

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

SCARLETT DOS ANJOS OLIVEIRA

**Transmissão vertical e localização do papaya meleira virus (PMeV) em
tecidos embrionários de *Carica papaya* L.**

VITÓRIA - ES

2019

SCARLETT DOS ANJOS OLIVEIRA

Transmissão vertical e localização do papaya meleira virus (PMeV) em tecidos embrionários de *Carica papaya* L.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Patricia Machado Bueno Fernandes

VITÓRIA - ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48t Oliveira, Scarlett dos Anjos, 1993-
Transmissão vertical e localização do papaya meleira virus (PMeV) em tecidos embrionários de Carica papaya L. / Scarlett dos Anjos Oliveira. - 2019.
84 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Papaya meleira virus. 2. transmissão vertical. 3. sementes. 4. Carica papaya. 5. RT-PCR. 6. hibridização in situ. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

Scarlett dos Anjos Oliveira

“Transmissão vertical e localização do papaya meleira virus (PMeV) em tecidos embrionários de *Carica papaya* L.”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2019.

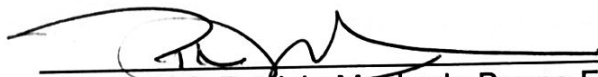
Comissão Examinadora:



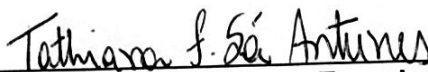
Prof. Dr.ª Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora



Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (UFES)
Examinador Titular Interno



Prof. Dr.ª Patricia Machado Bueno Fernandes (UFES)
Por **Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Junior (UFV)**
Examinador Titular Externo



Prof. Dr.ª Tathiana Ferreira Sá Antunes (UFES)
Examinadora Titular Externa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aelson e Edineia, e a minha família como forma de gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força, sustento e a paz que me concedeu em todos os momentos; sem Ele esta realização não seria possível;

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), por todo apoio, amizade e aprendizagem que me permitiram crescer como pessoa e profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo modalidades mestrado;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro que viabilizaram os trabalhos em campo;

Ao Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) e ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) pelas diretrizes durante as coletas em campo;

Aos profissionais que colaboraram na execução do projeto de pesquisa: Prof. Dr. Antonio Alberto Fernandes, Prof. Dr. José Aires Ventura, Prof. Dr. Alexandre Martins, Dr^a. Tathiana Sá Antunes e Dr. Oeber Quadros. Em especial, a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes;

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo. Obrigada por todo apoio, amizade e momentos de descontração durante a realização dos estudos, em especial, aos colegas Marlonni Maurastoni Araujo e Dr^a. Thatiana Sá Antunes pelo auxílio prestado neste trabalho;

Ao meu namorado Vinicius Costa, pelo suporte emocional, contribuição nas coletas em campo e auxílio na elaboração dos esquemas didático;

Aos pais, familiares e amigos que participaram da minha trajetória acadêmica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A- Seção transversal do ovário jovem de *Carica papaya* em vista inferior. Observe os numerosos óvulos que se aglomeram na parede interna do ovário. B- Detalhe do óvulo jovem e seu funículo que o ancora a parede do ovário. Seta: rudimento seminal ou óvulo. Asterisco: funículo. Barra de escala= 100 µm. Fonte: DECRAENE e SMETS, 1999 modificado.21
- Figura 2: Estruturas do grão de pólen (gametófito masculino) de Angiospermas. NR, núcleo reprodutivo; N.V, núcleo vegetativo. Fonte: THOMAZ *et al*, 2009.22
- Figura 3: Etapas na germinação de grãos de pólen e desenvolvimento embrionário. A- grão de pólen viável; B e C- alongamento do tubo polínico com sua extremidade bulbosa; D- extremidade do tubo polínico bulboso em contato com o jovem zigoto após a fecundação com formação de vários núcleos no endosperma. E- Rudimento seminal de *C. papaya* antes da polinização mostrando funículo maciço, os integumentos externos e internos, e um pequeno jovem gametófito feminino no centro do tecido nucelar; F- rudimento seminal após a dupla fecundação mostrando considerável aumento do integumento externo e nucelar, tubo polínico persistente, alguns núcleos de endosperma multinuclear sendo formados na região micropilar proximal do zigoto; G- seção do óvulo no estágio octante com o desenvolvimento das camadas do revestimento da semente. Legenda: a- Funículo; b- integumento externo; c- integumento interno; d- nucela; e- endosperma; f- sarcotesta; g- mesotesta; h- tubo polínico. Fonte: FOSTER, 1943.24
- Figura 4: Saco embrionário mostrando a bainha circundante no embrião, tubo polínico persistente e endosperma multinuclear. A- embrião zigótico. B- embrião octante. Legenda: a- nucela; b- endosperma; c- tubo polínico. Fonte: FOSTER, 1943.25
- Figura 5: A- embrião quase maduro mostrando tecido provisório no cotilédone com vasos condutores definidos. B- início da transição do endosperma multinuclear para uninuclear. C- deposição de membranas e paredes celulares entre os núcleos do endosperma. Fonte: FOSTER, 1943.26
- Figura 6: Secção do saco embrionário na região calazal mostrando os feixes vasculares que se ramificam no integumento interno. Legenda: d- feixe vascular; e- integumento interno; f- tecido nucelar com células superiores alongadas em forma de dedos; g- endosperma. Fonte: FOSTER, 1943.27
- Figura 7: Fotos de sementes de *Carica papaya* obtida de estereoscópio. A- Sementes com sarcotesta em evidência. B- Sementes com endotesta em evidência. C- Corte longitudinal mostrando a disposição da mesotesta, endotesta e tégmen no revestimento da semente. Legenda: Mest- mesotesta; Ent- endotesta; asterisco- tégmen.28
- Figura 8: Imagem obtida utilizando microscópio eletrônico de varredura. A- corte longitudinal com destaque as frações da testa da semente. B- corte longitudinal com ênfase nas células cristalíferas. Legenda: Mest- mesotesta; Ent- endotesta; Co- cristais de oxalato de cálcio; Teg- tégmen; Emb- embrião. Escala: 100µm. Fonte: SANTOS *et al*, 2009.28
- Figura 9: Imagens de sementes de *Carica papaya* obtida em estereoscópio. A- Sementes em corte longitudinal. B- Sementes em corte longitudinal lateral. C- embrião em evidência.

Legenda: a- testa ou revestimento da semente; b- endosperma; c- embrião; d- folha cotiledonar; e- eixo embrionário.....29

Figura 10: Sintomas da infecção pelo complexo PMeV em *Carica papaya*. **A-** Planta de mamão mostrando os sintomas da meleira. **B** – Em plantas doentes ocorre o extravasamento espontâneo do látex, que oxida após a exposição atmosférica, resultando em pequenas lesões necróticas nas bordas de folhas jovens e; **C-** frutas com aspecto pegajoso. **D-** Plantas doentes no México apresentam látex no interior da cavidade da fruta e; **E-** manchas necróticas nos pecíolos das folhas. Os círculos pretos destacam os principais sintomas. Fonte: ABREU *et al.*, 2015.35

Figura 11: Detecção do PMeV-Mx por RT-PCR em folhas e outros tecidos vegetais utilizando um par de oligonucleotídeos CB38 / CB39. Fonte: MORENO *et al.*, 2015.37

Figura 12: Frutos sadios de *Carica papaya* variedade THB. A- Fruta colhida no estágio de maturação 3, quando a superfície amarela de sua casca apresentam uma cobertura de até 50 % com áreas próximas em verde claro. B- fruta em estágio de maturação 5 (76-100 % da superfície em coloração amarelada) antes da secção longitudinal para a extração de sementes. C- As sementes sem sarcotesta foram colocadas em placa de Petri coberta com papel filtro por 24 horas para secagem a temperatura ambiente ± 25 °C.....42

Figura 13: Delineamento experimental para obter as sementes. Plantas (n=5) assintomáticas para a meleira do mamoeiro foram aleatoriamente selecionadas como doadora de sementes. Para cada planta-mãe foram colhidos 3 frutos dos quais foram extraídas 6 sementes para obter um único lote com 90 amostra: 40 para testes de hibridização *in situ* e 50 para transmissão vertical.44

Figura 14: Sementes de *Carica papaya* variedade THB foram cultivadas em frasco de vidro com tampa rosqueável contendo 15 ml de meio ágar 1 %. Em cada frasco de vidro foram cultivadas 10 sementes.45

Figura 15: A- Reações de RT-PCR convencional realizadas com oligonucleotídeos específicos para o PMeV, a partir de RNA de amostras foliares das plantas-mãe assintomáticas (n=5). Os fragmentos de 500 pb indicam a infecção do vírus. B- A amplificação do gene actina foi utilizada como controle da reação de RT-PCR. C+: Controle positivo (planta com sintomas). C-: controle negativo (água). M: marcador molecular (1Kb plus DNA ladder Termofisher®, Waltham, EUA).....50

Figura 16: Avaliação da transmissão do Papaya meleira virus (PMeV) através de sementes de *Carica papaya*. A- RT-PCR convencional, realizada com oligonucleotídeos específicos para o PMeV, a partir de RNA extraído de amostras constituídas de duas plântulas inteiras contendo raiz, hipocótilo e folha cotiledonar (n = 25). Os fragmentos de 500pb indicam a infecção do vírus. B- A amplificação do gene actina, fragmento de 200 pb, foi utilizada como controle da reação de RT-PCR C+: Controle positivo (planta com sintomas). C-: controle negativo (água). M: marcador molecular (1Kb plus DNA ladder Termofisher®, Waltham, EUA).....52

Figura 17: A- Esquema de sementes dormentes de *Carica papaya*. B- Plântulas após 15 dias de cultivo.53

Figura 18: Secções longitudinais na região da testa de sementes de *Carica papaya*. A- Reação positiva com safranina-azul de metileno mostrando parede secundaria lignificada em

vermelho. B- Reação positiva com safranina-azul de metileno mostrando regiões com deposição de calose em púrpura. C- Coloração com azul de toluidina mostrando células contendo compostos fenólicos (azul-esverdeado) na região do tégmen (seta). Legenda: Test- testa da semente; End- endosperma..... 54

Figura 19: Reação positiva com Sudan Black B em cortes longitudinais de sementes de *Carica papaya*. A- Endosperma de sementes dormentes mostrando vesículas de lipídios em coloração preta. B- Endosperma de plântulas com 15 dias de germinação mostrando células endospermáticas com pouco conteúdo lipídico. 55

Figura 20: A- Corte longitudinal da folha cotiledonar de sementes dormentes com estômatos ricos em lipídios (seta). B- Corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação. C- Foto ampliada de corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação enfatizando células estomáticas. A- sementes dormentes. B e C- plântulas com 15 dias de germinação. As setas mostram estômatos ricos em lipídeos. 56

Figura 21: Testes histo-citoquímicos em sementes de *Carica papaya*. A- Sementes dormentes submetidas à coloração com azul de toluidina evidenciando células parenquimáticas localizadas na folha cotiledonar em coloração púrpura. B- Sementes dormentes submetidas à coloração com azul de toluidina evidenciando células parenquimáticas localizadas no eixo embrionário em coloração púrpura. C- Corte longitudinal lateral de plântulas com 15 dias de germinação submetida à coloração com safranina-azul de metileno mostrando reação positiva (seta), em coloração vermelha, células lignificadas de vasos condutores do xilema ramificando-se pelo tecido parenquimático em folha cotiledonar. D- Corte longitudinal de plântulas com 15 dias de germinação submetida à coloração com safranina-azul de metileno mostrando reação positiva (seta), em coloração vermelha, células lignificadas de vasos condutores do xilema concentrado na região do procâmbio do eixo embrionário e, E- no ápice radicular. F- Corte longitudinal do ápice radicular de plântulas com 15 dias de germinação coradas com lugol evidenciando células com grão de amido (azul-arroxeadado) em seu interior. A e B: sementes dormentes. C-F: plântulas com 15 dias de germinação. Legenda: FC- folha cotiledonar; EX- eixo embrionário; End-endosperma; AR- ápice radicular; Test- testa da semente. 57

Figura 22: Folha cotiledonar de *Carica papaya* corado com oil red. A- Corte longitudinal de folha cotiledonar de sementes dormentes. B- Corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação. Legenda: FC- folha cotiledonar..... 58

Figura 23: Localização do PMeV em células da folha cotiledonar de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes, provenientes de plantas sadias, foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. A e D- DAPI. B e E- Rodamina. C e F- Sobreposição. G- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Legenda: FC- folha cotiledonar; End- endosperma. Setas indicam células do parênquima esponjoso infectadas. Ponta da seta indica células do endosperma infectadas. Escala: 50µm..... 59

Figura 24: Localização do PMeV em células do eixo embrionário de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. A e D- DAPI. B e E- Rodamina. C e F- Sobreposição. G-

Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Legenda: FC- folha cotiledonar; EX- eixo embrionário; End- endosperma. Setas indicam células na região do procâmbio infectadas. Ponta da seta indica células do endosperma infectadas. Asterisco indica células do parênquima cortical infectadas. Escala: 50µm. 60

Figura 25: Localização do PMeV em células do eixo embrionário de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. A e D- DAPI. B e E- Rodamina. C e F- Sobreposição com círculo pontilhado indica infecção em células do procâmbio. G- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Legenda: EX- eixo embrionário; End- endosperma; AR- ápice radicular. Setas indicam células do parênquima cortical infectadas. Escala: 50µm. 61

Figura 26: Localização do PMeV em células de folha cotiledonar de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de plântulas com 15 dias germinação provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. A e D- DAPI. B e E- Rodamina. C e F- Sobreposição. G- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal lateral com círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Setas indicam células infectadas. Escala: 50µm. 63

Figura 27: Secções longitudinais da testa de sementes de *Carica papaya*, obtidas de sementes provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. Nenhum sinal de hibridização foi visualizado. A- DAPI. B- Rodamina. C- Sobreposição. D- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal lateral com círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-C. Escala: 100µm. 64

Figura 28: Possivelmente, quando associado a uma proteína de movimento, o PMeV pode infectar diretamente o embrião de *Carica papaya* movimentando-se pelos canais plasmodesmáticos existentes entre células adjacentes. A- Por meio dos vasos condutores que se ramificam pelas camadas mais internas do revestimento da semente, o vírus pode alcançar o suspensor e infectar células do embrião durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Posteriormente, o vírus pode atravessar o limite do embrião para o endosperma. B- Entretanto, no decorrer da maturação da semente, o suspensor passa por morte celular programada. Na ausência desta estrutura, o PMeV pode atravessar o limite do revestimento da sementes para o endosperma e, posteriormente, infectar o embrião. 69

Figura 29: Devido a ausência de uma proteína de movimento (MP), o PMeV seria incapazes de movimentar-se célula a célula. Deste modo, para infectar embriões de *Carica papaya*, o PMeV deve apresentar um comportamento semelhante à vírus persistentes. Seu movimento ocorreria por meio de divisões celulares de células já infectadas. Portanto, o vírus infecta células meristemáticas das flores que, posteriormente, formaram os gametófitos. O processo de fecundação envolvendo um (feminino ou masculino) ou ambos gametófitos infectados, acarretaria na formação de um zigoto infectado. Desta forma, o vírus pode ser encontrado nos diferentes tecido que constitui a semente. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos tecidos e seus componentes utilizando corantes histo-citoquímica.	47
Tabela 2 - Secções de semente dormentes e sementes com 15 dias de germinação foram submetidas a reações de hibridização <i>in situ</i> para analisar a distribuição do PMeV nos tecidos embrionários. Os sinais + indicam células infectadas enquanto o sinal – indica célula não infectadas.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PMeV	papaya meleira virus
PMeV 2	papaya meleira virus 2
PMeV-Br	papaya meleira virus isolado coletado no Brasil
PMeV-Mx	papaya meleira virus isolado mexicano do PMeV
dsRNA	RNA fita dupla (do inglês <i>Double-stranded RNA</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
ssRNA	RNA fita simples (do inglês <i>Single-stranded RNA</i>)
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do Inglês <i>RNA dependent RNA polimerase</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
CP	Proteína capsidial (do inglês <i>Capsid protein</i>)
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês <i>Open reading frame</i>)
pb	Pares de base
PpVQ	papaya virus Q, isolado do Equador
MP	Proteína de movimento (do inglês <i>Movement protein</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
M-MLV	murine leukemia virus
RT	Transcriptase reversa (do inglês <i>Reverse transcriptase</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
SSC	Citrato de sódio salino (do inglês <i>Saline-Sodium Citrate</i>)
DAPI	4,6-diamino-2-fenil-indol

PSbMV	<i>Pea seed borne mosaic virus</i>
vRNA	RNA viral
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
N.V	Núcleo vegetativo
N.R	Núcleo reprodutivo
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
MTE	Microscopia eletrônica de transmissão
CI	Corpos de inclusão
RBDV	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
MCMV	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma frutífera de grande importância econômica para o Brasil e para o estado do Espírito Santo. A doença de etiologia viral, meleira do mamoeiro, tem afetado a produção da fruta causando grandes perdas econômicas em pomares do Brasil e México. A doença é atribuída a infecção combinada do papaya meleira virus (PMeV) e do papaya meleira virus 2 (PMeV2), ou complexo PMeV. Em plantas assintomáticas é possível detectar o PMeV, mas somente plantas com dupla infecção apresentam sintomas típicos da doença. Tem sido postulado que o PMeV pode ser um vírus de comportamento persistente em mamoeiro, visto que, não induz sintomas visíveis em infecção simples, não sintetiza uma proteína de movimento (MP) e possui capacidade de infectar células com potencial meristemático em embriões somáticos. Contudo, a transmissão de vírus através de sementes, mecanismo de dispersão comum em vírus persistente, não foi descrito para o PMeV. Devido a importância das sementes para a formação dos pomares, investigamos a transmissão vertical do PMeV e sua distribuição nos tecidos de semente. Frutas de plantas da variedade THB, sem sintomas visíveis para a meleira do mamoeiro, foram selecionadas para obter as sementes do estudo. Cinquenta sementes foram cultivadas em câmara de germinação para obter plântulas com 45 dias de emergência. Estas foram empregadas para o estudo de transmissão vertical do PMeV em uma abordagem RT-PCR seguida de eletroforese em gel. Investigamos também, por meio da hibridização *in situ*, a distribuição do dsRNA do PMeV nos tecidos de semente dormentes e plântula com 15 dias de germinação. Nossos resultados confirmam que o PMeV pode ser transmitido para a geração seguinte através de sementes infectadas, visto que 84 % das amostras de plântulas amplificaram o fragmento de aproximadamente 500 pb. Os resultados da hibridização *in situ* mostraram que o PMeV pode infectar diferentes tecidos da semente. Em sementes dormentes, o PMeV foi capaz de infectar células do parênquima esponjoso da folha cotiledonar, endosperma, parênquima cortical e procâmbio do eixo embrionário. Em plântulas com 15 dias de emergência, o vírus foi detectado em células do parênquima esponjoso próximo e dentro dos feixes vasculares da folha cotiledonar e nenhum sinal de fluorescência foi detectado no revestimento da semente dormente ou plântulas com 15 dias de germinação. A diferente distribuição do dsRNA em tecidos de semente em dois estádios de desenvolvimento diferentes apontam possíveis estratégias de infecção, sobrevivência e movimento que são discutidos neste trabalho.

Palavras-chave: Papaya meleira virus • transmissão vertical • sementes • *Carica papaya* • RT-PCR • hibridização *in situ*

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit of great economic importance for Brazil and for the Espírito Santo state. However, great economic losses have been attributed to papaya sticky disease (PSD) which affects the fruit production in Brazilian and Mexican orchards. The disease is attributed to a combined infection of papaya meleira virus (PMeV) and papaya meleira virus 2 (PMeV2), or PMeV complex. In asymptomatic plants it is possible to detect PMeV, but only plants with double infection present typical symptoms of the disease. It has been postulated that PMeV may be a virus of persistent lifestyle in papaya, since it does not induce visible symptoms in simple infection, does not synthesize a movement protein (MP) and has the capacity to infect cells with meristematic potential in somatic embryos. However, transmission through seeds, a common persistent virus dispersion mechanism, has not been described for PMeV. Due to the importance of the seeds for the initiation of the orchards we investigated the PMeV vertical transmission and its distribution in the papaya seed tissues. Asymptomatic fruits from THB variety papaya plants, were collected to obtain the seeds used in this study. Fifty seeds were grown in a germination chamber to obtain seedlings with 45 days-old. These were used to study the PMeV vertical transmission through RT-PCR method followed by gel electrophoresis. We also investigated, through *in situ* hybridization, the PMeV dsRNA distribution in dormant seed tissues and 15-day-old germinated seedlings. Our results confirm that PMeV can be transmitted to the next generation through infected seeds, since 84% seedlings amplified the approximately 500 bp PMeV fragment. *In situ* hybridization results have shown that PMeV can infect different seed tissues. In dormant seeds, PMeV was able to infect cells of the spongy parenchyma, cotyledon leaf, endosperm, cortical parenchyma and embryonic axis procambium. In 15-day-old germinated seedlings, the virus was detected in spongy parenchyma cells close to and within the vascular bundles of the cotyledon leaf. No fluorescence signal was detected in the seed coat of both dormant or 15-day-old germinated seedlings. The different distribution of dsRNA in seed tissues at two different seed developmental stages points to possible infection, survival and movement strategies which are discussed in this work.

Key words: Papaya meleira virus • vertical transmission • seeds • *Carica papaya* • RT-PCR • *in situ* hybridization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. <i>Desenvolvimento das sementes</i>	20
2.2. <i>Relações nutricionais durante o desenvolvimento embrionário</i>	26
2.3. <i>Anatomia da semente madura</i>	27
2.4. <i>Mecanismos de transmissão de vírus em semente</i>	29
2.4.1. <i>Infecção direta</i>	30
2.4.2. <i>Infecção indireta</i>	31
2.5. <i>Complexo PMeV</i>	32
2.6. <i>Sintomas e epidemiologia da meleira do mamoeiro</i>	34
2.7. <i>Métodos de detecção do PMeV em sementes de C. papaya</i>	37
3. HIPÓTESE	40
4. OBJETIVO	41
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
6. MATERIAIS E MÉTODOS	42
6.1. <i>Coleta</i>	42
6.2. <i>Processamento das frutas e sementes</i>	42
6.3. <i>Delineamento experimental</i>	43
6.4. <i>Germinação das sementes</i>	45
6.5. <i>Fixação do material e inclusão em parafina</i>	45
6.6. <i>Identificação dos tecidos embrionários</i>	46
6.7. <i>Hibridização in situ</i>	47
6.8. <i>Diagnóstico do PMeV por RT-PCR</i>	48
7. RESULTADOS	50
7.1. <i>Diagnóstico molecular</i>	50
7.2. <i>Identificação dos tecidos embrionários</i>	53
7.2.1. <i>Revestimento da semente</i>	53
7.2.2. <i>Endosperma</i>	55
7.2.3. <i>Embrião</i>	55

7.3. <i>Localização do dsRNA do PMeV</i>	58
8. DISCUSSÃO	65
8.1. <i>Transmissão vertical</i>	65
8.2. <i>Localização do dsRNA em tecidos embrionários</i>	68
9. CONCLUSÃO	76
10. REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma frutífera mundialmente consumida e de grande importância econômica em países tropicais e subtropicais (COSTA e SOUZA, 2018) como o Brasil, segundo maior produtor do mundo (FAOSTAT, 2016). No ano de 2017, o Espírito Santo apresentou o maior rendimento na produção brasileira de mamão com 50,86 toneladas por hectare (IBGE, 2017). O aumento do consumo da fruta no mercado externo e, principalmente, interno leva o estado do Espírito Santo a ampliar suas áreas de cultivo a cada ano (COSTA e SOUZA, 2018).

Apesar dos esforços para aumentar a produção da fruta, o mamoeiro é suscetível a diversas doenças que limitam seu cultivo (VENTURA *et al.*, 2003). Dentre as doenças virais, a meleira do mamoeiro é considerada uma das mais importantes, pois pode levar a 100 % de perdas econômicas em pomares do Brasil e México (VENTURA *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2012).

Os sintomas característicos da doença são a exsudação espontânea do látex, necrose na ponta de folhas jovens e manchas sazoadas nas frutas (KITAJIMA *et al.*, 1993; VENTURA *et al.*, 2004). Além das alterações na aparência da fruta, a doença altera sua consistência e sabor, tornando-a imprópria para o consumo. Até o momento, nenhum cultivar resistente foi identificada e a eliminação de plantas doentes no campo (*rouging*) é a única estratégia de controle aplicada pelos produtores (MEISSNER-FILHO *et al.*, 2017; VENTURA *et al.*, 2015).

A meleira do mamoeiro está associada a uma infecção combinada do papaya meleira virus (PMeV) e do papaya meleira virus 2 (PMeV2), ou complexo PMeV, uma associação entre vírus semelhante ao totivirus e ao umbravirus, respectivamente (ANTUNES *et al.*, 2016). Plantas com dupla infecção apresentam sintomas típicos da doença, entretanto, em plantas assintomáticas é possível detectar o PMeV. Devido a capacidade de não induz sintomas visíveis em infecção simples, não sintetizar uma proteína de movimento (MP) (ANTUNES *et al.*, 2016) e possuir capacidade de infectar células com potencial meristemático em embriões somáticos (MAURASTONI, 2018), foi postulado que o PMeV pode ser um vírus de comportamento persistente em mamoeiro.

