáceas que estavam ocorrendo próximas ou dentro de plantações de mamoeiro com mosaico, deram resultados negativos. A.S. Costa (década de 1980, dados não publicados), por outro lado, obteve recuperação desse vírus de abóboras que estavam presentes em um pomar de mamoeiros com mosaico. Magdalita et al. (1990), nas Filipinas, recuperaram o PRSV-P a partir de plantas de *Diplocyclos palmatus* que ocorriam em abundância nas proximidades de plantações de mamoeiro. Chin e Ahmad (2007) detectaram a infecção do PRSV-P em *Momordica charantia* ocorrendo nas proximidades de plantios de mamoeiro na Jamaica. Estes autores recuperaram o vírus a partir de inoculações mecânicas e por afídeo. O PRSV-P também infecta duas espécies de Chenopodiaceae (*Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*). Estas duas espécies reagem apenas com lesões locais quando inoculadas com alguns isolados desse potyvírus (YEH; GONSALVES, 1984). De maneira geral, os isolados brasileiros do PRSV-P não causam lesões nessas espécies vegetais. No entanto, Rezende e Costa (1985) relataram a obtenção de lesões locais com isolados brasileiros em *C. quinoa*, cujas sementes eram provenientes dos Estados Unidos.

Quanto à transmissão do PRSV-P por sementes de mamão, a maioria dos investigadores encontrou resultados negativos (PRASAD; SARKAR, 1989). Entretanto, testes conduzidos por Bayot et al. (1990) nas Filipinas mostraram que de 1.335 mudas obtidas de sementes da cultivar Cavite, colhidas de frutos de plantas com mosaico, duas mudas (0,15%) mostraram sintomas de mosaico.

O PRSV-P é transmitido naturalmente por afídeos, com a relação vírus-vetor do tipo não persistente. Embora os afídeos não colonizem plantas de mamoeiro, os processos de aquisição e inoculação do vírus ocorrem por ocasião das picadas de prova para o reconhecimento de seus hospedeiros. Por tal razão, a transmissão se dá com mais eficiência devido às constantes movimentações dos vetores dentro dos pomares. Mais de vinte espécies de afídeos já foram testadas experimentalmente e consideradas vetores desse vírus em outros países. No Brasil, já foram estudadas com resultados positivos de transmissão: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. coreopsidis*, *A. spiraecola*, *Aphis* sp, *Toxoptera citricidus* e *Uroleucon* sp.(COSTA et al.,

1969; BARBOSA; PAGUIO, 1982; MARTINS; VENTURA, 2007). Estudos de eficiência de transmissão do PRSV-P por três espécies de afídeos, realizados por Kalleshwaraswamy e Kumar (2008) na Índia, mostram que *M. persicae* foi a espécie ligeiramente mais eficiente, com 56% de plantas infectadas seguida de *A. gossypii* (53%) e *A. craccivora* (38%). Neste mesmo estudo, *A. gossypii* foi capaz de transmitir o PRSV-P sucessivamente por quatro vezes em testes com discos foliares. Assim, este afídeo parece ser capaz de inocular até quatro plantas de mamoeiro sem necessitar readquirir o vírus. Experimentalmente, o PRSV-P é facilmente transmitido através da inoculação mecânica, embora essa modalidade de transmissão não tenha significado do ponto de vista epidemiológico da doença.

Estudos realizados na região produtora do norte do estado do Espírito Santo, no período de 2002 a 2003, indicaram que a população de afídeos nas áreas plantadas com mamoeiros mostrou-se presente durante todos os meses do ano, com aumento da população a partir de abril, atingindo pico populacional nos meses de maio a julho. No período de março a junho é quando ocorrem as maiores incidências do vírus do mosaico do mamoeiro, ou seja, a incidência do mosaico do mamoeiro foi correlacionada à população de afídeos existentes (MARTINS, 2003). As espécies de afídeos mais frequentes para a cultura do mamoeiro na região norte do Espírito Santo foram *A. spiraecola*, *A. gossypii* e *T. citricidus* com 51,99%, 11,69% e 10,06% de frequências de ocorrência, respectivamente. *A. fabae*, *A. coeropsidis* e *M. persicae*, também foram constatados na região com frequências de ocorrência de 4,31%, 1,34% e 0,15%, respectivamente (MARTINS et al., 2007).

Nessa mesma região do Espírito Santo, Martins et al. (2005) observaram um total de 6.529 plantas daninhas associadas à cultura do mamoeiro, pertencentes a 51 espécies botânicas. Destas, 22 espécies (43,1%) de treze famílias botânicas e duas outras espécies não identificadas se mostraram como hospedeiras de afídeos, que juntas representavam cerca de 10% das plantas da cobertura vegetal natural presentes nas lavouras avaliadas. As espécies hospedeiras de pulgões mais importantes para a região foram *Commelina benghalensis* (Commelinaceae), *Sida* sp. (Malvaceae), *Chamaesyce hyrta*, *C. hyssopifolia* (Euphorbiaceae) e *Lepidium virginicum* (Cruciferae). Destas, a planta daninha trapoeraba (*C. benghalensis*) foi considerada a espécie mais

importante por ser hospedeira do maior número de espécie de afídeos e por estar associada à cultura do mamoeiro durante todo o ano. *A. gossypii* foi a espécie de afídeo encontrada com maior frequência nestas plantas, estando presente em 55% das amostras coletadas. Também foi a espécie encontrada colonizando o maior número de plantas hospedeiras (14 espécies) em nove famílias botânicas.

Para o mosaico do mamoeiro, por possuir característica endêmica, têm-se preconizado medidas de controle de modo que funcionem em convivência com a presença do patógeno. A procura de métodos de controle em convivência vem sendo considerada há anos em diversos países, através de diferentes abordagens e, em alguns casos os resultados têm sido satisfatórios. O ajuste e a determinação das estratégias de controle para o manejo dessa doença, levando em consideração o padrão de qualidade dos frutos para o mercado interno e externo, possibilitaram ao país a manutenção da liderança como maior produtor de mamão.

A erradicação sistemática de plantas infectadas, “roguing”, associada com o isolamento parcial do pomar, há décadas é considerada por diversos autores como uma forma de controlar o problema preventivamente (HARKNESS, 1967; COSTA et al., 1978; MARTINEZ, 1980), até que métodos mais duradouros sejam desenvolvidos. O primeiro relato de aplicação eficiente da erradicação para o controle do mosaico em pomares comerciais foi feito no Havaí, E.U.A., na década de 70 (NAMBA; HIGA, 1975). Anos mais tarde, a erradicação foi substituída pela premunização com estirpes fracas do vírus (YEH; GONSALVES, 1984), cuja aplicação foi logo abandonada por problemas de instabilidade das estirpes fracas selecionadas e/ou de quebra na proteção das plantas premunizadas. Desde 2002, no entanto, os produtores de mamão do Havaí têm controlado o mosaico por meio do plantio de mamoeiros transgênicos (cvs. Rainbow e Sun Up), resistentes aos isolados do vírus predominantes naquele estado americano. Em Taiwan, a premunização foi utilizada no período de 1984 a 1991. No entanto, as estirpes fracas oriundas de isolados havaianos e introduzidas naquele país tornaram-se instáveis e/ou não protegeram as plantas adequadamente, semelhante ao ocorrido no Havaí (YEH; GONSALVES, 1994). No Brasil, algumas estirpes fracas do vírus consideradas promissoras, permaneceram estáveis por curto período de tempo e não

puderam ser utilizadas no controle da doença (REZENDE; COSTA; SOARES, 1981; REZENDE, 1985; REZENDE; MÜLLER, 1995).

Talvez o exemplo de maior sucesso mundial no controle do mosaico do mamoeiro em convivência com o patógeno é do estado do Espírito Santo, Brasil. Neste estado brasileiro, a aplicação da erradicação de plantas doentes para o controle do mosaico vem sendo executada de maneira consistente com resultados bastante satisfatórios desde o início da década de 80, por ocasião da expansão da cultura no mamoeiro no estado. A partir de 1994, com a publicação da Portaria No. 175, de 25/10/1994, da Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), essa prática passou a ser mandatária em todo o estado. Em 2002, diante do sucesso da sua aplicação pelos produtores de mamão no Espírito Santo, essa legislação foi estendida ao vírus da meleira. No estado da Bahia, outro grande produtor de mamão, foi instituída, em 1998, uma legislação específica e semelhante à aplicada no estado do ES para o controle dos vírus do mosaico do mamoeiro e da meleira. Em agosto de 2008, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Secretaria de Defesa Agropecuária tornou mandatária a prática do “roguing” em todas as áreas produtoras de mamão que se destinam à exportação, com a Instrução Normativa número 26 (Portaria número 176 de 25/08/2008), para o controle do mosaico e da meleira. Como medida adicional de manejo, no Espírito Santo, tem sido recomendada a supressão de plantas daninhas hospedeiras de pulgões das lavouras de mamoeiro, reduzindo a população residente de afídeos que atuam como vetores do PRSV-P (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004; LIMA et al., 2003a, 2003b; COSTA, 2005, MARTINS; VENTURA, 2007). Isso poderá reduzir o número de plantas infectadas e erradicadas durante as inspeções.

Assim, a consistente erradicação de mamoeiros com mosaico, através de inspeções semanais nos pomares do estado do Espírito Santo, nos últimos 25 anos, levou a uma aparente seleção de fomas mais atenuadas do vírus. Isso pode ser compreendido, quando se considera que o complexo viral é composto por uma mistura de variantes genéticas, que podem induzir sintomas de diferentes intensidades, quando inoculados separados. A maioria das plantas geralmente exibe um desenvolvimento quase normal. A produção também não parece sofrer alterações quantitativas e

qualitativas significativas. Os frutos podem exibir poucos e pequenos anéis oleosos característicos da doença, que não depreciam a sua qualidade.

Diante desse quadro, os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar biológica, sorológica e molecularmente isolados fracos do vírus PRSV-P que estão presentes nos pomares do Espírito Santo e avaliar a estabilidade e o efeito protetor contra formas severas do vírus;
- Estudar a infecção natural de *Cucurbita maxima* cv. Exposição e *C. pepo* cv. Caserta com o PRSV-P, com o propósito de avaliar o potencial dessas cucurbitáceas como fontes de inóculo do vírus;
- Em adição, caracterizar biológica, sorológica e molecularmente o isolado do *Alfalfa mosaic virus* (AMV) encontrado infectando naturalmente o mamoeiro.

Referências

ADSUAR, J. **Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico**. IV: Preliminary studies on the host range of papaya mosaic. Rio Piedras,: University of Puerto Rico, 1950. 5 p. (Technical Paper, 5).

ARAÚJO, M.M.M.; TAVARES, E.T.; SILVA, F.R.; MARINHO, V.L.A.; SOUZA JÚNIOR, M.T. Molecular detection of Papaya meileira virus in the látex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.146, p.305-310, 2007.

BARBOSA, F.R.; PAGUIO, O.R. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: incidência e efeito na produção do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, p.365-373, 1982.

BAYOT, R.G., VILLEGAS, V.N., MAGDALITA, P.M., JOVELLANA, M.D., ESPINO, T.M.; EXCONDE, S.B. Seed transmission of papays ringspot virus. **Philippine Journal of Crop Science**, Manila, v.15, p. 107-111, 1990.

BOTEON, M. Desafios da fruticultura e o mercado de mamão. In: MARTINS, D.S. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap.1, p.15-21.

BONILHA, E. **Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de quatro variedades de *Cucurbita pepo***. 2007 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CHIN, M; AHMAD, M.H. *Momordica charantia* is a weed host reservoir for *Papaya ringspot virus* type P in Jamaica. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1518, 2007.

CONOVER, R.A. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Miami, v. 77, p. 444-448, 1964.

COOK, A.A.; ZETTLER, F.W. Susceptibility of papaya cultivars to papaya ringspot and papaya mosaic viruses. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, p. 893-895, 1960.

COSTA, A.F.S. da; MARTINS, D.S.; COSTA, A.N.; FASSIO, L.H. Evolução da cultura e do mercado mundial de mamão. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 15, p. 647-652.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 21, p. 38-43, 1969.

COSTA, A.S.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; MÜLLER, G.W.; CARVALHO, A.M. Problemas de controle do mosaico do mamoeiro. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 1., 1978, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Sociedade Paulista de Fitopatologia, 1978. p. 7.

COSTA, C.L. As inter-relações vírus-afídeos vetores e o controle da mancha anelar do mamoeiro causado pelo *Papaya ringspot virus* – P. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 13, p. 181-191.

DANTAS, J.L.L. Introdução: mamão produção. In: TRINDADE, A.V. **Mamão produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 5-13.

FAO. **Faostat (classic)**: production/crops primary. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/2006>. Acesso em: 20 dez. 2008.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DEESELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). **Virus taxonomy**: – eighth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. New York: Elsevier Academic Press, 2005. 1162 p.

FNP CONSULTORIA E AGROINFORMATIVOS. Mamão. In: _____. **AGRIANUAL 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 349-356.

GONSALVES, D.; TRUJILLO, E.E. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 501-506, 1986.

HARKNESS, R.W. **Papaya growing in Florida**. Gainesville: University of Florida, Florida Agricultural Experimental Station, 1967. 15 p. (Circular, S-180).

HOROVITZ, S.; JIMÉNEZ, H. Cruzamientos interspecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. **Agricultura Tropical**, Maracay, v. 17, p. 323-343, 1967.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4th ed. London: Academic Press, 2002. 1001 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 1990 a 2003.

KALLESHWARASWAMY; C.M.; KUMAR, N.K.K. Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. **Phytopathology**, London, v. 98, p. 541-545, 2008.

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

KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, F.C.; PINHEIRO, C.S.R.; SOARES, L.M.; PINHEIRO, K.; MADEIRA, M.C.; CHAGAS, M. Amarelo letal do mamoeiro solo no estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 282-285, 1992.

LIMA, J.A.A.; LIMA, A.R.T.; MARQUES, M.A.L. Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro 'solo' obtido no Ceará.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 19, p. 437-441, 1994.

LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 689-702, 2001.

LIMA, R.C.A.; PANCIERE, G.N.; ROCHA, M.A.M.; PAULA, A.; COUTO, A.O.F.; MARTINS, D.S. Ocorrência de plantas hospedeiras de afídeos em sistemas de produção integrada e convencional de mamão no pólo de fruticultura de Linhares - ES. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003a. p. 535-538.

LIMA, R.C. A.; COUTO, A.O. F.; ANDRADE, J.S.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J.A.; TATAGIBA, J.S.; COSTA, H. Flutuação populacional de insetos vetores de doenças do mamoeiro e sua relação com a ocorrência de doenças viróticas. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003b. p. 539-541.

LORETO, T.J.G.; VITAL, A.F.; REZENDE, J.A.M.; VEGA, J.; COSTA, A.S. Ocorrência de um amarelo letal no mamoeiro Solo no Estado de Pernambuco. **Biológico**, São Paulo, v. 49, p. 275-279, 1983.

LUQUE, C.S.; LÓPEZ, G.M. Identificación de plantas hospedantes del vírus de la mancha anular de la papaya. **Fitopatologia Colombiana**, Bogota, v. 6, p. 112-121, 1977.

MAGDALITA, P.M.; BAYOT, R.G.; VILLEGAS, V.N. *Diplocyclos palmatus* L. Jeffrey: a new weed host of Papaya ringspot virus. **Philippine Journal of Crop Science**, Manila, v. 15, p. 163-168, 1990.

MARTINEZ, J.A. Estudo da viabilidade prática e econômica do controle das viroses do mamoeiro pela erradicação sistemática das plantas afetadas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 1., 1980, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, FCAV, 1980. p. 211-217.

MARTINS, D.S. Situação atual da produção integrada de mamão no Brasil. In: _____. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 7, p. 97-127.

MARTINS, D.S.; VENTURA, J.A. Vetores de doenças do mamoeiro: monitoramento e controle. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.N; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão**. Vitória: Incaper, 2007. cap. 7, p. 113-128.

MARTINS, D.S.; PAULA, R.C.A.L.; CARVALHO, R.C.Z.; ROCHA, M.A.M. Espécies e hospedeiros de afídeos associados à cultura do mamão (*Carica papaya* L.) no norte do estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 15, p. 447-452.

MARTINS, D.S.; PAULA, R.C.A.L. de; PERONTI, A.L.B.G.; CARVALHO, R.C.Z. de. Ocorrência de espécies de afídeos em áreas comerciais de mamão no estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.N; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão**. Vitória: Incaper, 2007. cap. 20, p. 496-501.

NAMBA, R.; HIGA, S.Y. Papaya mosaic virus transmission as affected by the duration of the preliminary fasting and virus acquisition feeding of *Myzus persicae*. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Hawaii, v. 22, p. 113-117, 1975.

PINTO, O.L. Identificación de las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. **Revista Facultad Agrícola**, Caracas, v. 6, p. 5-36, 1972.

PRASAD, S.M.; SARKAR, D.P. Some ecological studies on papaya ringspot virus in Ranchi. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 5, p. 118-122, 1989.

PURCIFULL, D.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Wallington, n. 209, 1984.

REZENDE. J.A.M. **Tentativas de premunização para o controle do mosaico do mamoeiro**. 1985. 64 p. (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Produção de lesões locais em *Chenopodium quinoa* pelo potyvírus causador do mosaico do mamoeiro no Brasil depende da origem das sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 11, p. 39-40, 1985.

REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

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

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S.; SOARES, N.B. Ocorrência de um isolado fraco do vírus do mosaico do mamoeiro *Carica papaya* L. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 534, 1981.

RUGGIERO, C.; GOTTARDI, M.V.C.; SANTOS, S.C.; MENEGUCI, R.F.S. Situação da cultura do mamoeiro no Brasil. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, 2003. p. 37-55.

SAXENA, S.; HALLAN, V.; SINGH, B.P.; SANE, P.V. Leaf curl disease of *Carica papaya* from India may be caused by a bipartite geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 126, 1998.

SINGH, A.; SINGH, K.N.; YADAY, A.L.; VIKRARN, P. PCR based diagnostics of a geminivirus causing leaf curl disease in papaya. **Plant Archives**, Raleigh, v. 7, p. 87-89, 2007.

SMITH, F.E.V. Plant disease in Jamaica in 1928. **Annual Report of the Department of Agriculture in Jamaica**. p. 17-20. (Consultado o abstract no R.A.M. 8:631-632). 1929.

SUREKA, S.K.; MATHUR, K; SHUKLA, D.D. Virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Udaipur. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, New Delhi, v. 7, p. 115-121, 1977.

TORRES, M.R.; GIACOMETTI, D.C. Virosis de la papaya (*Carica papaya* L.) en el Valle de Cauca. **Agricultura Tropical**, Maracay, v. 22, p. 27-38, 1966.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. London: Kluwer Academic, 2004. p. 201-268.

WAN, S.H., CONOVER, R.A. A rhabdovirus associated with a new disease of Florida papayas. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Miami, v. 94, p. 318-321, 1981.

WANG, XY, XIE, Y., ZHOUY, XP. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 29, p. 303-309, 2004.

YEH, S.D.; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. **Phytopathology**, London, v. 74, p. 1086-1091, 1984.

ZAMBOLIIM-MACIEL, E.; KUNIEDA-ALONSO, S; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. Purification and some properties of Papaya meleira virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 389-394, 2003.

2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS FRACOS DO VÍRUS DO MOSAICO DO MAMOEIRO (*Papaya ringspot virus* – type p) OCORRENDO NATURALMENTE EM POMARES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Resumo

Papaya ringspot virus - type P (PRSV-P) é o vírus causador do mosaico do mamoeiro e constitui o principal fator limitante para a cultura dessa espécie no Brasil. No estado do Espírito Santo (ES), a eliminação de plantas doentes tem sido aplicada desde a década de 1980 para o controle dessa doença. Essa prática proporcionou uma aparente seleção e predominância de isolados fracos do vírus. Plantas infectadas com esses isolados aparentemente fracos exibem bom desenvolvimento e sintomas mais leves de mosaico sem deformações foliares. Os frutos podem exibir poucos e pequenos anéis oleosos e a produção não parece sofrer alterações significativas. O objetivo deste trabalho foi investigar a prevalência desses isolados fracos do PRSV-P em alguns pomares de mamão, a estabilidade e efeito protetor contra isolados severos em casa de vegetação e campo. A detecção do vírus nas amostras de mamoeiro do ES foi realizada por PTA-ELISA, microscopia eletrônica e RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da proteína capsidial (*cp*). Todos os isolados foram também inoculados mecanicamente em mamoeiro cv. Golden para avaliação de sintomas. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da região central do gene *cp* de alguns isolados foram comparados com outros isolados do PRSV-P. Os níveis de identidade foram superiores a 89% e 90%, respectivamente. De 119 amostras de mamoeiros analisadas, 86 estavam infectadas com o PRSV-P, mas somente 75 induziram sintomas fracos em mamoeiros. Os isolados fracos 1, 2, 7 e 9 foram selecionados ao acaso para estudos de estabilidade em casa de vegetação. Somente os isolados fracos 1 e 7 permaneceram estáveis até a oitava transferência de mamoeiro para mamoeiro. Mamoeiros premunizados com esses quatro isolados foram superinoculados com isolados severos do ES (PRSV-P-ES), do estado de São Paulo (PRSV-P-SP) e do estado de Pernambuco (PRSV-P-PE) em casa de vegetação. Os resultados dessas avaliações foram variáveis. A proteção total só foi obtida com plantas premunizadas com os isolados fracos 7 e 9 e desafiados com o PRSV-P-ES. Ausência de proteção foi encontrada quando as plantas foram desafiadas com o PRSV-P-PE. O afídeo *Myzus nicotianae* foi capaz de transmitir isolados fracos e severos do PRSV-P. Plantas de mamoeiros cv. Golden premunizadas com vários isolados fracos do PRSV-P foram expostas em condições de campo na ESALQ/USP, Piracicaba, SP, em dois experimentos independentes. Poucas plantas permaneceram com sintomas fracos de mosaico até o final dos experimentos. Uma terceira exposição, sob condições de campo, foi realizada em Linhares, ES, com mamoeiros cvs. Sunrise Solo e Golden premunizados com oito isolados fracos, coletados nos experimentos em campo de Piracicaba, SP, que se mostraram mais promissores. Apenas uma planta da cultivar Golden premunizada com o isolado 63, permaneceu com sintomas leves da doença até a última avaliação. Conjuntamente esses dados confirmam que o uso permanente do “rouging” para o controle do mosaico do mamoeiro proporcionou também o aumento no

número de mamoeiros apresentando sintomas fracos da doença. No entanto, nenhum dos isolados fracos estudados revelou-se estável e/ou com efeito protetor suficiente para o controle da doença por premunização.

Palavras-chaves: *Potyvirus*; *Papaya ringspot virus* – type P; Premunização; Controle; Caracterização molecular; Diagnose; Transmissão

Abstract

Papaya ringspot virus-type P (PRSV-P) causes the major disease in Brazilian papaya orchards that result in significant yield losses. In Espírito Santo (ES) state rouging of infected plants has been applied since 1980's for the control of this disease. Its permanent use over the last 25 years has led to an apparent selection and predominance of mild strains throughout papaya orchards. These apparent mild strains are characterized by inducing very mild mosaic symptom without leaf deformation and few minute ringspots on fruits. Plants exhibit normal development and fruit production does not show any apparent significant losses. The purpose of this work was to investigate the prevalence of PRSV-P mild strains in some papaya orchards, their stability and protective effect against severe isolates under greenhouse and field conditions. Virus detection from infected papaya plants collected in ES was done by PTA-ELISA, electron microscopic (EM) examination of negatively stained leaf sap, and RT-PCR using specific primers for the capsid protein (*cp*) gene of PRSV-P. All isolates were also mechanically inoculated in papaya seedlings cv. Golden for symptoms evaluation. Filamentous flexuous particles, typical of *Potyvirus*, were observed in several mild strain infected plants. Nucleotide and amino acid sequences of the core region of *cp* gene of some isolates showed identity levels above 89% and 90% with others PRSV-P isolates, respectively. 86 field samples, out of 119 was confirmed by PTA-ELISA, EM and RT-PCR and 75 papaya test-plants showed mild symptoms in the biological test. Among these isolates, four were selected for stability tests under greenhouse conditions, named isolates 1, 2, 7 and 9. Isolates 1 and 7 remained stable through eight transferences, from papaya to papaya; isolate 9 induced severe symptoms after the seventh transference and isolate 2 was not detected after the fourth transference. These four mild isolates were evaluated under greenhouse conditions for their ability to protect papaya plants against three severe isolates named: PRSV-P-ES, from ES state, PRSV-P-SP, from São Paulo and PRSV-P-PE from Pernambuco. The results were variable. Full protection was obtained with plants preimmunized with isolates 7 and 9 and challenged with PRSV-P-ES. Lack of protection was found when plants were challenged with PRSV-P-PE. Aphid transmission tests with *Myzus nicotianae* were positive. Papaya 'Golden' plants preimmunized with several mild isolates of PRSV-P were exposed under field conditions at ESALQ/USP, Piracicaba,SP, in two independent experiments, during February 2007 and May 2008, and November 2007 and June 2008. Very few plants remained with mild symptoms until the end of the experiments. A third field experiment was carried out in Linhares,ES, with papaya plants cvs. Sunrise Solo and Golden preimmunized with eight mild isolates collected from the experimental fields in Piracicaba,SP. Plants were exposed from April to December 2008. Only one papaya 'Golden' plant preimmunized with isolate 63 remained with mild symptoms until the last

evaluation. Together, these data confirmed that the permanent rouging for disease control increased the number of papaya plants exhibiting mild symptoms.

Keywords: *Potyvirus*; *Papaya ringspot virus* – type P; Preimmunization; Control; Molecular characterization; Diagnose; Transmission

2.1 Introdução

O vírus causador do mosaico do mamoeiro (*Carica papaya*), conhecido internacionalmente por *Papaya ringspot virus* – type P (PRSV-P) continua sendo um fator limitante da produção dessa frutífera em diversos países.

O PRSV-P pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* e sua presença foi constatada no Brasil em 1969 na região de Monte Alto, SP (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969) de onde se disseminou para outros estados e hoje ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de mamão no país. O mosaico do mamoeiro merece destaque por ser uma ameaça ao estabelecimento de pomares, longevidade da cultura e produtividade.

Devido à importância da virose causada pelo PRSV-P, sempre houve uma preocupação em se procurar alternativas para o seu controle. Grupos de pesquisadores em vários países já se encarregaram de investigar diversas alternativas, porém somente em poucos casos o sucesso tem sido alcançado (VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004, REZENDE et al., 2007).

No Brasil, a erradicação de plantas com mosaico (“rouging”), acompanhada de outras práticas culturais, como produzir mudas sadias em locais protegidos, eliminar pomares velhos ou abandonados antes do início do novo plantio, eliminar plantas enfermas localizadas na beira de estradas, chácaras, fundos de quintais, evitar o crescimento ou plantio de cucurbitáceas nas proximidades ou dentro do pomar, são preconizadas por diversos investigadores como alternativas eficientes para o controle da doença em convivência com o patógeno (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969; BARBOSA; PAGUIO, 1982a; COSTA; VENTURA, 2001; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004; COSTA, 2005; MARTINS; VENTURA, 2007).

Um dos maiores sucessos mundiais no controle dessa doença é a estratégia do “rouging,” adotada no estado do Espírito Santo, Brasil. Os primeiros relatos da

erradicação sistemática de plantas com mosaico datam da década de 1980 após a implantação da cultura naquele estado. Desde então, a prática de erradicação de plantas doentes dos pomares de mamoeiro vem sendo realizada de forma eficiente no controle do mosaico (MARTINS, 2003; COSTA, 2005) levando o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Secretaria de Defesa Agropecuária tornar obrigatória a prática do “roguing” em todo o território nacional nas áreas produtoras de mamão destinadas à exportação (Portaria número 176 de 25/08/2008), para o controle dos vírus causadores do mosaico e da meleira do mamoeiro.

A erradicação de mamoeiros com mosaico, através de inspecções semanais nos pomares do estado do Espírito Santo, nos últimos 30 anos, levou a uma aparente seleção de formas mais atenuadas do vírus. Isso pode ser compreensível, quando se considera que o complexo viral é composto por uma mistura de variantes genéticas, que podem induzir sintomas de diferentes intensidades, quando inoculados separadamente. A maioria das plantas geralmente exibe um desenvolvimento quase normal. A produção também não parece sofrer alterações quantitativas e qualitativas significativas. Os frutos podem exibir poucos e pequenos anéis oleosos característicos da doença, que não depreciam a sua qualidade.

A segregação desse complexo na plantação é feita por meio dos afídeos vetores, durante os processos de aquisição e transmissão do vírus. Como os “mosaiqueiros” baseiam-se apenas nos sintomas severos de mosaico foliar para a identificação das plantas a serem erradicadas, aquelas eventualmente infectadas com formas mais atenuadas do vírus passam despercebidas e permanecem por mais tempo na plantação, servindo como fonte de inóculo para a disseminação pelos afídeos. Com a repetição desse procedimento durante um longo período de tempo, pode-se supor que, nos últimos anos as fontes de inóculos predominantes nos pomares eram plantas infectadas com as formas menos severas do vírus e que passavam despercebidas aos olhos dos “mosaiqueiros”. Com isso, atualmente verifica-se uma aparente predominância de plantas sem sintomas severos nas folhas, boa produtividade e poucos anéis nos frutos, sugerindo tratar-se de plantas infectadas com formas mais fracas do vírus, aparentemente estável e com efeito protetor. Caso isso ocorra, esses isolados fracos poderão ser usados no controle do mosaico por meio da premunização,

semelhante ao que já ocorre há mais de 35 anos no controle da tristeza do citros no estado de São Paulo, Brasil (MÜLLER; REZENDE, 2004).

Diante desse quadro, este trabalho tem como objetivos a caracterização biológica, sorológica e molecular de alguns isolados menos severos do vírus PRSV-P presentes em alguns pomares inspecionados. Avaliar a estabilidade de alguns isolados fracos, bem como o efeito protetor contra formas severas de diferentes regiões do país, inclusive do estado do Espírito Santo, para uma maior compreensão desse fenômeno, de forma que, através da interferência organizada do homem, alguns desses isolados possam ser melhor explorados com benefícios para a cultura do mamoeiro.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

2.2.1.1 Sintomas e danos do mosaico do mamoeiro

O vírus do mosaico do mamoeiro, *Papaya ringspot virus* – type P (PRSV-P) ocorre em praticamente todos os países onde se cultiva essa frutífera. No Brasil, embora haja referências antigas sobre o aparecimento do mosaico do mamoeiro em São Paulo (BITANCOURT, 1935; GONSALVES-SILVA, 1941), sua ocorrência, de fato, se deu anos mais tarde, na década de sessenta (COSTA et al., 1969), sendo aquelas menções referentes aos danos causados pelo ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (COSTA, 1941; COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969).

Os sintomas causados pelo PRSV-P em mamoeiro, de maneira geral, incluem mosaico foliar, que pode estar acompanhado por bolhas de coloração verde escura e deformações no limbo, estrias oleosas na haste e nos pecíolos das folhas e anéis oleosos e, em raros casos, anéis necróticos nos frutos. Os sintomas podem variar em função do isolado do vírus e da interação deste com a planta e o ambiente (REZENDE et al., 2007). O mosaico do mamoeiro é considerado um fator limitante para a produção em todos os países onde ocorre, além de provocar o aparecimento de manchas nos frutos que depreciam sua qualidade junto ao consumidor (JENSEN, 1949; TORRES;

GIACOMETTI, 1966; HARKNESS, 1967; COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969; CONOVER, 1976; PURCIFUL et al., 1984; REZENDE; FANCELLI, 1997).

A avaliação quantitativa das perdas causadas pelo mosaico do mamoeiro, tanto no desenvolvimento como na produção das plantas afetadas, foi feita por Hendrix (1948) no Havaí. O autor verificou que plantas de mamoeiro com 20 meses de idade apresentaram uma redução de 7,9% e 29,5% no desenvolvimento e na produção, respectivamente, quando foram previamente inoculadas na idade de quatro meses. Quando a inoculação se processou em plantas com sete meses, as reduções foram de 3,4% no desenvolvimento e 3,1% na produção. Em outros estudos realizados no Havaí, Jensen (1949) concluiu, diferentemente daquele autor, ao afirmar que plantios comerciais de mamoeiro ficavam totalmente inaproveitáveis depois de um ou dois anos da infecção das plantas pelo vírus.

No Brasil, Barbosa e Paguio (1982a) avaliaram o efeito dessa moléstia sobre a produção de mamoeiro em Pernambuco. Os resultados apontaram uma redução de 72,1% na produção por planta, 61,5% no número de frutos por planta e de 25% no peso médio dos frutos por planta, no experimento conduzido na região de Condado. Na região de Aliança, essas perdas foram avaliadas em 68%, 59,1% e 19,4%, respectivamente.

2.2.1.2 O PRSV-P

O vírus causador do mosaico do mamoeiro (PRSV-P) pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. A família *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, contendo cerca de 20% dos vírus até hoje descritos. A família é dividida em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor e número de componentes do genoma (FAUQUET et al., 2005). O gênero *Potyvirus* agrupa vírus cujo genoma é composto por uma única molécula de RNA fita simples sentido positivo, e transmitidos por afídeos. Com 111 espécies descritas, o gênero *Potyvirus* é o mais numeroso, englobando cerca de 1/5 dos vírus de plantas.

O PRSV-P possui partículas do tipo alongadas e flexuosas, com comprimento médio de 800 nm e 12 nm de diâmetro. O ácido nucléico é do tipo RNA fita simples,

senso positivo, com cerca de 10.320 nucleotídeos (YEH et al., 1992; NOA-CARRAZANA; GONZALEZ-DE-LEÓN; SILVA-ROSALES, 2007; PARAMESWARI et al., 2007). O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por aproximadamente 2.200 cópias de um polipeptídeo com massa molecular em torno de 34 kDa. A proteína capsidial apresenta uma região amino-terminal, altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada, contendo de 215 a 227 aminoácidos e uma região carboxi-terminal de 18-20 aminoácidos. As duas extremidades estão voltadas para o exterior da partícula viral e são as maiores responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994).

O RNA possui uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), localizada entre duas regiões não-traduzidas (5'NTR e 3'NTR), que origina uma poliproteína com aproximadamente 350 kDa. Esta proteína é processada através de enzimas (proteínases) contidas na própria poliproteína, surgindo daí as proteínas necessárias para a infecção viral (CARRINGTON; FREED; OH, 1990; HULL, 2002). A partir desta, pelo menos oito proteínas são produzidas mediante a atividade de três proteínases contidas na própria poliproteína (P1, HC-Pro, NIa), conforme diagramado na figura 1. Uma característica das proteínas produzidas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Praticamente todas as proteínas, cujas funções já foram determinadas, atuam em mais de um processo do ciclo de infecção viral. Uma característica deste mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais são produzidas estequiometricamente iguais (ZERBINI; ZAMBOLIM, 1999). As proteínas P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, VPg e NIb estão envolvidas na replicação do genoma viral. P1, HC-Pro e P3 não são essenciais, mas aumentam significativamente a taxa de replicação, sendo, portanto, consideradas fatores de amplificação do genoma viral.

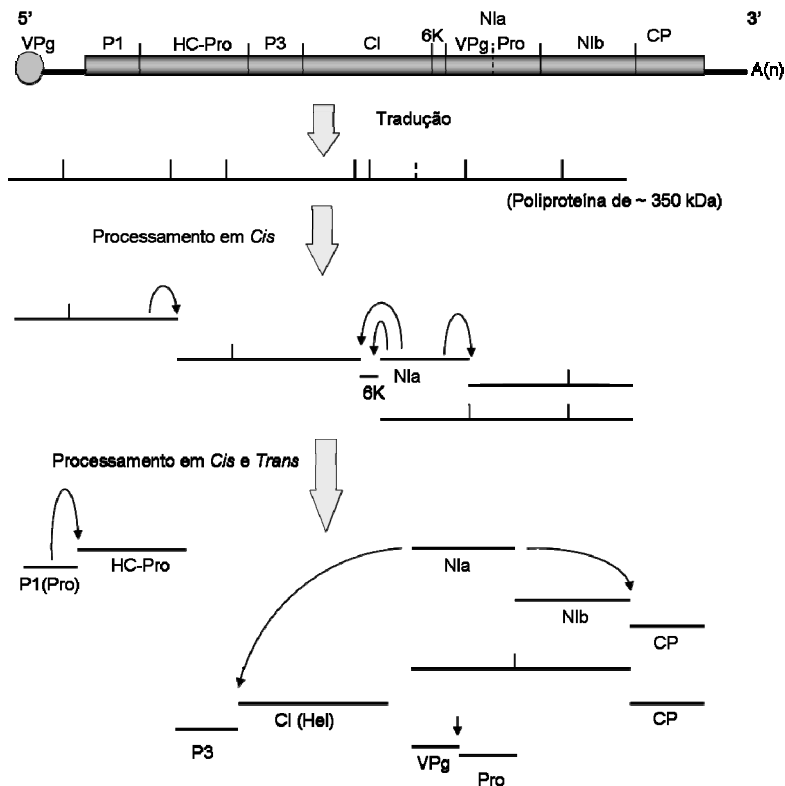


Figura 1 - Representação esquemática do genoma e do processamento da poliproteína dos potyvírus. A autólise proteolítica ocorre em conjunto com a tradução. Adaptado de Shukla; Ward; Brunt (1994)

Assim, a proteína capsial, requerida em maior quantidade, é produzida em quantidades idênticas a, por exemplo, a replicase viral. Como o vírus não necessita de grandes quantidades da replicase, esta se acumula na célula infectada induzindo a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (*cylindrical inclusions*, CIs), também denominadas “cata-ventos” (*pinwheels*). Esta é uma propriedade intrínseca à família *Potyviridae* e pode ser utilizada na diagnose (FAUQUET et al., 2005). Essa estratégia de replicação e expressão gênica é bastante danosa para a célula, implicando em um grande dreno de metabólitos, o que se reflete em sintomas severos na planta infectada (ZERBINI; ZAMBOLIM, 1999).