Este grupo de vírus mantém à infecção por toda a vida de seu hospedeiro e são eficientemente transmitidos por sementes (HULL, 2002; ROOSSINCK, 2010). A capacidade

de transmissão do PMeV para a próxima geração, através das sementes, foi descrita como um mecanismo de disseminação para o isolado mexicano (PMeV-Mx) (TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2015). Entretanto, por ocasião desse estudo, não era de conhecimento a existência de dois vírus associados à doença. Somente após o sequenciamento de amostras do isolado brasileiro constatou-se que o PMeV-Mx apresenta alta similaridade ao PMeV2 do Brasil. Curiosamente, em nenhuma amostra de plantas sintomáticas do México foi detectado o dsRNA do PMeV e, portanto, o mecanismo de transmissão por sementes ainda é desconhecido para este vírus.

No Brasil, a transmissão vertical do PMeV foi, inicialmente, investigada em amostras de sementes seccionadas em carúncula, sarcotesta, envoltório seminal, hipocótilo, cotilédone e endosperma. Solventes orgânicos foram utilizados para extrair o dsRNA genômico do PMeV para posterior tratamento com DNase e eletroforese em gel para visualizar uma banda de aproximadamente 12 kb. Somente amostras da carúncula apresentou o fragmento correspondente ao PMeV revelando que o vírus possui um contato próximo com a semente (RODRIGUES, 2006). Em outro trabalho, amostras de plântulas com 15-20 dias após a germinação foram empregadas para investigar a transmissão vertical do PMeV utilizando uma técnica mais sensível baseado na reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (ABREU *et al* 2012). Para a RT-PCR, foram desenvolvidos oligonucleotídeos através de uma abordagem RAPD (do inglês- Random Amplified Polymorphic DNA) (ARAÚJO *et al.*, 2007; ABREU *et al* 2012). Em nenhuma amostra foi detectado o dsRNA do vírus. Entretanto, a hipótese de transmissão por sementes não foi rejeitada, visto que, um número maior de amostras pode ter sido necessário.

Após o sequenciamento do complexo PMeV, novos oligonucleotídeos foram desenhados para o PMeV com base na sequência deduzida da ORF1 que codifica para uma CP (ANTUNES *et al.*, 2016). Estes oligonucleotídeos ainda não foram testados em sementes ou plântulas. Desta forma, retomamos neste trabalho, a investigação da transmissão do PMeV por sementes utilizando uma abordagem de RT-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desenvolvimento das sementes

Conhecer as estruturas que constituem as sementes e como estas se desenvolvem é crucial para compreender os possíveis mecanismos de infecção, sobrevivência e movimentação de vírus nos tecidos embrionários.

O envolvimento de estruturas reprodutivas femininas e masculinas da flor é necessário para que ocorra a formação das sementes. O gineceu é a denominação dada ao órgão reprodutor feminino. A estrutura é constituída por três regiões: (i) estigma, responsável pela recepção e reconhecimento dos grãos de pólen; (ii) ovário, que abriga um ou vários rudimentos seminais, também chamado de óvulo e; (iii) estilete, conecta o estigma ao ovário (BRESINSKU *et al.*, 2012).

Em *C. papaya*, encontram-se na parede interna do gineceu, vários óvulos em diferentes estágios de desenvolvimento ancorados pelo funículo (Fig. 1 A e B). O rudimento seminal é constituído por dois integumentos (externo e interno), tecido nucelar e gametófito feminino que corresponde ao saco embrionário. Quando maduro, o saco embrionário apresenta sete células disposta distintamente em sua estrutura estabelecendo duas extremidades. Uma oosfera e duas sinérgides estão agrupadas na região micropilar enquanto que na região oposta, calazal, estão situadas três antípodas. Na região central do gametófito feminino encontra-se os dois núcleos polares. As estruturas do rudimento seminal participam da formação da semente, ao passo que, mudanças nos tecidos do ovário originam a fruta (THOMAZ *et al.*, 2009; BRESINSKU *et al.*, 2012).

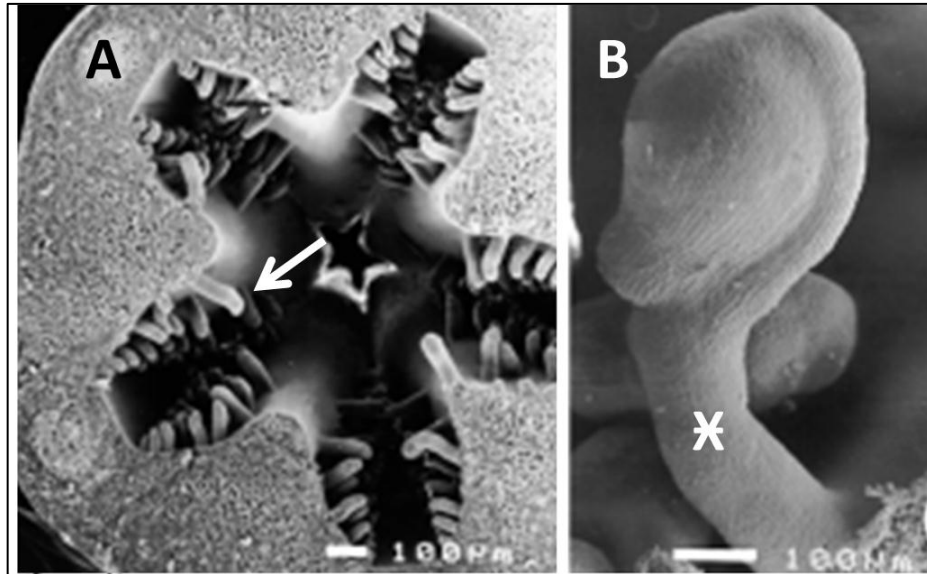


Figura 1: **A-** Seção transversal do ovário jovem de *Carica papaya* em vista inferior. Observe os numerosos óvulos que se aglomeram na parede interna do ovário. **B-** Detalhe do óvulo jovem e seu funículo que o ancora a parede do ovário. Seta: rudimento seminal ou óvulo. Asterisco: funículo. Barra de escala= 100 μ m. Fonte: DECRAENE e SMETS, 1999 modificado.

O estame, por sua vez, representa o órgão reprodutor masculino sendo constituído, principalmente, pelo filete e antera. Ancorado ao corpo floral pelo filete, a antera é constituída por uma estrutura em forma de saco revestido, internamente, por tecidos especializados capazes de produzir o gametófito masculino (grão de pólen). Cada grão de pólen maduro possui dois tegumentos envolventes que conferem resistência e proteção, sendo o externo denominado de exina e o interno, de intina (CORTEZ, SILVA e CHAVES, 2016).

No interior do grão de pólen encontra-se dois núcleos, um menor e reprodutivo (N.R) que após divisão mitótica dará origem a dois núcleos espermáticos e outro maior vegetativo (N.V) que produz o tubo polínico (Fig. 2). Os núcleos espermáticos são responsáveis pela formação da próxima geração por meio da dupla fecundação (THOMAZ *et al.*, 2009; BRESINSKU *et al.*, 2012).

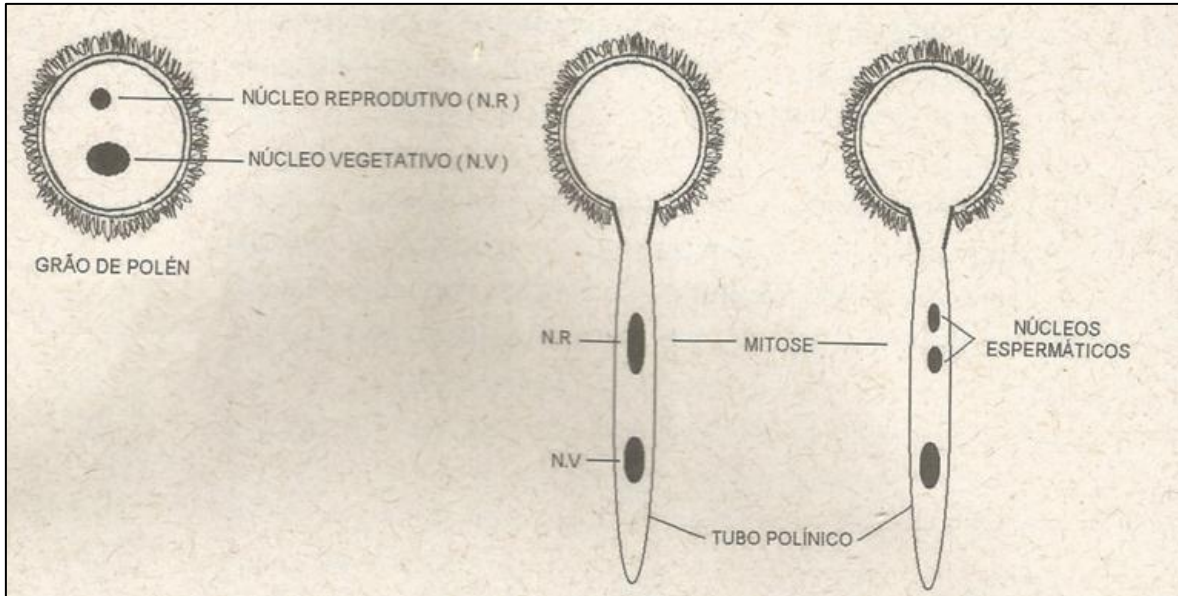


Figura 2: Estruturas do grão de pólen (gametófito masculino) de Angiospermas. **NR**, núcleo reprodutivo; **N.V**, núcleo vegetativo. Fonte: THOMAZ *et al*, 2009.

Em *C. papaya*, a polinização é o processo que marca o início do desenvolvimento embrionário das sementes. A chegada do grão de pólen e sua interação com o estigma estimulam mudanças celulares no rudimento seminal. Essas alterações morfológicas e citológicas que culminam na formação da semente foram descritas por FOSTER (1943) que acompanhou o desenvolvimento embrionário de *C. papaya* antes e após a polinização de flores hermafroditas.

A polinização em angiospermas é o processo de transferência do gametófito masculino para o estigma do gineceu. O grão de pólen viável adere-se firmemente a superfície do estigma onde absorve nutrientes e água. Durante a hidratação, o grão de pólen torna-se fisiologicamente ativo, germinando através do estilete para alcançar o saco embrionário e posteriormente fecunda-lo (Fig. 3 A-D) (FOSTER, 1943). O processo de germinação do grão de pólen estimula a protrusão de um poro germinativo formando o tubo polínico que se alonga pelo estilete devido ao deslocamento do núcleo vegetativo para esta extremidade. Apenas a porção distal bulbosa do tubo polínico contém citoplasma vivo e à medida que se alonga através dos tecidos receptivos no estilete é depositada calose nas porções vazias (MAHESHWARI, 1950). Antes que o tubo polínico alcance o rudimento seminal, os tecidos integumentares e o nucelar que envolvem o saco embrionário são estimulados ao crescimento (FOSTER, 1943).

Os tecidos integumentares externo e interno do rudimento seminal são compostos por células parenquimáticas que se dividem para formar um conjunto de camadas que constitui o revestimento da semente madura, ou testa da semente. Esses tecidos começam a se dividir durante a germinação do grão de pólen e continuarão a se desenvolver durante todo o processo de formação e maturação do embrião independente da fecundação (Fig. 3 E-G). Desta forma, os tecidos da testa da semente apresentam origem materna (FOSTER, 1943; SANTOS, 2009).

As divisões celulares do integumento externo originam três frações da testa: sarcotesta, mesotesta e endotesta. A primeira, composta por grandes células com aspecto gelatinoso e transparente, forma a porção mais externa do revestimento (Fig. 3 f). Internamente a sarcotesta, encontra-se a mesotesta que aparece como um tecido compacto que em vários intervalos forma cumes paralelos ao eixo da semente (Fig. 3 Gg). As células epidérmicas internas do integumento externo originam a endotesta composta por células menores de parede espessa e com numerosas conexões plasmodesmáticas. O integumento interno persiste na semente madura como uma camada distinta de células com deposição de tanino, denominada de tégmen (Fig. 3 Gc) (FOSTER, 1943; SANTOS, 2009).

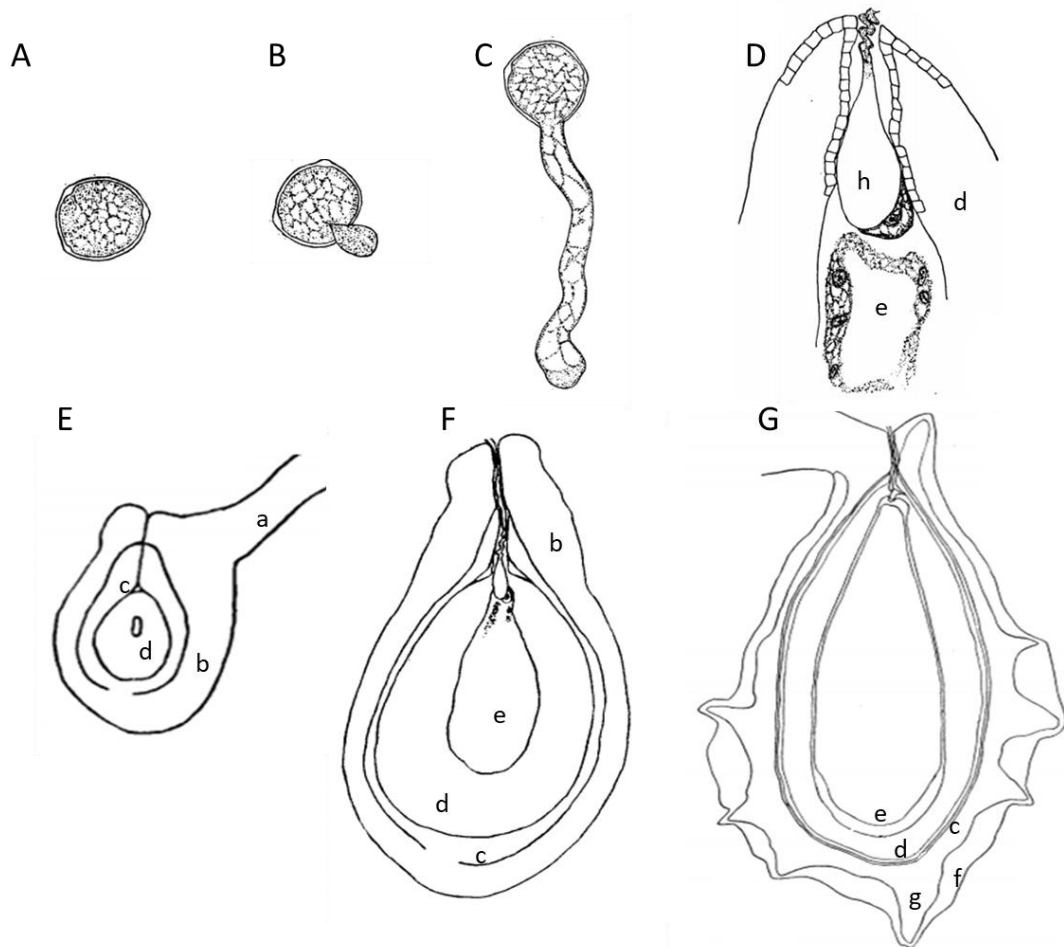


Figura 3: Etapas na germinação de grãos de pólen e desenvolvimento embrionário. **A**- grão de pólen viável; **B** e **C**- alongamento do tubo polínico com sua extremidade bulbosa; **D**- extremidade do tubo polínico bulbosa em contato com o jovem zigoto após a fecundação com formação de vários núcleos no endosperma. **E**- Rudimento seminal de *C. papaya* antes da polinização mostrando funículo maciço, os integumentos externos e internos, e um pequeno jovem gametófito feminino no centro do tecido nucelar; **F**- rudimento seminal após a dupla fecundação mostrando considerável aumento do integumento externo e nucelar, tubo polínico persistente, alguns núcleos de endosperma multinuclear sendo formados na região micropilar proximal do zigoto; **G**- seção do óvulo no estágio octantante com o desenvolvimento das camadas do revestimento da semente. Legenda: **a**- Funículo; **b**- integumento externo; **c**- integumento interno; **d**- nucela; **e**- endosperma; **f**- sarcotesta; **g**- mesotesta; **h**- tubo polínico. Fonte: FOSTER, 1943.

Para que ocorra a formação do embrião é necessário que o tubo polínico alcance o saco embrionário em sua região micropilar (FOSTER, 1943). Durante o processo de germinação do grão de pólen, o núcleo reprodutivo do gametófito masculino (n) passa por um processo de divisão mitótica para obter duas células (n) que participam da dupla fecundação. Uma das células une-se aos dois núcleos polares do saco embrionário, iniciando-se a multiplicação celular, que dará origem ao endosperma ($3n$) (Fig. 3 e). A outra célula reprodutiva fecunda a oosfera dando origem ao futuro embrião da semente ($2n$) (BRESINSKU *et al.*, 2012).

Após a dupla fecundação o endosperma e o zigoto se desenvolvem simultaneamente. As primeiras divisões do zigoto ocorrem de forma assimétrica estabelecendo sua polaridade

apical-basal (BRESINSKU *et al.*, 2012; RAVEN, EICHHORN e EVERT, 2014). Ao mesmo tempo, no endosperma, alguns núcleos são formados com um número comparativamente maior presente nas imediações do zigoto (Fig. 3 Fe). Há uma defasagem definida no desenvolvimento embrionário em relação ao endosperma que se mostra como um tecido multinuclear com rápido crescimento. O embrião e o endosperma não possuem contato direto, sendo estes órgãos separados por uma bainha conspícua (Fig. 4 A e B) (FOSTER, 1943).

Quando o zigoto atinge o estágio de desenvolvimento denominado globular, a célula da extremidade apical densamente citoplasmática, voltada para o centro do saco embrionário, sofre progressão ordenada de divisões celulares para formar o embrião globular octante, ou embrião propriamente dito. A célula basal do zigoto, com grande vacúolo central e potencial de desenvolvimento mais limitado produz, após sucessivas divisões transversais, um suspensor filamentososo unisseriado (COCUCCI e MARIATH, 2004; RAVEN, EICHHORN e EVERT, 2014). Nas angiospermas, o suspensor é uma região embrionária única, que conecta o embrião à região micropilar. Ele empurra o embrião para a cavidade do endosperma e o conecta aos tecidos maternos e endospermais circundantes (KAWASHIMA e GOLDBERG, 2009).

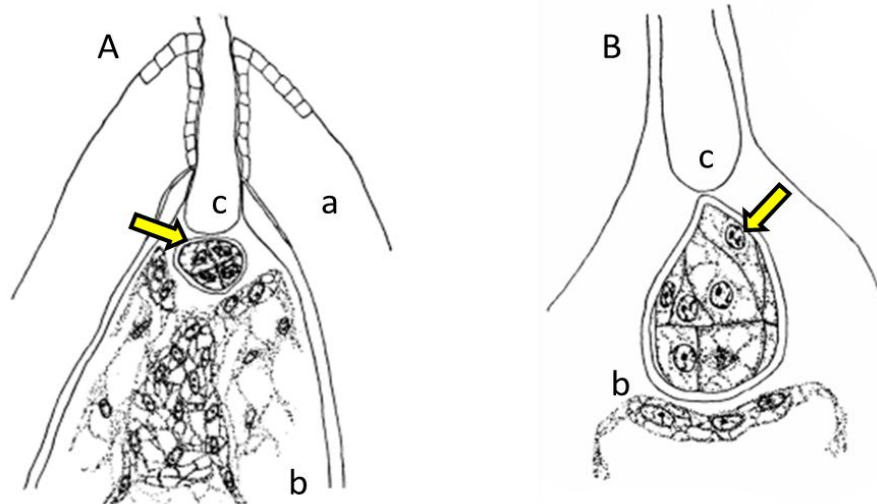


Figura 4: Saco embrionário mostrando a bainha circundante no embrião, tubo polínico persistente e endosperma multinuclear. **A-** embrião zigótico. **B-** embrião octante. Legenda: **a-** nucela; **b-** endosperma; **c-** tubo polínico. Seta- embrião em desenvolvimento. Fonte: FOSTER, 1943.

Gradualmente, o embrião octante desenvolve uma forma bilobada dando origem a dois cotilédones (primeiras folhas da planta). Neste estágio uma organização do ápice radicular e caulinar é iniciada. O embrião assume a forma, mas não o tamanho do embrião encontrado na semente madura (Fig. 5 A). Com o amadurecimento do embrião, o citoplasma do endosperma

torna-se menos denso com abundância de grãos de aleurona e vesículas de óleo. São observados também numerosos vacúolos diminutos no endosperma, bem como, deposição de membranas e paredes celulares entre os núcleos estabelecendo uma transição de uma condição multinuclear (Fig. 5 B) para uninuclear (Fig. 5 C) (FOSTER, 1943).

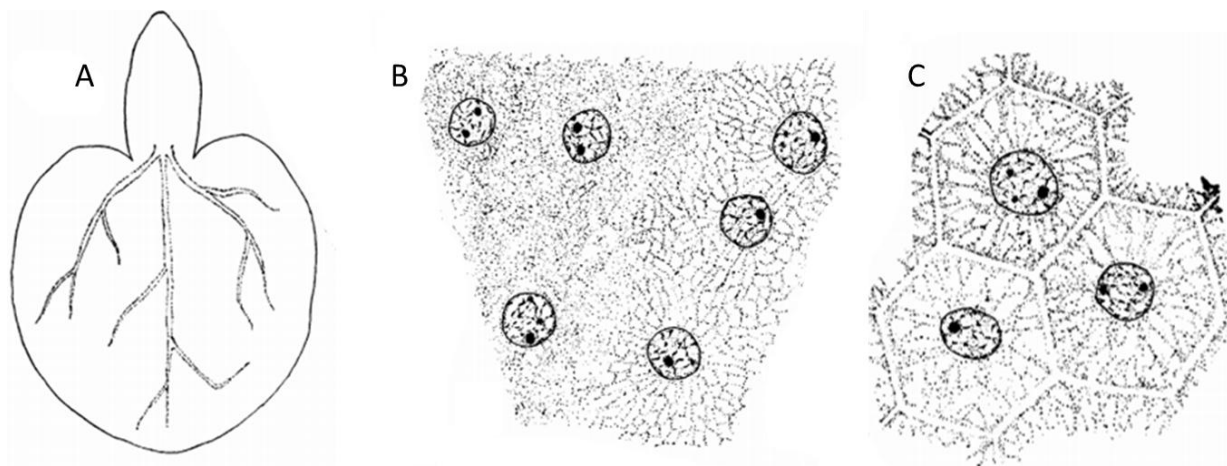


Figura 5: **A-** embrião quase maduro mostrando tecido provisório no cotilédone com vasos condutores definidos. **B-** início da transição do endosperma multinuclear para uninuclear. **C-** deposição de membranas e paredes celulares entre os núcleos do endosperma. Fonte: FOSTER, 1943.

A extensão simultânea dos tecidos meristemáticos primários define o estágio de torpedo, onde ocorre o alongamento do eixo embrionário e dos cotilédones. Posteriormente, as divisões celulares cessam e a semente passa pelo processo de maturação. Nesta fase ocorre um acúmulo maciço de reserva de nutrientes, desidratação e, conseqüentemente, diminuição do metabolismo proporcionando o estado de dormência às sementes (MARINOS, 1970; ROBERTS *et al.*, 2003; COCUCCI e MARIATH, 2004; RAVEN, EICHHORN e EVERT, 2014).

2.2. Relações nutricionais durante o desenvolvimento embrionário

Durante o desenvolvimento embrionário da semente de *C. papaya* algumas relações nutritivas entre a planta-mãe e o embrião foram levantadas. Uma via de nutrição poderia envolver o suspensor devido à presença de conexões plasmodesmáticas com embrião em desenvolvimento. Desta forma, o suspensor poderia atuar como um canal para o fornecimento de nutrientes e reguladores de crescimento cedidos pela planta-mãe. Contudo, durante a maturação da semente, o suspensor passa por morte celular programada. Portanto, esta estrutura mantém o desenvolvimento inicial do embrião, mas não contribui com as etapas finais (KAWASHIMA e GOLDBERG, 2009; BRESINSKU *et al.*, 2012). Uma segunda relação nutritiva poderia envolver o tubo polínico formado pela germinação do grão de pólen.

Persistente em diferentes etapas da embriogênese zigótica, o tubo polínico encontra-se intimamente pressionado contra o embrião multicelular podendo ocorrer uma nutrição nos estágios iniciais de desenvolvimento como ocorre em algumas cucurbitáceas. À medida que o embrião envelhece pode ocorrer uma mudança no arranjo nutritivo onde o endosperma pode tornar-se mais funcional em relação ao embrião à medida que este fica mais imerso no tecido (FOSTER, 1943). Por fim, a última relação nutritiva levantada poderia envolver um grupo de células nucelares diferenciadas com projeções alongadas semelhantes a dedos na região calazal do saco embrionário (Fig. 6). Estas células estão localizadas relativamente próximas ao endosperma e também ao tecido vascular ramificado do integumento interno. Desta forma, as células nucelares diferenciadas poderiam desempenhar um papel essencial no transporte de substância dos feixes vasculares ao endosperma. No entanto as inter-relações nutricionais durante o desenvolvimento embrionário ainda não são claras (FOSTER, 1943).