O produto gênico mais estudado dos potyvírus tem sido a proteína capsial (CP) (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; HULL, 2002) com aproximadamente 290 aminoácidos. Possui o domínio conservado DAG, que está envolvido na transmissão pelo inseto vetor, requerendo interação com a HC-Pro com o domínio conservado KITC (ATREYA et al., 1995; PIRONE; BLANC, 1996; LOPEZ-MOYA; WANG; PIRONE, 1999;

RACCAH; HUET; BLANC, 2001). A CP também está envolvida em diversas funções, como o encapsulamento do RNA viral, movimento célula a célula, juntamente com a HC-Pro (DOLJA et al., 1995; ROJAS et al., 1997), movimento a longa distância (DOLJA et al., 1995) e indução de sintomas (NADERI; BERGER, 1997a, b).

A proteína HC-Pro (*Helper Component-Proteinase*) é um produto gênico bastante estudado, à qual já foi atribuída o maior número de funções. A HC-Pro também catalisa a proteólise de seu terminal carboxílico, separando-se da proteína P3 (CARRINGTON; FREED; OH, 1990). Além da atividade de protease, a HC-Pro funciona como componente auxiliar para a transmissão por afídeos (RACCAH; HUET; BLANC, 2001), está envolvida em processos relacionados com a replicação viral (LEGRAVE et al., 1996), com o movimento célula a célula (ROJAS et al., 1997) e movimento sistêmico (CRONIN et al., 1995; YELINA et al., 2002). Está também envolvida no processo de inibição sobre o mecanismo de defesa da planta, baseado no silenciamento gênico pós-transcricional, atuando no complexo RISC desse fenômeno (MALLORY et al., 2001; KASSCHAU; CARRINGTON, 2001; LAKATOS et al., 2006).

As proteínas CI (*Cylindrical Inclusion*) e NIb (*Nuclear Inclusion b*) são as principais responsáveis pela replicação viral. Estudos atribuem à CI um papel de helicase, pois essa proteína provavelmente é responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação do genoma. A NIb é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (LAIN et al., 1989).

A região 5' não-traduzível (5'NTR) de diversos potyvírus possui sequências regulatórias da tradução do genoma e está ligada de forma covalente a uma proteína de origem viral (*Viral Protein Genome-linked*, VPg). A região 3' não-traduzível (3'NTR) apresenta uma variabilidade de sequência e tamanho (variando de 163 a 475 nucleotídeos) (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). A sua extremidade 3' apresenta uma cauda poli-A, envolvida na proteção contra exonucleases, codificada pelo próprio vírus. A sequência da 3'NTR é importante para o reconhecimento do RNA viral pelo complexo replicativo, contendo elementos em *cis* essenciais para a replicação (HALDEMAN-CAHILL et al., 1998; HULL, 2002).

Até recentemente, características como gama de hospedeiros, sintomatologia, proteção cruzada, morfologia de inclusões citoplasmáticas e sorologia, constituíam os

principais critérios para classificar espécies e estirpes de *Potyvirus*. Apesar de essas características terem desempenhado um papel significativo na determinação do relacionamento taxonômico entre muitos potyvírus, elas, por si só, não fornecem uma solução adequada para a identificação de espécies e estirpes no gênero como um todo, devido à intensa variação biológica e antigênica observada entre os membros do gênero (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; FAUQUET et al., 2005). De acordo com o último relatório do ICTV (International Committee of Taxonomy of Virus), os critérios de demarcação de espécies para o gênero *Potyvirus* estão baseados na sequência do genoma, na gama natural de hospedeiros, na patogenicidade e citopatologia, no modo de transmissão e propriedades antigênicas (FAUQUET et al., 2005). Considera-se no entanto, que o método mais eficiente para a classificação seja a comparação da sequência de aminoácidos da proteína capsial na ausência da sequência de nucleotídeos de todo o genoma. Para que duas espécies sejam consideradas distintas, a sequência de aminoácidos da proteína capsial deve ser inferior a 80%, já para a sequência de nucleotídeos de todo o genoma, espécies distintas apresentam identidade inferior a 85% (FAUQUET et al., 2005).

Segundo Adams, Antoniw e Beaudoin (2005), para o critério de demarcação de espécies de *Potyviridae*, na ausência de sequências completas de nucleotídeos, o gene da inclusão citoplasmática é o que melhor o representa, pois este gene apresentou-se mais conservado que o gene da proteína capsial. Estes autores avaliaram 187 sequências completas de *Potyviridae*, totalizando 46 espécies, e sugerem que, para duas espécies de *Potyvirus* sejam consideradas distintas a sequência de nucleotídeos do gene da inclusão citoplasmática deve ser inferior a 78,3% e a sequência de aminoácidos inferior a 88%. Os genes NIb, NIa-Pro e HC-Pro também mostraram-se melhores para comparações do que o gene da proteína capsial.

Estudos sobre a diversidade genética do PRSV-P vêm sendo realizados em diversos países, principalmente com o gene da proteína capsial. Esses estudos permitem inferir as diferenças entre os diversos isolados, em nível de sequência nucleotídica e o relacionamento filogenético entre eles. Os dados obtidos fornecem bases importantes a serem consideradas em estudos de premunização e transgenia.

Diversos autores demonstraram que o relacionamento filogenético mais próximo de isolados de PRSV-P e PRSV-W são oriundos de uma mesma região geográfica (BATESON et al., 1994, 2002; SILVA-ROSALES et al., 2000; LIMA et al., 2002; HEMA; PRASAD, 2004; JAIN et al., 2004; NOA-CARRAZANA; GONZALEZ-DE-LEÓN; INOUE-NAGATA et al., 2007; SILVA-ROSALES, 2007; WEI et al., 2007; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., LU et al., 2008; MANGRAUTHIA et al., 2008; 2008; TRIPATHI et al., 2008). Geralmente, os isolados do PRSV-P apresentam dois grupos de filogenia, um grupo de isolados do continente americano juntamente com isolados da Austrália e alguns isolados da Índia e outro grupo com isolados asiáticos. Bateson et al. (1994, 2002), avaliando a diversidade genética da proteína capsidial de isolados australianos do PRSV-P e PRSV-W sugerem que, evolutivamente, o PRSV-P derivou do PRSV-W por mutações específicas.

Em estudos de diversidade genética, o tamanho do gene da proteína capsidial mostrou-se variável, porém os domínios funcionais, como o domínio DAG, apontado como um dos responsáveis para transmissão por afídeos, estava sempre presente. As diferenças descritas na CP estavam nos primeiros 50 aminoácidos da região amino terminal, região onde se observa uma variabilidade devido a alterações no número das chamadas repetições EK ("EK repeats") (BATESON et al., 2002; JAIN et al., 2004). Contudo, as diferenças do genoma do vírus nesta região, preservam as funções da proteína capsidial. Os genes da proteína capsidial de isolados do PRSV-P da Índia, Vietnã e China variam de 840, 870 e 864 nucleotídeos, respectivamente (BATESON et al., 2002; JAIN et al., 2004; WEI et al., 2007). Estudos realizados por Lima et al. (2001) com o gene da proteína capsidial de isolados brasileiros demonstraram que todos os treze isolados avaliados, provenientes de oito estados do Brasil, apresentaram um comprimento de 924 nucleotídeos, com exceção de apenas um isolado que apresentou 921 nucleotídeos de tamanho. Ainda nesse trabalho, os autores revelaram que a identidade nucleotídica dos isolados avaliados foi de 97,3%, ou seja, os isolados brasileiros são filogeneticamente muito próximos uns aos outros. Contudo, as análises filogenéticas separaram os isolados em dois grupos: um grupo com isolados dos estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e alguns isolados do Distrito Federal e outro grupo com isolados do Distrito Federal, Ceará, Paraíba e Pernambuco.

Trabalhos realizados comparando as sequências de nucleotídeos de formas fracas e fortes de um mesmo vírus, relatam que para haver proteção pela forma fraca é necessária uma alta identidade de sequência (YEH; GONSALVES, 1984; WANG; NATSUAKI; OKUDA, 2006; INOUE-NAGATA et al., 2007). Porém, não foi estabelecido nenhum número limiar dessa identidade. Comparando as sequências completas de nucleotídeos de dois isolados do PRSV-W, um que induz sintomas fracos e tem efeito protetor sobre o isolado severo, Inoue-Nagata et al. (2007) mostraram que ambos compartilham 94,63% de identidade, diferindo em apenas 555 posições nucleotídicas. No entanto, o isolado fraco PRSV-P HA5-1, obtido por mutação do isolado severo do vírus do Havaí, e que possui efeito protetor contra isolados fortes daquela região, não foi capaz de promover proteção contra isolados do PRSV-P provenientes do México ou da Tailândia (YEH; GONSALVES, 1984; TÉLIZ et al., 1991; GONSALVES, 1998). O isolado HA5-1 compartilha com os isolados asiáticos 82 a 83% de identidade, o que poderia explicar a ausência de proteção. Contudo, isso não explica o isolado mexicano que sempre se agrupou no mesmo ramo que o isolado havaiano apresentando 95,2% de identidade para todo o genoma.

2.2.1.3 O controle do mosaico do mamoeiro

Pela característica endêmica do mosaico, a procura por métodos de controle em convivência com o patógeno vem sendo considerada há anos em diversos países, através de diferentes abordagens. Diversas estratégias têm sido adotadas com o intuito de controlar o mosaico do mamoeiro, dentre elas o uso de mudas certificadas, plantio em áreas livres do vírus, instruções para se evitar consórcio com cucurbitáceas, programas de erradicação, premunização e uso de plantas transgênicas (REZENDE; MÜLLER, 1995; REZENDE; FANCELLI, 1997; GONSALVES, 1998; COSTA, 2005; TRIPATHI et al., 2008).

A obtenção de variedades resistentes e/ou tolerantes, tanto dentro da espécie cultivada *C. papaya*, como através de tentativas de transferência de fatores de imunidade encontrados em espécies selvagens do gênero *Vasconcellea* (até recentemente pertencentes ao gênero *Carica*), têm sido motivo de investigação há vários anos, por ser este o método ideal de controle da doença. Os resultados

alcançados nessa linha de abordagem do problema não têm sido animadores. No primeiro caso porque os níveis de resistência e/ou tolerância encontrados dentro da espécie cultivada não são satisfatórios como método de controle, enquanto que, no segundo, diversas tentativas de cruzamentos falharam devido à existência de barreiras genéticas, causando principalmente o aborto de embriões e a consequente incapacidade de realizar retro-cruzamentos. No entanto, a obtenção de um híbrido interespecífico (*C. papaya* x *V. quercifolia*) resistente ao vírus e com características agronômicas adequadas foi recentemente obtido por um grupo de investigadores da Austrália e das Filipinas (DREW et al., 2006).

O controle químico dos afídeos vetores também foi avaliado, porém não tem sido promissor devido ao grande número de espécies envolvidas na transmissão e por ser o vírus de relação do tipo não persistente com os pulgões, isto é, os períodos de aquisição e inoculação têm a duração de apenas alguns segundos (COSTA, 2005). Também foram avaliadas outras substâncias, como detergentes que, quando aplicadas nas plantas pudessem interferir na transmissão do vírus, porém nenhuma apresentou resultados promissores (FIGUEIRA; COSTA, 1981). É importante salientar que o controle químico de afídeos pode ser eficiente quando este tem *status* de praga na cultura do mamoeiro e não quando tem o *status* de vetor. Contudo, não são conhecidas espécies de afídeos que colonizam o mamoeiro, assim, o controle químico não é recomendado. Recentemente, trabalhos realizados na Índia demonstraram que uma proteína de 34KDa, denominada CAP-34, proveniente da planta de *Clerodendrum aculeatum* induz resistência sistêmica contra o PRSV-P em plantas de mamoeiro, atuando na replicação do vírus (SRIVASTA et al., 2009).

A premunização no controle do mosaico do mamoeiro, na qual as plantas previamente infectadas por uma estirpe fraca do vírus ficam protegidas contra a posterior infecção e/ou manifestação de sintomas das estirpes severas do mesmo vírus, tem sido demonstrada com êxito restrito, inviabilizando um controle duradouro, econômico e seguro (REZENDE; COSTA; SOARES, 1981; REZENDE, 1985; REZENDE; COSTA, 1987; LIMA, et al., 2001). No Brasil, essa estratégia de controle vem sendo aplicada comercialmente com sucesso para o controle da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) há mais de 30 anos (MÜLLER; COSTA, 1977). Estudos de

premunização com o PRSV-W e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) mostraram a eficiência desta estratégia como medida de controle para plantas de abobrinha de moita 'Caserta' (REZENDE; PACHECO, 1998; RABELO; REZENDE, 2004; BONILHA, 2007; FREITAS, 2007). Ainda na década de 1970, a premunização foi eficiente para o controle de *Tomato mosaic virus* (ToMV) em diversos países da Europa (RAST, 1975; LECOQ, 1998), no Canadá (HIRUKI, 1979), no Japão (OSHIMA, 1975) e nos E.U.A. (AHOONMANESH; SHALLA, 1981). A interrupção do uso, posteriormente, foi causada pelo advento de variedades resistentes. Atualmente, a premunização tem sido empregada comercialmente em alguns países como, por exemplo, para o controle do mosaico amarelo da abobrinha, causado pelo ZYMV em cucurbitáceas em Israel (YARDEN et al., 2000). Para o controle do ZYMV em pepino, no Japão (KOSAKA et al., 2006), do vírus do mosaico comum da soja, causado pelo *Soybean mosaic virus* (SMV) neste mesmo país (KOSAKA; FUKUNISHI, 1993). Também tem sido empregada para o controle do vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) em tomateiro no Japão (YOSHIDA; GOTO; IIZUKA, 1985) e em pimentão na China (TIEN; WU, 1991).

Outros exemplos de sucesso da premunização foram obtidos no controle do intumescimento da haste do cacauzeiro (*Cocoa swollen shoot virus*) na África (HUGUES; OLLENNU, 1994, POSNETTE; TODD, 1955), do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Passion fruit woodiness virus*) na Austrália (SIMONDS, 1959). Nesses últimos casos, todavia, não há relatos de continuidade no uso da premunização. Embora essa metodologia tenha sido descrita há mais de 50 anos, os mecanismos de proteção não são completamente compreendidos (REZENDE; MÜLLER, 1995).

Para o mosaico do mamoeiro, na década de 1980, em Taiwan, no Brasil e nos E.U.A., vários estudos foram realizados na tentativa de obtenção de estirpes fracas estáveis e protetoras do PRSV-P para a implantação em larga escala (LIN, 1980; REZENDE; COSTA; SOARES, 1983; YEH; GONSALVES, 1984, REZENDE, 1985; REZENDE; COSTA, 1987; WANG et al., 1987). No entanto, os resultados obtidos não permitiram a implantação comercial permanente dessa tecnologia no controle da doença em campo. Há relatos sobre a utilização eficiente desse método para o controle do mosaico do mamoeiro em Taiwan e no estado americano do Havaí (YEH et al., 1988; YEH; GONSALVES, 1994). Porém, hoje se sabe que problemas de quebra de

proteção, especificidade dos isolados fracos, entre outros, não têm permitido a aplicação da premunização naqueles países (YEH; GONSALVES, 1994, 1998). No Brasil, apesar dos esforços, o uso da premunização para o controle do mosaico do mamoeiro em São Paulo não se tornou viável devido à aparente instabilidade dos isolados fracos selecionados diante do complexo viral ali existente (REZENDE; COSTA, 1987; REZENDE; MÜLLER, 1995; REZENDE et al, 2007).

A primeira planta transgênica de mamoeiro resistente ao PRSV-P, denominada Linha 55-1, foi obtida no início da década de 1990 no Havaí, com produção de plantas que expressam a proteína capsial do vírus (FITCH et al., 1992). Essa estratégia abriu um novo cenário na possibilidade de um controle mais eficiente e duradouro. Mas a resistência tem sido apenas para o isolado utilizado para a transformação, o que permite o seu uso comercial apenas naquele estado americano. Ou seja, quando desafiadas com isolados de outras regiões geográficas, inclusive com isolados brasileiros, essas plantas apresentam-se susceptíveis ao PRSV-P. As variedades transgênicas desenvolvidas, denominadas Sun Up e Rainbow, derivadas da Linha 55-1, tornaram-se os primeiros mamoeiros transgênicos para a comercialização, mas são comercializadas somente no Havaí. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, em Cruz das Almas, BA, vem realizando estudos com plantas transgênicas e estas apresentaram resistência múltipla aos isolados havaiano, tailandês e brasileiro (SOUZA JÚNIOR, 1999; SOUZA JÚNIOR; NICKEL; GONSALVES, 2005). Porém, há que se ressaltar, o plantio de mamoeiros transgênicos ainda não é permitido no Brasil.

A erradicação sistemática de plantas infectadas (“roguing”), associadas com o isolamento parcial do pomar, há décadas é considerada por diversos autores como uma forma de controlar o problema preventivamente (HARKNESS, 1967; COSTA et al., 1978; MARTINEZ, 1980), até que métodos mais duradouros sejam desenvolvidos. Os primeiros relatos de aplicação eficiente da erradicação para o controle do mosaico em pomares comerciais foram feitos no Havaí, E.U.A., na década de 1970 (NAMBA; HIGA, 1975). No Brasil, a erradicação de plantas com mosaico, acompanhada de outras práticas culturais, como produzir mudas sadias em locais protegidos, eliminar pomares velhos ou abandonados antes do início do novo plantio, eliminar plantas enfermas

localizadas na beira de estradas, chácaras, fundos de quintais, evitar o crescimento ou plantio de cucurbitáceas nas proximidades ou dentro do pomar, foram preconizadas por diversos investigadores como alternativa eficiente para o controle da doença em convivência com o patógeno (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969; BARBOSA; PAGUIO, 1982b; LIMA; BEZERRA, 1988; COSTA; VENTURA; TATAGIBA, 2001; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004; MARTINS; VENTURA, 2007).

De maneira geral, poucos são os relatos de países que adotaram ou adotam essas práticas culturais, especialmente a erradicação sistemática de plantas como forma de controle do mosaico do mamoeiro. Na região produtora de mamão em Santo Domingo, Equador, o “roguing” vem sendo aplicado de forma rotineira pelos produtores há aproximadamente 20 anos (J. A.M. Rezende, informação pessoal¹). No Brasil, os primeiros relatos do uso eficaz da erradicação para o controle do mosaico do mamoeiro datam do início dos anos 1980, quando ocorreu a expansão da cultura do mamoeiro no estado do Espírito Santo, iniciado na metade dos anos 1970. Na ocasião, pesquisadores do INCAPER demonstraram experimentalmente que plantios de mamoeiro, parcialmente isolados e frequentemente monitorados para a identificação de plantas com mosaico, tiveram em média 1% de plantas erradicadas ao ano. Na mesma época, propriedades que já praticavam o “roguing”, sob orientação dos pesquisadores do INCAPER, obtinham resultados altamente satisfatórios com taxas de erradicação da ordem de 5% a 10% ao ano (J.A.M. Rezende, relatório de visita, 1984). Talvez o exemplo de maior sucesso mundial da aplicação da erradicação de plantas doentes para o controle do mosaico do mamoeiro é o exemplo do estado do Espírito Santo, Brasil.

O início do “roguing” no norte do estado do Espírito Santo demonstrou bastante promissor e, de fato, obteve-se grande êxito no controle do mosaico do mamoeiro. Assim, estava estabelecida a única alternativa viável para se manter e expandir o cultivo do mamoeiro na região, como se constatou nos anos subsequentes até os dias atuais. Em razão da expansão da cultura do mamoeiro no Espírito Santo, da importância do programa de erradicação para o controle da doença e o conhecimento da necessidade da aplicação rigorosa do “roguing” para o controle do mosaico, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e

¹J. A. M. Rezende, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

Abastecimento estabeleceu, na Portaria Número 175 de 25/10/1994, que todos os produtores de mamão do ES eram obrigados a seguir as normas do programa de erradicação para o controle do mosaico do mamoeiro. Essa portaria ainda estabeleceu a fiscalização e punição dos produtores que não seguissem as recomendações. A erradicação de mamoeiros com mosaico, através de inspeções semanais nos pomares do estado do Espírito Santo, nos últimos 30 anos, levou a uma aparente seleção de fomas mais atenuadas do vírus. A maioria das plantas geralmente exibe um desenvolvimento quase normal. A produção também não parece sofrer alterações quantitativas e qualitativas significativas. Os frutos podem exibir poucos e pequenos anéis oleosos característicos da doença, que não depreciam a sua qualidade (figura 2).

Posteriormente, no estado da Bahia, outro grande estado produtor de mamão, legislação específica e semelhante à aplicada no estado do ES foi instituída com a Portaria SEAGRI/BA nº 086, de 17/03/1998 para o controle do mosaico do mamoeiro. A portaria no estado do ES foi alterada em 2002 (Instrução Normativa nº 4 de 01/03/2002) para incluir também a meleira do mamoeiro, outra doença de natureza viral, no programa de controle por meio da erradicação de plantas doentes. Em agosto de 2008, novamente o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, tornou obrigatória a prática do “roguing” em todo o território nacional nas áreas produtoras de mamão que se destinam à exportação, com a Instrução Normativa número 26 para o controle do mosaico e da meleira (Instrução Normativa nº 26, de 25/08/2008, portaria nº 107).

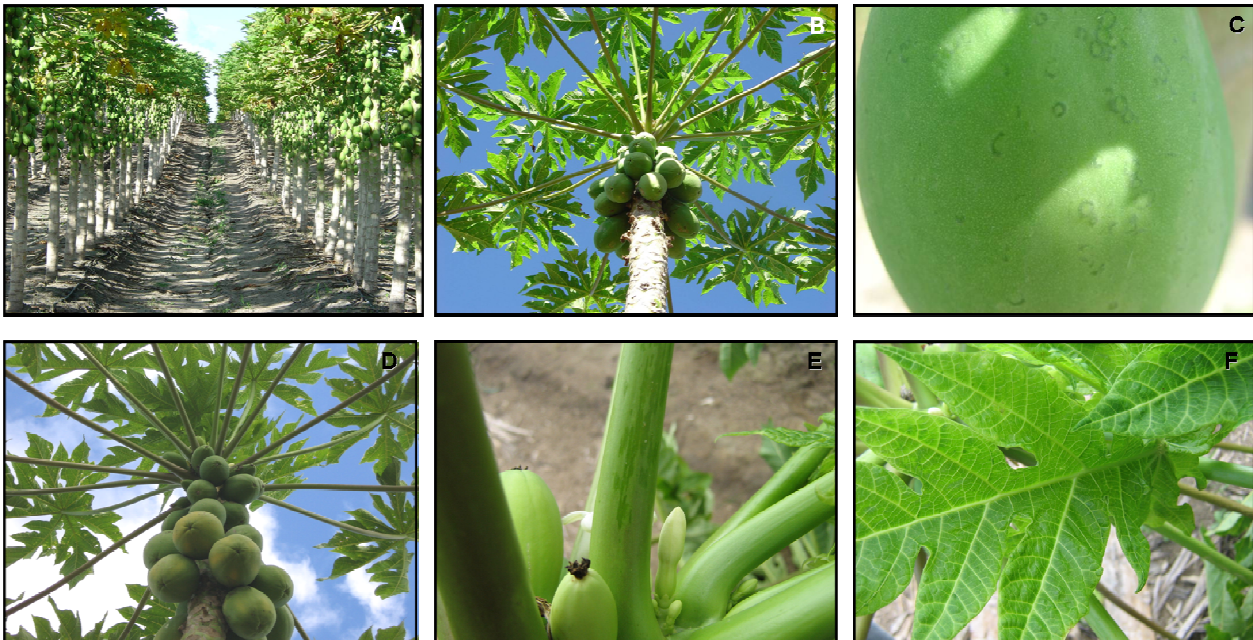


Figura 2 – Sintomas fracos em mamoeiros no estado Espírito Santo causados pelo PRSV-P. **A**, plantio comercial de mamoeiros com aproximadamente 11 meses de idade sem sintomas aparentes de mosaico; **B**, planta de mamoeiro sem sintomas de mosaico; **C**, fruto de mamoeiro com poucos anéis oleosos nos frutos, com alguns anéis no formato de vírgula; **D**, planta de mamoeiro erradicada com estrias oleosas nos pecíolos; **E**, detalhe da planta de mamoeiro erradicada com estrias oleosas nos pecíolos; **F**, detalhe da planta de mamoeiro erradicada com sintomas leves de mosaico

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Plantas-teste de mamoeiros

Os isolados fracos do PRSV-P foram obtidos em plantios de mamoeiros nas regiões de Linhares, Pinheiros e Sooretama, no estado do Espírito Santo. Os isolados severos foram obtidos nos municípios de Linhares – ES (PRSV-P-ES), Piracicaba – SP (PRSV-P-SP) e Petrolina – PE (PRSV-P-PE). Os inóculos virais foram mantidos em plantas de mamoeiro tipo Solo cultivar Golden, cujas sementes foram fornecidas pela Empresa Gaia Papaya de Linhares, ES.

As semeaduras de mamoeiro foram realizadas em vaso de alumínio contendo terra misturada com composto de matéria orgânica e adubo mineral, previamente preparada e autoclavada durante 2 h, a 121°C. Foram cultivadas duas a três plantas por

vaso. As plantas foram frequentemente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia por vaso e pulverizadas com acaricidas sempre que necessário.

2.2.2.2 Coleta e manutenção dos isolados

Todos os isolados foram mantidos separadamente em plantas de mamoeiro, em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

O inóculo foi preparado na diluição de 1:10 (p:v) em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M. Como abrasivo foi usado o carbureto de silício (Carborundum), grão 320. As folhas inoculadas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo. Para toda inoculação de isolados fracos foi realizada uma inoculação-controle com um dos isolados severos do vírus.

2.2.2.3 Detecção do PRSV-P

Todas as amostras de mamoeiro provenientes do Espírito Santo foram inicialmente indexadas para a presença do PRSV-P através de teste sorológico de PTA-ELISA, microscopia eletrônica e/ou teste molecular de RT-PCR para o gene da proteína capsidial (*cp*).

Após a inoculação dos diferentes isolados em plantas-teste de mamoeiro, a confirmação da infecção foi realizada por observação visual de sintomas, PTA-ELISA e/ou teste molecular de RT-PCR para o gene da proteína capsidial.

2.2.2.3 Escala de notas de sintomas

Foram elaboradas escalas de notas de sintomas nas folhas de mamoeiro para facilitar a classificação dos isolados durante os experimentos. Plantas sadias e plantas inoculadas com isolados severos foram mantidas como controles.

A escala de notas de severidade de sintomas para os ensaios realizados na ESALQ/USP, Piracicaba, SP, variou de 1 a 5: nota 1 para plantas com sintomas de mosaico fraco, sem deformações foliares e bom desenvolvimento; nota 2, para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar; nota 3, para sintomas

intermediários de mosaico e deformação foliar; nota 4, para sintomas de mosaico intenso e deformação foliar e nota 5, para plantas exibindo sintomas severos de mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido. Essa escala de notas foi utilizada em todas as fases de desenvolvimento das plantas a conclusão dos testes. A leitura dos sintomas nas plantas-teste geralmente teve início 15 - 20 dias após a inoculação, tempo este suficiente para que ocorra a invasão sistêmica do vírus.

No experimento realizado em campo, no estado do Espírito Santo, a escala de notas de severidade de sintomas variou de 1 a 9 (tabela 1).

Tabela 1 – Escala de notas de severidade de sintomas causado pelo PRSV-P em mamoeiro para o experimento em campo no estado do Espírito Santo

Nota	Descrição dos sintomas
1	Ausência de sintomas.
2	Mosaico muito fraco (Ausência de outros sintomas).
3	Mosaico fraco; pecíolos com poucas manchas oleosas; nervuras verde-pálido; frutos com muito poucas pontuações oleosas (vírgulas).
4	Mosaico na folha bem característico; manchas oleosas nos pecíolos e caule; clareamento de nervuras; frutos com poucos anéis (menos de cinco).
5	Mosaico severo e deformação nas folhas; presença de bolhas; nítido clareamento de nervuras; manchas oleosas nos pecíolos e caule; frutos com 5 - 10 anéis bem visíveis.
6	Mosaico muito severo; muitas manchas oleosas nos pecíolos e caule; frutos com mais de 10 anéis bem visíveis; crescimento da planta afetado em até 30%.
7	Mosaico muito severo; distorção do limbo foliar e redução do número de folhas; folhas com aspecto coreáceo; muitas manchas oleosas nos pecíolos e caule; diminuição do número e tamanho dos frutos; frutos com alta incidência de anéis bem visíveis (>30 anéis/fruto); forte redução no crescimento das plantas (de 30% a 50%).
8	Nanismo nas plantas e ausência de folhas com mosaico severo nas remanescentes; baixa produção de frutos e com desenvolvimento incompleto; redução no crescimento das plantas superior a 50%.
9	Nanismo muito severo; forte desfolha e mosaico severo nas folhas remanescentes; ausência de frutos ou quando presentes deformados e com desenvolvimento incompleto; pode ocorrer a morte da planta.

2.2.2.4 Purificação do vírus e produção de antissoro

Realizou-se a purificação do PRSV-P a partir da inoculação de amostra composta de isolados fracos e severos do vírus provenientes do estado do Espírito Santo. A inoculação foi realizada, mecanicamente, em plantas de *Cucumis metuliferus*. Para a purificação do PRSV-P foi utilizado o método descrito por Marinho e Kitajima (1989), com algumas modificações.

Folhas sintomáticas de *C. metuliferus* foram colhidas aos 20 dias após a inoculação, totalizando 126 gramas. As folhas foram trituradas em liquidificador, na presença de tampão fosfato 0,25 M pH 7,5, contendo 0,01 M de Na-EDTA e 0,1% de ácido tioglicólico, na proporção de 1:2 (p/v). O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado por 15 minutos, a 7.500 g. O sobrenadante foi transferido para um “beacker”, acrescido de 1% de Triton X-100, 4% de polietilenoglicol (PEG) e 0,1 M NaCl e agitado por duas horas e meia a 4°C. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 13.200 g. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,25 M pH 7,5, contendo 0,01 M de MgCl₂ por aproximadamente 14 horas a 4°C e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 13.200 g. O sobrenadante coletado foi centrifugado por uma hora e meia a 85.000 g. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 e centrifugado por 10 minutos a 13.200 g. O sobrenadante resultante foi coletado e centrifugado por 16 horas a 90.000 g em gradiente isopícnico de cloreto de céσιο (CsCl) a 15%, colocado sobre um colchão, também de CsCl a 53% (p/p), dissolvido em tampão fosfato 0,01 M. A banda viral visível foi coletada e dialisada três vezes em tampão fosfato 0,001 M, pH 7,0 sendo então armazenada a -20°C.

A concentração do purificado viral foi estimada com base nos valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260 nm considerando-se o valor de 2,4 para o coeficiente de extinção (E_{260}).

A integridade da partícula viral e a pureza do purificado foram examinadas em um microscópio de transmissão Zeiss EM 900, do núcleo de microscopia eletrônica da ESALQ, pela técnica de contrastação negativa.

O purificado viral foi injetado em dois coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 50 dias de idade, mantidos no Departamento de Produção Animal da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. A preparação viral foi emulsionada com adjuvante incompleto de Freund na proporção de 1:1 (v/v) e a mistura foi injetada via intramuscular nos coelhos. Semanalmente foi aplicado 1 mL da emulsão contendo 100 µg do vírus, em cada coelho, em um total de cinco imunizações. Dez dias após a última imunização o sangue foi coletado duas vezes, em intervalo de uma semana entre cada coleta, através de cortes realizados na veia marginal da orelha do coelho. Foram coletadas amostras de sangue de aproximadamente 25 mL, promovendo-se a

coagulação das mesmas a 4°C por 12 horas, seguida de uma centrifugação a 3.000 g por 10 minutos. Os soros foram transferidos para recipientes menores que foram etiquetados e armazenados a -20°C.

2.2.2.5 Detecção do PRSV-P em amostras de mamoeiro

2.2.2.5.1 PTA-ELISA

A confirmação da infecção das plantas-teste de mamoeiro foi realizada através do teste sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (MOWAT; DAWSON, 1987), com modificações.

Utilizou-se antissoro policlonal específico produzido contra a proteína capsial deste vírus. As amostras foram maceradas em tampão carbonato de sódio (15 mM Na₂CO₃; 35 mM, NaHCO₃ e 3 mM NaN₃, pH 9,6). Foram colocados 100 µl das amostras, diluídas 1:40 (p:v) em placas de ELISA de 96 cavidades e posteriormente incubadas por 15 minutos a 37°C. Utilizaram-se duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4PBS + 0,05% Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µl do antissoro diluído (1:1000) em tampão PBS-TPB (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000 + 0,2% Bovine Serum Albumin). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito. Foram colocados nas cavidades das placas 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-80225) diluídos 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubadas novamente por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, foram colocados em cada cavidade 100 µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942) diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro, para a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA, marca Metertech Σ960, utilizando-se um filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedeu em duas vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

2.2.2.5.2 Microscopia eletrônica

Exames de microscopia eletrônica foram realizados com extratos foliares de mamoeiros infectados em contrastação negativa (“leaf dip”). Inicialmente, sobre uma gota de extrato foliar foi colocada uma telinha de microscopia eletrônica de transmissão. Depois de 3 a 5 minutos a telinha foi removida e lavada três vezes em água destilada. A contrastação foi feita com acetato de uranila 1% durante 3 a 4 minutos. A telinha foi examinada em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

2.2.2.5.3 RT-PCR

As análises moleculares foram realizadas por meio da detecção de dois fragmentos do genoma do PRSV-P. Um fragmento da região que corresponde ao gene da proteína capsial (*cp*) com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descritos por Souza Júnior (1999) que amplificam um fragmento de aproximadamente 950 nucleotídeos e outro da região que compreende uma parte do gene da inclusão citoplasmática (*ci*), cujo par de primers amplifica um fragmento de aproximadamente 750 nucleotídeos (figura 3; quadro 1).

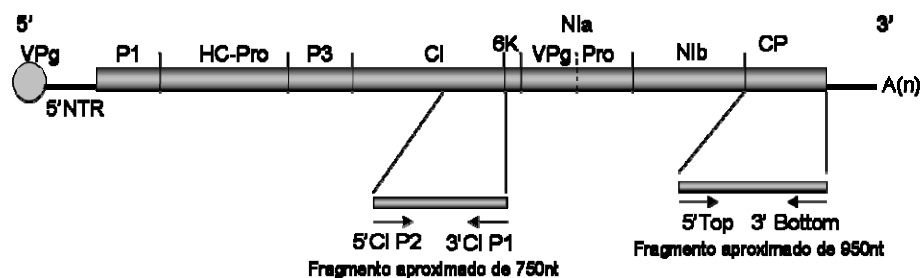


Figura 3 – Representação esquemática do genoma do gênero *Potyvirus* enfatizando a localização dos oligonucleotídeos iniciadores 5'Top e 3'Bottom utilizados para a amplificação do gene da proteína capsial e os oligonucleotídeos iniciadores 5'CI P2 e 3'CI P1 utilizados para a amplificação parcial do gene da inclusão citoplasmática do PRSV-P

Oligonucleotídeo	Sequência	Região de anelamento
5' PRSV Top	5' - ATCATTCCATGGGCGTGTTCATGAATCAA - 3'	Gene da proteína capsial (senso)
3' PRSV Bottom	5' - AGCTAACCATGGGCGAGTATTCAGTTGCGC - 3'	Gene da proteína capsial (anti-senso)
CI PRSV-P P1	5' - CCGCATACAATYGCATCC - 3'	Porção 3'- terminal do gene da inclusão citoplasmática (anti-senso)
CI PRSV-P P2	5' - CGTCCCTAYAAGYTGAGRG - 3'	Porção 3'- terminal do gene da inclusão citoplasmática (senso)

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR para detecção do PRSV-P

A extração de RNA total de folhas de plantas de mamoeiro foi realizada utilizando-se o produto Trizol® LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das folhas, separadamente para cada fragmento do genoma a ser amplificado. Para a reação de transcrição reversa (“reverse trascription”), inicialmente 3 µl de suspensão de RNA total, diluído em água “Milli-Q” previamente tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC), foram misturados com 1 µl do oligonucleotídeo iniciador anti-senso (20 mM). Foram adicionados também 1 µl de dNTP’s (dATP, dGTP, dCTP e dTTP - 10 mM) e 12 µl de água “Milli-Q” tratada com DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente mantida a 2°C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 5 µl do tampão 5X da enzima transcriptase reversa, 2 µl de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 200 unidades da enzima M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*). Essa solução foi incubada a 37°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e mantida a 4°C.

O cDNA sintetizado foi utilizado em uma reação de PCR (“polymerase chain reaction” – reação em cadeia da polimerase) separadamente para cada fragmento do genoma a ser amplificado. Para isso, 3 µl do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µl de tampão 10X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 0,8 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,8 µl do primer senso (20 mM), 0,8 µl do primer anti-senso (20 mM), 1,5 µl de mistura de dNTP’s (10 mM), 1,2 unidades de Taq DNA Polimerase e 14,3 µl de água “Milli-Q”.