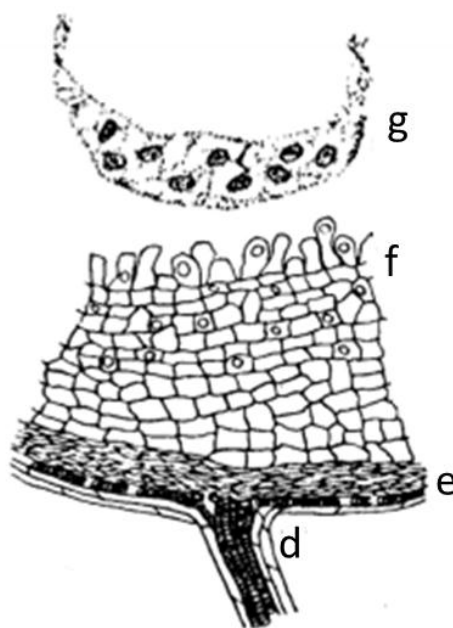


Figura 6: Secção do saco embrionário na região calazal mostrando os feixes vasculares que se ramificam no integumento interno. Legenda: **d**- feixe vascular; **e**- integumento interno; **f**- tecido nucelar com células superiores alongadas em forma de dedos; **g**- endosperma. Fonte: FOSTER, 1943.

2.3. Anatomia da semente madura

A semente de *C. papaya* é bitegmentada, pois o rudimento seminal apresenta dois integumentos. A exotesta, mesotesta e endotesta da semente madura (Fig. 7) são derivados do integumento externo enquanto o tégmen é procedente do integumento interno. Juntos, estes tecidos constitui a testa das sementes e conferem proteção à perda excessiva de água, injúrias

mecânicas e a outros agentes externos, inclusive microrganismos (FOSTER, 1943; SANTOS *et al.*, 2009).

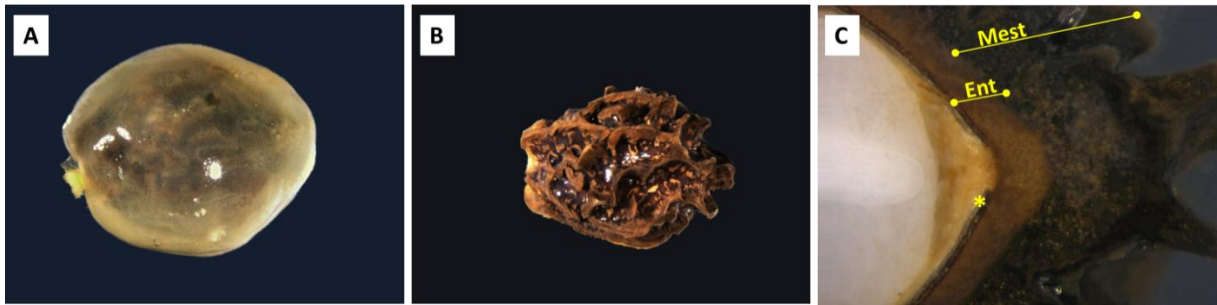


Figura 7: Fotos de sementes de *Carica papaya* obtida de estereoscópio. **A**- Sementes com sarcotesta em evidência. **B**- Sementes com endotesta em evidência. **C**- Corte longitudinal mostrando a disposição da mesotesta, endotesta e tégmen no revestimento da semente. Legenda: **Mest**-mesotesta; **Ent**- endotesta; **asterisco**- tégmen.

As grandes células de aspecto gelatinoso e transparente da sarcotesta são facilmente diferenciadas das demais frações do revestimento da semente madura (Fig. 7 A). A mesotesta e endotesta são compostas por células de formato isodiamétrico com parede celular espessa que confere rigidez a estas frações. A mesotesta está localizada na região mais externa da testa rígida e possui várias protuberâncias derivadas de divisões periclinais de suas grandes células que não se processam de maneira uniforme ao longo eixo da semente (Fig. 7 B). Em contrapartida, as células da endotesta são menores e compactadas localizadas logo abaixo da mesotesta (Fig. 7 C). Nas células mais internas da endotesta pode ser observada uma fileira ou mais de células com um cristal de oxalato de cálcio em seu interior (Fig. 8). Abaixo das células cristalíferas encontra-se o tégmen com epiderme cutinizada e deposição de tanino no interior de suas células (Fig. 8) (SANTOS *et al.*, 2009).

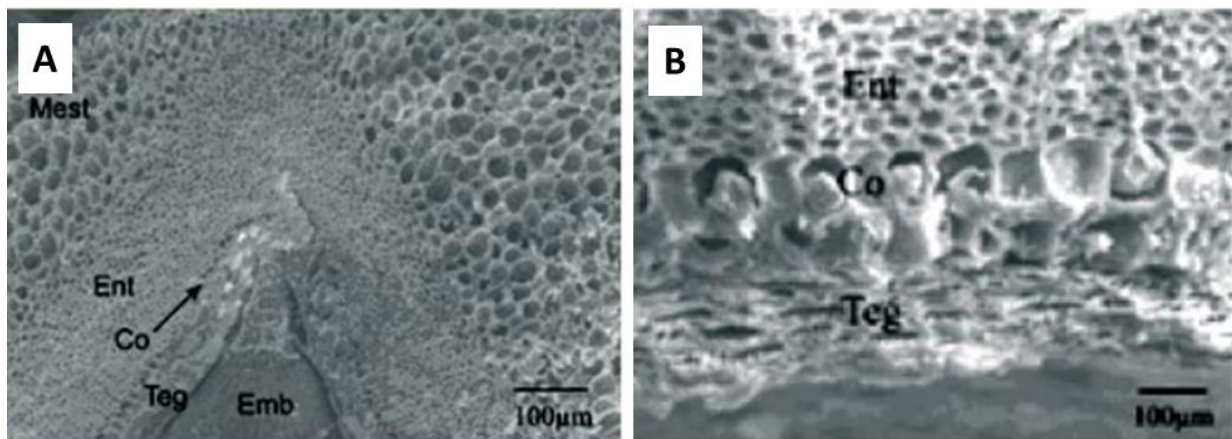


Figura 8: Imagem obtida utilizando microscópio eletrônico de varredura. **A**- corte longitudinal com destaque as frações da testa da semente. **B**- corte longitudinal com ênfase nas células cristalíferas. Legenda: **Mest**-mesotesta; **Ent**- endotesta; **Co**- cristais de oxalato de cálcio; **Teg**- tégmen; **Emb**- embrião. Escala: 100µm. Fonte: SANTOS *et al.*, 2009

Carnoso e rico em ácidos graxos, o endosperma de *C. papaya* (Fig. 9 b) possui coloração branco leitosa e uma camada circundante protéica de aleurona. Imerso no endosperma, encontra-se um embrião localizado no eixo central de semente (Fig. 9 A e B). Seu formato é do tipo espátula uma vez que possui dois cotilédones retos e o eixo embrionário não é coberto por eles como mostra a figura 9 C. Os cotilédones ovóides e achatados também de coloração branco leitosa são ricos em polissacarídeo (SANTOS *et al.*, 2009).

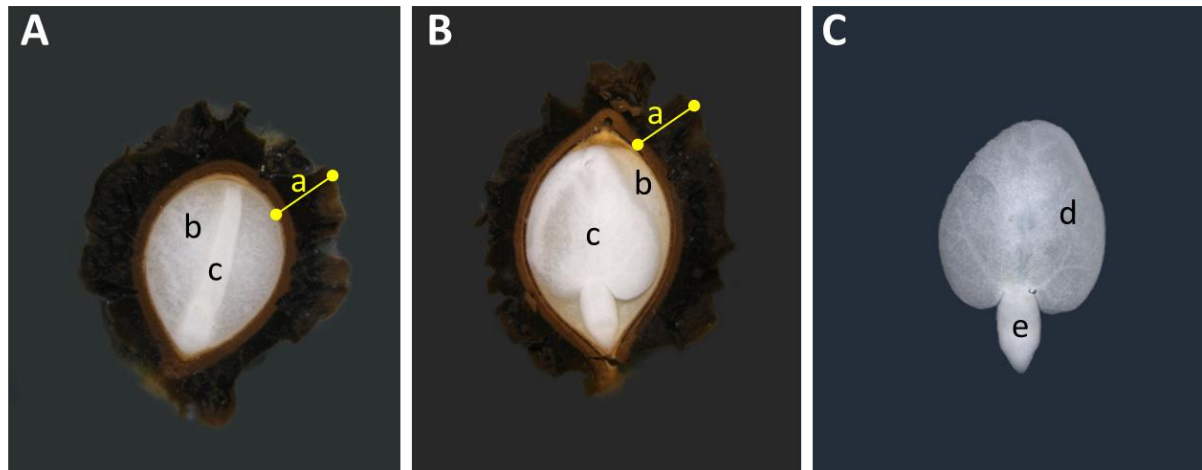


Figura 9: Imagens de sementes de *Carica papaya* obtida em estereoscópio. **A-** Sementes em corte longitudinal. **B-** Sementes em corte longitudinal lateral. **C-** embrião em evidência. Legenda: **a-** testa ou revestimento da semente; **b-** endosperma; **c-** embrião; **d-** folha cotiledonar; **e-** eixo embrionário.

2.4. Mecanismos de transmissão de vírus em semente

A capacidade de transmissão de vírus por sementes depende da combinação específica vírus-hospedeiro, competência do vírus em movimentar-se dos tecidos vegetativos para os tecidos reprodutivos e embrionários, bem como, sobreviver durante o processo de maturação das sementes (CARD, PEARSON e CLOVER, 2007).

Apesar dos embriões possuírem alto grau de proteção contra a invasão de patógenos um elevado número de vírus foi descrito com capacidade de superar as barreiras e se propagar pelas gerações seguintes (BENNETT, 1969) dentre os quais incluem alguns gêneros como *Nepovirus*, *Hordeivirus*, *Potyvirus*, *Carmovirus*, *Comovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Sobemovirus*, *Ilarvirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, dentre outros (JOHANSEN, EDWARDS e HAMPTON, 1994; LIMA *et al.*, 2015). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelos vírus de planta para infectar embriões (WANG e MAULE, 1994).

Vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* podem ser transmitidos para a geração seguinte pelo mecanismo de transmissão não embrionária, ou seja, o vírus não infecta o interior da semente. Devido à sua alta estabilidade, as partículas virais proveniente da planta-

mãe sistemicamente infectada ficam aderidas à superfície do tegumento da semente e permanecem ativas até que a mesma germine. A transmissão dos *Tobamovirus* ocorre quando este penetra nos tecidos da plântula em seus estágios iniciais (CARD, PEARSON e CLOVER, 2007; AMARI, BURGOS e PALLÁS, 2009).

Por outro lado, muitos vírus de planta podem infectar o interior da semente, mais comumente o embrião, durante seu desenvolvimento (CARD, PEARSON e CLOVER, 2007; AMARI, BURGOS e PALLÁS, 2009). Dois são os mecanismos pelos quais o vírus pode infectar o embrião: infecção direta ou indireta (JOHANSEN, EDWARDS e HAMPTON, 1994). Ambos os processos podem ser utilizados mutuamente por vírus de plantas para atingir seu nível final de transmissão vertical (MAULE e WANG, 1996).

2.4.1. Infecção direta

Ocorre quando o vírus invade o embrião em algum estágio de desenvolvimento, após a fertilização. O mecanismo pelo qual o vírus infecta diretamente o embrião pode ser exemplificado pelos primeiros estudos sobre transmissão por sementes realizados por WANG e MAULE (1992; 1994). Os autores avaliaram a transmissibilidade do *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) em sementes imaturas de duas variedades de ervilha (*Pisum sativa*).

Utilizando a técnica ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e microscopia eletrônica de transmissão (MTE), WANG e MAULE (1992) avaliaram a presença de partículas virais em órgãos reprodutivos, antes e após a fecundação, de plantas de ervilha sistemicamente infectadas pelo PSbMV. Partículas virais foram detectadas em amostras de sépalas, pétala, antera e carpelo antes da fecundação. No entanto, não foram detectadas em grão de pólen e óvulos. Após a fecundação, embriões ainda imaturos foram analisados e confirmados para a infecção por vírus.

Os autores postularam que o PSbMV é capaz de movimentar-se dos órgãos vegetativos da planta-mãe para os órgãos reprodutivos e, posteriormente, para a região micropilar do saco embrionário. Posteriormente, após a fertilização, o vírus atinge o suspensor que se forma temporariamente durante o desenvolvimento embrionário. Essa estrutura está relacionada com a nutrição do embrião nos primeiros estágios de desenvolvimento, mas pode atuar como uma ponte para que as partículas virais alcancem o embrião de ervilha (WANG e MAULE, 1994). Portanto, a capacidade do vírus para invadir a região do micróptero antes da

morte celular programada do suspensor pode ser um fator importante que controla a frequência de transmissão do PSbMV por sementes de ervilha.

Outro mecanismo para o acesso direto do PSbMV ao embrião de ervilha foi proposto por ROBERTS *et al* (2003). Segundo esses autores, o vírus explora novas vias simplásticas para infectar o embrião. Análise ultraestrutural, em sementes maduras, revelou conexões plasmodesmáticas entre as células da testa e o suspensor, testa e embrião, bem como, suspensor e embrião. No entanto, não foram visualizados plasmodesmas cruzando o limite entre o endosperma e as demais estruturas que fazem limites a esta, como a testa, o suspensor ou embrião. O isolamento do embrião e do suspensor em relação ao endosperma ocorre devido à presença de uma bainha embrionária composta de material da parede celular (MARINOS, 1970).

Curiosamente, proteínas de corpos de inclusão viral (CIs) foram visualizadas presas à parede celular da testa adjacente ao endosperma sugerindo a presença de plasmodesmas cruzando o limite entre a testa e o endosperma. Embora os plasmodesmas estivessem abundantemente presentes em todo o tecido da testa, nenhum deles foi definitivamente identificado cruzando o limite. Este fato pode estar relacionado com a rota tortuosa desses canais e as distorções ocasionais da parede celular entre os limites destes tecidos. Diante deste exposto, foi postulado que as partículas virais alcançariam os tecidos da testa via suspensor, por meio de sua ligação com a região micropilar e, posteriormente, os vírus poderiam atingir o endosperma através de canais plasmodesmáticos cruzando o limite entre a testa e o endosperma. A constatação da presença de plasmodesmas entre os limites desses tecidos poderia confirmar este processo de infecção direta do embrião de ervilha (ROBERTS *et al.*, 2003).

2.4.2. Infecção indireta

O processo de infecção indireta ocorre quando o vírus tem acesso ao embrião por meio de gametas infectados antes da fertilização. As partículas virais se movimentam dos tecidos vegetativos aos reprodutivos durante o processo de formação do grão de pólen e/ou óvulo que após a fecundação formaram o embrião (LIMA *et al.*, 2015).

Atualmente, mais de 45 espécies de vírus de planta foram descritos com capacidade de infectar embriões por intermédio de grão de pólen infectado (CARD, PEARSON e CLOVER, 2007). Este mecanismo de transmissão é utilizado pelo *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)

que é capaz de invadir grão de pólen de *Torenia fournieri* sistemicamente infectada. Durante a germinação do grão de pólen infectado pelos tecidos do pistilo de plantas saudáveis, o RBDV se acumula na extremidade do tubo polínico em extensão infectando o saco embrionário durante o processo de fertilização (ISOGAI *et al.*, 2014; 2015).

Em damasqueiro, o transporte do *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) em grão de pólen infectado para o saco embrionário saudável ocorre de maneira semelhante ao RBDV. Por meio da dupla fecundação, o PNRSV acessa os tecidos embrionários no início de seu desenvolvimento e pode ser detectado em todas as partes da semente madura: embrião, endosperma e testa (AMARI *et al.*, 2007).

A presença do PNRSV no grão de pólen diminui a aptidão deste em germinar e crescer pelos tecidos do pistilo e, conseqüentemente, a transmissão por grão de pólen é baixa. Aliado a capacidade de invadir grãos de pólen, o PNRSV pode potencializar sua transmissão vertical invadindo os tecidos reprodutivos femininos durante a gametogênese. O vírus infecta o ovário em estágios iniciais de desenvolvimento movendo-se pelo funículo para invadir os integumentos dos rudimentos seminiais. Posteriormente, o PNRSV é capaz de penetrar no tecido nucelar e em alguns casos, no saco embrionário. A capacidade de invadir o gametófito feminino e sua posterior fecundação com grão de pólen infectado aumenta a transmissão do PNRSV para as progênes (AMARI *et al.*, 2007).

Para o nepovírus *Tobacco ringspot virus* (TRSV) a invasão do gametófito feminino antes da polinização é o principal fator de transmissão pela semente em plantas de soja (YANG e HAMILTON, 1974). Em óvulos de feijoeiro, as taxas de infecção por *Bean common mosaic virus* (BCMV) alcança níveis de 80 % antes da fertilização. Entretanto a taxa de transmissão por semente é de apenas 15 % (SCHIPPERS, 1963). Os processos fisiológicos que ocorrem nas sementes durante a maturação como a realocação de nutrientes, a drástica redução da atividade celular e o aumento dos níveis de inibidores poderiam estar relacionados com a redução progressiva no acúmulo de partículas virais levando a baixas taxas de transmissão por sementes até a ausência de sementes infectadas (BOWERS e GOODMAN, 1979; DOMIER *et al.*, 2007).

2.5. Complexo PMeV

A incidência da doença meleira do mamoeiro foi relatada pela primeira vez na década de 80 em pomares no sul da Bahia (RODRIGUES, ALVES e MARIN, 1989a) e se

estendeu rapidamente para outros estados brasileiros ganhando proporções internacionais. Atualmente, a doença é considerada um dos maiores problemas fitossanitários para os pomares de produtores de mamão no Brasil e México (BRITO *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2015). Embora os sintomas da doença não foram relatados em pomares do Equador, a meleira do mamoeiro é capaz de infectar um parente subtropical de mamão nativo do país, o babaco (*Vasconcellea x heilbornii*, *Carica pentagona*) (FRANCO, QUINTO e AVILA, 2018).

Inicialmente, a doença foi atribuída a um distúrbio na absorção de cálcio ou boro resultante de um estresse hídrico ou um desbalanceamento desses elementos no solo (NAKAGAWA, TAKAYAMA e SUZUKAMA, 1987; CORREA *et al.*, 1988). Entretanto, o monitoramento da dispersão e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo indicou o envolvimento de um agente biológico a doença (RODRIGUES, VENTURA e MAFFIA, 1989b).

A etiologia da meleira foi então associada a um vírus quando KITAJIMA *et al.* (1993) detectaram, restrito em laticíferos de plantas doentes, partículas isométricas medindo cerca de 50 nm. A purificação destas revelou um fragmento de RNA fita dupla (dsRNA) denominado papaya meleira virus (PMeV) de aproximadamente 12 kb. Posteriormente, a etiologia viral foi comprovada através de micro-injeção de látex de planta doente em ápice caulinar de plantas saudáveis, sendo os sintomas da meleira manifestados 45 dias após inoculação (ZAMBOLIM *et al.*, 2003).

Estudos iniciais utilizavam látex de plantas com sintomas típicos da meleira para a extração do RNA total e posterior visualização das bandas de RNA resultantes por meio da eletroforese em gel de agarose. Normalmente, duas bandas poderiam ser visualizadas no gel: uma de aproximadamente 10 kb (KITAJIMA *et al.*, 1993; MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2003) e uma segunda com aproximadamente 4,5 kb (ANTUNES *et al.*, 2016).

A fim de caracterizar o PMeV, os fragmentos foram sequenciados e analisados *in silico*. Este estudo permitiu a constatação de dois vírus associados à doença meleira do mamoeiro formando um complexo viral. O dsRNA de aproximadamente 10 kb possui duas possíveis fases de leitura aberta (ORFs, do inglês open reading frame) com similaridade aos membros da família *Totiviridae*. A ORF1 do PMeV codifica para proteína de revestimento (CP) enquanto que a ORF 2 codifica para RNAs polimerase dependentes de RNA (RdRp,

do inglês RNA-dependent RNA polymerase) (ABREU *et al.*, 2015a; ANTUNES *et al.*, 2016).

O segundo fragmento de aproximadamente 4,5 kb corresponde a um vírus de RNA fita simples (ssRNA) relacionado a espécies do gênero *Umbravirus*, denominado de papaya meleira virus 2 (PMeV2). Este possui duas ORFs: ORF1 codifica uma proteína hipotética e a ORF2 codifica uma RdRp putativa (ANTUNES *et al.*, 2016). A variante mexicana PMeV-Mx, bem como, Papaya virus Q (PpVQ) isolado do Equador possuem 71 e 70 % de similaridade com o PMeV2, respectivamente. Entretanto, em plantas sintomáticas do México o isolado PMeV-Mx não está associado a outro vírus. No Equador o PpVQ encontra-se em co-infecção com o *Papaya ringspot virus* (PRSV). Contudo, sintomas não são induzidos em infecção simples ou dupla com PRSV (ANTUNES *et al.*, 2016; FRANCO, QUINTO e AVILA, 2018).

Em plantas com dupla infecção, a CP sintetizado pelo PMeV é capaz de encapsidar o próprio genoma de dsRNA bem como transencapsidar o ssRNA do PMeV2 (ANTUNES *et al.*, 2016). Todavia, as partículas virais somente são visualizadas restritas em células de laticíferos e fortemente aderidas a polímeros do látex de planta doentes (KITAJIMA *et al.*, 1993).

Evidências indicam que o PMeV pode ser um vírus persistente em *C. papaya* pois o dsRNA foi detectado em todas as plantas analisadas, sintomáticas ou assintomáticas. Contudo, somente as plantas sintomáticas foram infectadas pelo PMeV2 sugerindo que, em infecção simples, o PMeV pode agir como um vírus persistente e não induzir sintomas de meleira (ABREU *et al.*, 2015; ANTUNES *et al.*, 2016).

2.6. Sintomas e epidemiologia da meleira do mamoeiro

A doença meleira do mamoeiro possui como principal sintoma a exsudação espontânea de látex translúcido e viscoso que, em contato com o ar, oxida causando manchas escuras nas frutas (Fig. 10 A) e pequenas lesões necróticas em folhas jovens (Fig. 10 B). O látex extravasado confere um aspecto “melado” aos órgãos danificados atribuindo o nome a doença (Fig. 10 C). Além dos efeitos na aparência da fruta, mudanças nas propriedades organolépticas alteram seu sabor e consistência inviabilizando a venda do produto (RODRIGUES, ALVES e MARIN, 1989a).

No México, os sintomas da meleira são mais severos e a presença de látex pode ser observada no interior da cavidade da fruta cobrindo as sementes (Fig. 10 D) e manchas necróticas nos pecíolos de folhas (Fig. 10 E) (BRITO *et al.*, 2012). Todavia, os sintomas aqui descritos somente se desenvolvem após a floração que ocorre entre 6 a 8 meses de idade indicando um mecanismo de tolerância antes do florescimento (VENTURA, COSTA e TATAGIBA, 2004; MADROÑERO *et al.*, 2018).

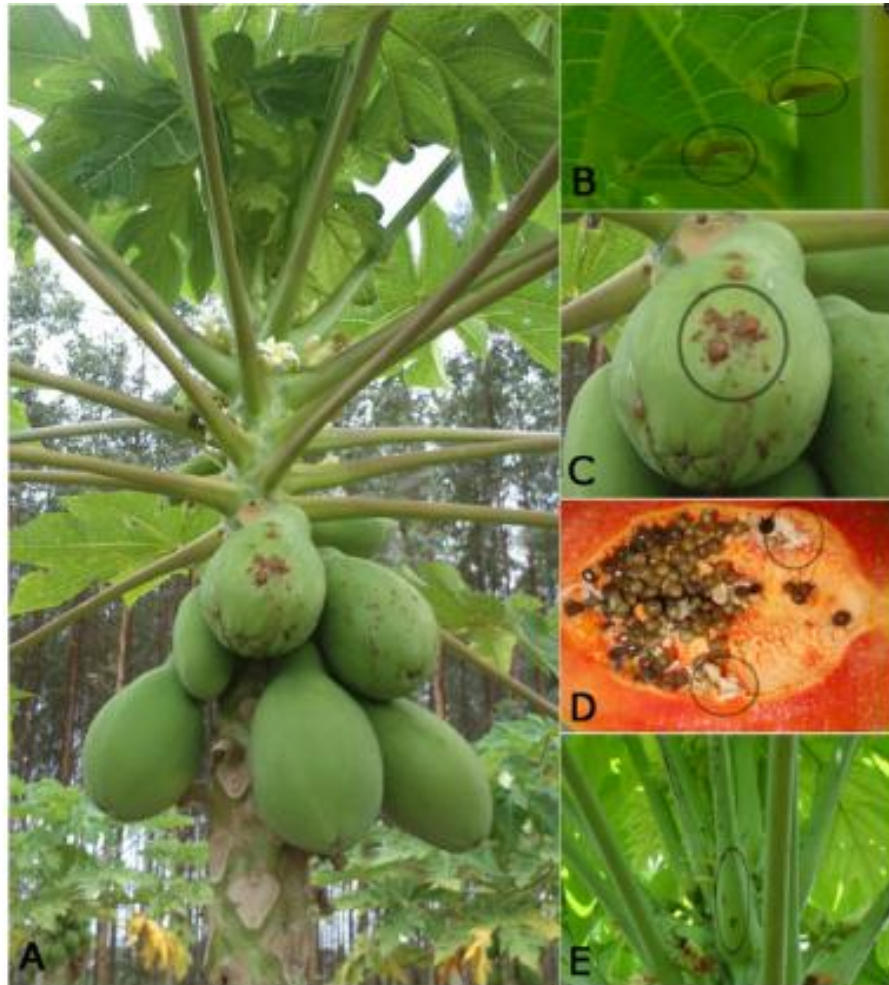


Figura 10: Sintomas da infecção pelo complexo PMeV em *Carica papaya*. **A**- Planta de mamão mostrando os sintomas da meleira. **B** – Em plantas doentes ocorre o extravasamento espontâneo do látex, que oxida após a exposição atmosférica, resultando em pequenas lesões necróticas nas bordas de folhas jovens e; **C**- frutas com aspecto pegajoso. **D**- Plantas doentes no México apresentam látex no interior da cavidade da fruta e; **E**- manchas necróticas nos pecíolos das folhas. Os círculos pretos destacam os principais sintomas. Fonte: ABREU *et al.*, 2015.