Para o gene da proteína capsidial, o regime do termociclador foi de 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento a 4°C. Para o fragmento do gene da inclusão citoplasmática, o regime do termociclador foi de 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento a 4°C.

Produtos da RT-PCR foram visualizados em géis de agarose a 0,8%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) em 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3), com auxílio de um transluminador de luz UV.

2.2.2.6 Sequenciamento e análise filogenética

Foram realizadas reações de sequenciamento a partir do produto de PCR e através da obtenção de clones destes produtos, para alguns isolados fracos e severos do PRSV-P.

Os fragmentos dos produtos da RT-PCR, obtidos a partir do RNA total de plantas de mamoeiro infectadas com o PRSV-P, foram purificados com o kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Para o sequenciamento direto, esses fragmentos foram submetidos a outra reação de PCR, com duas a três repetições por amostra, utilizando-se o kit Dyanamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech), contendo o par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da proteína capsidial do PRSV-P e/ou parte do gene da inclusão citoplasmática, seguindo as instruções do fabricante.

Para a obtenção de clones recombinantes, os produtos da RT-PCR foram submetidos à reação de ligação na proporção 3:1 (inserto:vetor). Foi utilizado o kit pGEM T-Easy Vector System (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α (Invitrogen) foram transformadas, utilizando-se o método do choque térmico (SAMBROOK et al., 1989) e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina, IPTG e X-Gal. As colônias recombinantes foram identificadas por meio de sua coloração branca, transferidas para meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37°C durante 12 horas sob agitação (220 rpm). A clonagem foi confirmada por meio de extração dos plasmídeos e posterior

PCR. Os clones foram mantidos em *E. coli*, na forma de culturas armazenadas na presença de glicerol a -80°C . Cada clone foi seqüenciado duas vezes nos sentidos senso e antissenso, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13 Forward e M13 Reverse, que anelam em regiões do vetor que flanqueiam o fragmento clonado. O sequenciamento foi realizado com o kit BigDye™ Terminator Cycling em sequenciador automático 3730xl de acordo com os protocolos descritos pela empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul.

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas pelos programas Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e Electropherogram Quality Analysis - Phred-Phrap (<http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>) para a obtenção da seqüência consenso. As seqüências consensos de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foram comparadas entre si e às seqüências correspondentes de outros isolados do PRSV-P depositadas no banco de dados do GenBank, acessado pelo National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa BLAST. O relacionamento filogenético dos isolados do PRSV-P foi deduzido com o programa MEGA 4 (www.megasoftware.net), utilizando-se o método “neighbor joining” para a seqüência de nucleotídeos. Os ramos do dendograma filogenético foram submetidos à análise de bootstrap com 2.000 repetições.

2.2.2.7 Avaliação da estabilidade de sintomas induzidos por alguns isolados fracos

O teste de estabilidade foi realizado em plantas de mamoeiro ‘Golden’, em casa da vegetação, no setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Foram analisados quatro isolados fracos provenientes do estado do Espírito Santo, denominados isolados 1, 2, 7 e 9. Cada isolado foi inoculado mecanicamente em duas plantas de mamoeiro. A inoculação foi realizada em dois dias consecutivos para assegurar a infecção viral. Foram utilizadas, como controles, duas plantas inoculadas com um isolado severo do vírus e duas plantas sadias, ambas para comparações de sintomas. Após 21 dias foi feito um teste de PTA-ELISA para a confirmação da infecção.

As plantas foram mantidas em observação por um período de 45 a 60 dias e avaliadas semanalmente. Foram realizadas oito transferências sucessivas, durante um

período de treze meses, transferindo-se os diferentes isolados a partir da planta que apresentou a menor nota de intensidade de sintomas, ou seja, com sintomas mais fracos para novas plantas saudias. A escala de notas de sintomas utilizada variou de 1 a 5, conforme descrito.

2.2.2.8 Avaliação do efeito protetor de alguns isolados fracos em casa de vegetação

Plantas de mamoeiro 'Golden', cultivadas em vaso em casa de vegetação, no setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, foram inoculadas mecanicamente com os quatro isolados fracos avaliados nos ensaios de estabilidade de sintomas. Quinze a vinte dias após a inoculação, confirmada a infecção por sintomas ou teste sorológico de PTA-ELISA, as plantas foram superinoculadas (desafiadas) com os isolados severos do vírus de três origens geográficas distintas: Linhares – ES (PRSV-P-ES), Piracicaba – SP (PRSV-P-SP) e Petrolina – PE (PRSV-P-PE). Para os testes com o isolado severo do Espírito Santo, as plantas de mamoeiro foram premunizadas com os isolados fracos 1, 2, 7 e 9. Para os testes de desafio com os isolados severos de São Paulo e Pernambuco, os mamoeiros foram premunizados com os isolados fracos 1, 7 e 9. A escala de notas de sintomas variou de 1 a 5.

Dez dias após a primeira superinoculação, as plantas foram novamente desafiadas com os mesmos isolados severos, inoculados mecanicamente em três folhas expandidas, porém diferentes daquelas utilizadas no primeiro desafio. Nos testes foram comparados os seguintes tratamentos: (a) plantas premunizadas com os isolados fracos do PRSV-P e não desafiadas; (b) plantas premunizadas e superinoculadas com os isolados severos, separadamente; (c) plantas da mesma idade, inicialmente saudias, inoculadas com os diferentes isolados severos separadamente, por ocasião das superinoculações e (d) plantas saudias. As plantas dos tratamentos c e d serviram de controle dos inóculos das superinoculações e para comparação de sintomas por meio da escala de notas descrita.

Todas as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação, onde foram realizadas leituras periódicas de sintomas para avaliação do valor protetor dos

isolados fracos. A proteção foi considerada positiva quando as plantas premunizadas e superinoculadas não apresentaram alterações dos sintomas iniciais fracos.

2.2.2.9 Avaliação do efeito protetor de alguns isolados fracos em condições de campo

Foram realizados dois experimentos no campo experimental do setor de Fitopatologia da ESALQ/USP e um experimento na Fazenda Calmon, localizada no município de Linhares, ES, em área cedida pela Empresa Gaia Papaya. As mudas de mamoeiro, no estágio de três folhas, foram inoculadas mecanicamente em casa de vegetação, com alguns isolados fracos a serem analisados. Aproximadamente vinte dias após a inoculação de premunização, as plantas foram analisadas por PTA-ELISA para a confirmação da infecção viral. Posteriormente, as mudas foram transplantadas em covas previamente preparadas com adubo mineral 04-14-08 (250 g/cova) e esterco de curral curtido (200 g/cova), aplicados 15 dias antes de cada plantio. Cada cova recebeu uma muda. As plantas foram irrigadas por aspersão e/ou gotejamento e receberam os tratos culturais convencionais requeridos pela cultura. Para todos os experimentos, plantas inoculadas com isolados severos do estado do Espírito Santo e plantas sadias foram levadas a campo para servirem como fonte de inóculo e controle.

O primeiro experimento foi realizado no período de 18/12/2006 a 05/05/2008 no campo experimental do setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Nesse experimento foram analisados 30 isolados fracos, inoculados em diferentes números de plantas, conforme tabela 9. O número total de plantas avaliadas foi de 62, cultivadas no espaçamento de 2 m entre linhas e 2,5 m entre plantas na linha. O segundo experimento foi realizado no mesmo local do primeiro, no período de 29/08/2007 a 25/06/2008 e constou de 7 isolados fracos, inoculados em diferentes números de plantas, conforme tabela 10. O número total de plantas foi de 72, cultivadas no espaçamento de 3 x 3 m. Os dois experimentos foram realizados com mamoeiros cultivar Golden. A avaliação foi realizada por meio de observação visual dos sintomas sobre o aspecto geral da planta. Foi utilizada a escala de notas variando de 1 a 5, conforme descrito.

O terceiro experimento foi realizado no período de 28/04/2008 a 29/12/2008, na Fazenda Calmon, localizada no município de Linhares, ES. O experimento constou de 8 isolados fracos, distribuídos em 80 plantas de mamoeiro da cultivar Sunrise Solo e 80 plantas de mamoeiro da cultivar Golden, cultivadas no espaçamento de 2 metros entre linhas e 1,5 m entre plantas na linha. Cada isolado foi inoculado em 15 plantas de cada cultivar. Todas as plantas foram posteriormente analisadas por PTA-ELISA e/ou RT-PCR para confirmar a infecção com o PRSV-P. Dez plantas de cada variedade, sabidamente infectadas com cada um dos isolados escolhidos ao acaso, foram transplantadas em campo conforme figura 4. As avaliações da severidade dos sintomas foram realizadas por meio de uma escala de notas variando de 1 a 9, conforme descrito. A proteção foi considerada positiva quando as plantas premunizadas e superinoculadas não apresentaram alterações dos sintomas iniciais fracos.

S U N R I S E S O L O	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	XS	XS	XS	XS	XS	XS	XS	XS	XS	XS	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	O	O	O	O	S	O	O	O	O	O	S			
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
	G O L D E N	G	O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G		
		G	O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G		
		G	O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G		
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	GS	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		O	O	O	O	G	O	O	O	O	O	G			
G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	

Legenda: S e G = Plantas cvs. Sunrise Solo e Golden inoculadas posteriormente com isolado severo para aumentar fonte de inóculo

XS e XG = Plantas cvs. Sunrise Solo e Golden sadias (sem inocular)

O = Plantas cv. Sunrise Solo e cv. Golden Inoculadas com os 8 isolados fracos do PRSV-P

Figura 4 - Croqui do ensaio de premunização de mamoeiros cvs. Sunrise Solo e Golden conduzido no estado do Espírito Santo

2.2.2.10 Teste de transmissão por afídeos

Testes de transmissão de um isolado fraco e dois isolados severos do PRSV-P com afídeos foram conduzidos com a espécie *Myzus nicotianae*. A colônia livre de vírus desse afídeo foi mantida em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) condicionadas em gaiolas à prova de insetos, em condição de casa de vegetação.

Para os testes de transmissão os afídeos foram removidos das folhas das plantas com o auxílio de um pincel fino e macio. Depois de coletados foram mantidos em jejum, numa caixa plástica, por um período de aproximadamente 30 minutos. A seguir foram colocados sobre folhas de mamoeiros infectados com os isolados do PRSV-P, separadamente. O período de aquisição foi de aproximadamente 30 minutos. Logo após, os afídeos foram transferidos com o auxílio do pincel para as folhas das plantas-teste de mamoeiro em número aproximado de 10 afídeos por planta. O período de inoculação foi de aproximadamente duas horas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, para posteriores avaliações de sintomas e RT-PCR.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Indexação das amostras de mamoeiros do estado do Espírito Santo

A relação dos isolados supostamente fracos do PRSV-P provenientes do ES, os resultados da detecção do PRSV-P nas amostras foliares, bem como a reação dos mamoeiros 'Golden' inoculados com esses isolados em casa de vegetação estão na tabela 2.

Tabela 2 – Detecção do PRSV-P por meio de PTA-ELISA, ME e RT-PCR em amostras de mamoeiros provenientes do estado do Espírito Santo e reação em mamoeiros 'Golden' inoculados com extratos foliares dessas amostras

(continua)

Isolado	Origem	PTA-ELISA	ME	RT-PCR (cp)	Nota de sintomas em mamoeiro*
1	Linhares	+	+	+	1
2	Linhares	+	+	+	1
3	Linhares	-	+	+	1
4	Linhares	+	-	+	1
5	Linhares	+	+	+	2
6	Linhares	+	+	+	2
7	Linhares	+	+	+	1
8	Linhares	-	+	+	1
9	Linhares	+	+	+	1
10	Linhares	+	+	+	1
11	Linhares	+	NT	NT	1
12	Linhares	+	NT	NT	1
13	Linhares	-	NT	NT	-
14	Linhares	+	NT	NT	-
15	Linhares	+	NT	NT	-
16	Linhares	-	NT	NT	1
17	Linhares	+	NT	NT	2
18	Linhares	+	NT	NT	2
19	Linhares	+	+	+	2
20	Linhares	-	-	+	-
21	Linhares	-	-	+	-
22	Linhares	+	+	+	2
23	Linhares	-	-	+	-
24	Linhares	+	-	+	2
25	Linhares	+	+	+	2
26	Linhares	+	+	+	1
27	Linhares	-	+	+	1
28	Linhares	-	-	-	-
29	Linhares	-	-	+	-
30	Linhares	-	+	+	2
31	Linhares	-	+	+	1

NT: não testado; * (-): ausência de sintomas

Tabela 2 – Detecção do PRSV-P por meio de PTA-ELISA, ME e RT-PCR em amostras de mamoeiros provenientes do estado do Espírito Santo e reação em mamoeiros 'Golden' inoculados com extratos foliares dessas amostras

Isolado	Origem	PTA-ELISA	ME	RT-PCR (cp)	(continuação)
					Nota de sintomas em mamoeiro*
32	Linhares	+	NT	+	1
33	Linhares	+	NT	+	-
34	Linhares	+	NT	+	-
35	Linhares	+	NT	+	2
36	Linhares	+	NT	+	1
37	Linhares	+	NT	+	-
38	Linhares	+	NT	+	-
39	Linhares	+	NT	+	1
40	Linhares	-	NT	NT	-
41	Linhares	-	NT	NT	-
42	Linhares	+	NT	NT	1
43	Linhares	+	+	NT	1
44	Linhares	+	+	NT	-
45	Linhares	+	+	NT	5
46	Linhares	-	-	-	-
47	Linhares	-	-	-	-
48	Linhares	+	+	+	1
49	Linhares	+	+	+	1
50	Linhares	-	+	+	2
51	Linhares	-	+	+	4
52	Linhares	-	+	+	4
53	Linhares	-	-	-	-
54	Linhares	+	-	+	5
55	Linhares	+	+	+	5
56	Linhares	+	-	+	4
57	Linhares	+	+	+	2
58	Linhares	+	NT	+	2
59	Linhares	+	NT	+	2
60	Linhares	+	NT	+	1
61	Linhares	-	NT	+	1
62	Linhares	-	NT	+	1

NT: não testado; * (-): ausência de sintomas

Tabela 2 – Detecção do PRSV-P por meio de PTA-ELISA, ME e RT-PCR em amostras de mamoeiros provenientes do estado do Espírito Santo e reação em mamoeiros 'Golden' inoculados com extratos foliares dessas amostras

(continuação)

Isolado	Origem	PTA-ELISA	ME	RT-PCR (cp)	Nota de sintomas em mamoeiro*
63	Linhares	+	NT	+	1
64	Linhares	+	NT	+	1
65	Linhares	-	NT	+	-
66	Linhares	-	NT	+	-
67	Linhares	+	+	+	2
68	Linhares	-	-	-	-
69	Linhares	-	+	+	1
70	Linhares	-	+	+	1
71	Linhares	+	+	+	2
72	Linhares	+	+	+	2
73	Linhares	-	-	+	-
74	Linhares	-	+	+	1
75	Linhares	+	+	+	2
76	Linhares	+	+	+	5
77	Linhares	-	-	+	1
78	Linhares	+	+	+	1
79	Linhares	+	+	+	1
80	Linhares	+	+	+	1
81	Linhares	+	+	NT	2
82	Linhares	-	-	NT	-
83	Linhares	+	+	NT	1
84	Linhares	+	-	NT	2
85	Linhares	+	+	NT	2
86	Linhares	+	+	NT	2
87	Linhares	+	+	+	2
88	Linhares	-	+	+	1
89	Linhares	-	-	+	-
90	Linhares	-	NT	+	1
91	Linhares	+	NT	+	1
92	Linhares	-	NT	+	5
93	Linhares	+	NT	+	1

NT: não testado; * (-): ausência de sintomas

Tabela 2 – Detecção do PRSV-P por meio de PTA-ELISA, ME e RT-PCR em amostras de mamoeiros provenientes do estado do Espírito Santo e reação em mamoeiros ‘Golden’ inoculados com extratos foliares dessas amostras

Isolado	Origem	PTA-ELISA	ME	RT-PCR (cp)	(conclusão)
					Nota de sintomas em mamoeiro*
94	Linhares	+	NT	+	4
95	Linhares	+	NT	+	3
96	Linhares	-	NT	-	-
97	Linhares	+	NT	+	2
98	Linhares	-	NT	+	2
99	Linhares	+	NT	+	1
100	Linhares	+	NT	+	1
101	Linhares	-	NT	+	1
102	Linhares	+	NT	+	-
103	Linhares	+	NT	+	2
104	Linhares	-	NT	+	2
105	Linhares	+	NT	-	2
106	Linhares	+	NT	+	5
107	Linhares	-	NT	+	-
108	Pinheiros	-	-	+	-
109	Pinheiros	-	-	-	-
110	Pinheiros	+	-	+	2
111	Pinheiros	+	-	+	1
112	Pinheiros	-	-	-	-
113	Pinheiros	+	+	+	2
114	Pinheiros	+	+	+	-
115	Pinheiros	-	-	+	1
116	Sooretama	+	+	+	-
117	Sooretama	-	-	+	2
118	Sooretama	+	+	+	1
119	Sooretama	-	-	-	-

NT: não testado; * (-): ausência de sintomas

De 119 isolados avaliados inicialmente como fracos, 75 induziram sintomas fracos, com plantas exibindo leve mosaico, pouca deformação foliar e poucas estrias oleosas nos pecíolos, variando as notas de 1 a 2. Onze isolados induziram sintomas fortes de mosaico, deformação foliar e estrias oleosas nos pecíolos, com notas de 3 a 5,

e trinta e três isolados não foram detectados no teste de indexação biológica, tratando-se provavelmente de amostras de plantas saudáveis.

Esses resultados indicam que há uma aparente predominância de plantas sem sintomas severos nas folhas, boa produtividade e poucos anéis nos frutos, sugerindo tratar-se de plantas infectadas com formas mais fracas do vírus na região do norte do estado de Espírito Santo.

2.2.3.2 Purificação do PRSV-P e análise do antissoro

A purificação realizada a partir de folhas de *C. metuliferus* sistemicamente infectadas com isolados do PRSV-P provenientes do Espírito Santo permitiu a obtenção de um purificado com a concentração de 1,72 µg de vírus por µL. A observação do purificado viral, em microscopia eletrônica de transmissão, revelou a presença de partículas alongadas, flexuosas e íntegras semelhantes às do gênero potyvírus.

O antissoro policlonal obtido contra o PRSV-P foi analisado por PTA-ELISA em diferentes diluições e os resultados encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Média dos valores de absorvância (A_{450}) obtidos em teste de PTA-ELISA utilizando quatro diluições de antissoro contra suspensões do purificado viral em três diluições e extratos foliares de mamoeiros saudáveis e infectados com isolados fracos e severo do PRSV-P, diluídos 1:50

Amostras	Diluição do antissoro			
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
Sadio	0,405	0,259	0,238	0,150
Purificado viral (1:100)	1,316	1,301	1,314	1,201
Purificado viral (1:1000)	0,666	0,549	0,528	0,404
Purificado viral (1:2000)	0,701	0,586	0,514	0,436
Isolado severo	0,542	0,502	0,409	0,340
Isolado fraco	0,423	0,329	0,293	0,197

Tabela 4 – Média dos valores de absorvância (A_{450}) obtidos em teste de PTA-ELISA para a detecção do PRSV-P utilizando 4 diluições de extratos foliares de mamoeiros e antissoro pré-absorvido diluído 1:1000

Amostras	Diluição das amostras			
	1:5	1:10	1:20	1:40
Sadio	0,060	0,058	0,062	0,065
Isolado forte	0,205	0,226	0,161	0,361
Isolado fraco	0,072	0,070	0,116	0,117

Os valores de absorvância obtidos indicam que o antissoro apresentou boa reação com o vírus purificado na diluição 1:100, porém reagiu também com o extrato da planta sadia, indicando reação inespecífica. Por esse motivo, não foi possível detectar os isolados severo e fraco em extratos de folhas de mamoeiro, considerando-se positivas as reações cujos valores de absorvância são superiores a duas vezes a média de absorvância do extrato da planta sadia. Exceção apenas para o isolado severo analisado com antissoro diluído 1:4000 (tabela 3).

No entanto, a pré-absorção do antissoro com extrato de folha de mamoeiro sadio possibilitou o seu uso para detecção do PRSV-P conforme ilustrado na tabela 4. Em todas as diluições do extrato foi possível a detecção do isolado severo, considerando-se o mesmo critério descrito anteriormente. Para o extrato do tecido infectado com o isolado fraco, a reação foi melhor nas diluições 1:20 e 1:40, porém ligeiramente abaixo do limite estabelecido. Antissoro pré-absorvido diluído 1:1000 e amostras diluídas 1:40 foram utilizados no decorrer deste trabalho.

2.2.3.3 Análises moleculares de alguns isolados fracos e severos do PRSV-P

A hipótese de as estirpes ou isolados fracos do estado do Espírito Santo serem de uma espécie de *Potyvirus* distinta do PRSV-P foi levantada no início das investigações. Essa hipótese foi investigada através de duas abordagens: a) testes de proteção em plantas de mamoeiro premunizadas com os isolados fracos e desafiadas com o isolado severo PRSV-P-ES e PRSV-P-SP, em casa de vegetação e em campo e

b) análise da sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial. De acordo com o último relatório do ICTV (International Committee of Taxonomic of Virus), esses critérios fornecem subsídios para a demarcação de espécies para o gênero *Potyvirus* (FAUQUET et al., 2005). Nos testes de proteção, todas as plantas de mamoeiro premunizadas com quatro isolados fracos ficaram protegidas contra a infecção e/ou manifestação dos sintomas causados pelo isolado severo PRSV-P-ES e cinquenta por cento das plantas ficaram protegidas contra o PRSV-P-SP em testes realizados em casa de vegetação (tabelas 7 e 8). No caso do sequenciamento parcial do genoma, identidades da sequência de aminoácidos da proteína capsidial superiores a 80% indicam tratar-se de isolados de uma mesma espécie. O sequenciamento da região central (“core region”) do gene da proteína capsidial de alguns isolados fracos do PRSV-P e os isolados severos do Espírito Santo (PRSV-P-ES) e Pernambuco (PRSV-P-PE) revelou identidades entre 89 e 97% para a sequência de nucleotídeos e entre 90 e 97% para a sequência de aminoácidos deduzidos, quando comparados com as respectivas sequências de outros isolados do PRSV-P depositadas no GenBank. Esses resultados comprovam a etiologia dos isolados fracos do vírus provenientes de mamoeiros do estado do Espírito Santo como isolados do PRSV-P.

Foram obtidas as sequências dos seguintes isolados fracos: 2', 2'' (que representam repetições do mesmo isolado, porém de plantas diferentes), 1, 4, 7, 9, 11, 30, 36, 39, 48, 63 e 74. Também foram obtidas sequências de nucleotídeos para o gene da proteína capsidial dos isolados severos PRSV-P-ES e PRSV-P-PE.

Para o isolado 2' obteve-se a maior sequência, 1.022 nucleotídeos, a partir de clones recombinantes. As sequências dos isolados PRSV-P-ES, 1, 39, 42, 48, 60 e 74, obtidas a partir de clones, apresentaram 1.004 nucleotídeos e a do isolado 63 apresentou 1.006 nucleotídeos. As sequências dos demais isolados do PRSV-P foram obtidas a partir do sequenciamento direto dos produtos da RT-PCR, apresentando portanto sequências parciais variando de 645 a 875 nucleotídeos, compreendendo a região central do gene da proteína capsidial. Todos os isolados apresentaram altas identidades de nucleotídeos com outros isolados do PRSV-P depositados no GenBank. Para a sequência de aminoácidos deduzidos, alguns isolados fracos a identidade não

foi tão alta como se esperava. Contudo, as avaliações mostraram que são todos isolados do PRSV-P (tabela 5).

Todas as sequências obtidas de aminoácidos deduzidos apresentaram na região N-terminal o domínio conservado DAG, um dos responsáveis pela transmissão por afídeos, antes da região de repetição EK (“EK repeats”), com exceção da sequência para o isolado severo PRSV-P-PE. Também apresentaram o domínio conservado WCIEN, com exceção das sequências do isolado 2’.

As sequências de nucleotídeos da região central do gene da proteína capsidial foram utilizadas para a construção do dendograma filogenético, incluindo-se isolados do PRSV-P de outras regiões do Brasil e do mundo. Também incluíram-se isolados da espécie relacionada PRSV-W (PRSV-W-1, isolado fraco e PRSV-W-C, isolado severo) do Brasil e um isolado da espécie tipo de potyvírus, o *Potato virus Y* (PVY). Os números de acesso das sequências do GenBank, tal como a origem geográfica dos outros isolados/espécies, estão no dendograma filogenético (figura 5).

O dendograma filogenético agrupou os isolados/espécies em três grandes ramos distintos, de acordo com a espécie e a origem geográfica dos isolados: um ramo para a espécie PVY, um ramo com isolados/espécies das Américas, juntamente com o isolado indiano e um ramo com os isolados asiáticos do PRSV-P. No ramo dos isolados/espécies americanos, os isolados/espécies brasileiros formaram um subgrupo distinto, verificando-se que os isolados brasileiros são filogeneticamente muito próximos quanto à sequência de nucleotídeos da região central do gene da proteína capsidial do PRSV-P.

Foi obtida a sequência de nucleotídeos completa para o gene da inclusão citoplasmática do isolado fraco 4. A identidade de nucleotídeos entre o isolado fraco 4 variou de 92 e 95% para os isolados/espécies americanos. Para os isolados do PRSV-P da Índia e China, a identidade foi de 90 e 84%, respectivamente.

Tabela 5 – Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos (abaixo-esquerda) e de aminoácidos deduzidos (acima-direita) da região central do gene da proteína capsidial de alguns isolados fracos do PRSV-P e dois isolados severos: Estado do Espírito Santo e Pernambuco e outros isolados depositados no GenBank

Isolado	1	2'	2''	4	7	9	11	30	36	39	48	63	74	PRSV-P-ES	PRSV-P-PE	PRSV-P, ES Brazil AF344644.1	PRSV-P Havai S46722.1	PRSV-P China EF183499.1	PRSV-P Índia EF017707.1
1	x	96,4	82	95,8	99,6	99,6	98,9	98,9	99,6	93,1	93,4	83,1	97,3	93,4	82,1	96,1	88	85,3	85,9
2'	97,6	x	82	95,8	99,6	99,6	99,6	98,9	99,6	91,6	91,9	83,1	95,5	91,9	82,2	96,1	86,2	83,5	84,1
2''	100	97,6	x	81	84,3	82,3	84,1	83,7	83,1	85,1	85,5	87,2	89,3	85,1	81,3	82,6	81	80,1	80,1
4	99	98,1	99	x	96,8	97,4	96,1	95,7	97,8	91,9	91,3	83,4	95,8	91,9	80	93,3	90,5	87,1	88,5
7	99,4	98,1	99,4	99,5	x	100	100	100	98,9	99,2	95,4	82,4	99,6	95,7	80,1	96,8	94,4	90,8	92,3
9	99	99,1	99	99,6	99,8	x	100	100	98,5	96,3	96,7	81,2	99,6	96,3	80,2	97	94,8	91,9	92,2
11	99,8	99	98,8	99,4	99,6	99,4	x	99,3	99,3	95,2	95,2	82,5	99,3	95,2	80,1	96,6	94,5	90,4	91,7
30	99	98,1	99	99,6	99,5	100	99,4	x	98,6	95,4	95,6	81,2	98,9	95,4	80	96,5	94,3	90,8	91,8
36	99,2	97,9	99,2	99,4	99,1	99,4	99,2	99,4	x	96	96,4	82,6	98,9	96	80,2	97,1	94,9	91,4	92,4
39	95,5	94,2	95,5	95,7	95,4	95,7	95,9	95,7	95,9	x	93,7	84,5	94	98,2	80,1	94,1	89,5	86,8	86,8
48	96,6	95,3	96,6	96,8	96,8	96,8	97	96,8	97	96	x	85	93,4	93,4	81,1	94,8	89,2	86,2	84,7
63	98,7	97,7	97	99,2	99,8	99,2	99	99,2	99	95,3	96,4	x	88,6	84,2	80,7	87,4	82,8	80,1	80,2
74	99	98,1	99	99,6	99,8	99,6	99,4	99,6	99,4	95,7	96,8	99,2	x	94	81	95,3	88	85,3	85,9
PRSV-P-ES	95,5	94,2	95,5	95	95,2	95,7	95,9	95,7	95,9	100	96	95,3	95,7	x	81,1	94,1	89,5	87,1	86,8
PRSV-P-PE	94	93,2	94	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	94,4	94	94	94,2	92,5	x	81,2	81,2	80,2	80,1
PRSV-P,ES Brazil AF344644.1	97,4	96,7	97,4	97,2	97,4	97,4	97,3	97,4	97	94,8	95,7	96,5	97,5	94,5	93,3	x	93,2	89,9	90,3
PRSV-P Havai S46722.1	93,9	91,6	93,9	93,7	93,1	94,1	94	94,7	93,4	94,5	93,9	93,2	94,3	94,4	90,6	93,2	x	91,9	92,7
PRSV-P China EF183499.1	90,2	86,2	90,2	89,5	89,7	89,6	89,7	90,1	89,2	90,7	90	88,8	90,2	90,6	85,9	89,5	90,3	x	90,6
PRSV-P Índia EF017707.1	92,4	88,3	92,4	91,8	91,9	92,1	92,1	92,2	91,5	92,5	91,8	91,7	92,6	92,4	88,5	91,7	93,2	89,5	x

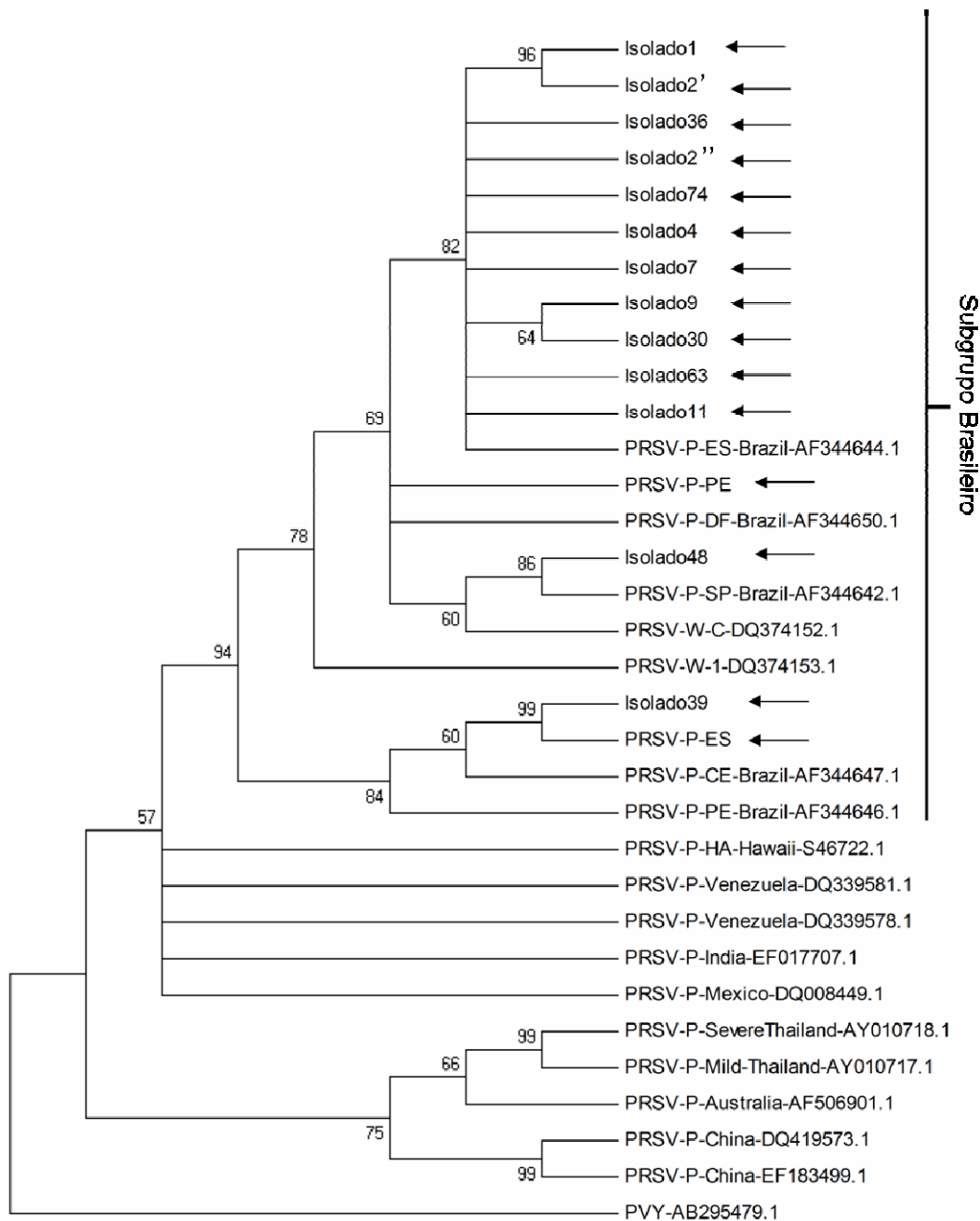


Figura 5 - Dendograma filogenético obtido a partir do alinhamento da sequência de nucleotídeos da região central do gene da proteína capsidial (*cp*) do PRSV-P, indicando o relacionamento entre os isolados fracos do estado do Espírito Santo e severos do Brasil com isolados de origens geográficas distintas, incluindo-se o PRSV-W e PVY. Os isolados do presente estudo estão indicados por setas. Os ramos com menos de 50% foram excluídos. O dendograma foi construído com o programa Mega 4, utilizando o método de "Neighbor Joining" e análise de "bootstrap" com 2.000 repetições

2.2.3.4 Estabilidade dos sintomas induzidos por alguns isolados fracos do PRSV-P

Foram realizadas oito transferências dos isolados fracos identificados por 1, 2, 7 e 9, provenientes da região de Linhares, ES, juntamente com um isolado severo do estado do Espírito Santo (PRSV-P-ES). Os resultados encontram-se na tabela 6.

A passagem sucessiva dos quatro isolados fracos do PRSV-P indicou alta estabilidade para os isolados 1 e 7, com base na expressão dos sintomas. Após oito passagens sucessivas, durante um período de treze meses, constatou-se que todas as plantas inoculadas com estes isolados sempre exibiram sintomas fracos. O isolado fraco 2 após a quarta passagem não foi mais detectado nas plantas. Isto pode ter ocorrido por falha no processo de inoculação mecânica ou pelo fato de este isolado ter perdido a capacidade de ser transmitido mecanicamente, o que pode ocorrer com alguns vírus de plantas.

O isolado fraco 9 induziu sintomas severos após a sétima transferência para plantas de mamoeiro. Essa intensificação dos sintomas induzidos por esse isolado pode estar associada com o fato de esse isolado não estar numa forma “pura” e sim representar uma mistura de variantes genéticas, que podem induzir sintomas de diferentes intensidades. Outro fator que pode explicar essa intensificação dos sintomas é que houve alteração genética do isolado fraco que reverteu para forma severa do vírus.

Tabela 6 - Reação de plantas de mamoeiro da variedade Golden inoculadas com quatro isolados fracos e um isolado severo (controle) do PRSV-P, após oito transferências consecutivas

Isolado viral	Transferência	N° de plantas-teste	N° de plantas de acordo com a severidade dos sintomas				
			1	2	3	4	5
1	0	2	2				
2		2	2				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2				2	
1	1	2	2				
2		2	2				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2			2		
1	2	2	2				
2		2	2				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2			2		
1	3	2	2				
2		2	1	1			
7		2	2				
9		2	2				
severo		2				2	
1	4	2	2				
2		2	-				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2				2	
1	5	2	2				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2				2	
1	6	2	2				
7		2	2				
9		2	2				
severo		2				2	
1	7	2	2				
7		2	2				
9		2				2	
severo		2				2	
1	8	2	2				
7		2	2				
9		2				2	
severo		2				2	

(-) Plantas com dificuldades para identificar os sintomas.

2.2.3.5 Efeito protetor de alguns isolados fracos do PRSV-P em casa de vegetação

Os resultados dos testes de proteção em mamoeiros premunizados com quatro isolados fracos e desafiados com o isolado severo de Linhares, ES (PRSV-P-PE) estão na tabela 7. Todas as plantas inicialmente sadias e inoculadas com o isolado severo exibiram sintomas intensos da doença. As plantas premunizadas com os isolados fracos 7 e 9 e desafiadas mantiveram sintomas semelhantes àquelas apenas premunizadas e não desafiadas, sugerindo tratarem-se de isolados protetores. Já as plantas premunizadas com os isolados fracos 1 e 2 exibiram sintomas intermediários quando superinoculadas com o isolado severo do ES, sugerindo quebra de proteção. As plantas foram desafiadas duas vezes para melhor consistência dos resultados e, ainda assim, os isolados 7 e 9 mantiveram a proteção. As avaliações tiveram duração de 133 dias.

Tabela 7 - Reação de plantas de mamoeiro premunizadas com quatro isolados fracos do PRSV-P premunizadas e desafiadas com o isolado severo do ES e sadias inoculadas com o mesmo isolado severo

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas de acordo com severidade dos sintomas*				
		1	2	3	4	5
Premunizada isolado 1	1	1				
Premunizada com isolado 1+ PRSV-P-ES	2		1	1		
Sadia + PRSV-P-ES (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-ES (segundo desafio)	1				1	
Premunizada com 2	1	1				
Premunizada com isolado 2 + PRSV-P-ES	2		1		1	
Sadia + PRSV-P-ES (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-ES (segundo desafio)	1					1
Premunizada com 7	1	1				
Premunizada com isolado 7 + PRSV-P-ES	2	2				
Sadia + PRSV-P-ES (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-ES (segundo desafio)	1					1
Premunizada com 9	1	1				
Premunizada com isolado 9 + PRSV-P-ES	2	2				
Sadia + PRSV-P-ES (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-ES (segundo desafio)	1				1	

Os resultados do teste de proteção realizado contra o isolado severo de Piracicaba, SP (PRSV-P-SP) estão na tabela 8. Somente o isolado fraco 9 apresentou 100% de proteção. Para os isolados fracos 2 e 7 houve quebra de proteção, pois 50% das plantas exibiram sintomas mais acentuados após o desafio com o isolado severo. As avaliações tiveram duração de 133 dias.