Estudos sobre os aspectos epidemiológicos da meleira do mamoeiro apontam uma relação entre as práticas agrícolas à disseminação da doença dentro dos pomares de mamoeiro. Instrumentos de poda e colheita, bem como, o movimento do trator durante o trabalho de campo podem ocasionar feridas em plantas doentes proporcionando a exsudação de látex contaminado e, subsequente inoculação mecânica em mamoeiros saudáveis

(VENTURA *et al.*, 2003). A alta porcentagem de plantas infectadas em pomares do México também foi atribuída às práticas agrícolas (MAGAÑA-ALVAREZ, 2013).

Estudos sobre hospedeiros alternativos confirmam que o PMeV infecta *Brachiaria decumbens* (*Poaceae*) presente nas entrelinhas de pomares com incidência da doença. Contudo, a gramínea não manifesta os sintomas de infecção por vírus (ZAMBOLIM *et al.*, 2003). Em pomares do México onde a melancia é frequentemente cultivada em ciclos próximo ou sobreposto ao mamão, o PMeV-Mx foi capaz de infectá-las causando lesões necróticas nas bordas de suas folhas (CÁMARA *et al.*, 2018).

Estudos epidemiológicos apontaram, também, o envolvimento de vetores aéreos associada à disseminação da meleira (VENTURA *et al.*, 2003). Na Bahia, a transmissão da doença por cigarrinha *Empoasca bordia*, afídeos *Toxoptera citricidus*, *Myzus persicae* e mosca branca *Bemisia tabaci* Biotipo B foi avaliada em condições controladas. Somente as plantas submetidas à infestação com a mosca-branca apresentaram os sintomas característicos de exsudação de látex nas frutas e a presença de dsRNA. Desta forma, o vírus é passivo a ser transmitido por mosca-branca (VIDAL *et al.*, 2000). No Equador, a transmissão da doença por mosca-branca, ácaros vermelhos e cochonilhas foi avaliada em fazendas experimentais, mas somente a *B. tabaci* foi descrito como um potencial vetor para o PpVQ (FRANCO, QUINTO e AVILA, 2018).

Estudos realizados no estado do Espírito Santo demonstraram que, em condições de campo, a flutuação populacional de mosca-branca da espécie *Trialeurodes variabilis* (Quaintance) não apresenta relação com a incidência de meleira (ANDRADE *et al.*, 2003). No entanto, o aumento do grau de infestação de cigarrinhas apresentou uma relação positiva com a ocorrência da doença indicando fortes indícios de que este inseto seja um possível vetor. Contudo, são necessários estudos em condições controladas para constatar a transmissão por cigarrinhas (LIMA *et al.*, 2003; GOUVEA *et al.*, 2018).

Como a instalação de novos pomares de mamão se dá por meio da semeadura, o potencial de transmissão de vírus por semente também foi investigada. O único trabalho que confirma a transmissão vertical da meleira foi descrito no México com uma taxa de 81 % de transmissão. Sementes secas obtidos de frutas doentes foram seccionadas em revestimento e embrião-endosperma e avaliados quanto à infecção pelo PMeV-Mx pelo método RT-PCR. Das 100 sementes analisadas o PMeV-Mx infectou 50 % das amostras de embrião-endosperma e 83 % do revestimento da semente. A detecção do PMeV-Mx em sementes de

plantas doentes levantou a hipótese de que a meleira pode ter sido introduzida no México via sementes infectadas (TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2015). Em outro experimento, tecidos de folhas jovens e maduras, flores, pecíolos e sementes, incluindo a sarcotesta foram utilizadas para avaliar a presença do ssRNA. Em todas as amostras houve amplificação de um fragmento de 491 pb (Fig. 11) indicando que o PMeV-Mx é amplamente distribuído no mamoeiro (MORENO *et al.*, 2015). Vale ressaltar que o vírus encontrado no México apresenta alta similaridade ao PMeV2 identificado no Brasil (ANTUNES *et al.*, 2016).

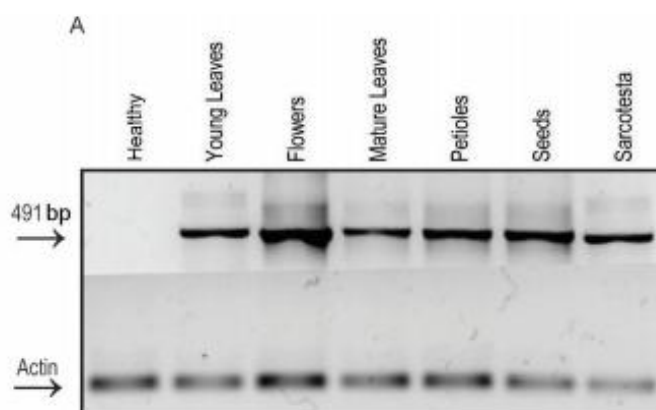


Figura 11: Detecção do PMeV-Mx por RT-PCR em folhas e outros tecidos vegetais utilizando um par de oligonucleotídeos CB38 / CB39. Fonte: MORENO *et al.*, 2015.

2.7. Métodos de detecção do PMeV em sementes de *C. papaya*.

No Brasil, diferentes métodos de detecção molecular foram empregados em amostras de sementes ou plântulas a fim de identificar a transmissão do PMeV através de sementes. Em estudo inicial, RODRIGUES (2006) utilizou a extração do dsRNA genômico do PMeV usando solventes orgânicos, com posterior tratamento com DNase e eletroforese em gel para a visualização da banda de dsRNA com aproximadamente 12 kb. Além da utilização para o diagnóstico em pomares, este método também foi empregado para monitorar a distribuição do PMeV em mamoeiros da cv. Golden infectados com látex de plantas doentes. Amostras de caule, flores, fruto e sementes (seccionadas em carúncula, sarcotesta, envoltório seminal, hipocótilo, cotilédone e endosperma) foram submetidos à análise. Por meio deste estudo foi possível identificar que o dsRNA encontra-se amplamente distribuído no corpo do mamoeiro infectado, ocorrendo em maior concentração nas partes aéreas. Em sementes, somente na carúncula foi possível detectar uma banda com resistência ao tratamento enzimático de peso molecular correspondente as moléculas de dsRNA viral. Este método não detectou o vírus nas sementes, mas revelou um contato próximo visto que a carúncula está localizada na região da micrópila.

A aplicação de um método mais sensível baseado em ensaios de RT-PCR e qRT-PCR para investigar a possibilidade de transmissão vertical do PMeV foi possível após o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para o vírus. ARAÚJO *et al.* (2007) desenvolveu os primeiros oligonucleotídeos para o diagnóstico molecular a partir do dsRNA genômico do PMeV usando uma abordagem RAPD combinado com RT. Estes ensaios permitiram o desenvolvimento de fragmentos curto de DNA gerados aleatoriamente a partir de um molde de RNA viral cuja sequência era desconhecida (WILLIAMS *et al.*, 1990). Dentre os fragmentos de RT-RAPD clonados e sequenciados o C05-3 apresentou alta similaridade com outras RdRp virais (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Posteriormente, novos oligonucleotídeos foram desenhados por ABREU *et al.* (2012) visando uma sequência do PMeV homóloga a RdRp. Um par de oligonucleotídeo (direto e reverso), nomeado como PMeVconv, e o C05-3 foram utilizados para avaliar a transmissão do vírus por sementes. Plântulas da cv. Golden com 15-20 dias de emergência, provenientes de frutos originalmente doentes ($n = 172$) ou frutos sadios ($n = 187$) foram submetidas ao ensaio RT-PCR. Ambos os grupos de plântulas apresentaram resultados negativos para a presença de PMeV. Todavia, a hipótese de transmissão do vírus por sementes não pode ser rejeitado, pois um número maior de plântulas pode ter sido necessário para detectar este vírus em seus ensaios (ABREU *et al.*, 2012).

O único relatório que comprovou a transmissão do vírus da meleira por sementes foi descrito no México (TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2015). Foram colhidos frutos doentes e saudáveis da cv. Maradol para obter as sementes do estudo. Sementes secas inteiras (600 semente por grupo), bem como, sementes seccionadas em embrião-endosperma e revestimento (100 sementes) foram submetidas à análise de RT-PCR. Todas as amostras de sementes inteiras amplificaram um fragmento de aproximadamente 500 pb, enquanto que amostras do revestimento das sementes apresentaram uma taxa de 83 % de infecção quando comparada a infecção do embrião-endosperma com 50 %. Estes resultados sugerem que níveis mais altos de vírus estão presentes no tegumento da semente do que no embrião-endosperma (TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2015). Os resultados positivos para a transmissão do vírus por sementes no México podem ser atribuídos à especificidade dos oligonucleotídeos utilizados no estudo. Estes, foram desenvolvidos por LÓPEZ-OCHOA, MORENO-VALENZUELA e ZAMUDIO-MORENO (2013) para uma sequência conhecida do PMeV-Mx. Os oligonucleotídeos são sensíveis o suficiente para detectar o vírus em qualquer tipo de tecido vegetal, incluindo plantas assintomáticas.

Embora a transmissão vertical tenha sido comprovada apenas para o isolado mexicano, os trabalhos descritos nesta revisão foram desenvolvidos sem o conhecimento da existência de um segundo vírus com genoma de ssRNA associado à meleira. Vale ressaltar que o vírus identificado no México possui similaridade ao PMeV2 do Brasil e que nenhum trabalho descrito até o momento comprovou a transmissão do PMeV por sementes.

Entretanto, após o sequenciamento completo do dsRNA extraído a partir de látex de plantas doentes, novos oligonucleotídeos foram desenhados para o PMeV com base na sequência deduzida da ORF1 que codifica para uma CP (ANTUNES *et al.*, 2016). Estes oligonucleotídeos foram sensíveis o suficiente para permitir a detecção do PMeV em plantas sintomáticas e assintomáticas. Contudo, não foram empregados em amostras de sementes ou plântulas. Desta forma, é necessário retomarmos a investigação da transmissão vertical do PMeV, visto que, introdução de sementes infectadas, principalmente em locais livres do vírus, pode acarretar em graves consequências econômicas para o produtor da cultura (NAKAMURA *et al.*, 2011).

3. HIPÓTESE

O PMeV infecta indiretamente os tecidos embrionário da semente de *C. papaya* sendo transmitido verticalmente para as progênies.

4. OBJETIVO

Avaliar o potencial de transmissão vertical do PMeV e identificar os tecidos embrionários infectados pelo vírus.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de transmissão por sementes;
- Identificar os tecidos que constituem a semente madura;
- Avaliar a distribuição do dsRNA do PMeV em tecidos embrionários do mamoeiro e;
- Predizer estratégias de infecção e sobrevivência e movimento nos tecidos da semente.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Coleta

Para obter as sementes do estudo foram coletados frutos em propriedades produtoras de mamão localizadas no município de Linhares – ES (coordenadas: 19°03'47.0"S 40°01'25.4"W). Frutas de plantas da variedade THB, sem sintomas visíveis para a meleira do mamoeiro, foram colhidos no estágio de maturação 3 (Fig. 12 A), quando a superfície amarela de sua casca apresentam uma cobertura de até 50 % com áreas próximas em verde claro (BASTOS, 2006). Amostras foliares das plantas matriz (plantas-mãe) foram coletadas e armazenadas no ultrafreezer (-80 °C) para posterior diagnóstico molecular da doença.

6.2. Processamento das frutas e sementes

No laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, localizada na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), as frutas foram lavadas em água corrente, sanitizadas em solução contendo 200 mg.L⁻¹ de cloro residual livre por 5 minutos. Em seguida, foram secas a temperatura ambiente e armazenadas até atingir o estágio de maturação 5 (Fig. 12 B), onde 76- 100 % da superfície das frutas apresentaram a coloração amarelada (BASTOS, 2006). Após esse período, as frutas foram seccionadas longitudinalmente e suas sementes extraídas com auxílio de uma colher. A sarcotesta foi removida friccionando as sementes contra a malha metálica de uma peneira sob jato de água corrente. Posteriormente, foram colocadas em placa de Petri coberto com papel filtro por 24 horas para secagem a temperatura ambiente \pm 25 °C (Fig. 12 C). As sementes foram armazenadas em potes de vidro com tampa em geladeira até o estabelecimento dos tratamentos.