Tabela 8 - Reação de plantas de mamoeiro premunizadas com três isolados fracos do PRSV-P premunizadas e desafiadas com o isolado severo de SP e sadias inoculadas com o mesmo isolado severo

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas de acordo com severidade dos sintomas				
		1	2	3	4	5
Premunizada com isolado 2	1	1				
Premunizada com isolado 2 + PRSV-P-SP	2		1		1	
Sadia + PRSV-P-SP (primeiro desafio)	1				1	
Sadia + PRSV-P-SP (segundo desafio)	1					1
Premunizada com isolado 7	1	1				
Premunizada com isolado 7 + severo PRSV-P-SP	2	1			1	
Sadia + PRSV-P-SP (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-SP (segundo desafio)	1					1
Premunizada com isolado 9	1	1				
Premunizada com isolado 9 + PRSV-P-SP	2	2				
Sadia + PRSV-P-SP (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-SP (segundo desafio)	1				1	

Para o teste de proteção com o isolado forte de Petrolina-PE (PRSV-P-PE) não houve proteção contra nenhum dos isolados fracos estudados, pois todas as plantas mostraram sintomas fortes (tabela 9). As avaliações tiveram duração de 88 dias.

Tabela 9 - Reação de plantas de mamoeiro premunizadas com três isolados fracos do PRSV-P premunizadas e desafiadas com um isolado severo de PE e sadias inoculadas com o mesmo isolado severo

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas de acordo com severidade dos sintomas				
		1	2	3	4	5
Premunizada com isolado 2	1	1				
Premunizada com isolado 2 + PRSV-P-PE	2				2	
Sadia + PRSV-P-PE (primeiro desafio)	1	-				
Sadia + PRSV-P-PE (segundo desafio)	1	-				
Premunizada com isolado 7	1	1				
Premunizada com isolado 7 + PRSV-P-PE	2				1	1
Sadia + PRSV-P-PE (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-PE (segundo desafio)	1					1
Premunizada com isolado 9	1	1				
Premunizada com isolado 9 + PRSV-P-PE	2			1		1
Sadia + PRSV-P-PE (primeiro desafio)	1			1		
Sadia + PRSV-P-PE (segundo desafio)	1				1	

(-) Plantas com dificuldades para identificar os sintomas.

Observou-se também, neste estudo, uma especificidade na proteção, obtendo-se os melhores resultados com plantas premunizadas e desafiadas com o isolado severo do ES (PRSV-P-ES), uma vez que os isolados fracos são provenientes da mesma região geográfica.

2.2.3.6 Efeito protetor de alguns isolados fracos do PRSV-P em campo

Considerando-se que o teste definitivo para ensaios de proteção são os testes realizados em campo, por ser o vírus disseminado naturalmente por afídeos, foram realizados estudos em campo com alguns isolados fracos escolhidos aleatoriamente, além dos utilizados nos testes de proteção em casa de vegetação.

No primeiro ensaio em campo realizado na ESALQ/USP foram avaliados 30 isolados fracos do PRSV-P provenientes do estado do Espírito Santo. Os resultados das leituras dos sintomas das plantas premunizadas e não premunizadas em diferentes épocas estão na tabela 10. O número de plantas avaliadas com cada um dos isolados variou de um a quatro.

Na primeira avaliação de sintomas, realizada 61 dias após a implantação do experimento, observou-se que os isolados fracos, de maneira geral, causaram sintomas fracos de mosaico nas plantas premunizadas. Nessa avaliação constatou-se que duas plantas inicialmente sadias já estavam infectadas, indicando que afídeos vetores estiveram presentes no campo, disseminando o vírus. Nessa ocasião ocorreu a morte de algumas plantas devido à podridão de *Phytophthora* sp.

Tabela 10 – Avaliação de sintomas do primeiro experimento de exposição em campo de mamoeiros ‘Golden’ premunizados e não premunizados (controle) realizado na ESALQ/USP, Piracicaba – SP (continua)

Planta/ Isolados	Avaliação de sintomas									
	1 19/02/07	2 10/03/07	3 30/03/07	4 20/04/07	5 03/05/07	6 09/08/07	7 14/11/07	8 18/01/08	9 18/02/08	10 05/05/08
1	1	1	1	3	3	3	3	x		
1	1	x								
2	1	1	1	3	3	4	5	x		
2	1	1	1	3	3	3	3	3	4	5
7	1	1	1	1	2	3	x			
7	1	1	1	1	1	2	x			
7	1	1	1	1	3	4	x			
7	1	1	1	1	1	1	3	x		
9	1	1	1	3	1	1	x			
9	1	1	1	1	1	1	x			
9	1	1	1	1	3	3	x			
39	1	1	1	1	3	3	2	x		
39	1	1	1	1	1	1	1	x		
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
48	1	1	1	1	1	1	1	x		
48	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1
57	1	1	1	2	2	2	3	3	3	2
60	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3
61	1	1	1	2	2	2	3	3	4	5
62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
63	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
66	x									
66	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
66	1	1	1	1	1	1	1	x		
67	3	3	x							
69	1	1	1	1	5	5	5	5	5	x
70	1	1	3	3	5	5	5	x		
71	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5
72	1	1	1	1	1	1	x			
74	1	x								
74	1	1	x							
74	1	1	1	1	1	1	1	x		

Tabela 10 – Avaliação de sintomas do primeiro experimento de exposição em campo de mamoeiros ‘Golden’ premunizados e não premunizados (controle) realizado na ESALQ/USP, Piracicaba – SP

(conclusão)

Avaliação de sintomas										
Planta/ Isolados	1 19/02/07	2 10/03/07	3 30/03/07	4 20/04/07	5 03/05/07	6 09/08/07	7 14/11/07	8 18/01/08	9 18/02/08	10 05/05/08
74	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
75	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3
77	2	2	2	2	3	3	x			
79	1	1	1	1	3	3	x			
84	2	3	4	4	5	5	5	x		
85	3	5	x							
86	x									
87	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5
88	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5
90	2	5	x							
91	1	4	4	5	5	5	x			
93	2	3	4	4	5	5	x			
101	1	1	x							
Sadio	1	1	3	x						
Sadio	-	-	1	1	2	2	x			
Sadio	-	-	x							
Sadio	x									
Sadio	-	-	-	-	1	1	1	1	x	
Sadio	-	-	-	-	1	1	1	1	x	
Sadio	-	-	x							
Sadio	1	3	4	5	5	5	5	5	5	5
Sadio	-	-	-	-	-	-	1	1	3	5
Sadio	-	-	1	1	1	1	2	3	3	3
Sadio	-	-	3	3	3	3	3	x	x	x
Severo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Severo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Severo	5	5	5	5	5	5	5	5	x	
Severo	5	5	5	5	5	5	x	x		
Severo	5	5	5	5	5	5	5	x		
Severo	5	5	5	5	5	5	5	x		

x = planta morta; (-) = planta sem sintomas

Na segunda e terceira avaliação de sintomas - realizadas 81 e 101 dias após a instalação - constatou-se que as plantas premunizadas exibiram sintomas semelhantes aos da primeira avaliação. Nessas avaliações, constatou-se que duas plantas inicialmente saudáveis exibiam sintomas atenuados, sugerindo tratarem-se de possíveis infecções com isolados fracos, sendo premunizadas. Também uma planta inicialmente sadia exibiu sintomas mais severos, sugerindo tratarem-se de possível infecção com isolado severo do PRSV-P.

Na quarta e quinta avaliação, foi possível constatar que alguns isolados fracos pareciam mais promissores. Duas plantas premunizadas com o isolado fraco 74 chamaram atenção, pois permaneceram com sintomas fracos, recebendo nota 1 praticamente até o final do experimento. Uma planta inicialmente sadia, crescendo entre essas duas plantas, foi naturalmente infectada com o isolado severo e ficou bastante afetada pela doença (figura 6).

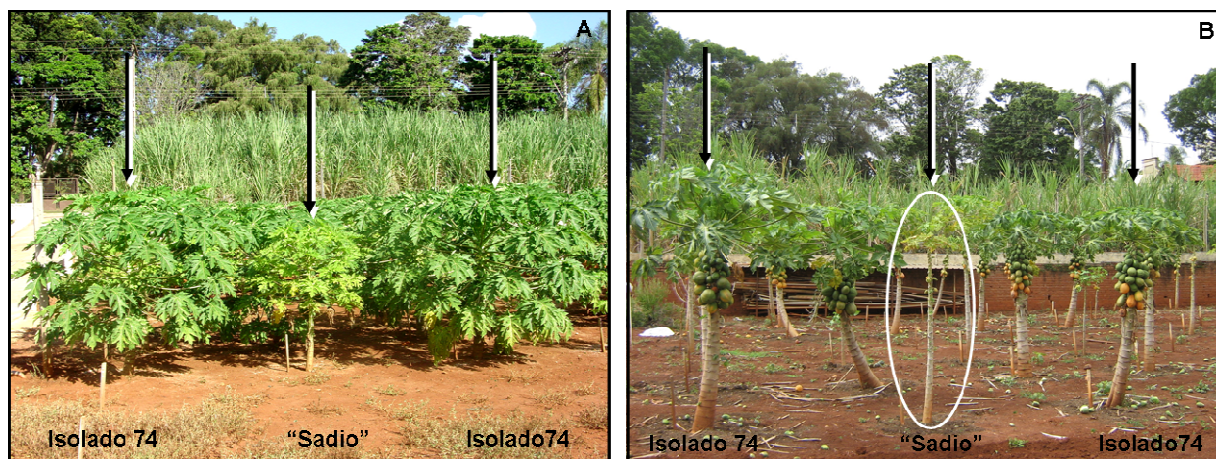


Figura 6 – **A**, vista de plantas de mamoeiro premunizadas com o isolado fraco 74 e ao centro planta inicialmente sadia já infectada na segunda avaliação de sintomas do experimento em campo realizado na ESALQ/USP; **B**, vista das mesmas plantas na quinta avaliação de sintomas

Outras plantas infectadas com os isolados fracos 9, 39, 48, 62, 63, 66 e 72 permaneceram com nota 1 de sintomas por longo período, algumas até o final das avaliações.

Um fato interessante ocorreu com os isolados fracos 2 e 7 que, nos estudos de estabilidade em casa de vegetação apresentaram-se estáveis até a oitava transferência. Neste experimento em campo, plantas premunizadas com o isolado fraco

2 apresentaram intensificação de sintomas com nota 5 ao final das avaliações. Plantas premunizadas com o isolado fraco 7 apresentaram comportamento de severidade variável, conforme mencionado. Nos estudos de proteção em casa de vegetação, plantas premunizadas com estes isolados ficaram 100% protegidas contra o isolado severo do estado do Espírito Santo e 50% contra o isolado severo do estado de São Paulo. Todavia, plantas premunizadas com o isolado fraco 9, nos estudos de estabilidade, apresentaram intensificação de sintomas na sétima transferência. Nos testes de proteção em casa de vegetação, este foi o único isolado que protegeu as plantas de mamoeiro contra o isolado severo do Espírito Santo. No teste em campo, uma planta inoculada com esse isolado apresentou-se de forma promissora, com sintomas fracos até quase o final das avaliações, quando houve morte das plantas.

Para o segundo ensaio em campo, realizado também na ESALQ/USP, foram avaliados sete isolados fracos do PRSV-P. Os isolados fracos 1, 2, 7 e 9 foram novamente avaliados em campo, por causa dos estudos de estabilidade e proteção realizados em casa de vegetação. Os isolados fracos 9, 39, 48 e 74 mostraram-se promissores no primeiro experimento em campo. Os resultados das leituras dos sintomas das plantas premunizadas e não premunizadas em diferentes épocas estão na tabela 11.

A primeira avaliação foi realizada 80 dias após a instalação do experimento e observou-se que os isolados fracos, de maneira geral, causaram sintomas fracos de mosaico nas plantas premunizadas, exceto algumas plantas premunizadas com o isolado 39 que receberam nota 3. Observou-se que plantas sadias apresentaram sintomas atenuados, o que indica que afídeos vetores estiveram presentes no campo, disseminando o vírus. Também se observou morte de algumas plantas devido à podridão de *Phytophthora* sp.

Na segunda e terceira avaliação também foi possível constatar que plantas inicialmente sadias exibiam sintomas atenuados, sugerindo tratarem-se de possíveis infecções com isolados fracos. Também observaram-se plantas inicialmente sadias exibindo sintomas mais severos, sugerindo tratarem-se de possíveis infecções com isolados severos do PRSV-P. Na terceira avaliação observou-se a intensificação de sintomas em diversas plantas premunizadas e na quarta avaliação, algumas poucas

plantas premunizadas apresentaram uma ligeira redução na intensidade dos sintomas induzidos pelo vírus do mosaico do mamoeiro. Entre a quarta e quinta avaliação houve um período de frio intenso, o que provavelmente acarretou intensificação dos sintomas nas plantas. Foi realizada uma sexta avaliação, porém, todas as plantas apresentaram nota 5 de severidade de sintomas. O efeito de baixas temperaturas na intensificação dos sintomas causados pelo vírus do mosaico do mamoeiro já é conhecido para a estirpe melancia (PRSV-W), como relatado por Foster e Webb (1965), porém não há estudos para o PRSV-P.

Tabela 11 – Avaliação de sintomas do segundo experimento de exposição em campo de mamoeiros ‘Golden’ premunizados e não premunizados (controle) realizado na ESALQ/USP, Piracicaba – SP

Isolado	Avaliação de sintomas					Isolado	Avaliação de sintomas				
	1 19/11/ 07	2 18/01/ 08	3 18/02/ 08	4 05/05/ 08	5 25/06/ 08		1 19/11/ 07	2 18/01/ 08	3 18/02/ 08	4 05/05/ 08	5 25/06/ 08
1	1	1	3	3	3	48	2	2	2	3	3
1	1	1	2	3	3	48	x				
1	2	2	2	1	x	48	1	1	1	1	2
1	1	1	3	1	x	48	1	1	1	2	3
1	3	1	3	3	4	48	x				
1	x					48	1	1	1	2	3
1	2	1	2	3	3	48	1	1	1	2	3
2'	1	1	1	1	1	48	1	1	1	1	2
2''	1	1	1	1	x	74	1	1	3	1	1
2	1	2	1	1	3	74	2	3	3	1	2
2	x					74	x				
2	1	1	1	1	x	74	3	3	4	5	x
2	1	1	1	1	3	74	x				
2	2	1	1	1	3	74	1	1	4	3	5
2	1	1	1	1	4	Sadio	1	1	3	4	5
7	3	1	2	1	3	Sadio	1	1	1	1	3
7	x					Sadio	0	0	1	2	3
7	1	3	2	3	3	Sadio	x				
7	1	3	3	3	4	Sadio	0	0	0	1	1
7	1	2	2	3	3	Sadio	0	1	4	4	x
9	1	2	2	5	5	Sadio	0	1	1	3	x
9	1	1	1	2	3	Sadio	0	4	3	3	3
9	1	1	1	1	3	Sadio	1	1	1	1	3
9	2	1	1	1	x	Sadio	1	1	1	1	x
9	x					Sadio	x				
9	x					Sadio	1	0	1	1	3
9	1	1	1	1	x	Sadio	0	1	1	4	5
9	1	2	1	1	x	Sadio	x				
39	3	3	3	2	2	Sadio	x				
39	3	3	3	4	5	Sadio	x				
39	2	3	3	2	3	Severo	5	5	5	5	5
39	2	2	2	4	5	Severo	5	5	5	5	5
39	3	3	3	2	3	Severo	x				
39	2	3	3	4	5	Severo	5	5	5	5	5
39	2	2	2	4	x	Severo	5	5	5	5	5
39	x					Severo	5	5	5	5	5

x = planta morta

(-) = planta sem sintomas

Isolados fracos do primeiro e segundo experimentos foram coletados para a implantação de um terceiro ensaio em campo, na região de Linhares, ES. Os isolados selecionados foram 62 e 63, provenientes de plantas do primeiro experimento; do segundo experimento o isolado fraco 2, proveniente de duas plantas, denominadas de isolados 2' e 2''; os isolados fracos 9, 48, 74 e um isolado fraco proveniente de uma

planta inicialmente sadia e que posteriormente foi infectada naturalmente, mantendo-se com sintomas de nota 1. Estes isolados foram renomeados para a implantação do experimento no estado do Espírito Santo. As novas denominações dos isolados fracos encontram-se no quadro 2.

Isolado fraco original	Nova denominação
Fraco 74	1
Fraco 9	2
Fraco 48	3
Fraco 62	4
Fraco 2.1	5
Fraco 2.5	6
Obtido de planta sadia	7
Fraco 63	8

Quadro 2 – Denominação dos isolados fracos do PRSV-P para o experimento em campo realizado na região de Linhares, ES

A avaliação das plantas desse ensaio foi realizada com a escala de nota de severidade de sintomas variando de 1 a 9. Foram realizadas três avaliações, entre outubro e dezembro de 2008. Os resultados das avaliações estão na tabela 12.

Na primeira avaliação de sintomas, as plantas premunizadas apresentaram notas de severidade de sintomas variando de 1 a 9. As plantas da cultivar Golden apresentaram notas um pouco melhores que as plantas da cultivar Sunrise Solo. Na segunda avaliação houve uma intensificação de sintomas para ambas as cultivares avaliadas e novamente plantas da cultivar Golden apresentaram notas ligeiramente melhores que as plantas da cultivar Sunrise Solo. Na terceira avaliação, quase todas as plantas apresentaram sintomas severos de mosaico. Apenas duas plantas mantiveram-se com sintomas relativamente fracos, nota 3: G8-4 (isolado 63) (figura 7) e S2-14 (isolado 9).

Tabela 12 – Avaliação de sintomas do terceiro experimento de exposição em campo de mamoeiros ‘Sunrise’ (S) e ‘Golden’ (G) premunizados realizado na Fazenda Calmon, no município de Linhares – ES

(continua)

Isolado/planta	Avaliação de sintomas			Isolado/planta	Avaliação de sintomas		
	1 24/10/08	2 21/11/08.	3 29/12/08.		1 24/10/08	2 21/11/08.	3 29/12/08.
S1.1	5	6	6	G1.12	3	6	6
S1.2	3	7	7	G1.2	4	6	6
S1.3	5	7	7	G1.3	3	6	6
S1.4	5	7	7	G1.4	3	7	7
S1.13	3	7	7	G1.6	3	6	6
S1.8	5	7	7	G1.7	5	7	7
S1.9	4	6	6	G1.8	3	6	6
S1.10	5	6	6	G1.9	3	6	6
S1.11	5	6	6	G1.10	3	6	6
S1.12	5	6	6	G1.11	3	6	6
S2.2	5	8	8	G2.1	3	6	6
S2.4	5	7	7	G2.2	3	7	7
S2.5	4	6	6	G2.3	3	6	6
S2.7	5	x		G2.4	4	7	7
S2.8	5	6	6	G2.7	5	7	7
S2.10	3	6	6	G2.8	2	6	6
S2.11	5	6	6	G2.9	3	6	6
S2.13	4	5	5	G2.10	3	6	6
S2.14	2	2	3	G2.11	2	6	5
S2.15	5	8	8	G2.12	2	7	7
S3.1	4	8	8	G3.1	4	7	7
S3.2	4	8	8	G3.2	4	7	6
S3.3	4	8	8	G3.3	4	6	6
S3.4	4	8	8	G3.4	4	6	6
S3.5	5	8	8	G3.6	4	6	6
S3.6	4	8	8	G3.8	4	8	8
S3.7	5	8	8	G3.11	5	8	7
S3.8	4	8	8	G3.12	4	5	7
S3.13	4	8	8	G3.13	4	8	8
S3.11	5	8	8	G3.14	4	8	8
S4.1	5	8	8	G4.1	5	8	8
S4.4	5	8	8	G4.2	5	7	7
S4.6	4	8	8	G4.4	2	6	6
S4.7	5	8	8	G4.6	4	7	7
S4.8	3	8	8	G4.9	5	7	7
S4.10	5	8	8	G4.11	2	7	7
S4.11	4	8	8	G4.12	4	8	8
S4.12	5	8	8	G4.13	5	8	8
S4.13	5	8	8	G4.14	4	8	8
S4.15	5	8	8	G4.15	3	7	7
S5.1	5	8	8	G5.1	4	8	8
S5.3	3	8	8	G5.2	3	8	8
S5.4	5	8	8	G5.3	3	7	7
S5.5	3	8	7	G5.4	4	8	8
S5.6	5	8	8	G5.6	5	7	7
S5.7	x			G5.7	3	6	6
S5.8	x			G5.8	3	7	7

Tabela 12 – Avaliação de sintomas do terceiro experimento de exposição em campo de mamoeiros ‘Sunrise’ (S) e ‘Golden’ (G) premunizados realizado na Fazenda Calmon, no município de Linhares – ES

(conclusão)

Isolado/planta	Avaliação de sintomas			Isolado/planta	Avaliação de sintomas		
	1 24/10/08	2 21/11/08.	3 29/12/08.		1 24/10/08	2 21/11/08.	3 29/12/08.
S5.9	4	8	8	G5.9	3	7	7
S5.10	9	9	9	G5.12	5	8	8
S5.11	x	x		G5.13	3	8	7
S6.1	9	9	9	G6.1	2	8	8
S6.5	5	8	8	G6.2	x		
S6.6	4	8	8	G6.3	3	8	8
S6.7	4	8	8	G6.4	4	8	8
S6.8	4	8	8	G6.5	3	8	8
S6.10	4	8	8	G6.6	5	8	8
S6.11	5	7	7	G6.15	4	8	8
S6.12	4	7	7	G6.9	2	8	8
S6.15	4	7	7	G6.10	3	8	8
S6.14	3	6	6	G6.13	4	8	8
S7.1	4	8	8	G7.1	3	7	7
S7.2	3	8	8	G7.4	4	8	8
S7.4	3	8	8	G7.5	4	8	8
S7.5	3	8	8	G7.6	3	7	7
S7.6	2	8	8	G7.7	3	8	6
S7.14	4	8	8	G7.8	3	6	8
S7.9	3	8	8	G7.9	2	6	6
S7.11	2	8	8	G7.12	3	8	6
S7.15	3	8	8	G7.13	3	8	8
S7.13	5	8	8	G7.15	3	8	8
S8.3	1	8	8	G8.1	x		
S8.4	2	8	8	G8.3	3	7	7
S8.7	2	8	5	G8.4	1	2	3
S8.9	2	8	8	G8.6	2	7	8
S8.10	3	8	8	G8.7	2	7	7
S8.11	3	8	8	G8.8	3	6	6
S8.13	2	8	8	G8.10	4	8	8
S8.14	1	8	8	G8.11	1	7	7
S8.12	4	8	8	G8.13	2	8	8
S8.15	9	9	9	G8.15	1	7	7

x=planta morta

Todas as plantas inicialmente sadias estavam infectadas na última avaliação e a maioria exibiu sintomas severos, o que indica que afídeos vetores estiveram presentes no campo, disseminando o vírus.

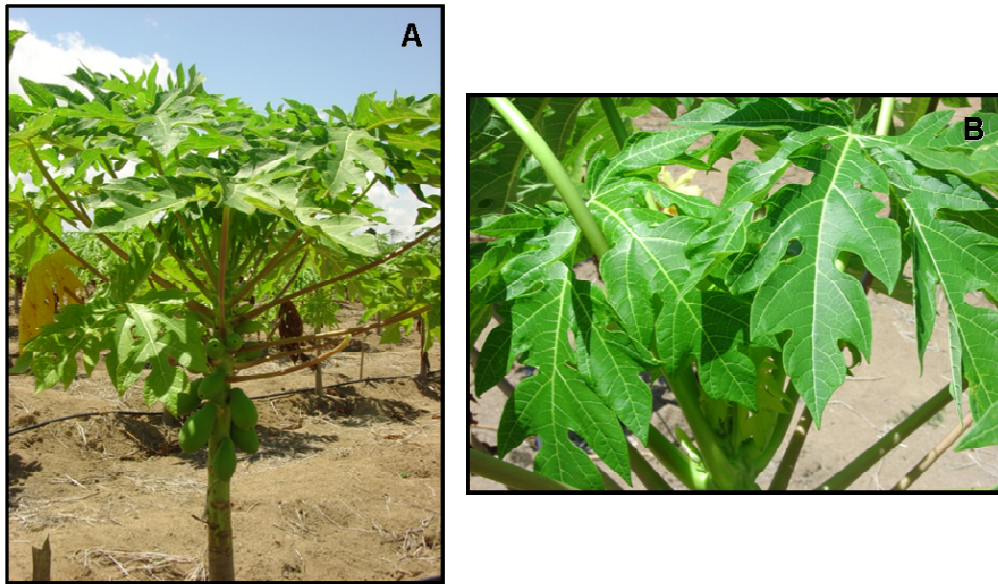


Figura 8 – **A**, planta da mamoeiro 'Golden' premunizada com o isolado fraco 63 (planta G8.4) em campo no estado do Espírito Santo; **B**, detalhe da copa da planta, sem sintomas aparentes de mosaico

Posteriormente, em março de 2009, algumas plantas premunizadas com isolados fracos do PRSV-P foram analisadas visualmente e apresentaram sintomas fracos de mosaico e bom desenvolvimento em campo. Essas plantas foram coletadas para análises em casa de vegetação e em campo na ESALQ/USP. Esses estudos estão sendo continuados.

Em campo, no estado do Espírito Santo, as plantas de mamoeiro 'Golden' premunizadas com o isolado fraco 63 (isolado G8) apresentaram melhor desenvolvimento e poucos sintomas da doença. O experimento em campo no estado do Espírito Santo está sendo continuado para novas avaliações, na tentativa de se obter uma planta premunizada com o PRSV-P com bom desenvolvimento e sem, ou poucos, sintomas de mosaico, estável e com efeito protetor.

2.2.3.7 Teste de transmissão por afídeos

O afídeo *M. nicotianae* foi capaz de transmitir o PRSV-P de plantas de mamoeiro para mamoeiros (tabela 13). A confirmação da infecção das plantas foi realizada por observação de sintomas e por RT-PCR para o gene da proteína capsidial e da inclusão citoplasmática.

Tabela 13 – Teste de transmissão de um isolado fraco e dois isolados severos do PRSV-P em mamoeiros com o afídeo *Myzus nicotianae*

Isolado do PRSV-P	No. de plantas infectadas/No. de plantas testadas
Fraco obtido de planta sadia	9/11
PRSV-P-ES	6/7
PRSV-P-SP	7/8

No Brasil já foram estudadas com resultados positivos de transmissão do PRSV-P as espécies de afídeos *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. coreopsidis*, *A. spiraecola*, *Aphis* sp, *Toxoptera citricidus* e *Uroleucon* sp.(COSTA et al., 1969; BARBOSA; PAGUIO, 1982; MARTINS; VENTURA, 2007). O presente estudo mostrou que a espécie *M. nicotianae* transmitiu os três isolados do PRSV-P utilizados no ensaio. Segundo Martins et al. (2007), esta espécie de afídeo não está entre as espécies mais frequentes nas áreas plantadas com mamoeiros na região norte do estado do Espírito Santo, mas sim as espécies *A. spiraecola*, *A. gossypii* e *T. citricidus*.

2.2.4 Discussão

A procura de isolados fracos estáveis e protetores de um vírus é a principal etapa de um programa que visa ao estabelecimento da premunização como alternativa de controle de fitovirose. Há diferentes maneiras de se procurar isolados fracos de vírus, sendo aconselhável iniciar pela localização de plantas naturalmente infectadas com estes vírus, denominadas plantas de “elite”, em plantios severamente afetados pela doença (REZENDE, MÜLLER, 1995).

A procura de plantas de “elite”, com bom desenvolvimento e sem sintomas da doença para a seleção de possíveis isolados fracos com capacidade protetora contra isolados severos foi utilizada com sucesso para algumas fitovirose, como o endurecimento dos frutos do maracujazeiro, causado pelo *Passion fruit woodiness virus*, na Austrália e a tristeza dos citros, causada pelo CTV no Brasil, África do Sul, Austrália, Japão e Ilhas Reunion (SIMMONDS, 1959; MÜLLER; COSTA, 1968; 1977; MÜLLER;

REZENDE, 2004). Outros exemplos de sucesso que seguiram esse método de seleção de estirpes fracas podem ser encontrados nos trabalhos realizados com o intumescimento da haste do cacauzeiro (*Cocoa swollen shoot virus*) em Gana (POSNETTE; TODD, 1955), com o mosaico da macieira (*Apple mosaic virus*) na Inglaterra e na Nova Zelândia (POSNETTE; CROPLEY, 1956; CHAMBERLAIN; ATKINSON; HUNTER, 1964) e com a necrose da baunilha (*Vanilla necrosis virus*) em Tonga (LIEFTING; PEARSON; PONE, 1992). A idéia é que o estabelecimento de isolados fracos em plantas de elite em campo ocorra através de um processo de seleção natural, uma vez que estas plantas estão localizadas em meio a outras infectadas pelo complexo normal do vírus e assim, o isolado fraco já teria sofrido pressão de inóculo suficiente para mostrar o seu valor protetor e de estabilidade (MÜLLER; REZENDE, 2004).

No caso do mosaico do mamoeiro, a primeira tentativa de obtenção de isolados fracos a partir de plantas infectadas em campo foi feita no Havaí por Yeh e Gonsalves (1984), com resultados negativos. Depois de analisarem 116 isolados coletados em campo, nenhum mostrou-se satisfatório. No Brasil, por outro lado, Rezende (1985) teve sucesso na seleção de três isolados fracos após analisar 71 isolados coletados em pomares de mamoeiro onde foram inspecionadas aproximadamente 334.500 plantas. Na Tailândia, durante uma triagem realizada em pomares de mamoeiro de quatro províncias foram obtidos nove isolados fracos do PRSV-P (CHATCRAWANKANPHANICH et al., 2001). Na Índia, de vários pomares inspecionados, trinta plantas de mamoeiro foram analisadas e quatro apresentaram sintomas fracos em infecção de campo (RAM et al., 2006).

Nos casos mencionados, especialmente para o mosaico do mamoeiro, nota-se que o número de isolados fracos obtidos de plantas de elite em campo nem sempre foi alto. No presente trabalho, no entanto, encontraram-se 75 isolados fracos do PRSV-P, após a análise de 119 isolados coletados de mamoeiros naturalmente infectados em campo no estado do Espírito Santo. Esse grande número de plantas infectadas com isolados fracos do vírus naquela região foi atribuído à pressão de seleção exercida pela prática do “roguing” que vem sendo executada há mais de 25 anos para o controle do mosaico do mamoeiro. Esta parece ser a primeira constatação de aumento do número

de isolados fracos de um vírus induzido por uma prática cultural de controle de viroses: a erradicação de plantas doentes. A segregação desse complexo na plantação é feita por meio dos afídeos vetores, durante os processos de aquisição e transmissão do vírus. Como os “mosaiqueiros” baseiam-se apenas nos sintomas severos de mosaico foliar para a identificação das plantas a serem erradicadas, aquelas eventualmente infectadas com formas mais atenuadas do vírus passam despercebidas e permanecem por mais tempo na plantação, servindo como fonte de inóculo para a disseminação pelos afídeos. Com a repetição desse procedimento durante um longo período de tempo, pode-se supor que, nos últimos anos as fontes de inóculos predominantes nos pomares eram plantas infectadas com as formas menos severas do vírus e que passavam despercebidas aos olhos dos “mosaiqueiros”.

Os testes de estabilidade conduzidos com quatro isolados fracos, escolhidos ao acaso entre aqueles encontrados no Espírito Santo, indicaram que apenas dois mostraram-se estáveis após oito passagens sucessivas por mamoeiro, durante 13 meses em condições de casa de vegetação. Os isolados fracos do PRSV-P, obtidos por Rezende (1985) também tiveram o mesmo comportamento durante sucessivas multiplicações em mamoeiros em casa de vegetação (²J.A.M. Rezende, informação pessoal).

Estudos sobre a estabilidade de sintomas induzidos por isolados fracos de vírus também foram realizados com dois isolados fracos do PRSV-W em plantas de abobrinha de moita ‘Caserta’ em casa de vegetação (REZENDE; PACHECO, 1997). Os isolados fracos denominados PRSV-W-1 e PRSV-W-2 foram avaliados por um período de 28 meses com um total de 18 transferências. Os estudos revelaram que o isolado PRSV-W-1 manteve-se estável por todo o período da avaliação, enquanto que o isolado PRSV-W-2 manteve-se estável por 22 meses, visto que, após a 16^a transferência, as plantas exibiram sintomas severos. Os autores sugeriram que poderia ter ocorrido alterações no ácido nucléico do vírus, mas sem comprovação experimental. Desde então o isolado fraco PRSV-W-1 está sendo mantido no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba e até o momento nunca induziu sintomas mais acentuados nas plantas premunizadas. O mesmo ocorre com um isolado fraco do ZYMV, selecionado por Rabelo e Rezende (2004) e que até o momento tem-se mantido estável (²J.A.M.

²J.A.M.Rezende, ESALQ/USP.

Rezende, informação pessoal). O caso mais evidente de estabilidade parece ser dos isolados fracos do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) que, em mais de trinta anos de uso na premunização de plantas cítricas no Brasil não há menção de intensificação de sintomas em plantios comerciais (MÜLLER; COSTA, 1977; MÜLLER; CARVALHO, 2001).

Estudos de proteção com o PRSV-P em casa de vegetação, realizados por Rezende (1985) no Brasil, demonstraram efeito protetor positivo nas diferentes variedades premunizadas com dois isolados fracos obtidos, tanto para o desafio realizado por inoculação mecânica, como por meio de afídeos virulíferos, com isolados severos da mesma região geográfica. No Havaí, dois isolados fracos do PRSV-P forneceram resultados semelhantes em condições de casa de vegetação (YEH; GONSALVES, 1984). Proteção parcial em casa de vegetação foi relatada em testes de proteção com isolados fracos do *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), anteriormente designado *Passion fruit woodiness virus* (PWV), em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Brasil (NOVAES; REZENDE, 2003). Neste estudo, a proteção em casa de vegetação foi eficiente quando plantas premunizadas com os isolados fracos 7 e 9 foram desafiadas com o isolado severo do estado do Espírito Santo. Contra o isolado severo do estado de São Paulo, apenas o isolado fraco 9 teve efeito protetor. Nenhuma proteção foi encontrada quando as plantas foram desafiadas com o isolado severo do estado de Pernambuco. As falhas encontradas na proteção das plantas nesse estado podem ser atribuídas a diferentes variáveis: a) tempo insuficiente para os isolados fracos invadirem todos os tecidos das plantas antes do desafio com as estirpes severas; b) distribuição irregular e/ou baixa concentração dos isolados fracos nos tecidos das plantas e c) especificidade da proteção em função da origem geográfica dos isolados.

Ram et al. (2006) estudando a proteção com isolados fracos do PRSV-P, relacionaram a eficiência da proteção com o tempo da inoculação de desafio. Quando plantas de mamoeiro foram desafiadas aos 7, 15, 20 e 30 dias após a inoculação com isolados fracos, a porcentagem de proteção foi de 8,33%, 8,33%, 24,99% e 66,67% respectivamente. Este fato já havia sido relatado por Yeh e Gonsalves (1984). Estudos realizados na Tailândia mostraram que isolados fracos do PRSV-P forneceram proteção

moderada quando plantas de mamoeiro foram desafiadas com o isolado severo após 45 dias da inoculação de proteção (CHATCHAWANKANPHANICH et al., 2001).

A hipótese da necessidade de invasão completa do primeiro vírus para que a proteção seja eficiente já é conhecida há vários anos. De acordo com Kunkel (1934) e Bawden e Kanassis (1945), um dos pré-requisitos para a proteção entre isolados de uma mesma espécie de vírus é a presença do primeiro isolado fraco em todos os sítios de replicação do vírus na célula, o que impede o estabelecimento de outro isolado relacionado. You et al. (2005) apontaram que o isolado fraco de um vírus deve possuir replicação e acumulação na planta hospedeira rápida e elevada, para assim possuir uma grande capacidade de competir por sítios livres, que também serão requeridos pelo isolado desafiante. A quebra de proteção relacionada à baixa concentração do vírus protetor nos tecidos da planta foi observada por Sherwood e Fulton (1982) em plantas de *Nicotiana sylvestris* infectadas por um isolado do *Tobacco mosaic virus* (TMV) que causa mosaico. Quando plantas foram desafiadas com um isolado que causa lesões locais necróticas, esses sintomas foram observados apenas em áreas verde-escuras das folhas de tabaco, onde a concentração do isolado protetor era baixa. Nas áreas verde-claras das mesmas folhas não houve quebra de proteção, pois a concentração do isolado protetor era elevada. Posteriormente, Sherwood e Fulton (1983) relataram que a proteção entre esses isolados estava relacionada com a competição por sítios de infecção e a multiplicação do isolado desafiante. Em plantas de *N. tabacum* cvs. Samsun e Xanthi, Rezende e Sherwood (1991) também verificaram que a quebra de proteção entre os isolados do TMV estava associada à menor concentração desse vírus em áreas verde-escuras das folhas.

O efeito da distribuição irregular e/ou baixa concentração do isolado premunizante na proteção de plantas foi bem caracterizado nos trabalhos realizados com o CABMV em maracujazeiro e crotalária (*Crotalaria juncea*) no Brasil (NOVAES; REZENDE, 2003, 2005). Esses autores constataram que as plantas de maracujazeiro premunizadas com seis isolados fracos não ficaram protegidas contra um isolado severo do vírus em teste de campo, sob condições de telado. Analisando-se a concentração de alguns desses isolados fracos em tecidos foliares constataram uma variabilidade muito grande na distribuição e/ou concentração do vírus, analisada por

meio de PTA-ELISA. Em vários discos foliares não houve detecção das estirpes fracas na análise sorológica, indicando a possível existência de sítios livres disponíveis para a posterior infecção e estabelecimento do isolado severo utilizado no desafio. Por outro lado, quando a hospedeira foi crotalária, todos os isolados ofereceram proteção e a distribuição e/ou concentração dos isolados fracos nos tecidos foliares foi bastante uniforme.

O efeito da origem geográfica do isolado na proteção parece ter sido primeiramente relatada no Havaí em ensaios com mamoeiros premunizados com o isolado fraco PRSV-P HA5-1, obtido através do tratamento do isolado severo do mesmo local com ácido nitroso. Plantas premunizadas com esse isolado ficaram protegidas contra isolados severos do Havaí, mas não contra isolados do PRSV-P provenientes do México e da Tailândia (YEH; GONSALVES, 1984; TÉLIZ et al., 1991; GONSALVES, 1998).

Trabalhos realizados, comparando-se as sequências de nucleotídeos de isolados fracos e fortes de um mesmo vírus apontaram que para haver proteção pelo isolado fraco é necessária uma alta identidade na sequência de nucleotídeos dos isolados (YEH; GONSALVES, 1984; INOUE-NAGATA et al., 2007; WANG et al., 2006). Porém, não foi estabelecido nenhum número limiar dessa identidade e também não parece haver suporte científico para essa proposta.

O isolado fraco HA5-1, que não protegeu mamoeiros contra a infecção com os isolados da Tailândia e do México, compartilha com os isolados asiáticos 82 a 83% de identidade, o que poderia explicar a ausência de proteção, apresenta, no entanto, 95,2% de identidade com o isolado mexicano.

Inoue-Nagata et al. (2007) compararam as sequências completas de nucleotídeos dos isolados fracos PRSV-W-1 e severo PRSV-W-C e constataram 94,63% de identidade, o que significa diferenças em 555 posições nucleotídicas. Diferente desse caso mencionado, para o mesmo nível de identidade de nucleotídeos, a proteção do PRSV-W-1 tem sido bastante alta em diversos estudos realizados com diferentes espécies de cucurbitáceas (REZENDE et al., 1992, 1994; REZENDE; PACHECO, 1998; DIAS; REZENDE, 2000; GIAMPAN, 2002; BONILHA, 2007; FREITAS, 2007).

Um exemplo menos evidente sobre o valor do alto nível de identidade de nucleotídeos entre os isolados fracos e severos na proteção pode ser visto nos estudos realizados por Novaes e Rezende (2003, 2005) em testes de proteção em maracujazeiro com isolados fracos do CABMV. Apesar da ausência de proteção, os autores encontraram identidade de 99,7% para a seqüência de nucleotídeos da região do gene que codifica a proteína capsidial dos isolados forte e fraco. Deve-se lembrar que houve proteção quando o hospedeiro em estudo foi *Crotalaria juncea*.

Neste estudo, os isolados fracos analisados apresentaram identidade de nucleotídeos para a porção central do gene da proteína capsidial acima de 92,5% com os isolados severos dos estados do Espírito Santo e Pernambuco, mas a proteção não se mostrou satisfatória.

Finalmente, os resultados dos testes de proteção em campo não foram satisfatórios, porém não muito diferentes daqueles de trabalhos anteriores de premunização para o mesmo potossistema. Rezende e Costa (1987) analisando mamoeiros premunizados em campo e constataram intensificação dos sintomas na maioria das plantas após seis a oito meses de exposição. Naquela ocasião, sugeriram que esse fenômeno poderia estar associado com o aparecimento de mutantes severos e mais competitivos, embora essa hipótese não tenha sido testada experimentalmente. Lin; Su e Wang, (1989), em Taiwan, também relataram que mamoeiros infectados com isolados fracos do PRSV-P apresentaram intensificação de sintomas seis meses após a exposição das plantas inoculadas em campo e sugeriram que a instabilidade dos sintomas estava associada à mutação dos isolados fracos. Nenhum dos isolados fracos analisados nos ensaios em campo em Piracicaba, SP e Linhares, ES mostrou-se suficientemente estável ou protetor e com possibilidade de uso no controle do mosaico por premunização. Os dados disponíveis, mais uma vez, não permitem identificar a(s) causa(s) da intensificação dos sintomas verificada nas plantas.

Pode-se sugerir, como no passado, que as alterações nos sintomas fracos estão associadas com o surgimento de variantes mais severas, por meio de mutações ou recombinações que, por serem mais competitivas acabam predominando nas plantas ou ainda quebra de proteção. A segunda hipótese fica enfraquecida quando se observa que as alterações nos sintomas da maioria das plantas premunizadas ocorreram de

forma mais ou menos sincronizada, ou seja, em grande número de plantas, quase ao mesmo tempo a cada intervalo de leitura. Observa-se, portanto, que não foi seguido o modelo de disseminação natural do vírus dentro de uma plantação, que é um processo gradativo. Pode-se ainda sugerir que a intensificação dos sintomas resulta do fato de os isolados coletados no ES, não representarem variantes genéticas fracas “puros”, mas por estarem em mistura com algumas variantes que induzem sintomas severos, que naquelas plantas de “elite” estavam em menor proporção e, portanto, com menor poder de competição. No entanto, com a passagem para outras plantas tornaram-se mais abundantes e acabaram se sobrepondo às variantes fracas.

Caso a hipótese de mistura seja verdadeira, a passagem de isolados fracos por hospedeiro que reage com lesões locais nas folhas inoculadas pode ser uma alternativa interessante para promover a segregação dos variantes com posterior inoculação em plantas de mamoeiro. Infelizmente, no caso dos isolados brasileiros do PRSV-P essa opção é inviável, visto que geralmente eles não induzem lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, como ocorre com isolados de outras regiões geográficas. Em um caso isolado, Rezende e Costa (1985) obtiveram sintomas de lesões locais em folhas dessas duas espécies indicadoras de vírus e atribuíram esse resultado positivo à origem das sementes. No entanto, diversas tentativas posteriores (²J.A.M. Rezende, informação pessoal), bem como algumas realizadas durante esse trabalho não mais reproduziram aqueles resultados. Outra alternativa para a segregação de possível mistura de variantes genéticas é a passagem sucessiva por outra espécie vegetal que é invadida sistemicamente pelo vírus. (MÜLLER; REZENDE, 2004). Yeh e Cheng (1989) obtiveram isolados fracos do PRSV-P por meio da passagem do complexo normal do vírus, previamente tratado com ácido nitroso, através de plantas de *Cucumis metuliferus*. Recentemente, Alves (2008) constatou que a transmissão mecânica sucessiva de um begomovírus que infecta maracujazeiro (Passion fruit little leaf mosaic virus) para plantas de *Nicotiana benthamiana* também proporcionou o aparecimento e predominância de uma forma fraca e protetora do vírus. Há ainda outras alternativas de seleção de estirpes fracas de vírus discutidas por Müller e Rezende (2004) que podem ser analisadas sobre a aplicabilidade nesse caso.

A continuidade dessa linha de abordagem do problema ainda não deve ser abandonada, especialmente pelo fato de a erradicação sistemática de plantas com mosaico, nos pomares no estado do Espírito Santo, estar proporcionando o aparecimento de diversas plantas exibindo sintomas fracos de mosaico, bom desenvolvimento e boa produtividade. A análise de maior número de isolados coletados dessas plantas, bem como de plantas em pomares no sul do estado da Bahia, onde a prática do “roguing” é obrigatória e o mesmo fenômeno pode estar ocorrendo, poderá resultar na obtenção de um isolado fraco, estável e protetor para fins de premunização de mamoeiros.

2.3 Conclusões

No estado do Espírito Santo contatou-se uma predominância de isolados fracos do PRSV-P ocorrendo naturalmente, devido à pressão da seleção exercida pela prática do “roguing”.

Nenhum isolado fraco analisado mostrou-se estável e protetor para fins de premunização.

Referências

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BEAUDOIN, F. Review: overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. **Archives of Virology**, Vienna, v. 6, p. 471–487, 2005.

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

ALVES, A.C.C.N. **Passion flower little leaf mosaic begomovirus: reação de espécies de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B**. 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ATREYA, P.L.; LOPEZ-MOYA, J.J.; CHU, M.H.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 265-270, 1995.

BATESON, M.; HENDERSON, J.; CHALEEPROM, W.; GIBBS, A.; DALE, J. Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and origin of PRSV type P (Australia). **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 3547–3553, 1994.

BATESON, M.F.; LINES, R.E.; REVILL, P.; CHALEEPROM, W.; HA, C.V.; GIBBS, A.J.; DALE, J.L. On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. **Journal of General Virology**, London, v. 83, p. 2575–2585, 2002.

BARBOSA, F.R.; PAGUIO, O.R. Identificação do vírus da mancha anelar do mamoeiro no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 37-45, 1982a.

_____. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: incidência e efeito na produção do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 365-373, 1982b.

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

BITANCOURT, A.A. Mosaico do mamoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.1, p.41, 1935.

BONILHA, E. **Efeito de estirpes fracas do PRSV-W e do ZYMV sobre a produção de quatro variedades de *Cucurbita pepo***. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; OH, C.S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 9, p. 1347-1353, 1990.

CHAMBERLAIN, E.; ATKINSON, J.D.; HUNTER, J.A. Cross protection between strains of *Apple mosaic virus*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 7, p. 480-90, 1964.

CHATCHAWANKANPHANICH, O.; JAMBOONSRI, W.; KOSITRATA, W.; ATTATHON, S. Screening of mild strains of *Papaya ringspot virus* for cross protection. **Thai Journal of Agriculture Science**, Bangkok, v. 33, p. 147-152, 2000.

CONOVER, R.A. A program for development of papaya tolerant to the distortion ringspot virus. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Miami, v. 89, p. 229-231, 1976.

COSTA, A.S. Uma anomalia das folhas de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **O Biológico**, Campinas, v. 7, p. 285-286, 1941.

COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 21, p. 38-43, 1969.

COSTA, A.S.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; MÜLLER, G.W.; CARVALHO, A.M. Problemas de controle do mosaico do mamoeiro. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 1., 1978, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Sociedade Paulista de Fitopatologia, 1978. p. 7

COSTA, C.L. As inter-relações vírus-afídeos vetores e o controle da mancha anelar do mamoeiro causado pelo *Papaya ringspot virus* – P. In: MARTINS, D.S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 13, p. 181-191.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; TATAGIBA, J.S. **Mosaico do mamoeiro: uma ameaça à cultura no Espírito Santo**. Vitória: Incaper, 2001. 4 p. (Folder).

CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M. C., CARRINGTON, J. C. Long distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 5449-559, 1995.

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

DOLJA, V.V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MONTGOMERY, A. E.; VANDENBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, New York, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DREW, R.A; SIAR, S.V.; O'BRIEN, C.M.; SAJISE, A.G.C. Progress in backcrossing between *Carica papaya* x *Vasconcellea quercifolia* intergeneric hybrids and *C. papaya*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 46, p. 419-424, 2006.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DEESELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). **Virus taxonomy**: eighth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. New York: Elsevier Academic Press, 2005. 1162 p.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, T.; RUBIO, L.; CARBALLO, O.; MARYS, E. Genetic variation of *Papaya ringspot virus* in Venezuela. **Archives of Virology**, Vienna, v. 153, p. 343-349, 2008.

FIGUEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Mecanismo de inibição e possibilidade do uso de detergentes no controle do vírus do mosaico do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 531, 1981.

FITCH, M.M.M; MANSARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD, J.C. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Bio-Technology**, New York, v. 10, p. 1466–1472, 1992.

FOSTER, R.E.; WEBB, R.E. Temperature effects on symptoms expression and concentration of six muskmelon viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, p. 981-985, 1965.

FREITAS, D.M.S. **Novas observações sobre a proteção com estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* type W e *Zucchini yellow mosaic virus* em plantas de abobrinha de moita**. 2007. 62 p. (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 415–437, 1998.

GONSALVES-SILVA, S. Doenças do mamoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 7, p. 220-225, 1941.

HALDEMAN-CAHILL, R., DAROS, J. A., CARRINGTON, J. C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. **Journal of Virology**, London, v. 72, p. 4072-4079, 1998.

HARKNESS, R.W. **Papaya growing in Florida**. Miami: University of Florida, Florida Agricultural Experimental Station, 1967. 15 p. (Circular, S-180).

HEMA, M.V.; PRASAD, D.T. Comparasion of the coat protein of a south Indian strain of PRSV with other strains from different geographical locations. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 86, p. 35-42, 2004.

HENDRIX, J.W. **The influence of papaya ringspot on the growth and yield of papaya trees**: report of the Hawaiian Agricultural Experiment Station 1946-1948. Manoa: University of Hawaii, 1948.119 p.

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

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

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4th ed. London: Academic Press, 2002.1001 p.

INOUE-NAGATA, A.K.; FRANCO, C.M.; MARTIN, D.P.; REZENDE, J.A.M.; FERREIRA, G.B.; DUTRA, L.S.; NAGATA, T. Genome analysis of a severe and a mild isolate of *Papaya ringspot virus*-type W found in Brazil. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 35, p.119-127, 2007.

KASSCHAU, K.D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J.C. Genome amplification and long distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component proteinase. **Virology**, New York, v. 228, p. 251-262, 1997.

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

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

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

JAIN, R.K.; SHARMA, J.; SIVAKUMAR, A.S.; SHARMA, P.K.; BYADGI, A.S.; VERMA, A.K.; VARMA, A. Variability in the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* isolates from multiple locations in India. **Archives of Virology**, Vienna, v. 149, p. 2435-2442, 2004.

JENSEN, D.D. Papaya virus disease with special reference to papaya ringspot. **Phytopathology**, Saint Paul, v.39, p.191-211, 1949.

LAIN, S.; RIECHMANN, J. L.; MARTIN, M. T.; GARCIA, J. A. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. **Gene**, London, v. 82, p. 357-362, 1989.

LAKATOS, L.; CSORBA, T.; PANTALEO, V.; CHAPMAN, E.J.; CARRINGTON, J.C.; LIU, Y.P.; DOLJA, V.V.; CALVINO, L.F.; LOPEZ-MOYA, J.J.; BURGYAN, J. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 25, p. 2768-2780, 2006.

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

LEGRAVE, T.; MAIA, I.G.; CASSE DELBART, F.; BERNARDI, F.; ROBAGLIA, C. Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid transmissible strain of *Potato virus Y* with reduced helper component and virus accumulation. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 1343-1347, 1996.

LIEFTING, L.; PEARSON, M; PONE, S. The isolation and evaluation of two naturally occurring mild strains of *Vanilla necrosis potyvirus* for control by cross-protection. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136; p. 9-15, 1992.

LIMA, J.A.A.; BEZERRA, D.R. Levantamento da incidência do vírus da mancha anelar do mamoeiro em municípios cearenses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p.115, 1988.

LIMA, R.C.A.; SOUZA-JÚNIOR, M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; LIMA, J.A.A. Sequences of the coat protein gene from brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 174-180, 2002.

LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA JR.,M.T; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.A. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 689-702, 2001.

LIN, C.C. **Strains of papaya ringspot virus and their cross protection**. Nat. Taiwan University, Thesis (PhD in Phytopathology). 1980.

LIN, C.C.; SU, H.J.; WANG, D.N. **The control of papaya ringspot virus in Taiwan**. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center, 1989. 114 p. (Technical Bulletin).

LOPEZ-MOYA; J.J; WANG; R.Y.; PIRONE, T.P. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 3281-3288, 1999.

LU, Y.W.; SHEN, W.T.; ZHOU, P.; TANG, Q.J.; NIU, Y.M.; PENG, M.; XIONG, Z. Complete genomic sequence of a *Papaya ringspot virus* isolate from Hainan Island, China. **Archives of Virology**, Vienna, v. 153, p. 991-993, 2008.

MALLORY, A.; ELY, L., SMITH, T.; MARATHE, R.; ANANDALAKSHMI, R.; FAGARD, M.; VAUCHERET, H.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. **The Plant Cell**, Baltimore, v.13, p.571-583, 2001.

MANGRAUTHIA, S.K.; PARAMESWARI, B.; JAIN, R.K.; PRAVEEN, S. Role of genetic recombination in the molecular architecture of *Papaya ringspot virus*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 46, p. 835-846, 2008.

MARINHO, V.L.A.; KITAJIMA, E.W. Um método simplificado de purificação de potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 91-93, 1989.

MARTINEZ, J.A. Estudo da viabilidade prática e econômica do controle das viroses do mamoeiro pela erradicação sistemática das plantas afetadas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 1., 1980, Jaboticabal: **Anais...** Jaboticabal: UNESP, FCAV, 1980. p. 211-217.

MARTINS, D.S. Situação atual da produção integrada de mamão no Brasil. In: _____. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, 2003. cap. 7, p.97-127.

MARTINS, D.S.; VENTURA, J.A. Vetores de doenças do mamoeiro: monitoramento e controle. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.N; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão**. Vitória: Incaper, 2007. cap. 7, p. 113-128.

MARTINS, D.S.; PAULA, R.C.A.L. de; PERONTI, A.L.B.G.; CARVALHO, R.C.Z. de. Ocorrência de espécies de afídeos em áreas comerciais de mamão no estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.N; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão**. Vitória: Incaper, 2007. cap. 20, p. 496-501.

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

MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A. Trinta e três anos de controle da tristeza dos citros por premunização no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 241-242, 2001.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGY, 4., 1968, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1968. p. 71-82.

_____. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Miami, v.3, p.868-872, 1977.

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

NADERI, M.; BERGER, P. H. Effects of chloroplast targeted potato virus Y coat protein on transgenic plants. **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 67-83, 1997a.

_____. Pathogenesis related protein 1a is induced in potato virus Y infected plants as well as by coat protein targeted to chloroplasts. **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 41-44, 1997b.

NAMBA, R.; HIGA, S.Y. Papaya mosaic virus transmission as affected by the duration of the preliminary fasting and virus acquisition feeding of *Myzus persicae*. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v. 22, p. 113-117, 1975.

NOA-CARRAZANA, J.C.; GONZALEZ-DE-LEÓN, D.; SILVA-ROSALES, L. Molecular characterization of a severe isolate of *Papaya ringspot virus* in Mexico and its relationship with other isolates. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 35, p. 109-117, 2007.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of Passion fruit woodiness virus (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 699-708, 2003.

_____. Protection between strains of *Passion fruit woodiness virus* in sunnhemp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 307-311, 2005.

OSHIMA, N. The control of tomato mosaic virus disease with attenuated virus of tomato strain of ToMV. **Review of Plant Protection Research**, Palo Alto, v. 8, p. 126-135, 1975.

PARAMESWARI, B.; MANGRAUTHIA, S.K.; PRAVEEN, S.; JAIN, R.K. Complete genome sequence of an isolate of Papaya ringspot virus from India. **Archives of Virology**, Vienna, v. 15, p. 843–845, 2007.

PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 227–247, 1996.

POSNETTE, A.F.; CROPLEY, R. Apple mosaic viruses: host reactions and strain interference. **The Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 31, p. 119-133, 1956.

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

PURCIFULL, D.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Wallington, n. 209, 1984.

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

RACCAH, B.; HUET, H.; BLANC, S. Potyviruses. In: HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. (Ed.). **Virus-insect-plant interactions**. San Diego: Academic Press, 2001. chap. 10, p. 181-206.

RAM, R.D.; VERMA, R.; TOMER, S.P.S.; PRAKASH, S. Management of *Papaya ringspot virus* through cross-protection strategy. **Journal of Maharashtra Agriculture**, Maharashtra, v. 31, p. 92-95, 2006.

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

REZENDE, J.A.M. **Tentativas de premunização para o controle do mosaico do mamoeiro**. 1985. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Produção de lesões locais em *Chenopodium quinoa* pelo potyvírus causador do mosaico do mamoeiro no Brasil depende da origem das sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 11, p. 39-43, 1985.

_____. Intensificação dos sintomas dificulta o controle do mosaico do mamoeiro por premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, p.110-101, 1987.

REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

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

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

_____. Estabilidade de isolados fracos premunizantes do vírus do mosaico – estirpe melancia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 64-68, 1997.

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

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S.; SOARES, N.B. Ocorrência de um isolado fraco do vírus do mosaico do mamoeiro *Carica papaya* L. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 534, 1981.

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

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

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

REZENDE, J.A.M.; MOREIRA, A.G.; MORETTI, E.R.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; MARTINS, M.V.V.; RODRIGUES, C.H. "Roguing" para o controle do mosaico do mamoeiro no estado do Espírito Santo: um caso de sucesso e perspectivas. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.N.; COSTA, A.F.S. da. (Ed.). **Papaya Brasil: manejo, qualidade e mercado do mamão**. Vitória: Incaper, 2007. cap. 6, p. 101-111.

ROJAS, M. R.; ZERBINI, F. M.; ALLISON, R. F.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, London, v. 237, p. 283-295, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V.3, 253p.

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

_____. Competition for infection sites and multiplication of the competing strain in plant virus interference. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1363-1365, 1983.

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

SILVA-ROSALES, L.; BECERRA-LEOR, N.; RUIZ-CASTRO, S.; TELIZ-ORTIZ, D.; NOA-CARRAZANA, J.C. Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. **Archives of Virology**, Vienna, v. 145, p. 835-843, 2000.

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

SOUZA Jr., M.T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV-Brazil-Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil**. 1999. 277 p. Thesis (PhD in Phytopathology) - Cornell University, Geneva, 1999.

SOUZA Jr., M.T. ;NICKEL, O.; GONSALVES, D. Development of virus resistant transgenic papayas expressing the coat protein gene from a brazilian isolate of *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 357-365, 2005.

SRIVASTA, A.; TRIVEDI, S.; KRISHNA, S.K.; VERMA, H.N.; PRASAD, V. Suppression of *Papaya ringspot virus* infection in *Carica papaya* with CAP-34, a systemic antiviral resistance inducing protein from *Clerodendrum aculeatum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, p. 241-246, 2009.

TÉLIZ-ORTIZ, D.; MORA-AGUILERA, A.; NIETO-ANGEL, D.; GONSALVES, D.; GARCÍA-PÉREZ, E.; MATHEIS-TOLEDANO, L.; ÁVILA-RESENDIZ, C. Mancha anular del papayo en México. **Revista Mexicana de Fitopatología**, México, v. 9, n. 1, p. 64-68, 1991.

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

TORRES, M.R.; GIACOMETTI, D.C. Virosis de la papaya (*Carica papaya* L.) en el Valle de Cauca. **Agricultura Tropical**, Maracay, v. 22, p. 27-38, 1966.

TRIPATHI, S.; SUZUKI, J.Y.; FERREIRA, S.A.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus* – P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, p. 269-280, 2008.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: abacaxi, banana e mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas: fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p. 279-352.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. London: Klumer Academic, 2004. p. 201-268.

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

YEH, S.D.; CHENG, Y.H. Use of resistant *Cucumis metuliferus* for selection of nitrous-acid induced attenuated strains of papaya ringspot virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1257-1261, 1989.

YEH, S.D.; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1086-1091, 1984.

_____. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. In: HARRIS, K.F. (Ed.). **Advances in disease vector research**. New York: Springer-Verlag, 1994. v. 10, p. 237-257.

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

YEH; S.D.; JAN, F.J.; CHIANG, C.H.; DOONG, P.J.; CHEN, M.C.; CHUNG, P.H. Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Papaya ringspot virus* RNA. **Journal of General Virology**, London, v. 73, p. 2531-2541, 1992.

YELINA, N.E.; SAVENKOV, E.I.; SOLOVYEV, A.G.; MOROZOV, S.Y.; VALKONEN, J.P. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. **Journal of Virology**, London, v.76, p.12981-1299, 2002.

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

YOU, B.J.; CHIANG, C.H.; CHEN, L.F.; SU, W.C.; YEH, S.D. Engineered mild strain of *Papaya ringspot virus* for broader cross protection in cucurbits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 533-540, 2005.

WANG, H.L.; YEH, S.D; CHIU, R.J.; GONSALVES, D. Effectiveness of cross-protection by mild mutants of *Papaya ringspot virus* for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 491-497, 1987)

WANG, WEI-QIN; NATSUAKI, T.; KOSAKA, Y.; OKUDA, S. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of parental and attenuated isolates of *Zucchini yellow mosaic virus* **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, p. 52-56, 2006.

WEI, JUN-YA; LIU, DE-BING; LI, XIAO-YING; ZHOU, P. Variation in the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* isolates from multiple locations in China. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 49, p. 1062-1069, 2007.

ZERBINI F.M.; ZAMBOLIM-MACIEL, E. A família *Potyviridae* – Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 1-66, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências de nucleotídeos da porção central do gene da proteína capsidial (*cp*) dos isolados fracos e severo do PRSV-P, provenientes do estado do Espírito Santo e do isolado severo do estado de Pernambuco

>Isolado1

GGCCGCGGGAATTCGATCCTTTTATACATGGGCTGTTCCATGAATCAAGGAGCAATGTTG
ATTATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAAGTGAAGCTG
TGGATGCTGGTTTAAATGAAAAAGAGAAAAAGAAAAAGAGAAACAAAAAGAAAAAGAAAG
AAAAACAAAAAGAGAAAAGAAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCA
CAAGAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCCTGTTTC
CGAGAACAAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAGACTGTCC
TTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAACAAATGACATTTCTAACACTCGTG
CCACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTACGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATG
ATAGTGAAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACAT
CTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAAACCCAGGTTGACTATCCAA
TCAAGCCTTTAATTGAGCAGCTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTTATGGCTCACTTCAGTA
ACGCGGCAGAAACATACATTACAAAAGAGAAAATGCTACTGAAAAGGTACATGCCGCGGTATG
GGATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGG
TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGC
TGCGAAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTGAGTAAACAAGGAAGAAA
ACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTCCTGGGTATGC
GCAACTGAATACTCGCCATGTTAGCTAATCACTAGTGAATTC

>Isolado2''

CCCCACCCGCGAGGCGGCCGGAANNCACCCCTTAAAGCACCCACGGGCGGGNCCATG
AATCAAGGAGCAATGTTGATTATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATC
AGTCCAAAAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAAGAGAAAAAGAAAAAGAGAAAC
AAAAAGAAAAAGAAAGAAAAACAAAAAGAGAAAAGAAAAAGACGATGCTAGTGACGGAA
ACGATGTGTCAACTAGCACAAGAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCA
GTGGGACTTTCCTGTTCCGAGAACAAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAA
TTAAGGGAAAAGACTGTCTTAAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAACAAATG
ACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTACGAGGGAGTGAGGA
ATGATTATGGCCTTAATGATAGTGAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGT
GTATCGAAAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAA
CCCAGGTTGACTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCAGCTACTCCGTCGTTTAGGCAA
TTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAACATACATTACAAAAGAGAAAATGCTACTGAAA
GGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACG
CTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGC
AGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTG
TCAGTAAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGC
ACTCTCTCCTGGGTATGCGCAACTGAATACTCGCCATGTTAGCTAATCACTAGTGAAT
TC

>Isolado 2'

GAATTCACTACTGATTATCATTTCCATGGGCGTTGTTCCATGAATCAAGGAGCAATGATGA
TTATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAAGTGAAGCTGT
GGATGCTGGTTTAAATGAAAAAGAGAAAAAGAAAAAGAGAAACAAAAAGAAAAAGAAAGA
AAAACAAAAAGAGAAAAGAAAAGGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTATCAC
AAGAACTGGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCCTGTTTC
GAAAACAAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAAAATTAAGGGAAAGACTGTCTT
TAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAACAAATGACATTTCTAACACTCGTGC
CACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGA
TAGTGAAATGCCAAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCCAAAACGGTACAT
CTCCAGACATCTCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAAACCCCGTTGATTATCCAA
TCAAGCCTTTAATTGAGCATGCTACTCCGTTGTTTAGGCAAATTTAT

>Isolado4

TATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTA
 AATGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGAAACAAAAGAAAAGAAGAAGAAAACAAAAGAG
 AAAGAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAGAAGACTGGAGAG
 AGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCAGTGTCCGAAAACAAAATCA
 TTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCCTTAATTTAAATCAT
 CTCCTTCAGTATAATCCGAAAACAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAATCACAA
 TTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGGATGATTATGGCCTTAATGATAGTGAAATGCAA
 ATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACATCTCCAGACATATCT
 GGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATT
 GAGCATGCTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGCA
 TACATTACAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAAT
 TTAACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAACA
 CCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAAT
 CGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTGAGTAACAAGGAAGAAAACACGGATGAGACA
 CACAGTGGAAGATGTCAATAGA

>Isolado7

TTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTT
 AAATGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGAAACAAAAGAAAAGAAGAAGAAAACAAAAGA
 GAAAGAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAGAAGACTGGAGA
 GAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCAGTGTCCGAAAACAAAATC
 ATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCCTTAATTTAAATCA
 TCTCCTTCAGTATAATCCGAAAACAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAATCACA
 ATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGATAGTGAAATGCA
 AATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACATCTCCAGACATATC
 TGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAAT
 TGAGCATGCTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGC
 ATACATTACAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAA
 TTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAACA
 CCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAA
 TCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTGAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACA
 CACAGTGGAAGATGTC

>Isolado9

AAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGAAACAAAAG
 AAAAGAAGAAGAAAACAAAAGAGAAAAGAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATG
 TGTCAACTAGCACAGAAGACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGA
 CTTTCACTGTTCCGAAAACAAAATCATTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGG
 GAAAGACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGAAAACAAATTGACATTT
 CTAACACTCGTGCCACTCAATCACAAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATT
 ATGGCCTTAATGATAGTGAAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCG
 AAAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAGG
 TTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATGCTACTCCGTCGTTTAGGCAAATTATGG
 CTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAGCATAACATTACAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACA
 TGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCG
 ATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGA
 AAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTGAGTA
 ACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGA

>Isolado11

ATGATTATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAG
CTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGAAAACAAAAGAAAAGAAAG
AAGAAAACAAAAGAGAAAAGAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTA
GCACAAGAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGTACCAGTGGAACTTTCAGT
TTCCGAAAACAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTG
TCCTTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAAACAAAATTGACATTTCTAACACTC
GTGCCACTCAATCACAATTTGAGAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTA
ATGATAGTGAAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTA
CATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAAACCCAGGTTGATTATC
CAATCAAGCCTTTAATTTAGCATGCTACTCCGTCGTTTAGGCAAAATTTATGGCTCACTTCA
GTAACGCGGCAGAAACATACATTTACAAAGAGAAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGT
ATGGGATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATG
AGGTGAATTCGAAAACACTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAG
CGCTGCGAAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTTCAGTAACAAGGAAG
AAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTCAAT

>Isolado30

AATACATTTGCCCTTCCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAG
AGAAAAGAAAAGAGAAAACAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAACAAAAGAGAAAAGAAAAG
GACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAAAGAACTGGAGAGAGAGACAGA
GATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCAGTGTTCGAAAACAAAATCATTTACTGAT
AAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAG
TATAATCCGAAAACAAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAATCACAATTTGAGAAG
TGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGATAGTGAAATGCAAATAATGCTA
AATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGG
GTTATGATGGATGGGGAAAACCCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTTAGCATGCT
ACTCCGTCGTTTAGGCAAAATTTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAACATACATTTACA
AAGAGAAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAAATTTGACTGAC
ATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCAAAACACCTGATAGG
GCTCGGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAATCGCAGAATG
TTTGGTATGGACGGCAGTGTTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAA
GATGTCAAT

>Isolado36

AATACTCATGTGTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAG
AGAAAAGAAAAGAGAAAACAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAACAAAAGAGAAAAGAAAAG
GACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAAAGAACTGGAGAGAGAGACAGA
GATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCAGTGTTCGAGAACAAAATCATTTACTGAT
AAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCTTAATTTAAATCATCTCCTTCAG
TATAATCCGAAAACAAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAATCACAATTTGAGAAG
TGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGATAGTGAAATGCAAATAATGCTA
AATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGG
GTTATGATGGATGGGGAAAACCCAGGTTGATTATCCAATCAAGCCTTTAATTTAGCATGCT
ACTCCGTCGTTTAGGCAAAATTTATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAAACATACATCACA
AAGAGAAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAAATTTGACTGAC
ATTAGTCTTGCAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAACACCTGATAGG
GCTCGGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGAAAACACTAATCGCAGAATG
TTTGGTATGGATGGCAGTGTTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACGCACA

>Isolado39

GGCCGCGGGAATTCCATTCTCTTTCCATGGGCGTGTTCCATGAATCAAGGAGCACTGATA
 ACTACCAACTTGTTCGTAGCAGCAATGCACATGTATTTTCATCAGTCTAAGAATGAAGCTG
 TGGATGCTGGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAAAAAGAGAAACAAAAAGAAAAAGAAAGAG
 AAAAAACAAAAAGATAAAGAAAAAGACGAAGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCA
 CAAAAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGAACCTTTCACTGTCC
 CGAGAACAAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTTACCTAGAATTAAGGGGAAAGACTGTCC
 TTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCACAACAAATTGACATTTCTAACACTCGTG
 CCACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATG
 ATAATGAAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAGAACGGTACAT
 CTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGATTATCCAA
 TCAAGCCTTTAATTGAGCATGCCACTCCGTCGTTTAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTA
 ACGCGGCAGAAGCATAACATTACAAAGAGAAACGCCACCGAGAGGTACATGCCGCGGTATG
 GAATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGCCTCGCAAGATATGCTTTTCGATTTCTATGAGG
 TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAGCTGCAGCGC
 TGCGAAACACTAATCGCAGAATGTTTCGGCATGGACGGCAGTGTTAGTAACAAGGAAGAAA
 ACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTCCTGGGTATGC
 GCAACTGAATACTCGCCCATGGTTAGCTAATCACTAGTGAATTC

>Isolado48

GGCCGCGGGAATTTCGATTATCATTCCATGGGCGTGTTCCATGAATCAAGGAGCATTGATG
 ATTATCAGCCTGTTTGTGGTTGCAATACACATGTATTTTCATCAGTCCAGAAATGAAGCTG
 TGGATGCTGGTTTAAATGAGAAGCGTAAAGAAAAAGAGAAACAAAAAGAAAAAGAAGAAG
 AAAAAACAAAAAGAGAAAGAAAAAGACAACGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCA
 CAAAAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGAACCTTTCACTGTTC
 CGAGAACAAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTTACCTAGAATTAAGGGGAAAGACTGTCC
 TTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGCAACAAATTGACATTTTCAACACTCGTG
 CCACTCAATCACAATTTGAGAAATGGTATGAGGGAGTGAGGAATGAGTATGGCCTTAATG
 ATAATGAAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACAT
 CTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAGGTTGATTATCCAA
 TCAAGCCTTTAATTGACTACTCCTCCGTCGTTTAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTA
 ACGCGGCAGAAGCGTACATTGCAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATG
 GAATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATATGCTTTTCGATTTCTATGAGG
 TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGC
 TGCGAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTTAGTAACAAGGAAGAAA
 ACACGGAGAGGCACACAGTGGAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTCCTGGGTATGC
 GCAACTGAATACTCGCCCATGGTTAGCTAATCACTAGTGAATTC

>Isolado63

GAATTCACTACTGATTATCATTCCATGGGCGTGTTCCATGAATCAAGGAGCAATGTTAAT
 TATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTGTG
 GATGCTGGTTTAAATGAAAAGAGAAAAAGAAAAAGAGAAACAAAAAGAAAAAGAAGAAGAA
 AAACAAAAAGAGAAAGAAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACA
 AGAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCACTGTTCCG
 AAAACAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTTACCTAGAATTAAGGGGAAAGACTGTCTT
 AATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAACAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCC
 ACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGAT
 AGTGAATGCAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACATCT
 CCAGACATATCTGGTGTCTGGGTATGATGGATGGGGAAACCCAGGTTGATTATCCAAT
 CAAGCCTTTAATTGACCATGCTACTCCGTCATTTAGGCAAATTTAGGCTCCCTTCAAAAA
 CCCGGCAGAAGCATAACATTACAAAGAGAAATGCTACTGAAAGGTACATGCCGCGGTATGG
 GATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTTCGATTTCTATGAGGT
 GAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGAT
 GCGAAACACTAATCGCAGAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAA
 CATGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTTCTGGGTATGCG
 CAACTGAATACTCGCCCATGTTTAAAGGGATCGAATTCCTCGGCC

>Isolado74

GGCCGCGGGAATTCGATCCTCTTTCCATGGGCGTGTTCATGAATCAAGGAGCAATGTTA
 ATTATCAATCTGTTTATAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAGTCCAAAAGTGAAGCTG
 TGGATGCTGGTTTAAATGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGAAAACAAAAGAAAAGAAAGAA
 AAAACAAAAGAGAAAAGAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCA
 CAAGAACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGGACTTTCACTGTTC
 CGAAAATAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCC
 TTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCGAAAACAAATGACATTTCTAACACTCGTG
 CCACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATG
 ATAGTGAAAATGCAAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAACGGTACAT
 CTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCCAGGTTGATTATCCAA
 TCAAGCCTTTAATGAGCATGCTACTCCGTCTGTTAGGCAAATTTATGGCTCACTTCAGTA
 ACGCGGCAGAAGCATACATTACAAAGAGAAAATGCTACTGAAAAGGTACATGCCGCGGTATG
 GGATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGG
 TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAAGCTGCAGCGC
 TGCGAAAACACTAATCGCAGAAATGTTTGGTATGGATGGCAGTGTGAGTAACAAGGAAGAAA
 ACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTCCTGGGTATGC
 GCAACTGAATACTCGCCCATGGTTAGCTAATCACTAGTGAATTC

>PRSV-P-ES

GGCCGCGGGAATTCGATCCTCTTTACATGCCCGTGTTCATGAATCAAGGAGCACTGATA
 ACTACCAACTTGTTCGTAGCAGCAATGCACATGTATTTTCATCAGTCTAAGAATGAAGCTG
 TGGATGCTGGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAAAAGAGAAAACAAAAGAAAAGAAAAGAG
 AAAACAAAAGATAAAGAAAAGACGAAGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCA
 CAAAACACTGGAGAGAGAGACAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGAACTTTCACTGTTC
 CGAGAAACAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAGAATTAAGGGAAAAGACTGTCC
 TTAATTTAAATCATCTCCTTCAGTATAATCCACAACAAATGACATTTCTAACACTCGTG
 CCACTCAATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATG
 ATAATGAAAATGCAAAATAATGCTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTATCGAGAACGGTACAT
 CTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCAAGTTGATTATCCAA
 TCAAGCCTTTAATGAGCATGCCACTCCGTCTGTTAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTA
 ACGCGGCAGAAGCATACATTACAAAGAGAAAACGCCACCGAGAGGTACATGCCGCGGTATG
 GAATCAAGAGAAAATTTGACTGACATTAGCCTCGCAAGATATGCTTTTCGATTTCTATGAGG
 TGAATTCGAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAAGCTGCAGCGC
 TGCGAAAACACTAATCGCAGAAATGTTCCGCATGGACGGCAGTGTAGTAACAAGGAAGAAA
 ACACGGAGAGACACACAGTAGAAGATGTCAATAGAGACATGCACTCTCTCCTGGGTATGC
 GCAACTGAATACTCGCCCATGGTTAGCTAATCACTAGTGAATTC

>PRSV-P-PE

CCTGCAGGCGGCCGGAATTCACCACTGATTATCATTTCCATGGGCGTGTTCATGAATCA
 AGGAGCATTGGTGATTATCAACCTGTTTGTAGCAGCAATACACATGTGTTTCATCAATCC
 AAAAAAGAACTGTGGATGCTGGCTTAAATGAAAAGCGTAAAGAAAAGACAAACAAAAA
 GAAAAAAAAGAAAGAAAACAAAAGAGAAAAGAAAAGACGTTGCTAGTGATGGAAACGAT
 GTGTCAACTAGCACAAAGAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGTA
 ATTTTTCACTGTTCCGAGAAACAAAATCATTTACTGATAAGATGATTTTACCTAAAAATTA
 GGGAAAAGCTGTCTTAAATTTAAATCCTCTCCTTCAGTATAATCCGCAACAAATGACAT
 TTCTAACACTCGTGCCACTCTATCACAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGA
 TTATGGCCTTAATGATAATGAAATGCAAAATATGCTTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGTAT
 CAAAACCGGACATCTCCACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACTCA
 GGTTGATTATCAATCCAGCCTTTAATTTGATCATGCTACTCCGTCTGTTAGGAAAATTTAT
 GGCTCATTTTCAATTAACCGGCAGAGCATACATTACAAAAGAAAATGCTACTGAAAAGTA
 CATGCCGAGGTATGGGATTAAGAGAAAATTTGACTGACATTTACTCTCGCTAGATATGCTTTT

C

APÊNDICE B – Sequência de nucleotídeos do gene da inclusão citoplasmática (*ci*) do isolado fraco 4 do PRSV-P, proveniente do estado do Espírito Santo

>Isolado4

TACTGGCGCAAATAGCGATGTGACTGCCTTTGCTGATAACATATTGGTTTTATGTCGCAAG
TTACAATGAAGTGGACGAACTAAGTAAGCTTTTATCTGATAAAGGCTACTTGGTTACTAA
AATCGATGGAACAACAATGAAAGTTGGAAAGACTGAAATTTCAACTAGTGGCACAAAATC
CAAGAAGCATTTCATAGTCGCCACAAATATCATCGAGAATGGTGTTACACTTGACATAGA
AGCTGTCATAGATTTTTGGGTTGAAAGTAGTACCTGAGATGGATTTCAGACAATCGTATGAT
TCGGTACTCGAAACAAGCAATCAGTTTTGGAGAGAGAATTCAAAGGCTCGGCCGAGTGGG
GAGACACAAAGAGGGAATTGCACTAAGAATTGGGCACACAGAGAAAGGCATTCAAGAAAT
TCCAGAGATGGCAGCCACTGAAGCGGCTTTTCTGAGCTTCACGTATGGCCTGCCCGTAAT
GACTCACAATGTAGGGCTAAGCTTACTCAAAAATTCGACTGTGAGACAAGCACGCACAAT
GCAACAGTATGAACTAAGCCCGTTCTTCACACAAAATTTAGTAAACTTTGACGGGACAGT
GCACCCCAAGATTGATGTCTTGTTACGACCCTATAAGTTGAGAGATTGTGAAGTCAGATT
AAGCGAAGCAGCAATACCGCATGGGGTACAGTCTATTTGGATGTCTGCTCGGGAGTATGA
AGCAGTTGGAGGCCGTCTTTGCCTAGAAAGTGATGTCCGAATACCATTCCCTCATTAAGGA
TGTTCCCTGAGCGATTGTACAGAGAATTATGGGATATCGTGCAGACTTATAAGCGTGACTT
TACGTTTGGGCGAGTTAATTCTGTGTCCGCTGGGAAAATTGCATACACATTAAGAACTGA
TGTTGATTCTATTCCCTAGAACTCTCATAACGATTGACAAGCTGATTGAGAGTGAGAACAT
GAAGCATGCCCATTTTAAAGCTATGACAAGTTGCACTGGCCTCAACTCTAGCTTCTCTCT
ACTTGGTGTTATAAACACTATCCAAAGTAGATACCTAGTTGATCATTAGTTGAGAATAT
CAGAAACTTCAACTGGCGAAGGCTCAAATTCACAACCTAGAAGCTCATGTGCAAGACAA
CAACGTCGAAAATCTCATTCAATCTCTTGGCGCTGTCAGAGCTGTCTATCATCAAAGTGT
AGATGGAGTAAAGCACATAAAGCAAGAGTTGGGCTTGAAAGGAATATGGGATGGCTCATT
GATGATTAA

3 AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO NATURAL DE *Cucurbita pepo* cv. Caserta e *C. Maxima* cv. EXPOSIÇÃO COM O *Papaya ringspot virus* - type P (PRSV-P)

Resumo

Entre as hospedeiras de invasão sistêmica do vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* – type P) encontram-se espécies de cucurbitáceas, cuja susceptibilidade à transmissão experimental, mecânica e com afídeos, é variável. Todavia, raros são os relatos de recuperação do PRSV-P em infecções naturais de cucurbitáceas. Este trabalho teve como objetivo estudar a infecção natural de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) e abóbora moranga (*C. maxima* cv. Exposição) plantadas ao lado de mamoeiros infectados com o PRSV-P. Dois plantios de abobrinha de moita, com 340 plantas cada, ficaram expostos à infecção natural nos períodos de 30/03/2007 a 20/05/2007 e 10/07/2007 a 20/09/2007, respectivamente, e dois plantios de abóbora moranga foram analisados nos períodos de 20/12/2007 a 10/03/2008 e 19/03/2008 a 30/06/2008, com 97 e 70 plantas, respectivamente. No final dos ciclos das culturas, amostras foliares dos ponteiros individuais de abobrinha de moita foram coletadas e agrupadas dez a dez e, de abóbora moranga coletadas e agrupadas duas a duas. Extrato de cada uma das amostras compostas foi inoculado mecanicamente em três plantas de mamoeiro cv. Golden na tentativa de recuperação do PRSV-P. Avaliações dos mamoeiros foram feitas por meio de sintomas, PTA-ELISA e RT-PCR para os genes da proteína capsidial (*cp*) e parte do gene da inclusão citoplasmática (*ci*). Nenhuma das plantas de mamoeiro inoculadas com extratos foliares de abobrinha de moita e de abóbora moranga exibiu sintomas de mosaico. Nas plantas do primeiro ensaio com abobrinha de moita detectou-se o gene *ci*, mas não o *cp*, em quatro grupos de três plantas de mamoeiro, indicando que ao menos uma planta em quarenta de abobrinha de moita estava infectada. Nos demais ensaios de exposição, o PRSV-P não foi detectado por PTA-ELISA ou RT-PCR em nenhuma planta de mamoeiro. Plantas de abobrinha de moita e de abóbora moranga inoculadas mecanicamente em casa de vegetação foram suscetíveis ao PRSV-P. Este estudo indicou baixa infecção natural de abobrinha de moita ‘Caserta’ e ausência de infecção natural de abóbora moranga ‘Exposição’ com o PRSV-P.

Palavras-chave: Cucurbitaceae; Fonte de inóculo; *Carica papaya*; Potyvirus; Transmissão

Abstract

Cucurbit species are the only alternative hosts systemically infected by *Papaya ringspot virus* – type P (PRSV-P), although their susceptibility to mechanical and aphid transmissions of the virus has been variable. However, reports on the recovery of PRSV-P from naturally infected cucurbits are rare. The aim of this work was to study the natural infection of zucchini squash (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) and pumpkin (*C. maxima* cv. Exposição) grown near to papaya trees infected with PRSV-P. Two experimental fields of zucchini squash, each one with 340 plants, were exposed to natural infection during

03/30/2007 to 05/20/2007 and 07/10/2007 to 09/20/2007, respectively, and the two pumpkin plantings were exposed during 12/20/2007 to 03/10/2008 and 03/19/2008 to 06/30/2008, with 97 plants and 70 plants, respectively. At the end of the cycle of each culture, leaf samples from each zucchini squash plants were collected and grouped ten by ten, and those from pumpkin plants were collected and grouped two by two. The extract from each compound sample was mechanically inoculated on three papaya test-plants cv. Golden as an attempt to recover the PRSV-P. Papaya test-plants were maintained in the greenhouse and infection was evaluated by means of symptoms, PTA-ELISA and RT-PCR for coat protein gene (*cp*) and a portion of the cytoplasmic inclusion gene (*ci*). None of the inoculated papaya test-plants, for the four tests, exhibited symptoms, neither the virus was detected in these plants by PTA-ELISA or RT-PCR. The only exception occurred for the first exposure test with zucchini squash, in which the *ci* gene, not the *cp* gene, was detected in four groups of three papaya test-plants, indicating that at least one plant out of forty of zucchini squash was apparently infected with PRSV-P. Plants of zucchini squash and pumpkin mechanically inoculated under greenhouse conditions were susceptible to PRSV-P infection. This study indicated that natural infection of zucchini squash 'Caserta' with PRSV-P was very low, whereas pumpkin 'Exposição' was not infected.

Keywords: Cucurbitaceae; Source of inoculum; *Carica papaya*; Potyvirus; Transmission

3.1 Introdução

O mosaico do mamoeiro é causado pelo *Papaya ringspot virus* – type P (PRSV-P) e é o principal fator limitante na produção dessa frutífera em todos os lugares onde ocorre. O PRSV-P pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, transmitido naturalmente por afídeos, com relação vírus-vetor do tipo não persistente (FAUQUET et al., 2005). Diversas estratégias têm sido adotadas com o intuito de controlar o mosaico do mamoeiro, dentre elas o uso de mudas sadias, plantio em áreas livres do vírus, evitar consórcio com cucurbitáceas, programas de erradicação de plantas doentes, premunização e uso de plantas transgênicas (REZENDE; MÜLLER, 1995; REZENDE; FANCELLI, 2005; GONSALVES, 1998; COSTA, 2005; TRIPATHI et al., 2008).

Entre as hospedeiras de invasão sistêmica do vírus do mosaico do mamoeiro encontram-se espécies de cucurbitáceas, cuja susceptibilidade à transmissão experimental, mecânica e com afídeos é variável em função da origem do isolado viral e das espécies/variedades avaliadas. Adsuar (1950), em Porto Rico, transmitiu o PRSV-P para *Melothria guadalupensis* e Capoor e Varma (1958) na Índia, transmitiram esse

vírus para *Cucurbita maxima*, *C. pepo*, *Citrullus vulgaris*, *C. fistulosus*, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Langenaria siceraria*, *Tricosanthes anguina* e *Luffa acutangula*. Posteriormente, outros investigadores identificaram como hospedeiras de infecção sistêmica do PRSV-P as espécies *Cucumis anguria*, *Cucumis metuliferus*, *Cucurbita moschata*, *Cyclanthera pedata*, *Diplocyclos palmatus*, *Momordica charantia*, *Melothria fluminesis*, *M. pendula* e *L. vulgaris* (ISHII; HOLTZMAN, 1963; CONOVER, 1964; BOKX, 1965; ZETLER et al., 1968; STORY et al., 1968; COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969; COOK, 1972; LOPEZ-PINTO, 1972; LIMA; GOMES, 1975; LUQUE; MARTINÉZ, 1976; LUQUE; LÓPEZ, 1977; WANG, H.L. et al., 1978; CHANG, 1979; LANA, 1980; YEH; GONSALVES; PROVVIDENTI, 1984). Na década de 1980, no Brasil, Rezende e Costa¹ (dados não publicados) avaliaram espécies de cucurbitáceas através de transmissão experimental por inoculação mecânica em abobrinha de moita cv. Caserta, abobrinha de moita var. I-1909, dez variedades de abóbora e sete variedades de melancia. Todas foram infectadas com o PRSV-P, sendo a abobrinha de moita a espécie mais suscetível ao vírus.

Apesar da suscetibilidade das cucurbitáceas a diferentes isolados do PRSV-P, poucos são os relatos de recuperação desse vírus em infecções naturais de cucurbitáceas (SUREKA et al., 1977; PINTO, 1972; LUQUE; LÓPEZ 1977; YEH; GONSALVES; PROVVIDENTI, 1984). A importância dessas espécies como fonte de afídeos e de inóculo do vírus em campo ainda não está bem estabelecida. Estudos realizados na Flórida, E.U.A., para recuperar o PRSV-P de cucurbitáceas próximas ou dentro de plantações de mamoeiro com mosaico, forneceram resultados negativos (CONOVER, 1964). No Brasil, Barbosa e Paguio, (1982) no estado de Pernambuco, avaliando *M. charantia*, *M. fluminesis* e *C. pepo* dentro ou próximas a plantios de mamoeiros, não recuperaram o PRSV-P dessas plantas. Por outro lado, A. S. Costa obteve recuperação desse vírus de abóboras que estavam presentes em um pomar de mamoeiros com mosaico (REZENDE, 1985). Magdalita et al. (1990), nas Filipinas, recuperaram o PRSV-P a partir de plantas de *D. palmatus* que ocorriam em abundância nas proximidades de plantações de mamoeiro. Chin e Ahmad (2007) detectaram a infecção do mosaico do mamoeiro em melão de São Caetano (*M. charantia*) ocorrendo

nas proximidades de plantios de mamoeiros na Jamaica. Esses autores recuperaram o vírus a partir de inoculações mecânicas e pelo afídeo *Myzus persicae*.

Em estudos de recuperação experimental em casa de vegetação, Adsuar (1950) avaliou 49 espécies em 21 famílias botânicas, sendo 10 espécies de cucurbitáceas e apenas obteve recuperação do PRSV-P a partir de plantas de abóbora-do-mato (*M. guadalupensis*). Estudos realizados na Colômbia por Luque e López-Martinez (1976; 1977) recuperaram o vírus do mosaico do mamoeiro a partir de plantas de *C. melo*, de duas variedades de *C. vulgaris* e *C. pepo*, com maior eficiência quando os mamoeiros foram inoculados com *M. persicae* do que inoculados mecanicamente.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a infecção natural de abobrinha de moita (*C. pepo* cv. Caserta) e abóbora moranga (*C. maxima* cv. Exposição), plantadas ao lado de mamoeiros infectados com o PRSV-P, na tentativa de fornecer algum subsídio do real papel destas espécies como fonte de inóculo do PRSV-P em campo.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Ensaios em campo com *Curcubita pepo* cv. Caserta

Foram realizados dois ensaios nos períodos de 30/03/2007 a 20/05/2007 e 10/07/2007 a 20/09/2007, respectivamente, com 340 plantas de abobrinha de moita cv. Caserta cada um. Estas plantas ficaram expostas à infecção natural, no campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, próximas a um plantio de mamoeiros infectados com o PRSV-P, conforme diagramado nas figuras 1A e 1B. As plantas de abobrinha de moita foram obtidas através da semeadura direta em covas previamente preparadas com adubo mineral 04-14-08 (250 g/cova) e esterco de curral curtido (200 g/cova), aplicados 15 dias antes do plantio. O espaçamento foi de 1x1 metro entre plantas e, após a germinação foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por cova.

Ao final do ciclo das plantas de cada ensaio, foram coletadas amostras foliares dos ponteiros de todas as plantas (340 plantas) e agrupadas dez a dez. Os extratos de cada grupo, totalizando 34 grupos, foram inoculados mecanicamente em três mudas de mamoeiro Solo cv. Golden em casa de vegetação. No primeiro ensaio, as amostras conjuntas de abobrinha de moita também foram analisadas por PTA-ELISA com antissoro contra o PRSV-P. Também foram realizadas inoculações em mudas de mamoeiro com o PRSV-P como controle.

As amostras foram preparadas na diluição de 1:10 (p:v) em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M. Como abrasivo foi usado o carbureto de silício (Carborundum), grão 320. As folhas inoculadas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo. As avaliações dos mamoeiros foram feitas com base nas observações dos sintomas, PTA-ELISA e RT-PCR.

3.2.1.2 Ensaios em campo com *Curcubita maxima* cv. Exposição

Foram realizados dois ensaios nos períodos de 20/12/2007 a 10/03/2008 e 19/03/2008 a 30/06/2008, respectivamente, com 97 plantas de abóbora moranga cv. Exposição para o primeiro ensaio e 70 plantas para o segundo ensaio. Estas plantas ficaram expostas à infecção natural, no mesmo campo experimental onde foram realizados os ensaios com abobrinha de moita (figuras 1A e 1C). As plantas de abóbora foram obtidas através da sementeira direta em covas previamente preparadas com adubo mineral 04-14-08 (250 g/cova) e esterco de curral curtido (200 g/cova), aplicados 15 dias antes de cada plantio. O espaçamento foi de 3 m entre linhas e 2 m entre plantas e após a germinação foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por cova. No segundo ensaio com abóbora foram plantadas ao acaso nove mudas sadias de mamoeiro para servirem de controle de infecção natural do vírus.

Ao final do ciclo das plantas de cada ensaio, foram coletadas amostras foliares dos ponteiros de todas as plantas e agrupadas duas a duas, totalizando 49 grupos para o primeiro ensaio (97 plantas) e 35 grupos (70 plantas) para o segundo ensaio. Os extratos de cada grupo foram inoculados mecanicamente em três mudas de mamoeiro Solo cv. Golden em casa de vegetação. Também foram realizadas inoculações em mudas de mamoeiro com o PRSV-P como controle.

O preparo dos inóculos, as inoculações e as avaliações seguiram os mesmos critérios descritos em 3.2.1.1. Nesses ensaios as amostras de abóbora também foram analisadas por PTA-ELISA para a detecção dos seguintes vírus: *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), no primeiro ensaio e detecção do PRSV-W e ZYMV no segundo ensaio.



Figura 1 – **A**, croqui parcial do campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, indicando a área com mamoeiros infectados com o PRSV-P e a área dos ensaios com cucurbitáceas. **B**, vista parcial de um ensaio com *Cucurbita pepo* cv. Caserta. **C**, vista parcial de um ensaio com *C. maxima* cv. Exposição

3.2.1.3 Transmissão mecânica do PRSV-P para *C. pepo* cv. Caserta e *C. maxima* cv. Exposição

Foram avaliadas 13 plantas de *C. pepo* cv. Caserta e 19 plantas de *C. maxima* cv. Exposição em casa de vegetação. As plantas-teste foram obtidas em vasos de alumínio contendo uma mistura de terra e esterco. A semeadura foi realizada colocando três sementes por vaso. A inoculação foi realizada com um isolado do PRSV-P obtido do campo experimental. Foram inoculados mamoeiros como controles da infectividade do inóculo.

O preparo do inóculo e a inoculação foram realizados como descritos anteriormente. As avaliações foram feitas com base na observação visual de sintomas a

partir de 10 dias após a inoculação e a confirmação da infecção foi realizada por PTA-ELISA.

3.2.1.4 PTA-ELISA

A confirmação da infecção das plantas-teste foi inicialmente realizada pelo método sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (MOWAT; DAWSON, 1987), com modificações. Para a detecção do PRSV-P utilizou-se antissoro policlonal específico contra a proteína capsial desse vírus, produzido conforme relatado no capítulo anterior. Nos ensaios com a abóbora moranga, para a avaliação da infecção com o *Papaya ringspot virus* – type W (PRSV-W), o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e o *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) foram utilizados antissoros policlonais específicos contra as respectivas proteínas capsiais desses vírus, disponíveis no Laboratório de Virologia Vegetal, ESALQ/USP. O antissoro contra o ZLCV foi cedido pela Dra. Alice I. Nagata, Embrapa, CNPH, Brasília, DF.

As amostras foram maceradas em tampão carbonato de sódio (15 mM Na₂CO₃; 35 mM, NaHCO₃ e 3 mM NaN₃, pH 9,6). Foram colocados 100 µl das amostras, diluídas 1:50 (p:v) em placas de ELISA de 96 cavidades e posteriormente incubadas por 15 minutos a 37°C. Foram utilizadas duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4PBS + 0,05% Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µl do antissoro diluído (1:1000) em tampão PBS-TPB (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000 + 0,2% Bovine Serum Albumin). As placas foram incubadas por duas horas a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito. Foram colocados 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-80225) diluídos 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubadas novamente por duas horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, foram colocados em cada cavidade 100 µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942) diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de

ELISA, marca Metertech Σ960, utilizando-se um filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedeu três vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

3.2.1.5 RT-PCR

A indexação molecular foi realizada por meio da detecção de dois fragmentos do genoma do PRSV-P. Um fragmento foi da região que corresponde ao gene da proteína capsial (*cp*) com primers descritos por Souza Júnior (1999) que amplificam um fragmento de aproximadamente 950 nucleotídeos. O outro fragmento foi da região que compreende uma parte do gene da inclusão citoplasmática (*ci*) cujo par de primer amplifica um fragmento de aproximadamente 750 nucleotídeos (quadro 1).

Oligonucleotídeo	Sequência	Região de anelamento
5' PRSV Top	5' - ATCATTCCATGGGCGTGTTCCATGAATCAA - 3'	Gene da proteína capsial (senso)
3' PRSV Bottom	5' - AGCTAACCATGGGCGAGTATTCAGTTGCGC - 3'	Gene da proteína capsial (anti-senso)
CI PRSV-P P1	5' - CCGCATACAATYGCATCC - 3'	Porção 3'- terminal do gene da inclusão citoplasmática (anti-senso)
CI PRSV-P P2	5' - CGTCCCTAYAAGYTGAGRG - 3'	Porção 3'- terminal do gene da inclusão citoplasmática (senso)

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR para detecção do PRSV-P

Realizou-se a extração de RNA total de folhas de plantas de mamoeiro utilizando-se o produto Trizol® LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das folhas, separadamente para cada fragmento do genoma a ser amplificado. Para reação de transcrição reversa (“reverse trascription”), inicialmente 3 µl de suspensão de RNA total, diluído em água “Milli-Q” previamente tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC), foram misturados com 1 µl do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) anti-senso (20 mM). Foram adicionados também 1 µl de dNTP’s (dATP, dGTP, dCTP e dTTP - 10 mM) e 12 µl de água “Milli-Q” tratada com DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente mantida a 2°C por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 5 µl do tampão 5X da enzima transcriptase reversa, 2 µl de

ditiotreitól (DTT) 0,1 M e 200 unidades da enzima M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*). Essa solução foi incubada a 37°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e mantida a 4°C.

O cDNA sintetizado foi utilizado em uma reação de PCR (“polymerase chain reaction” – reação em cadeia da polimerase) separadamente para cada fragmento do genoma a ser amplificado. Para isso, 3 µl do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µl de tampão 10X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 0,8 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,8 µl do oligonucleotídeo iniciador senso (20 mM), 0,8 µl do oligonucleotídeo iniciador anti-senso (20 mM), 1,5 µl de mistura de dNTP’s (10 mM), 1,2 unidades de Taq DNA Polimerase e 14,3 µl de água “Milli-Q”. Os testes moleculares para ambos os genes foram realizados duas vezes.

Para o gene da proteína capsidial, o regime do termociclador foi de 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento a 4°C. Para o fragmento do gene da inclusão citoplasmática, o regime do termociclador foi de 3 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento a 4°C.

Produtos das RT-PCR foram visualizadas em gel de agarose a 0,8%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) em 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3), com auxílio de um transluminador de luz UV.

3.2.2 Resultados e discussão

Para o primeiro ensaio, os resultados das avaliações da infecção natural das plantas de abobrinha de moita cv. Caserta com o PRSV-P encontram-se na tabela 1. Extratos dos 34 grupos, constituídos por folhas de 10 plantas cada um, foram inicialmente analisados por PTA-ELISA com antissoro policlonal para detecção do PRSV-P e os resultados foram negativos. Essas mesmas amostras foram inoculadas mecanicamente em mamoeiros e nenhuma planta exibiu sintomas de infecção durante os períodos de observações. As plantas de mamoeiros inoculadas com o isolado do

PRSV-P de mamoeiros do campo, controles positivos, mostraram sintomas típicos da doença. A análise de PTA-ELISA para a detecção do vírus em extratos das folhas de mamoeiros, agrupadas conforme indicação na tabela 1, também foi negativa. O mesmo ocorreu com a tentativa de detecção do gene da proteína capsidial (*cp*) do vírus por meio de RT-PCR. No entanto, em uma única amostra composta (extratos foliares de 12 plantas de mamoeiro) foi obtida amplificação de um fragmento do gene da inclusão citoplasmática (*ci*) de aproximadamente 730 nucleotídeos (figura 2), indicando que, pelo menos uma planta de abobrinha de moita estava infectada com o PRSV-P.

Os resultados do segundo ensaio com abobrinha de moita estão apresentados na tabela 2. Nessa avaliação, os extratos dos 34 grupos, constituídos por folhas de 10 plantas de abobrinha de moita, foram inicialmente inoculados em plantas-teste de mamoeiro. Nenhuma planta exibiu sintomas, exceto aquelas inoculadas com o isolado do PRSV-P de mamoeiro do campo. As análises de PTA-ELISA e RT-PCR para a detecção do gene da proteína capsidial (*cp*) e de um fragmento do gene da inclusão citoplasmática (*ci*) a partir do RNA total extraído de amostras compostas de folhas de mamoeiro foram negativas, indicando ausência de infecção com PRSV-P.

Nas tabelas 3 e 4 estão as análises para a detecção da infecção natural de abóbora moranga cv. Exposição com o PRSV-P. No primeiro ensaio (tabela 3) constatou-se inicialmente que dos 49 grupos de amostras compostas analisadas, 40 mostraram-se infectadas com o PRSV-W, todas estavam infectadas com o ZYMV e nenhuma com o ZLCV. Este último resultado corrobora a alta resistência que esta cultivar possui contra esse tospovírus (GIAMPAN; REZENDE; SILVA, 2007). Quando essas amostras foram inoculadas em mamoeiro, nenhuma planta mostrou sintomas de mosaico, indicando ausência de recuperação do PRSV-P. As plantas inoculadas com o isolado do PRSV-P do campo experimental, controle positivo, mais uma vez exibiram sintomas de infecção sistêmica. Tentativas de detecção desse vírus nas plantas de mamoeiro (amostras compostas indicadas na tabela 3) por meio de PTA-ELISA e RT-PCR também foram negativas.

No segundo ensaio com a abóbora moranga, os resultados foram semelhantes. A única exceção encontrada foi a constatação de que todas as plantas estavam infectadas com o PRSV-W e ZYMV, conforme análise de PTA-ELISA (Tabela 4). Mais

uma vez não foi possível recuperar o PRSV-P por meio de inoculação dos extratos das folhas de abóbora moranga em plantas de mamoeiro. Contudo, os mamoeiros inoculados com o isolado do PRSV-P do campo foram infectados. Análises de PTA-ELISA e RT-PCR novamente não detectaram o PRSV-P nas folhas das plantas de mamoeiro inoculadas com extratos das folhas de abóbora moranga. Das nove plantas de mamoeiro expostas ao acaso entre as plantas de abóbora moranga nesse ensaio, oito foram infectadas com o PRSV-P e exibiram sintomas típicos de mosaico.

Tabela 1 – Análises para detecção do PRSV-P em plantas de abobrinha de moita (*C. pepo* 'Caserta') expostas em campo no primeiro ensaio através do teste sorológico de PTA-ELISA, recuperação do vírus para plantas de mamoeiro e posterior detecção por meio de PTA-ELISA e RT-PCR para o gene CP e um fragmento do gene CI

Grupo de plantas	PTA – ELISA*	Nºmamoeiros sint./Nºmamoeiros inoc.	PTA – ELISA**	RT-PCR**		Grupo de plantas	PTA – ELISA*	Nºmamoeiros sint./Nºmamoeiros inoc.	PTA – ELISA**	RT-PCR**	
				CP	CI					CP	CI
1-10	-	0/3	}	-	-	161-170	-	0/3	}	-	-
11-20	-	0/3				171-180	-	0/3			
21-30	-	0/3				181-190	-	0/3			
31-40	-	0/3				191-200	-	0/3			
41-50	-	0/3	}	-	-	201-210	-	0/3	}	-	-
51-60	-	0/3				211-220	-	0/3			
61-70	-	0/3				221-230	-	0/3			
71-80	-	0/3				231-240	-	0/3			
81-90	-	0/3	}	-	-	241-250	-	0/3	}	-	-
91-100	-	0/3				251-260	-	0/3			
101-110	-	0/3				261-270	-	0/2			
111-120	-	0/3				271-280	-	0/3			
121-130	-	0/3	}	-	-	281-290	-	0/3	}	-	-
131-140	-	0/3				291-300	-	0/3			
141-150	-	0/3				301-310	-	0/3			
151-160	-	0/3				311-320	-	0/3			
			}	-	-	321-330	-	0/3	}	-	-
						331-340	-	0/1			
						PRSV-P	Não testado	2/2	+	+	+

*PTA-ELISA realizado para detecção do PRSV-P em plantas de abobrinha de moita cv. Caserta.

**PTA-ELISA e RT-PCR realizados para detecção do PRSV-P em plantas de mamoeiros inoculados com os extratos das plantas de abobrinha.

Tabela 2 – Análises para detecção do PRSV-P em plantas de abobrinha de moita (*C. pepo* 'Caserta') expostas em campo no segundo ensaio através da recuperação do vírus para plantas de mamoeiro e posterior detecção por meio de PTA-ELISA e RT-PCR para o gene CP e um fragmento do gene CI

Grupo de plantas	Nºmamoeiros sint./Nºmamo-eiros inoc.	PTA – ELISA*	RT-PCR*		Grupo de plantas	Nºmamoeiros sint./Nºmamo-eiros inoc.	PTA – ELISA*	RT-PCR*	
			CP	CI				CP	CI
1-10	0/3	-	}	-	161-170	0/3	-	}	-
11-20	0/3	-			171-180	0/3	-		
21-30	0/3	-			181-190	0/3	-		
31-40	0/3	-			191-200	0/3	-		
41-50	0/3	-	}	-	201-210	0/3	-	}	-
51-60	0/3	-			211-220	0/3	-		
61-70	0/3	-			221-230	0/3	-		
71-80	0/3	-			231-240	0/3	-		
81-90	0/3	-	}	-	241-250	0/3	-	}	-
91-100	0/3	-			251-260	0/3	-		
101-110	0/3	-			261-270	0/3	-		
111-120	0/3	-			271-280	0/3	-		
121-130	0/3	-	}	-	281-290	0/3	-	}	-
131-140	0/3	-			291-300	0/3	-		
141-150	0/3	-			301-310	0/3	-		
151-160	0/3	-			311-320	0/3	-		
			}	-	321-330	0/3	-	}	-
					331-340	0/3	-		
					PRSV-P	2/2	+		

*PTA-ELISA e RT-PCR realizado para detecção do PRSV-P em plantas de mamoeiros inoculados com os extratos das plantas de abobrinha.

Tabela 3 – Análises para detecção do PRSV-P em plantas de abóbora moranga (*C. maxima* 'Exposição') expostas em campo no primeiro ensaio através do teste sorológico de PTA-ELISA, recuperação do vírus para plantas de mamoeiro e posterior detecção por meio de PTA-ELISA e RT-PCR para o gene CP e um fragmento do gene CI

(continua)

Grupo de plantas	PTA-ELISA*			Nºmam. sint./Nº mamoeiros inoc.	PTA-ELISA**			RT-PCR**			Grupo de plantas	PTA-ELISA*			Nºmam. sint./Nº mam. inoc.	PTA-ELISA*			RT-PCR**		
	PRSV-W	ZYMV	ZLCV		PRSV-P	CP	CI	PRSV-W	ZYMV	ZLCV		PRSV-P	CP	CI		PRSV-W	ZYMV	ZLCV	PRSV-P	CP	CI
1-2	+	+	-	0/3	-	}	-	-	41-42	+	+	-	0/3	-	}	-	-	-			
3-4	+	+	-	0/3	-				43-44	+	+	-	0/3	-							
5-6	-	+	-	0/3	-				45-46	+	+	-	0/3	-							
7-8	-	+	-	0/3	-				47-48	+	+	-	0/3	-							
9-10	+	+	-	0/3	-				49-50	+	+	-	0/3	-							
11-12	+	+	-	0/3	-				51-52	+	+	-	0/3	-							
13-14	+	+	-	0/3	-				53-54	+	+	-	0/3	-							
15-16	-	+	-	0/3	-				55-56	+	+	-	0/3	-							
17-18	+	+	-	0/3	-				57-58	+	+	-	0/3	-							
19-20	+	+	-	0/3	-				59-60	+	+	-	0/3	-							
21-22	+	+	-	0/3	-	61-62	+	+	-	0/3	-										
23-24	-	+	-	0/3	-	63-64	+	+	-	0/3	-										
25-26	+	+	-	0/3	-	65-66	+	+	-	0/3	-										
27-28	+	+	-	0/3	-	67-68	+	+	-	0/3	-										
29-30	+	+	-	0/3	-	69-70	+	+	-	0/3	-										
31-32	+	+	-	0/3	-	71-72	+	+	-	0/3	-										
33-34	+	+	-	0/3	-	73-74	+	+	-	0/3	-										
35-36	+	+	-	0/3	-	75-76	-	+	-	0/3	-										
37-38	+	+	-	0/3	-	77-78	+	+	-	0/3	-										
39-40	+	+	-	0/3	-	79-80	+	+	-	0/3	-										

Tabela 3 – Análises para detecção do PRSV-P em plantas de abóbora moranga (*C. maxima* ‘Exposição’) expostas em campo no primeiro ensaio através do teste sorológico de PTA-ELISA, recuperação do vírus para plantas de mamoeiro e posterior detecção por meio de PTA-ELISA e RT-PCR para o gene CP e um fragmento do gene CI

(conclusão)

Grupo de plantas	PTA-ELISA*			Nºmam. sint./Nº mamoeiros inoc.	PTA-ELISA**		RT-PCR**	
	PRSV-W	ZYMV	ZLCV		PRSV-P	CP	CI	
81-82	+	+	-	0/3	-	}	-	-
83-84	-	+	-	0/3	-			
85-86	+	+	-	0/3	-			
87-88	-	+	-	0/3	-			
89-90	+	+	-	0/3	-			
91-92	-	+	-	0/3	-			
93-94	-	+	-	0/3	-			
95-96	+	+	-	0/3	-			
97	+	+	-	0/3	-			
PRSV-P	Não testado	Não testado	Não testado	1/1	+	+	+	

*PTA-ELISA realizado para detecção do PRSV-W, ZYMV e ZLCV em plantas de abóbora.

**PTA-ELISA e RT-PCR realizados para detecção do PRSV-P em plantas de mamoeiros inoculados com os extratos das plantas de abóbora.

Tabela 4 – Análises para detecção do PRSV-P em plantas de abóbora moranga (*C. maxima* 'Exposição') expostas em campo no segundo ensaio através do teste sorológico de PTA-ELISA, recuperação do vírus para plantas de mamoeiro e posterior detecção por meio de PTA-ELISA e RT-PCR para o gene CP e um fragmento do gene CI

PTA-ELISA*				PTA-ELISA**			RT-PCR**			PTA-ELISA*				PTA-ELISA**			RT-PCR**			
Abóbora	PRSV-W	ZYMV	Nºmam. sintomáticos /Nº mamoeiros inoculados	PRSV-P	CP	CI	Abóbora	PRSV-W	ZYMV	Nºmam. sintomáticos /Nº mamoeiros inoculados	PRSV-P	CP	CI	Abóbora	PRSV-W	ZYMV	Nºmam. sintomáticos /Nº mamoeiros inoculados	PRSV-P	CP	CI
1-2	+	+	0/3	-	}	- -	41-42	+	+	0/3	-	}	- -	41-42	+	+	0/3	-	}	- -
3-4	+	+	0/3	-			43-44	+	+	0/3	-									
5-6	+	+	0/3	-			45-46	+	+	0/3	-									
7-8	+	+	0/3	-			47-48	+	+	0/3	-									
9-10	+	+	0/3	-			49-50	+	+	0/3	-									
11-12	+	+	0/3	-	}	- -	51-52	+	+	0/3	-	}	- -	51-52	+	+	0/3	-	}	- -
13-14	+	+	0/3	-			53-54	+	+	0/3	-									
15-16	+	+	0/3	-			55-56	+	+	0/3	-									
17-18	+	+	0/3	-			57-58	+	+	0/3	-									
19-20	+	+	0/3	-			59-60	+	+	0/3	-									
21-22	+	+	0/3	-	}	- -	61-62	+	+	0/3	-	}	- -	61-62	+	+	0/3	-	}	- -
23-24	+	+	0/3	-			63-64	+	+	0/3	-									
25-26	+	+	0/3	-			65-66	+	+	0/3	-									
27-28	+	+	0/3	-			67-68	+	+	0/3	-									
29-30	+	+	0/3	-			69-70	+	+	0/3	-									
31-32	+	+	0/3	-	}	- -	PRSV-P	Não testado	Não testado	1/1	+	}	+ + +	PRSV-P	Não testado	Não testado	1/1	+	}	+ + +
33-34	+	+	0/3	-																
35-36	+	+	0/3	-																
37-38	+	+	0/3	-																
39-40	+	+	0/3	-																

*PTA-ELISA realizado para detecção do PRSV-W e ZYMV em plantas de abóbora.

**PTA-ELISA realizado para detecção do PRSV-P em plantas de mamoeiros inoculados com os extratos das plantas de abóbora.

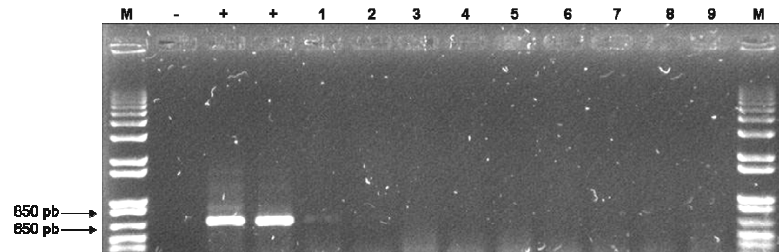


Figura 2 - Aliquotas de produtos de reações de RT-PCR para parte do gene da inclusão citoplasmática (*ci*) do *Papaya ringspot virus* – type P (PRSV-P). Gel de agarose (0,8%) corado com SYBR SAFE® e visualizado em transluminador de luz UV. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); -, controle negativo da reação (água); +, controles positivos de mamoeiros infectados com o PRSV-P; **1 a 9**, amostras de mamoeiros inoculadas com extrato foliares de *C. pepo* cv. Caserta

Nos testes de inoculação mecânica de abobrinha de moita ‘Caserta’ e abóbora moranga ‘Exposição’, realizados em casa de vegetação, nove de treze plantas (9/13) de abobrinha de moita foram infectadas com o PRSV-P, confirmadas em teste de PTA-ELISA, e sete apresentaram sintomas. Para a abóbora moranga, cinco de dezenove plantas (5/19) foram positivas para a infecção com o PRSV-P, confirmadas em teste de PTA-ELISA, porém nenhuma planta exibiu sintomas. Os mamoeiros utilizados como controles foram positivos, exibindo sintomas típicos de mosaico. Esses resultados demonstram que, de fato, estas espécies/cultivares são suscetíveis ao PRSV-P isolado do campo experimental, onde foram realizados os experimentos.

Embora não tenha sido realizado o monitoramento da presença de afídeos nos campos de abobrinha de moita e de abóbora moranga, há evidências de que esses insetos estiveram sempre presentes na área. Nos ensaios com abobrinha de moita observou-se que, por ocasião da coleta das amostras, a maioria das plantas exibia sintomas de mosaico acompanhado por bolhas e deformações foliares, típicos de infecção com o PRSV-W e/ou ZYMV, que são potyvírus transmitidos por afídeos. Também foi constatada a presença de infecção com o ZLCV, transmitido por trípes, com base na presença de plantas exibindo sintomas típicos de infecção com esse tospovírus. No ensaio com a abóbora moranga, a presença daqueles dois potyvírus foi confirmada na maioria das plantas por PTA-ELISA (tabelas 3 e 4). Ainda mais, no segundo ensaio com a abóbora moranga, oito plantas de mamoeiro expostos ao acaso foram infectadas com o PRSV-P por meio de afídeos vetores. Portanto, pode-se afirmar que as plantas das duas espécies de cucurbitáceas tiveram oportunidade de serem

visitadas por afídeos e que estes poderiam estar virulíferos com o PRSV-P, pois a fonte de inóculo estava bastante próxima (figura 1).

Os resultados desses ensaios corroboram alguns relatos anteriores nos quais não foi constatada a recuperação do PRSV-P em cucurbitáceas encontradas nas proximidades de mamoeiros com mosaico (CONOVER, 1964; BARBOSA; PAGUIO 1982). Mostraram também que a abobrinha de moita 'Caserta' é altamente suscetível ao PRSV-P em testes de inoculação mecânica, conforme relatado por diversos autores (CAPOOR; VARMA, 1958; LUQUE; MARTINÉZ, 1976; LUQUE; LÓPEZ, 1977; YEH; GONSALVES; PROVVIDENTI, 1984), porém pouco suscetível à infecção natural. A abóbora 'Exposição' por sua vez também foi suscetível à inoculação mecânica, e não à infecção natural com o PRSV-P.

Os resultados não permitem explicar a diferença entre os resultados obtidos em campo e em casa de vegetação. Uma possível explicação para a quase total ausência de infecção das plantas em campo é através da resistência de campo, que é definida como a resistência observada sob condições naturais, mas que não é detectada em condições de inoculação experimental, relacionada com a interação planta-vetor. Outra explicação é que a infecção com outros vírus que infectam cucurbitáceas, de caráter mais agressivo e predominante, interfira com o PRSV-P, não permitindo a infecção das cucurbitáceas e/ou posterior recuperação para mamoeiros.

Os resultados deste trabalho são indicativos de que a abobrinha de moita 'Caserta' e a abóbora moranga 'Exposição' podem não ser importantes fontes de inóculo do PRSV-P no estado de São Paulo, ou até mesmo em outras regiões do Brasil, devido à dificuldade de serem naturalmente infectadas com esse vírus. Novas avaliações em outras regiões geográficas, com outras espécies de cucurbitáceas e com outros isolados do vírus são necessárias para determinar a importância dessas plantas como fontes de inóculo do PRSV-P.

3.3 Conclusões

Foi possível recuperar o PRSV-P a partir de plantas de abobrinha de moita (*C. pepo* cv. Caserta) expostas à infecção natural, porém em baixa porcentagem.

Não houve recuperação do PRSV-P a partir de plantas de abóbora moranga (*C. maxima* cv. Exposição) expostas às infecções naturais.

Referências

- ADSUAR, J. **Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico.** IV: Preliminary studies on the host range of papaya mosaic. Rio Piedras: University of Puerto Rico, 1950. 5 p. (Technical Paper, 5).
- BARBOSA, F.R.; PAGUIO, O.R. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: incidência e efeito na produção do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 365-373, 1982.
- BOKX, J.A. Host and electron microscopy of two papaya viruses. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 49, p. 742-746, 1965.
- CAPOOR, S.P.; VARMA, P.M. A mosaic disease of papaya in Bombay. **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 27, p. 225-233, 1958.
- CHANG, C.A. Isolation and comparison of two isolates of *Papaya ringspot virus* in Taiwan. **Journal of Agriculture Research of China**, Taiwan, v. 28, p. 207-216, 1979.
- CHIN, M; AHMAD, M.H. *Momordica charantia* is a weed host reservoir for *Papaya ringspot virus* type P in Jamaica. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1518, 2007.
- CONOVER, R.A. A program for development of papaya tolerant to the distortion ringspot virus. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Miami, v. 89, p. 229-231, 1976.
- COOK, A.A. **Virus diseases of papaya.** Gainesville: University of Florida, Florida Agricultural Experimental Station, 1972. 19 p. (Bulletin Technical, 750).
- COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 21, p.38-43, 1969.

COSTA, C.L. As inter-relações vírus-afídeos vetores e o controle da mancha anelar do mamoeiro causado pelo *Papaya ringspot virus* – P. In: MARTINS, D.S. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. cap. 13, p. 181-191.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DEESELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses**. New York: Elsevier Academic Press, 2005. 1162 p.

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

GONSALVES, D. Control of *Papaya ringspot virus*: A case of study. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 415-437, 1998.

ISHII, M.; HOLTZMAN, O.V. Papaya mosaic disease in Hawaii. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 47, p. 947-951, 1963.

LANA, A.F. Transmission and properties of viruses isolated from *Carica papaya* in Nigeria. **Journal of Horticultural Science**, Wellesbourne, v. 55, p. 191-197, 1980.

LIMA, J.A.A.; GOMES, M.N.S. Identificação de “papaya ringspot virus” em Fortaleza, Ceará. **Fitossanidade**, Fortaleza, v. 1, p. 56-59, 1975.

LUQUE, C.S.; MARTINÉZ, G. L. Reconocimiento del virus de la mancha anular de la papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia. **Revista del Instituto Colombiano Agropecuario**, Bogota, v. 11, n. 3, p. 205-220, 1976.

LUQUE, C.S.; LÓPEZ, G.M. Identificación de plantas hospedantes del virus de la mancha anular de la papaya. **Fitopatología Colombiana**, Bogota, v. 6, p. 112-121, 1977.

MAGDALITA, P.M.; BAYOT, R.G.; VILLEGAS, V.N. *Diplocyclos palmatus* L. Jeffrey: a new weed host of Papaya ringspot virus. **Philippine Journal of Crop Science**, Manila, v. 15, p. 163-168, 1990.

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

PINTO, O.L. Identificación de las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. **Revista de la Facultad de Agricultura**, Caracas, v. 6, p. 5-36, 1972.

REZENDE, J.A.M. **Tentativas de premunização para o controle do mosaico do mamoeiro**. 1985. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

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

SOUZA Jr., M.T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV-Brazil-Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil**. 277 p. Thesis (PhD in Phytopathology) - Cornell University, Geneva, 1999.

STORY, G.E.; HALLIWEL, R.S.; SMITH, L.R. Investigación de los virus de papaya (*Carica papaya* L.) em la Republica Dominicana, com apuntes especiales sobre la asociación de um organismo del tipo mycoplasma com la enfermedad “bunchy top”. **División de Investigaciones Agrícolas**, Instituto Superior de Agricultura, Boletín n. 14, 12p., 1968.

SUREKA, S.K.; MATHUR, K; SHUKLA, D.D. Virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Udaipur. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, New Delhi, v.7, p.115-121, 1977.

TRIPATHI, S.; SUZUKI, J.Y.; FERREIRA, S.A.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus* – P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Molecular Plant Pathology**, London, v.9, p.269-280, 2008.

WANG, H.L.; WANG, C.C.; CHIU, R.J.; SUN, M.H. A preliminary study of papaya ringspot virus in Taiwan. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 20, p. 133-140, 1978.

YEH, S.D.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R. Comparative studies on host range and serology of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus* I. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1081-1085, 1984.

ZETTLER, F.W.; EDWARDSON, J.R.; PURCIFULL, D.E.. Ultramicroscopic differences in inclusions of *Papaya mosaic virus* and *Papaya ringspot virus* correlated with differential aphid transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 332-335, 1968.

4 CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO *Alfalfa mosaic virus* (AMV) EM INFECÇÃO NATURAL EM MAMOEIRO (*Carica papaya*) NO BRASIL

Resumo

Diversos vírus já foram relatados em mamoeiros (*Carica papaya*) no mundo, porém, no Brasil, apenas três foram identificados até o momento: *Papaya ringspot virus* - type P (PRSV-P), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) and *Papaya meleira virus* (PMeV). Exame de microscopia eletrônica realizado em extrato foliar de uma planta de mamoeiro cultivar Golden exibindo sintomas severos de mosaico amarelo, deformação foliar e necrose sistêmica, oriundo do campo experimental do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, revelou a presença de partículas alongadas e flexuosas, típicas do gênero *Potyvirus* e outras partículas baciliformes de tamanhos variáveis, semelhantes às do gênero *Alfamovirus*. Extrato foliar de mamoeiro infectado foi inoculado mecanicamente em mamoeiro e em onze espécies vegetais indicadoras de vírus. As seguintes plantas exibiram sintomas de lesão local (LL) e/ou sistêmicos (S): *Chenopodium amaranticolor* (LL;S), *C. quinoa* (LL;S), *Gomphrena globosa* (LL;S), *Medicago sativa* (S), *Nicotiana glutinosa* (S) e *Phaseolus vulgaris* (LL). Posteriormente, plantas de mamoeiro foram inoculadas com extrato de folhas sintomáticas de *G. globosa* e apresentaram sintomas similares aos observados no mamoeiro originalmente infectado em campo. O afídeo *Myzus persicae* foi capaz de transmitir o vírus a partir de *G. globosa* para *G. globosa*, mamoeiro, *M. sativa* e *N. glutinosa*. Todas as plantas-teste foram analisadas por PTA-ELISA com antissoro para a detecção do *Alfalfa mosaic virus* (AMV) e a reação sorológica foi positiva. O AMV foi parcialmente purificado a partir de folhas de *G. globosa* com lesões locais. O RNA viral extraído de plantas de mamoeiro e *G. globosa* foi utilizado em reação de transcrição reversa seguida de amplificação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para uma melhor identificação e caracterização do vírus. Para a RT-PCR usou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplifica um fragmento de 669 nucleotídeos na região que codifica a síntese da proteína capsidial do AMV. A identidade do isolado foi confirmada com a análise de sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados por RT-PCR. Análises de sequências indicaram 97-98% de identidade com a sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do AMV depositadas no GenBank. A sequência de amino ácidos deduzidos também apresentou 98% de identidade com a da proteína capsidial do AMV. Posteriormente, uma nova análise sorológica por PTA-ELISA e RT-PCR foi realizada para todos os mamoeiros presentes no campo experimental (48 plantas) em que o mamoeiro originalmente infectado foi encontrado. A presença do AMV foi detectada em mais uma planta no campo. Este é o primeiro relato de infecção natural de mamoeiro pelo AMV.

Palavras-chave: *Alfamovirus*; Diagnose; RT-PCR, PTA-ELISA; Sequência de nucleotídeos; Sequência de amino ácidos

Abstract

Viruses are the major disease problem in papaya (*Carica papaya*). Although different viruses have been described in papaya worldwide, only three have been identified, up to now, naturally infecting this plant in Brazil: *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), Papaya lethal yellowing virus (PLYV) and Papaya meleira virus (PMeV). An electron microscopy (EM) exam of leaf extract from one papaya plant of an experimental field in Piracicaba, São Paulo State, exhibiting severe yellow leaf mosaic, leaf distortion and systemic necrosis, revealed the presence of potyvirus-like particles and bacilliform particles of varying sizes, similar to those of the *Alfamovirus* genus. Leaf sap from symptomatic papaya was mechanically inoculated onto health papaya plants and eleven other species of virus indicator hosts. The following plants showed local lesions (LL) and/or systemic infection (S): *Chenopodium amaranticolor* (LL;S), *C. quinoa* (LL;S), *Gomphrena globosa* (LL;S), *Medicago sativa* (S), *Nicotiana glutinosa* (S) and *Phaseolus vulgaris* (LL). Papaya plants were later inoculated with leaf sap from *G. globosa*. All papaya test-plants developed similar symptoms observed in the field. All symptomatic plants were evaluated with antiserum against *Alfalfa mosaic virus* (AMV) by PTA-ELISA and the reaction was positive. Transmission EM of thin section from symptomatic leaves of *G. globosa* and papaya showed the presence of bacilliform particles of varying sizes in the cells, as before. *G. globosa* leaves exhibiting local lesions were used for partial purification of the virus. Specific pair of primers designed to amplify the coding region of the coat protein gene of AMV (669 nucleotide) was used for a RT-PCR for further identification of the virus from total RNA of *C. papaya* and *G. globosa*. The identity of this isolate was confirmed by sequence analysis of the amplicons in both directions using the same primer set. Sequence analysis indicated that the nucleotide and the amino acid deduced sequences showed identity of 97-98% and 97-98%, respectively, with sequence of the CP gene of AMV. Aphid transmission showed *Myzus persicae* was able to transmit the virus from *G. globosa* to *G. globosa*, papaya, *M. sativa* and *N. glutinosa* plants. Further, a new serological analysis by PTA-ELISA and RT-PCR was done for all papaya plants in the experimental field (48 plants) where the original infected papaya plant was found. The presence of the AMV was detected in one more plant in the field throughout this analysis. This is the first report of AMV naturally infecting papaya plants in Brazil.

Keywords: *Alfamovirus*; Diagnose; RT-PCR; PTA-ELISA; Nucleotide sequence; Amino acid sequence; Molecular characterization

4.1 Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma fruteira de alto valor nutricional e econômico, cultivada em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Como inúmeras outras espécies vegetais exploradas economicamente pelo homem, a cultura do mamoeiro pode ser prejudicada por pragas que reduzem a longevidade das plantas, bem como a

produção quantitativa e qualitativa de frutos. Entre essas pragas encontram-se os vírus, cujo número ultrapassa dez espécies até então encontradas em mamoeiro em diferentes países (COOK; ZETTLER, 1960, WAN; CONOVER, 1981; LORETO et al., 1983; GONSALVES; TRUJILLO, 1986; KITAJIMA et al., 1991; REZENDE; FANCELLI, 1997; SAXENA et al., 1998; LIMA et al., 2001; ZAMBOLIM-MACIEL et al., 2003; WANG et al., 2004; SING et al., 2007). Entre esses vírus, sem dúvida alguma, o mais importante é o do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* – type P – PRSV-P). Esse vírus pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* e parece ter sido relatado pela primeira vez em mamoeiros na Jamaica em 1928 (SMITH, 1929). A sua constatação no Brasil deu-se em 1969 na região de Monte Alto, SP (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969) de onde se disseminou posteriormente para outros estados e hoje ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de mamão no país. Além desse potyvirus, os mamoeiros, em algumas regiões do Brasil, podem ser afetados pelos vírus do amarelo letal (LORETO et al., 1983; KITAJIMA et al., 1992; LIMA; LIMA; MARQUES, 1994) e da meleira (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003; ARAÚJO et al., 2007). Há também o relato da recuperação do vírus da necrose do fumo (*Tobacco necrosis virus*- TNV) em raízes de plantas assintomáticas (COSTA; CARVALHO, 1960).

Em 2007, no campo experimental do Setor de Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, em um ensaio de mamoeiro cv. Golden foi identificada uma planta com sintomas bastante distintos daqueles causados pelo PRSV-P, caracterizados principalmente por intenso mosaico amarelo, distorção foliar e necrose sistêmica (figura 1). Observaram-se também estrias oleosas na haste da planta e nos pecíolos das folhas. Análises preliminares de microscopia eletrônica e teste sorológico de PTA-ELISA revelaram tratar-se de infecção mista do PRSV-P e o vírus do mosaico da alfafa (*Alfalfa mosaic virus* - AMV).

O AMV é a espécie tipo do gênero *Alfavirus*, família *Bromoviridae* (FAUQUET et al., 2005) sendo distribuído mundialmente. Esse vírus possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo capaz de infectar naturalmente muitas espécies herbáceas e algumas espécies lenhosas (150 espécies em 22 famílias). Experimentalmente, já foi transmitido para mais de 430 espécies de 51 famílias de dicotiledôneas (JASPARS;

BOS, 1980). Pelo fato de infectar diversas espécies vegetais, o AMV pode causar diversos tipos de sintomas, havendo espécies em que a infecção é assintomática como em *Arabidopsis thaliana* (BALASUBRAMANIAM et al., 2006). Os sintomas induzidos pelo AMV podem ser de mosaico, amarelecimento, má formação e mosqueado foliar em alfafa (*Medicago sativa*), mosaico cálico, amarelecimento foliar e necrose de tubérculos em batata (*Solanum tuberosum*), amarelecimento em folhas de ervilha (*Pisum sativum*), necrose severa em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), sintomas variados em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* e *N. glutinosa*). Algumas plantas, como *N. glutinosa*, podem exibir remissão de sintomas após invasão sistêmica. (JASPARS; BOS, 1980). No Brasil, o AMV já foi relatado em plantas de alfafa, causando estrias amarelas longitudinais nas folhas, em soja induzindo mosaico cálico, intenso amarelecimento foliar e redução no crescimento das plantas e em trevo (OLIVEIRA; KIMATI; CORSI, 1986; ALMEIDA et al., 1981; KITAJIMA et al., 1985).



Figura 1 – **A**, Vista parcial do campo experimental do Setor de Fitopatologia com planta de mamoeiro (*Carica papaya*) infectada com AMV, exibindo acentuado sintoma de mosaico amarelo; **B** – **E**, Detalhes de folhas com sintomas de deformação, necrose sistêmica e mosaico amarelo

O vírus do mosaico da alfafa é transmitido de forma não-persistente por dezesseis espécies de afídeos, inclusive *Myzus persicae* (GARRAN; GIBBS, 1982). Também pode ser transmitido por pólen e sementes em algumas espécies vegetais (VALKOVENEM; PEHU; WATANABE, 1992). O AMV possui partículas do tipo baciliforme de 18 a 19 nm de diâmetro e comprimento variável de 30 a 57 nm (HULL, 2002). O genoma do AMV é tripartido (figura 2), constituído de três moléculas de RNA fita simples, sentido positivo, convencionalmente denominadas de RNA 1 a 3, separadamente protegidas por capas protéicas constituídas por capsômeros de 24 kDa. Os RNAs 1 e 2 codificam proteínas da replicase viral (P1 e P2), enquanto o RNA 3 dicistrômico codifica a proteína de movimento e, através de um RNA subgenômico (RNA 4), a proteína capsidial. O RNA 4 possui aproximadamente 876 nucleotídeos. As três moléculas de RNA compartilham uma seqüência idêntica de aproximadamente 145 nucleotídeos na extremidade 3'. Todos os RNAs são capeados na extremidade 5' e, na extremidade 3' possui uma estrutura complexa do tipo aminoacil-tRNA (HULL, 2002; FAUQUET et al., 2005). Estudos de análises filogenéticas e de evolução, baseados na seqüência de nucleotídeos, sugerem que o AMV seja incluído no gênero *Ilarvirus* e não faça mais parte do gênero *Alfavirus* (CODOÑER; ELENA, 2006).

Este trabalho teve por objetivo a caracterização biológica, sorológica e molecular do isolado do AMV encontrado infectando naturalmente planta de mamoeiro.

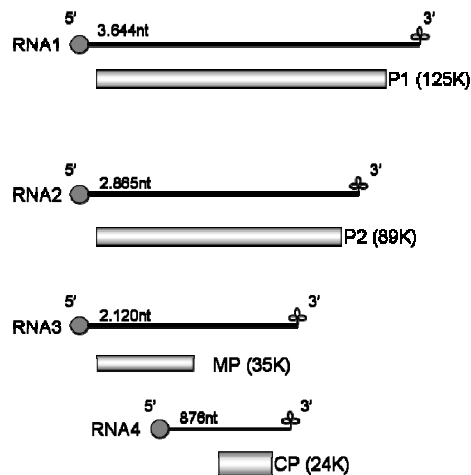


Figura 2 - Representação esquemática do genoma do *Alfalfa mosaic virus* (AMV), composto por três moléculas de RNA fita simples sentido positivo (+ssRNA), capeado na extremidade 5' (M^7G^5ppp) e contendo uma estrutura complexa do tipo aminoacil-tRNA (-AUGC-OH) na extremidade 3'. O RNA4 é produto subgenômico do RNA3. As caixas representam as proteínas codificadas pelos respectivos RNAs e os números entre parênteses representam os pesos moleculares destas proteínas

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

4.2.1.1 Fontes do vírus e manutenção dos isolados

Inicialmente utilizou-se o isolado do AMV obtido de uma planta de mamoeiro infectada naturalmente no campo experimental do setor de Fitopatologia, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em março de 2007. O vírus foi frequentemente propagado em plantas de *Gomphrena globosa* através de inoculação mecânica. O inóculo foi preparado na diluição de 1:10 (p:v) em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M. Como abrasivo foi usado o carbureto de silício (Carborundum), grão 320. As folhas inoculadas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo.

Também foi obtido um isolado do AMV em plantas de alfafa (*Medicago sativa*) na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA CNPGL), São Carlos, SP. Esse isolado foi mantido em plantas de alfafa e *G. globosa* conforme descrito no parágrafo anterior.

4.2.1.2 Teste de gama de hospedeiros

Os testes para a determinação parcial da gama de hospedeiros do isolado do AMV foram realizados por inoculação mecânica. As plantas-teste utilizadas foram: *Carica papaya*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucurbita pepo* ‘Caserta’, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Medicago sativa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* ‘TNN’, *N. tabacum* ‘Havana’, *Phaseolus vulgaris* e *Solanum lycopersicum*. As plantas foram obtidas em vasos de alumínio contendo uma mistura de terra e esterco e mantidas em casa de vegetação.

A avaliação da infecção das plantas foi realizada através da observação visual de sintomas e confirmada por teste sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (MOWAT; DAWSON, 1987), com modificações. Em algumas plantas a infecção também foi confirmada por

recuperação do vírus para plantas de *G. globosa* e *C. amaranticolor* por meio de inoculação mecânica. Posteriormente, todas as plantas do campo experimental foram avaliadas pelo método PTA-ELISA e as plantas que apresentaram as dez maiores leituras foram analisadas por RT-PCR.

Para o teste sorológico foi utilizado antissoro específico contra a proteína capsidial do AMV, gentilmente cedido pelo professor Dr. Herman B. Scholthof, Texas A&M University, College Station, TX, EUA.

As amostras foram maceradas em tampão carbonato de sódio (15 mM Na₂CO₃; 35 mM, NaHCO₃ e 3 mM NaN₃, pH 9,6). Foram colocados 100 µl das amostras, diluídas 1:50 (p:v) em placas de ELISA de 96 cavidades e posteriormente incubadas por 15 minutos a 37°C. Foram utilizadas duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4PBS + 0,05% Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µl do antissoro diluído (1:1000) em tampão PBS-TPB (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000 + 0,2% Bovine Serum Albumin). As placas foram incubadas por duas horas a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito. Foram colocados 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-80225) diluídos 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubadas novamente por duas horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, em cada cavidade foram colocados 100 µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942) diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA, marca Metertech Σ960, utilizando-se um filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedeu em duas a três vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

4.2.1.3 Microscopia eletrônica

Exame preliminar de microscopia eletrônica foi realizado com extrato foliar do mamoeiro infectado em contrastação negativa (“leaf dip”). Inicialmente, sobre uma gota

de extrato foliar foi colocada uma telinha de microscopia eletrônica de transmissão. Depois de 3 a 5 minutos a telinha foi removida e lavada três vezes em água destilada. A contrastação foi feita com acetato de uranila 1% durante 3 a 4 minutos. A telinha foi examinada em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

Análises posteriores foram feitas em cortes ultrafinos de tecidos foliares de plantas doentes de mamoeiro, *G. globosa* e *C. amaranticolor*. Nesses casos, fragmentos foliares de 1 a 3 mm² foram pré-fixados em solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato ou fosfato 0,05 M, pH 7,2) por pelo menos 60 minutos. Promoveu-se a lavagem dos tecidos pré-fixados em tampão cacodilato 0,05 M por 10 minutos, três vezes consecutivas. Para pós-fixação utilizou-se Tetróxido de ósmio (O₃O₄ 1%) em tampão cacodilato 0,05 M por 1 a 2 horas. Decorrido este período, lavou-se a amostra com água destilada, fixando-a com acetato de uranila por aproximadamente 16 horas. A amostra fixada foi desidratada em acetona (uma vez por 10 minutos, em acetona 30, 50, 70, 90%, respectivamente, e três vezes por 10 minutos em acetona 100%) e filtrada com mistura 1:1 de acetona:Spurr por 3 a 4 horas e, posteriormente, apenas com Spurr por aproximadamente 16 horas. O tecido fixado foi colocado em formas de silicone cheias de resina Spurr pura, cuja polimerização foi feita em estufa 70°C durante 48 horas.

Obtiveram-se cortes ultrafinos (50 – 100 nm) em ultramicrotomo (Reicher, Ultracut E) através de navalha de diamante (Diatone). Estes foram colocados em telinhas de microscopia eletrônica de transmissão, contrastando-se as secções em acetato de uranila 3% por 15 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. As telinhas foram lavadas através da imersão em água destilada, repetindo-se o procedimento três vezes consecutivas. Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4.2.1.4 Purificação do vírus do mosaico da alfafa

Para a purificação do isolado do AMV obtido de mamoeiro foi utilizado o método descrito por Dijkstra e Jager (1998) com algumas alterações, sendo o vírus multiplicado em plantas de *G. globosa*. A purificação foi realizada a partir de lesões locais de folhas

infectadas, 10 dias após a inoculação mecânica das plantas, totalizando 65 gramas de tecido foliar.

Fragments foliares com lesões locais foram trituradas em liquidificador, na presença de uma parte de tampão de extração (0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M ácido ascórbico, 0,02 M Na_2 -EDTA, pH 7,2) e uma parte de clorofórmio:butanol (1:1). O produto homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 7.000 g por cinco minutos. Ao sobrenadante foi adicionada uma solução de 30% de PEG 20.000 em água destilada, para uma concentração final de 5%. Promoveu-se uma agitação por 25 minutos a 4°C seguida por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,01 M, contendo ácido ascórbico 0,01M e Na_2 -EDTA 0,001 M, pH 7,0, na proporção 1/10 do volume do sobrenadante. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi colhido e centrifugado a 64.000 g por duas horas. O precipitado resultante foi dissolvido por aproximadamente 16 horas, a 4°C, no mesmo tampão mencionado. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi colocado sobre um colchão de gradiente de sacarose (6, 10, 20 e 30%) em tampão fosfato. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação de 83.000 g por três horas. A banda correspondente ao vírus foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e submetida a uma centrifugação de 64.000 g por três horas. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato. Em seguida, fez-se uma diálise em membrana de celulose (10 mm x 6 mm) e o produto final foi armazenado a -20°C em tampão de armazenamento (tampão fosfato 0,01 M, contendo Na_2 -EDTA 0,01 M, pH 7,0).

4.2.1.5 Teste de transmissão por afídeos

Testes de transmissão do isolado do AMV com afídeos foram conduzidos com a espécie *Myzus persicae*. A colônia livre de vírus deste afídeo foi mantida em plantas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) acondicionadas em gaiolas à prova de insetos, em condição de casa de vegetação. A colônia foi gentilmente cedida pelo Dr. Valdir A. Yuki, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas, SP).

Para os testes de transmissão, os afídeos foram removidos das folhas das plantas com o auxílio de um pincel fino e macio. Depois de coletados foram mantidos

em jejum, numa caixa plástica, por um período de aproximadamente 30 minutos. A seguir foram colocados sobre folhas de plantas de *G. globosa* infectadas com o AMV. O período de aquisição foi de aproximadamente 30 minutos, quando os afídeos foram transferidos com o auxílio do pincel para as folhas das plantas-teste de *C. papaya*, *G. globosa*, *M. sativa* e *N. glutinosa*, em número de trinta afídeos por planta. O período de inoculação foi de aproximadamente 24 horas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, do setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, para posteriores avaliações de sintoma e indexação por RT-PCR.

4.2.1.6 RT-PCR

Realizou-se a extração de RNA total de folhas de plantas de mamoeiro, *G. globosa* e *M. sativa* utilizando-se o produto Trizol® LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das folhas. Para reação de transcrição reversa (“reverse transcription”), inicialmente 3 µl de suspensão de RNA total, diluído em água “Milli-Q” previamente tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC), foram misturados a 1 µl do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) antissenso (20 mM) originário da região do genoma que codifica a proteína capsial do AMV (5’–TCAATGACGATCAAGATCGTC–3’) que anela nos nucleotídeos 1.838-1.858 do RNA 3 (XU; NIE, 2006). Foram adicionados também 1 µl de dNTP’s (dATP, dGTP, dCTP e dTTP - 10 mM) e 12 µl de água “Milli-Q” tratada com DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por cinco minutos e posteriormente mantida a 2°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µl do tampão 5X da enzima transcriptase reversa, 2 µl de ditiotretol (DTT) 0,1 M e 200 unidades da enzima M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*). Essa solução foi incubada a 37°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e mantida a 4°C.

Esse cDNA sintetizado foi utilizado em uma reação de PCR (“polymerase chain reaction” – reação em cadeia da polimerase). Para isso, 3 µl do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µl de tampão 10X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 0,8 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,8 µl do *primer* senso (20 mM), 0,8 µl do *primer* anti-senso (20 mM), 1,5 µl de mistura de

dNTP's (10 mM), 1,2 unidades de Taq DNA Polimerase e 14,3 µl de água "Milli-Q". O *primer* senso utilizado para a detecção do AMV (5'-ATCATGAGTTCTTCACAAAAGAA-3') foi descrito por Xu e Nie (2006), que anela nos nucleotídeos 1.190-1.212 do RNA 3. O regime do termociclador foi de três minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, finalizado com 72°C por 10 minutos e posterior resfriamento a 4°C. Uma alíquota do produto da RT-PCR foi visualizada em gel de agarose a 0,8%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen) em 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,3), com auxílio de um transluminador de luz UV, observando-se um fragmento de 669 nucleotídeos.

4.2.1.7 Sequenciamento direto do produto da RT-PCR e análise filogenética

Os fragmentos dos produtos da RT-PCR obtidos a partir do RNA total de duas plantas de mamoeiro e de duas plantas de *G. globosa* infectadas com o AMV isolado originalmente de mamoeiro e de duas plantas de alfafa e duas plantas de *G. globosa* infectadas com o AMV isolado de alfafa foram purificados com o kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Esses fragmentos foram submetidos a outra reação de PCR, com duas repetições por amostra, utilizando-se o kit Dyenamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech), contendo o par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da proteína capsidial do AMV, seguindo as instruções do fabricante. A reação de amplificação foi realizada com 400-500 ng de DNA, 5 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 4,0 µL de Dyenamic, num volume final de 10 µL em água Milli-Q estéril. O regime do termociclador foi de 30 ciclos de 1 minuto e 35 segundos, divididos em 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 5 minutos a 4°C. Ao conteúdo dos tubos foram acrescentados 1 µL de solução de acetato de sódio/EDTA (NaC₂H₃O₂ 1,5 M, pH 8,0, EDTA 250 mM) e 40 µL de etanol 95% para a precipitação dos dNTP's não incorporados na reação de amplificação. A mistura foi colocada no escuro por 20 minutos e, em seguida, centrifugada a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 250 µL de etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 g por 5 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foi dissolvido em 4 µL de tampão de carregamento. O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ de acordo com os protocolos descritos nos kits utilizados no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, da ESALQ/USP.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas pelos programas Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, COPERT, 1988) e Electropherogram Quality Analysis - Phred-Phrap (<http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>) para a obtenção da sequência consenso. A sequência consenso de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foram comparadas às sequências de outros isolados do AMV depositadas no banco de dados do GenBank, acessado pelo National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa BLAST. O relacionamento filogenético do isolado do AMV oriundo de mamoeiro e outros isolados do AMV foi deduzido pelo método “neighbor joining” com bootstrap de 2.000 repetições através do programa MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net>).

4.2.2 Resultados e discussão

4.2.2.1 Teste de gama de hospedeiros

A relação das espécies vegetais inoculadas mecanicamente com o isolado do AMV obtido de mamoeiro e as respectivas reações encontram-se na tabela 1. Os sintomas apareceram 7 a 18 dias após a inoculação. Das doze espécies inoculadas, apenas *Carica papaya*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Medicago sativa*, *Nicotiana glutinosa* e *Phaseolus vulgaris* foram infectadas. Todas as espécies infectadas apresentaram sintomas sistêmicos, exceto *P. vulgaris* ‘BT-2’, *P. vulgaris* ‘Mulato’ e *P. vulgaris* ‘Preto’ (figura 3 A-I). Esses resultados corroboram dados da literatura relativos aos sintomas induzidos pelo AMV nestas espécies vegetais, com exceção para o mamoeiro (JASPARS; BOS, 1980).

As plantas de mamoeiro inoculadas apresentaram sintomas similares aos observados na planta originalmente infectada em campo (figuras 3 A e B). Também se constatou remissão de sintomas e posterior reaparecimento desses, como na planta originalmente infectada em campo. Testes de inoculação mecânica em mudas sadias de mamoeiros, realizados a partir de extrato de *G. globosa* infectada mostraram um atraso no surgimento dos sintomas de aproximadamente 15 dias em relação à inoculação com o extrato do mamoeiro originalmente infectado. A hipótese de que o vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus* – type P, PRSV-P), presente na amostra original do campo, estaria contribuindo para o surgimento dos sintomas foi levantada. Um teste de inoculação mecânica do AMV sozinho e em conjunto com o PRSV-P foi realizado e observou-se que, de fato, quando o PRSV-P foi inoculado juntamente com o AMV os sintomas progrediram mais rapidamente (dados não mostrados). Também foi efetuada a inoculação mecânica a partir do purificado viral e de RNA viral em plantas de mamoeiro, alfafa e de *G. globosa*. Todas foram infectadas (dados não mostrados).

Tabela 1 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com o isolado do AMV causador de mosaico amarelo, deformação foliar e necrose sistêmica em mamoeiro

Família	Espécie	No. de plantas infectadas/No. de plantas inoculadas	Sintomas locais	Sintomas sistêmicos
Amarathaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	4/4	LLC	MF
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	3/3	As	MF, DF, NS
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	3/3	LLC	MF
	<i>C. quinoa</i>	3/3	LLC	MF
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> 'Caserta'	0/3	As	As
Fabaceae (Leguminosae-Papilionoideae)	<i>Phaseolus vulgaris</i> 'BT2'	3/3	LLN	As
	<i>P. vulgaris</i> 'Mulato'	3/3	LLN	As
	<i>P. vulgaris</i> 'Preto'	3/3	LLN	As
	<i>Medicago sativa</i>	1/18	LLC	MF, M
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	0/3	As	As
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	3/3	LLC	MF, DF, NS
	<i>N. tabacum</i> 'Havana'	0/3	As	As
	<i>N. tabacum</i> 'TNN'	3/3	As	As
	<i>Solanum lycopersicum</i>	0/2	As	As

(As) ausência de sintomas; (LLN) lesões locais necróticas; (LLC) lesões locais cloróticas; (MF) mosaico foliar; (M) manchas foliares; (DF) deformações foliares; (NS) necrose sistêmica.

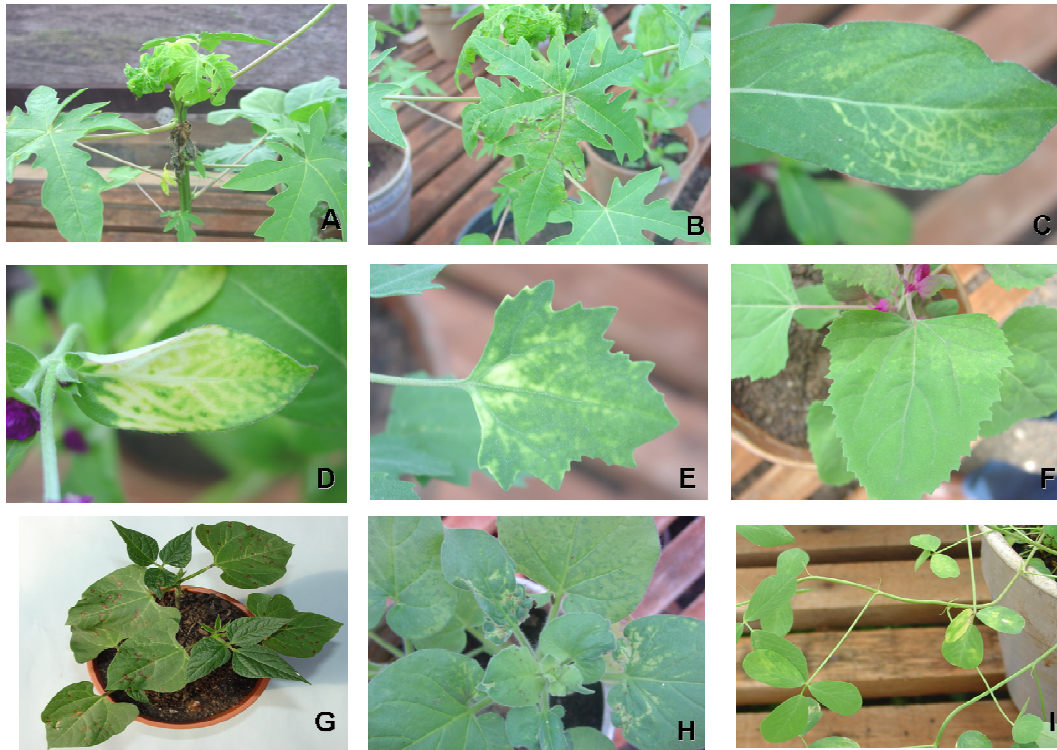


Figura 3 – Sintomas foliares induzidos pelo isolado do AMV de mamoeiro inoculado mecanicamente. **A e B**, *C. papaya* com sintomas de mosaico, deformação foliar e necrose sistêmica; **C e D**, *G. globosa* com mosaico nas nervuras inicial e tardiamente, respectivamente; **E**, *C. quinoa* com mosaico; **F**, *C. amaranticolor* com mosaico; **G**, *P. vulgaris* 'BT2' com lesão local necrótica; **H**, *N. glutinosa* com mosaico, deformação foliar e necrose sistêmica; **I**, *M. sativa* com mosaico amarelo e manchas foliares

Observou-se que apenas uma planta de alfafa (1/18) foi infectada mecanicamente com esse isolado do AMV. Tal ocorrência pode ser causada pela origem do isolado viral, proveniente de mamoeiro, ou algum efeito inibidor do extrato da planta utilizada como inóculo. Os isolados provenientes de alfafa também tiveram baixa taxa de infecção em mamoeiro, infectando duas plantas em oito inoculadas mecanicamente em casa de vegetação. Os mamoeiros infectados, no entanto, exibiram sintomas semelhantes aos induzidos pelo isolado do AMV obtido de mamoeiro, aproximadamente 28 dias após inoculação (figura 4). A infecção foi confirmada por reação de RT-PCR (dados não mostrados). Estes isolados também foram capazes de infectar plantas de *G. globosa* e de alfafa.

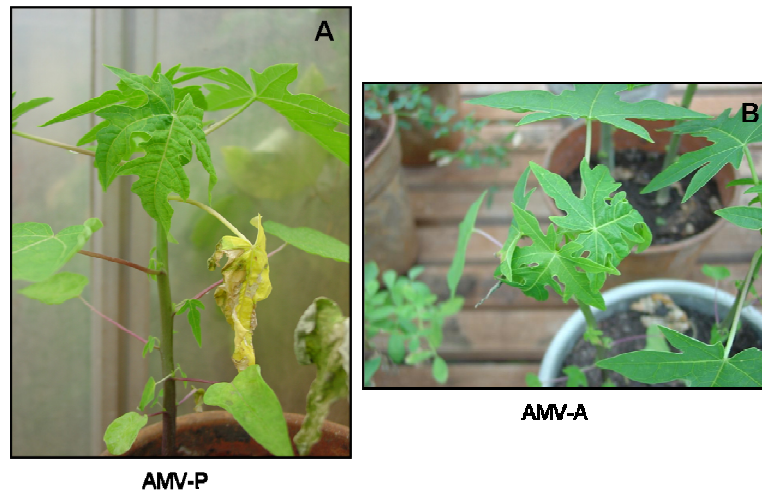


Figura 4 – Sintomas foliares induzidos pelo AMV em mamoeiros. **A**, *C. papaya* inoculado com o isolado de AMV de mamoeiro (AMV-P) apresentando sintomas de mosaico e deformação foliar; **B**, *C. papaya* inoculado com o isolado de AMV de alfafa (AMV-A) apresentando sintomas similares de mosaico e deformação foliar

4.2.2.2 Microscopia eletrônica

Exame de microscopia eletrônica por contrastação negativa de extratos de mamoeiro originalmente infectado em campo, revelou partículas do tipo bastonetes de tamanhos variados, com 18 a 19 nm de diâmetro e comprimento entre 30 a 57 nm, típicas do gênero *Alfamovirus* e também partículas do tipo alongadas e flexuosas com comprimento médio de 800 nm e 12 nm de diâmetro, características do gênero *Potyvirus* (figura 5D).

Exames de cortes ultrafinos de tecidos foliares de mamoeiro, *G. globosa* e *C. amaranticolor* infectados sistemicamente com o isolado do AMV, proveniente de mamoeiro, revelaram a presença do mesmo tipo de partículas típicas do gênero *Alfamovirus* (figura 4). Com este resultado foi possível aferir que a espécie *G. globosa* era a espécie ideal para a propagação e purificação deste vírus. As análises realizadas do purificado viral revelaram partículas com as mesmas morfologias daquelas encontradas em constratação negativa de extrato foliar.

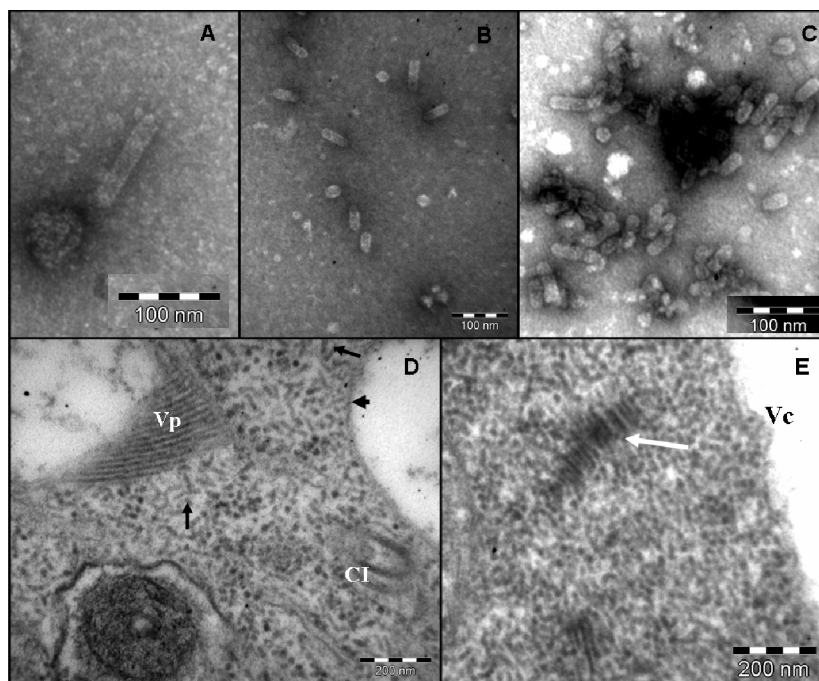


Figura 5 – Micrografia eletrônica de transmissão (MET) do isolado do AMV proveniente de mamoeiro. **A**, Partículas do tipo bastonete em folha de mamoeiro originalmente infectada com o AMV; **B**, Partículas do AMV em alta concentração no extrato foliar de plantas de *C. amaranticolor*; **C**, Partículas do AMV em suspensão do purificado viral; **D e E**, Cortes ultrafinos de secção de folhas de infectadas com o AMV; **D**, Mamoeiro infectado em campo com o PRSV-P e o AMV. Partículas tipo bastonetes são observadas no citoplasma (seta) de uma célula parenquimática e partículas do PRSV-P (Vp) e uma pequena parte de uma inclusão citoplasmática (CI) típica de infecção por potyvírus; **E**, Seção de parênquima foliar de *C. amaranticolor* com alta concentração de partículas típicas de AMV, algumas vezes formando agregados (seta) no citoplasma. Vc, vacúolo. (Fotos: Elliot W. Kitajima, NAP/MEPA ESALQ/USP)

4.2.2.3 Teste de transmissão por afídeos

Afídeos da espécie *M. persicae* foram capazes de transmitir o isolado do AMV de mamoeiro a partir de plantas de *G. globosa* para mamoeiro, alfafa, *N. glutinosa* e *G. globosa* (tabela 2), porém em baixa porcentagem.

Tabela 2 – Teste de transmissão do AMV (*Alfalfa mosaic virus*) isolado de mamoeiro a partir de plantas de *Gomphrena globosa* com o afídeo *Myzus persicae*

Espécie vegetal	No. de plantas infectadas/No. de plantas testadas
<i>Carica papaya</i>	1/7
<i>Gomphrena globosa</i>	2/3
<i>Medicago sativa</i>	1/8
<i>Nicotiana glutinosa</i>	1/3

4.2.2.4 Análises moleculares: RT-PCR, sequenciamento e análise filogenética

Reações de RT-PCR a partir de RNA total extraído de plantas de mamoeiro e de *G. globosa* infectadas com o isolado do AMV obtido de mamoeiro, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores descritos por Xu e Nie (2006), amplificaram um fragmento de 669 nucleotídeos na região do genoma que codifica a proteína capsial (figura 6).

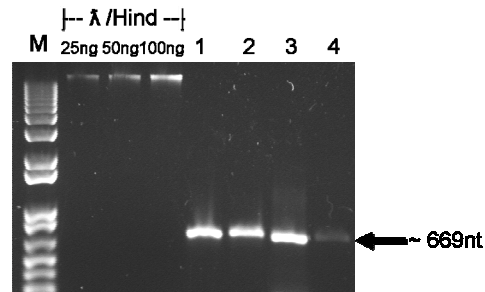


Figura 6 – Alíquotas de produtos de reações de RT-PCR para o gene da proteína capsial (*cp*) do *Alfalfa mosaic virus* (AMV) isolado de mamoeiro. Gel de agarose (0,8%) corado com SYBR SAFE® e visualizado em transluminador de luz UV. **M.** Marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”). **□/***Hind*. Marcador de peso molecular com massas de 25, 50 e 100 ng, respectivamente. **1 e 2.** Amostras de *G. globosa* infectada (3 µl). **3.** Amostra de mamoeiro original infectado em campo (3 µl). **4.** Amostra de mamoeiro infectado em casa de vegetação (3 µl)

Os RNAs totais extraídos de plantas de alfafa naturalmente infectadas com o isolado do AMV de alfafa e de plantas de *G. globosa* infectadas com este mesmo isolado, também foram submetidos a reações de RT-PCR utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descritos por Xu e Nie (2006). Também houve amplificação de um fragmento de 669 nucleotídeos na região do genoma que codifica a proteína capsial.

Estes *amplicons* foram submetidos ao sequenciamento direto, utilizando-se o mesmo par de *primers* da reação de amplificação. As sequências consenso de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos (figuras 7 e 8) foram comparadas com as respectivas sequências de outros isolados do AMV depositadas no GenBank e os resultados estão na tabela 3. As identidades nas sequências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos da proteína capsial oscilaram entre 97 e 98%, dependendo do isolado utilizado para comparação. De acordo com o oitavo relatório do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (FAUQUET et al., 2005), não há critério bem definido para demarcação de espécie dentro do gênero *Alfamovirus*, uma

vez que o AMV é espécie única nesse gênero. No entanto, a alta porcentagem de identidade encontrada na sequência de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos da proteína capsidial, em conjunto com a morfologia das partículas e a reação sorológica com antissoro contra o AMV são indicativos de que se trata de um isolado desse vírus.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos isolados brasileiros provenientes de mamoeiro e de alfafa apresentaram uma alta identidade entre elas (tabela 3).

A.

```
>CGTTCTCAGAACTATGCTGCTCTGCGCAAAGCTCAACTGCCGAAACCTCCGGCGTTGAAAGTCCCG
GTTGCAAACCCGACGAATACTATACTGCCACAGACGGGCTGCGTGTGGCAAAGCCTTGGGACCCCT
CTGAGTCTGAGCTCTTTTAATGGGCTCGGCGTGAGATTCTCTACAGTTTTCTGAAGGATTTGCGGG
GACCTCGGATCCTCGAAGAGGATCTGATTTACAGGATGGTGTCTATAACACCGTCCCATGCCGG
CACCTTTTGTCTCACTGATGACGTGACGACTGAGGATGGTAGGGCCGTTGCGCATGGTAATCCCATG
CAAGAATTTCTCAAGGCGTGTTCACGCCAATGAGAAGTTCGGGTTTGAGTTGGTCTTCACAGCTCC
TACCCATGCGGGAATGCAAATCAAAATTTAAGCATTCTATGCCGTAGCCCTCTGTTTGGACTTCG
ATGCGCAGCCTGAGGGATCTAAAAATCCCTCATACCGATTCAACGAAGTTTGGGTGAGAGAAAGGC
GTTCCCGCAGCAGGGCCCCTCCGCAGTTTGATTACTGTGGGGCTGCTCGAAGAACTGACGATCT
TG
```

B.

```
>TCATGAGTTCTTCACAAAAGAAAGCTGGTGGGAAAGCTGGTAAACCTACTAAACGTTCTCAGAACTA
TGCTGCCTTGCCAAAGCTCAACTGCCGAAAGCCTCCGGCGTTGAAAGTCCCGGTTGTAAAACCGAC
GAATACTATACTGCCACAGACGGGCTGCGTGTGGCAAAGCCTCGGGACCCCTCTGAGTCTGAGCTC
TTTTAATGGGCTCGGCGTGAGATTCTCTACAGTTTTCTGAAGGATTTGCGGGACCTCGGATCCTC
GAAGAGGATCTGATTTACAGGATGGTGTCTTCCATAACACCGTCCCATGCCGGCACCTTTTGTCTCAC
TGATGACGTGACGACTGAGGATGGTAGGGCCGTTGCGCATGGTAATCCCATGCAGGAATTTCTCAA
GGCGTGTTCACGCTAATGAGAAGTTCGGGTTTGAGTTGGTCTTCACAGCTCTACCCATGCCGGGAA
TGCAAATCAAAATTTCAAGCATTCTATGCCGTAGCCCTCTGTCTGGACTTCGACGCGCAGCCTGA
GGGATCTAAAAATCCCTCATACCGATTCAACGAAGTTTGGGTGAGAGAAAGGCGTTCCCGCAGCA
GGGCCCTCCGCAGTTTGATTACTGTGGGGCTGCTCGACGAAGCTGACGATCTTGATCGTCATTGA
```

Figura 7 – Sequência parcial de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do AMV. **A**, isolado de mamoeiro (604 nt); **B**, isolado de alfafa (668 nt)

A.

```
>RSQNYAALRKAQLPKPPALKVPVAKPTNTILPQTGCVWQSLGTPLSLSSFNGLGVRFLYSFLKDFAGPRI
LEEDLIYRMVFSITPSHAGTFCLTDDVTTEDGRAVAHGNPMQEFQGVFHANEFKGFELVFTAPTHAGMQ
NQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLEETDDL
```

B.

```
>MSSSQKKAGGKAGKPTKRSQNYAALRKAQLPKPPALKVPVVKPTNTILPQTGCVWQSLGTPLSLSSFN
GLGVRFLYSFLKDFAGPRILEEDLIYRMVFSITPSHAGTFCLTDDVTTEDGRAVAHGNPMQEFQGVFHAN
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLIT
VGLLDEADDLDRH
```

Figura 8 – Sequência parcial de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial do AMV. **A**, isolado de mamoeiro (201 aa); **B**, isolado de alfafa (221 aa)

Tabela 3 – Porcentagem de identidade entre sequências de nucleotídeos (nt) e de amino ácidos (aa) deduzidos do isolado do AMV (*Alfalfa mosaic virus*) proveniente de mamoeiro e de alfafa com outros isolados do mesmo vírus

Número de acesso no GenBank	Origem do isolado	Isolado AMV – mamoeiro		Isolado AMV – alfafa	
		Identidade de sequência (%)		Identidade de sequência (%)	
		nt	aa	nt	aa
AMV (AF215663.1)	<i>Pisum sativum</i> (Nova Zelândia)	98	98	98	98
AMV (AJ130706.1)	<i>Vigna unguiculata</i> (Itália)	98	98	97	99
AMV (AF215664.1)	<i>Pisum sativum</i> (Nova Zelândia)	97	97	97	97
AMV (Y09110.1)	<i>Solanum lycopersicum</i> (Itália)	97	98	100	100
AMV-P (FJ858264)	<i>C. papaya</i> (Brasil)	-	-	97	98
AMV-A (FJ858265)	<i>M. sativa</i> (Brasil)	97	98	-	-

A sequência de nucleotídeos consenso para o gene da proteína capsial (*cp*) do isolado do AMV de mamoeiro e de alfafa do Brasil foi utilizada para a construção de um dendograma filogenético, incluindo-se outros isolados do AMV em diferentes hospedeiras e de origens geográficas distintas (figura 9). Os isolados utilizados para a construção da árvore filogenética encontram-se listados na tabela 4.

Tabela 4 – Isolados do AMV (*Alfalfa mosaic virus*) e do TSV (*Tobacco streak virus*) utilizados nas comparações de sequências e análise filogenética

Número de acesso no GenBank	Origem do isolado
AF215663.1	<i>Pisum sativum</i> , Nova Zelândia
AJ130706.1	<i>Vigna unguiculata</i> , Itália
AF215664.1	<i>P. sativum</i> , Nova Zelândia
Y09110.1	<i>Solanum lycopersicum</i> , Itália
DQ314749.1	<i>S. tuberosum</i> , Canadá
DQ314750.1	<i>S. tuberosum</i> , Canadá
AJ130703.1	<i>S. lycopersicum</i> , França
AJ130706.1	<i>S. lycopersicum</i> , Itália
K02703	<i>Trifolium</i> sp., E.U.A.
M59241.1	<i>Medicago sativa</i> , E.U.A.
U12510.1	<i>M. sativa</i> , Nova Zelândia
NC_003845.1 - TSV	<i>N. glutinosa</i> e <i>N. clevelandii</i> , Holanda

Neste estudo, verifica-se que os isolados do Brasil, tanto de mamoeiro como de alfafa, agruparam-se em ramos distintos, apesar da alta identidade na sequência de nucleotídeos entre elas. Outros isolados do AMV de uma mesma região geográfica também não seguiram a tendência de se agruparem no mesmo ramo, como alguns isolados da Nova Zelândia, da Itália e do Canadá. Análises filogenéticas anteriores, baseadas em sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial, de isolados do AMV já haviam revelado a formação de subgrupos mesmo com altas identidades entre eles (KRAAL, 1975; PARRELA et al., 2000; XU; NIE, 2006). A formação de sub-grupos não mostrou correlação com a origem geográfica dos isolados (PARRELLA et al., 2000; XU; NIE, 2006) ou com diferenças na gama de hospedeiros e sintomas (PARRELLA et al., 2000). Parrella et al. (2000) ainda constataram que os dois subgrupos identificados podem ser separados com base em um sítio de restrição para a enzima *Bam* HI.

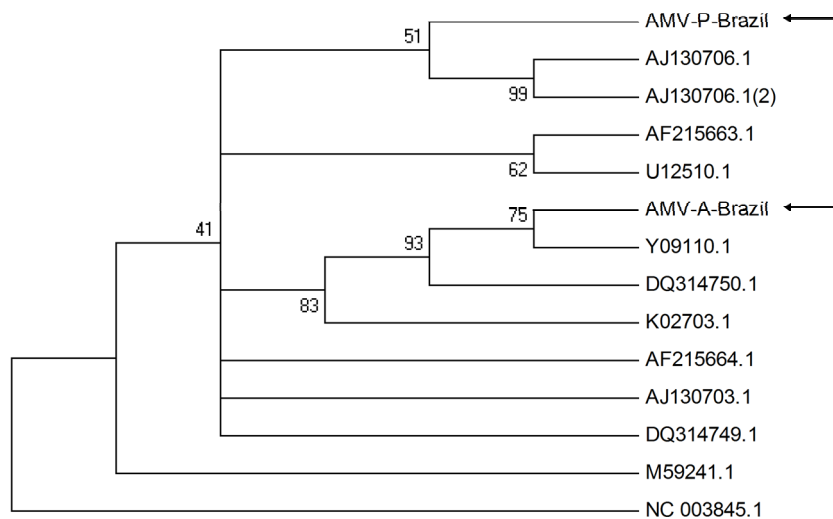


Figura 9 - Dendrograma filogenético obtida a partir do alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial (*cp*) do AMV isolado de mamoeiro (AMV-P) e de alfafa (AMV-A) (indicados pelas setas), indicando o relacionamento entre eles e outros isolados do vírus. Os ramos com menos de 40% foram excluídos. O dendrograma foi construído com o programa Mega 4, utilizando o método de "Neighbor Joining" e análise de "bootstrap" com 2.000 repetições

Parrella et al. (2000), em estudos filogenéticos com base nas sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de isolados do AMV provenientes de diversas espécies vegetais da França e da Itália relataram a existência de dois subgrupos distintos, porém sem correlação com a origem geográfica. Xu e Nie (2006)

estudando isolados do AMV obtidos de batata relataram que os isolados provenientes do Canadá estavam em vários grupos do dendograma filogenético formado, independente da origem geográfica.

Mesmo que atualmente o AMV não seja considerado importante para a cultura do mamoeiro, sempre é importante salientar a ameaça que esse vírus pode oferecer para esta importante cultura no Brasil, uma vez que os resultados indicam que essa espécie vegetal é suscetível a esse vírus.

Os resultados deste estudo confirmam o que parece ser a primeira constatação da infecção natural de *C. papaya* com o vírus do mosaico da alfafa. Apesar da baixa porcentagem de mamoeiros naturalmente infectados em campo, duas plantas em quarenta e oito (tabela 5, figura 10), bem como experimentalmente por meio de transmissões mecânicas e com *M. persicae*, os resultados mostram, de maneira contundente que essa fruteira é suscetível ao AMV, o que pode torná-lo mais uma ameaça para a cultura do mamoeiro, caso infecções mais consistentes e permanentes se estabeleçam nas plantações. No Brasil, esse vírus já foi constatado na década de 80 infectando naturalmente alfafa, soja e trevo (*Trifolium* sp.) (COSTA et al., 1980; OLIVEIRA; KIMATI; CORSI, 1986; ALMEIDA et al., 1981; KITAJIMA et al., 1985), porém não parece constituir-se problema para essas culturas uma vez que não há relatos posteriores.

Tabela 5 – Média dos valores de absorvância (A_{450}), obtidos em teste de PTA-ELISA utilizando antissoros diluídos 1:1000, contra a proteína capsial do AMV, para amostras de mamoeiro no campo experimental da ESALQ/USP

Amostras	Antissoro AMV	Amostras	Antissoro AMV	Amostras	Antissoro AMV
Controle sadio (mamoeiro)	0,143 x 3 = 0,429	Planta 16	0,245	Planta 33*	0,348
Controle positivo (mamoeiro)	0,422	Planta 17	0,157	Planta 34	0,302
Planta 1	0,221	Planta 18	0,095	Planta 35	0,319
Planta 2*	0,428	Planta 19	0,274	Planta 36	0,051
Planta 3*	0,343	Planta 20	0,243	Planta 37*	0,399
Planta 4	0,296	Planta 21	0,135	Planta 38	0,333
Planta 5	0,266	Planta 22	0,215	Planta 39	0,147
Planta 6*	0,383	Planta 23	0,206	Planta 40	0,127
Planta 7	0,259	Planta 24	0,164	Planta 41	0,190
Planta 8	0,297	Planta 25	0,122	Planta 42	0,118
Planta 9	0,197	Planta 26	0,230	Planta 43	0,189
Planta 10*	0,345	Planta 27	0,090	Planta 44	0,132
Planta 11*	0,339	Planta 28*	0,351	Planta 45	0,152
Planta 12	0,237	Planta 29*	0,339	Planta 46	0,095
Planta 13	0,334	Planta 30	0,205	Planta 47	0,190
Planta 14*	0,382	Planta 31	0,211	Planta 48	0,247
Planta 15	0,277	Planta 32	0,215		

*Plantas avaliadas por RT-PCR

**A amostra original foi eliminada do experimento para evitar contaminações.

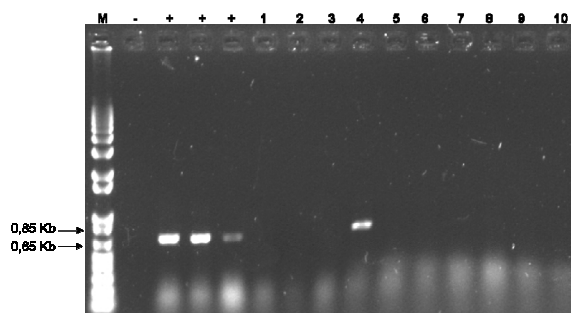


Figura 10 – Gel de agarose (0,8%) corado com SYBR SAFE® visualizado em transluminador de luz UV com produtos de RT-PCR para o gene da proteína capsial (*cp*) do AMV das amostras de mamoeiro do campo experimental. **M.** Marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”). -. Controle negativo da PCR (água); +. Controles positivos da RT-PCR; **1 a 10.** Amostras de mamoeiros assintomáticos do campo experimental apresentando as maiores leituras no teste de PTA-ELISA

Em cultivos de alfafa no Brasil, o AMV não parece constituir problema. É interessante mencionar que, na ocasião da coleta do isolado do AMV de alfafa na EMBRAPA CNPGL, a incidência de plantas sintomáticas era baixa e o pesquisador consultado (Dr. Adônis Moreira) mencionou que normalmente não há preocupação com esse patógeno.

Difícil é compreender, todavia, porque um vírus presente no Brasil e em várias partes do mundo onde se cultiva mamoeiro, transmitido por inúmeras espécies de afídeos de forma não persistente, capaz de infectar sistemicamente diversas espécies vegetais e agora também o mamoeiro, não é encontrado com mais frequência nessa planta, embora não seja o desejável. Os sintomas induzidos pelo AMV em mamoeiro foram severos (mosaico amarelo, necrose sistêmica, deformação foliar, estrias oleosas na haste) e, caso a incidência desse vírus se torne comum em mamoeiros no país certamente ocasionará danos no desenvolvimento das plantas e na produção de frutos.

A detecção esporádica da suscetibilidade do mamoeiro a outros vírus cosmopolitas de plantas e de ampla gama de hospedeiros, que normalmente não são frequentes nessa espécie vegetal, não é um fato novo. Gonsalves e Trujillo (1986) relataram incidências de 50 a 90% de mamoeiros com três meses de idade infectados com o vírus do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV) na ilha de Kauai, Havaí. Segundo os autores, a doença estava invariavelmente associada com pomares que tinham alta incidência de *Emilia fosbergii* infectada com esse tospovírus. Nenhum relato posterior de infecção natural de mamoeiro com esse tospovírus foi encontrado. No Brasil, Rezende e Costa (1986; 1987), estudando a suscetibilidade de mamoeiros a diversos vírus por meio da transmissão mecânica experimental constataram que o TSWV, o *Tobacco streak virus* (TSV), o *Tobacco rattle virus* o *Cucumber mosaic virus* e o vírus do broto amarelo da soja causaram infecção localizada nas folhas das plantas inoculadas. O TSWV e o TSV também foram capazes de invadir sistemicamente algumas poucas plantas. Mesmo assim, não se conhece infecção natural de mamoeiros com esses dois vírus no país.

Embora os dados desse trabalho não permitam qualquer explicação sobre essa rara infecção natural do mamoeiro com o AMV, algumas hipóteses podem ser apresentadas para explicar esse fenômeno. Pode-se supor, por exemplo, que essa

infecção esporádica está relacionada com a baixa incidência de hospedeiras cultivadas e da vegetação espontânea infectadas com esse vírus nas proximidades dos plantios nas principais regiões produtoras de mamão no Brasil. Como esse vírus já foi constatado infectando naturalmente mais de 150 espécies vegetais, em 22 famílias botânicas (JASPARS; BOS, 1980), é possível que algumas espécies, mesmo que suscetíveis, não sejam necessárias para a sua perpetuação na natureza.

Dessa forma, a constatação da existência no campo de um isolado do AMV capaz de infectar naturalmente plantas de mamoeiro pode ser preocupante e se associada à predominância de uma espécie do afídeo vetor mais eficiente na transmissão, o surgimento de novas espécies mais adaptadas ao mamoeiro pode gerar epidemias severas nessa cultura de grande importância econômica para o país.

4.3 Conclusões

Estudos de morfologia das partículas virais, biológicos, sorológicos e moleculares comprovam a infecção de plantas de mamoeiro (*Carica papaya*) por um isolado do AMV (*Alfalfa mosaic virus*).

Este é o primeiro relato do AMV infectando naturalmente plantas de mamoeiro.

Referências

ALMEIDA, A.M.R.; BIANCHINI, A.; COSTA, A.S.; VEGA, J. Mosaico cálico: Uma nova virose da soja no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 531-532, 1981.

ARAÚJO, M.M.M.; TAVARES, E.T.; SILVA, F.R.; MARINHO, V.L.A.; SOUZA JÚNIOR, M.T. Molecular detection of Papaya mealeira virus in the látex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 146, p. 305-310, 2007.

BALASUBRAMANIAM, M.; IBRAHIM, A.; KIM, B.S.; LOESCH-FRIES, L.S. *Arabidopsis thaliana* is an asymptomatic host of *Alfalfa mosaic virus*. **Virus Research**, Atlanta, v. 121, p. 215-219, 2006.

BOL, J.F. Replication of alfalfa- and ilarviruses: role of the coat protein. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 39-62, 2005.

CODOÑER, F.M.; ELENA, S.F. Evolutionary relationships among members of the *Bromoviridae* deduced from whole proteome analysis. **Archives of Virology**, Vienna, v. 151, p. 299-307, 2006.

COOK, A.A.; ZETTLER, F.W. Susceptibility of papaya cultivars to papaya ringspot and papaya mosaic viruses. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, p. 893-895, 1960.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B. Presença do vírus da necrose do fumo em São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.19, p. CXLVII-CLI,1960.

COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 21, p. 38-43, 1969.

DALL, D.J.; RANGLES, J.W.; FRANCKI, R.I.B. The effect of *Alfalfa mosaic virus* on productivity of annual barrel medic, *Mediticago trunculata*. **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v. 40, p. 807-815, 1989.

DIJKSTRA, J.; JAGER, C.P. Protocol 28: virus purification. In: _____. **Practical plant virology: protocols and exercises**. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1998.

DUIJSINGS, D.; KORMELINK, R; GOLDBACH, R. *Alfalfa mosaic virus* RNAs serve as cap donors for *Tomato spotted wilt virus* transcription during coinfection of *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Virology**, London, v. 73, n. 6, p. 5172-5175, 1999.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DEESELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses**. New York: Elsevier Academic Press, 2005. 1162 p.

GARRAN, J.; GIBBS, A. Studies on *Alfalfa mosaic virus* and alfalfa aphids. **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v. 33, p. 657-664, 1982.

GONSALVES, D.; TRUJILLO, E.E. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 501-506, 1986.

JASPARS, E.M.L.; BOS, L. *Alfalfa mosaic virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Kew, n. 229, 1980. 13 p.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4th ed. London: Academic Press, 2002. 1001 p.

KITAJIMA, E.W.; FORMINGA, L.C.M.; MARINHO, V.L.A.; LIN, M.T. Infecção natural de trevo (*Trifolium* sp.) com o vírus do mosaico da alfafa no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 304, 1985.

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

KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, F.C.; PINHEIRO, C.S.R.; SOARES, L.M.; PINHEIRO, K.; MADEIRA, M.C.; CHAGAS, M. Amarelo letal do mamoeiro solo no estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 282-285, 1992.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, C.H.; SILVEIRA, J.S.; ALVES, F.L.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric virus-like particles restricted to lactificers with "meleira" ("sticky disease") of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n.1, p.118-122, 1993.

KRAAL, B. Amino acid analysis of *Alfalfa mosaic virus* coat proteins: An aid for viral strain identification. **Virology**, New York, v. 66, p. 336-340, 1975.

LIMA, J.A.A.; LIMA, A.R.T.; MARQUES, M.A.L. Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro 'solo' obtido no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 437-441, 1994.

LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 689-702, 2001.

LORETO, T.J.G.; VITAL, A.F.; REZENDE, J.A.M.; VEGA, J.; COSTA, A.S. Ocorrência de um amarelo letal no mamoeiro Solo no Estado de Pernambuco. **Biológico**, São Paulo, v. 49, p. 275-279, 1983.

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

OLIVEIRA, P.R.D.de ; KIMATI, H. ; CORSI, M. Ocorrência de doenças em alfafa (*Medicago sativa* L.) em Piracicaba, São Paulo, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 310, 1986.

PARRELLA, G.; LANAVE, C.; MARCHOUX, G.; FINETTI SIALER, M.M.; DI FRANCO, A.; GALLITELLI, D. Evidence of two distinct subgroups of *Alfalfa mosaic virus* (AMV) from France and Italy and their relationship with other AMV strains. **Archives of Virology**, Vienna, v. 145, p. 2659-2667, 2000.

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Reação de mamoeiros a 13 diferentes potyvirus. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 12, p. 187-194. 1986.

_____. Quatro vírus capazes de infetar mamoeiros experimentalmente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 63-65, 1987.

REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 32, p. 293-302.

SAXENA, S.; HALLAN, V.; SINGH, B.P.; SANE, P.V. Leaf curl disease of *Carica papaya* from India may be caused by a bipartite geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 126, 1998.

SINGH, A.; SINGH, K.N.; YADAY, A.L.; VIKRARN, P. PCR based diagnostics of a geminivirus causing leaf curl disease in papaya. **Plant Archives**, Raleigh, v. 7, p. 87-89, 2007.

SMITH, F.E.V. Plant disease in Jamaica in 1928. **Annual Reporter of Department of Agriculture in Jamaica**. p. 17-20. (Consultado o abstract no R.A.M. 8:631-632). 1929.

VALKOVENEM, J.P.T.; PEHU, E.; WATANABE, K. Symptom expression and seed transmission of *Alfalfa mosaic virus*, *Potato yellowing virus* and *Potato yellowing virus* SB-22 in *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. **Potato Research**, Amsterdam, v. 202, p. 403-410, 1992.

XU, H.; NIE, J. Identification, characterization, and molecular detection of *Alfalfa mosaic virus* in Potato. **Virology**, New York, v. 96, p. 1237-1242, 2006.

WAN, S.H.; CONOVER, R.A. A rhabdovirus associated with a new disease of Florida papayas. **Florida State Horticultural Society**, Florida, v. 94, p. 318-321, 1981.

WANG, XY, XIE, Y., ZHOUY, XP. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 29, p. 303-309, 2004.

ZAMBOLIIM-MACIEL, E.; KUNIEDA-ALONSO, S; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. Purification and some properties of Papaya meleira virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 389-394, 2003.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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