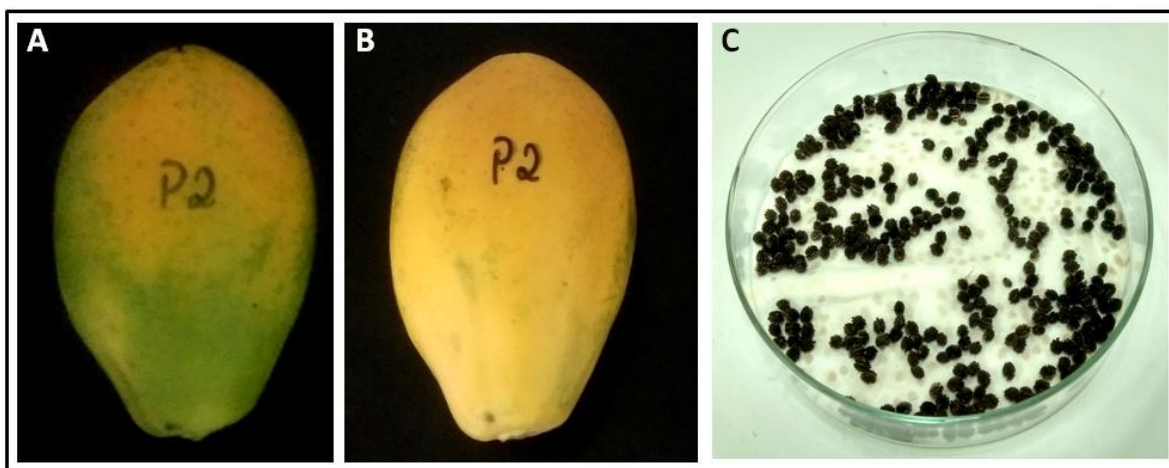


Figura 12: Frutos sadios de *Carica papaya* variedade THB. **A**- Fruta colhida no estágio de maturação 3, quando a superfície amarela de sua casca apresentam uma cobertura de até 50 % com áreas próximas em verde claro. **B**- fruta em estágio de maturação 5 (76-100 % da superfície em coloração amarelada) antes da secção longitudinal

para a extração de sementes. C- As sementes sem sarcotesta foram colocadas em placa de Petri coberta com papel filtro por 24 horas para secagem a temperatura ambiente ± 25 °C.

6.3. Delineamento experimental

Cinco plantas-mãe assintomáticas para a meleira do mamoeiro, com aproximadamente 8 meses de idade, foram escolhidas aleatoriamente como doadoras de frutas para a obtenção das sementes. Estabeleceram-se três frutas para cada planta-mãe das quais foram coletadas 6 sementes para compor um lote de 90 amostras: 40 para localização do PMeV e 50 para transmissão vertical (Fig. 13). Afim de investigar a localização viral, o lote de 40 sementes foi subdividido em dois grupos de vinte: sementes dormentes e plântulas com 15 dias de germinação em câmara tipo B.O.D. Para avaliar a transmissão vertical do PMeV, 50 sementes foram cultivadas em B.O.D por 45 dias. Plântulas inteiras (raiz, hipocótilo e folha cotiledonar) foram utilizadas para o diagnóstico molecular por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

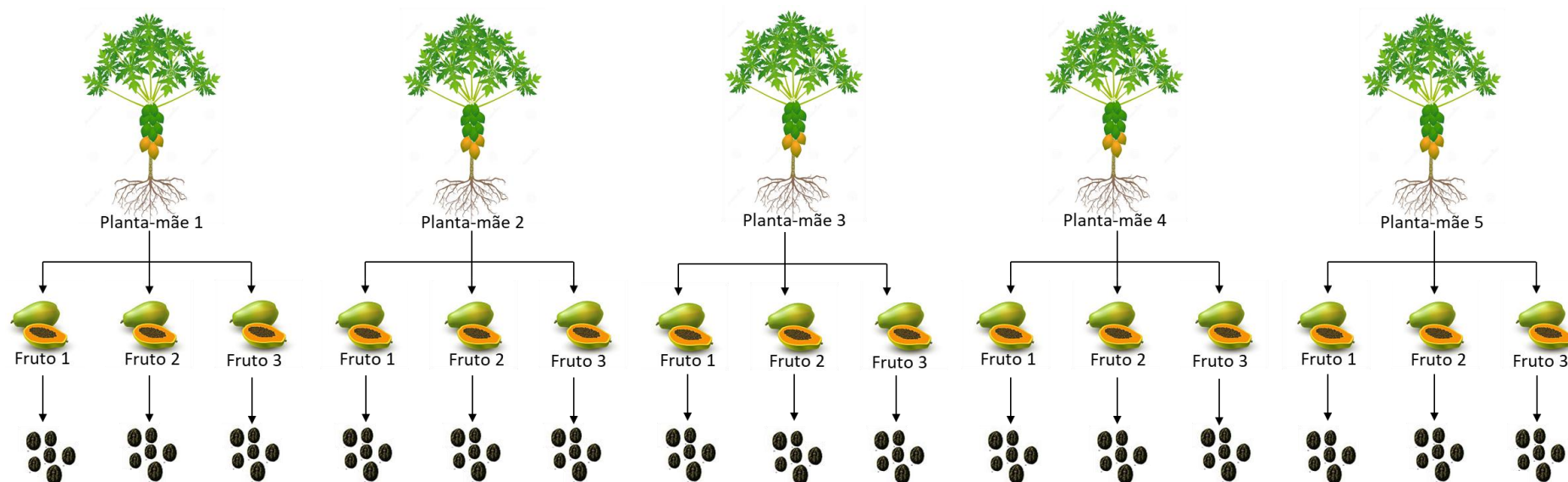


Figura 13: Delineamento experimental para obter as sementes. Plantas ($n=5$) assintomáticas para a meleira do mamoeiro foram aleatoriamente selecionadas como doadora de sementes. Para cada planta-mãe foram colhidos 3 frutos dos quais foram extraídas 6 sementes para obter um único lote com 90 amostra: 40 para testes de hibridização *in situ* e 50 para transmissão vertical.

6.4. Germinação das sementes

As sementes foram desinfetadas com etanol 70 % (v/v) por 10 segundos, posteriormente banhadas em solução de hipoclorito de sódio 2 % (v/v) por 5 minutos e lavadas três vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar (ABREU *et al.*, 2012). Em seguida, as sementes (10 sementes/frasco) foram colocadas para germinar em frascos de vidro com tampa rosqueável de 35 cm de diâmetro contendo 15 ml de meio ágar 1 % (p/v). Todos os materiais e meio de cultivo foram autoclavados em 121 °C por 30 minutos. As sementes foram acondicionadas, por 15 ou 45 dias, em B.O.D com fotoperíodo de 8 horas de luz com alternância de temperatura de 25 a 30 °C.



Figura 14: Sementes de *Carica papaya* variedade THB foram cultivadas em frasco de vidro com tampa rosqueável contendo 15 ml de meio ágar 1 %. Em cada frasco de vidro foram cultivadas 10 sementes.

6.5. Fixação do material e inclusão em parafina

Para o experimento de localização viral, as sementes foram emblocadas em parafina, seccionadas e afixadas em lâminas para microscopia. Vinte (20) sementes foram fixadas em estágio de dormência recebendo um pré-tratamento com hidratação em água destilada por 24h a fim de atenuar os tecidos para melhor absorção das soluções de fixação. Outro lote de 20 sementes foi cultivada em condição estéril por 15 dias. Todas as amostras foram fixadas, lavadas, desidratadas e infiltrados com xilol:etanol conforme descrito por MAURASTONI (2018), com a seguinte modificação. O material foi incubado duas vezes em xilol puro por 12

horas. Após a segunda incubação foi adicionada parafina de inclusão (1/3 do volume de xilol do frasco) e o material foi colocado em estufa a 65 °C por 12-16 horas. A proporção parafina:xilol foi aumentada durante 24 horas com três trocas durante esse período, e em seguida foram realizadas mais três substituições com parafina pura. As sementes foram montadas em blocos de parafina e seções de 7µm foram obtidas em micrótomo de mesa e fixadas em lâminas tratadas com trietoximetilsilano (Sigma, St. Louis, EUA). Cento e trinta e cinco (135) cortes foram submetidos ao processo de hibridização *in situ*, enquanto que 42 cortes foram utilizados para coloração histo-citoquímica.

6.6. Identificação dos tecidos embrionários

Para identificar os tecidos embrionários e sua composição, cortes de 7µm foram submetidos a testes histo-citoquímico com os seguintes reagentes: Sudan Black B, azul de toluidina, lugol, safranina- azul de metileno e oil red.

O corante Sudan Black B 0,1 % (p/v) foi empregado para visualizar a presença de lipídios em coloração preta. Os cortes foram cobertos com o reagente por 30 min, lavadas em etanol 70 % (v/v), seguida por lavagem em água destilada. As estruturas básicas como parede celular, citoplasma e núcleo foram determinadas por meio da coloração com azul de toluidina 0,05 % (p/v) por 2 min seguida de lavagem em água destilada. Esta reação permite identificar paredes do xilema (azul-esverdeado), paredes do colênquima e parênquima (vermelho-púrpura), paredes do floema (vermelho), compostos fenólicos (azul esverdeado) e mucilagem (azul escuro ou roxo). A solução de lugol (iodo 0,5 % (p/v) adicionada de iodeto de potássio 1 % (p/v)) foi aplicada sobre os cortes por 5 min para a identificação de grão de amido em roxo-azulado. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada (CORTEZ, SILVA e CHAVES, 2016).

Uma dupla coloração com safranina-azul de metileno foi empregada para a identificação de cutícula (laranja- avermelhado), calose (púrpura), citoplasma (púrpura-rosa-claro) e lignina (vermelha). Os cortes foram primeiramente corados com azul de metileno por 30 min a 60 °C, lavados em água para uma segunda coloração com solução de safranina aquecida a 60 °C por 2 min para subsequente lavagem em água destilada (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Afim de identificar partículas de borracha em laticíferos de *C. papaya*, uma solução saturada de oil red em ácido fórmico 90 % foi aplicada por 5 min e, posteriormente, lavadas em água destilada (CORTEZ, SILVA e CHAVES, 2016).

Todos os cortes foram montados em água destilada e lamínulas e visualizados em microscópio NIKON® Eclipse E-200. As imagens foram fotografadas e analisadas com auxílio do software Infinity 2.

As reações positivas encontram resumidas no quadro abaixo.

Tabela 1 - Identificação dos tecidos e seus componentes utilizando corantes histo-citoquímica.

Substância detectada	Reagente	Coloração positiva
Lipídios	Sudan black B	Preta
Xilema	Azul de toluidina	Azul-esverdeado
Paredes do colênquima e parênquima	Azul de toluidina	Vermelho-púrpura
Paredes do floema	Azul de toluidina	Vermelho-púrpura
Compostos fenólicos	Azul de toluidina	Azul esverdeado
Mucilagem	Azul de toluidina	Azul escuro ou roxo
Amido	Lugol	Roxo
Cutícula	Safranina-azul de metileno	Laranja- avermelhado
Calose	Safranina-azul de metileno	Púrpura
Citoplasma	Safranina-azul de metileno	Púrpura-rosa-claro
Lignina	Safranina-azul de metileno	Vermelha
Partículas de borracha	Oil red	Vermelho-púrpura

6.7. Hibridização *in situ*

Escherichia coli contendo a sequência molde para a síntese da sonda de hibridização, transformada por MAURASTONI (2017), foi incubada em meio Luria-Bertani (LB) líquido por 24 h a 37 °C. Após crescimento do inóculo, os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e digeridos com enzima de restrição *EcoRI* (Promega, Madison, EUA) conforme o fabricante. O fragmento de interesse foi separado do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose, purificado com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemanha) e utilizadas para as reações de síntese da sonda de hibridização. Primeiramente foi feita a desnaturação de 70-100 ng de DNA molde em um

volume de 15 µl em banho seco por 10 min. Uma solução com 2 µl de mix de hexanucleotídeo/ hexameros randômicos, 2 µl da mistura dNTPs/tetrametilrodamina e 1 µl da enzima Klenow (Sigma, St. Louis, EUA) foi incubada por 24 horas a 37 °C.

Após a síntese de sonda, as lâminas foram incubadas em estufa a 60 °C por 1 h para melhor adesão dos cortes e remoção da parafina. Posteriormente foram lavadas com xilol 100 % (v/v) por 5 min retornando ao forno por mais 15min. Seguiu-se a lavagem em xilol 100 % (v/v) e etanol 100 % (v/v) para completa remoção da parafina. Após secagem, o material foi tratado com 0,5 µg.ml⁻¹ em 0,05M Tris-HCL pH 7,5 de Proteinase K (Sigma, St. Louis, EUA) e aquecido a 37 °C por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram colocadas em Solução de Hibridização (1M pH 7,5-8 Tris-HCL; 5M NaCl; 50 % Formamida deionizada; 0,5M EDTA; Solução de Denharts; 50 % (p/v) Sulfato de Dextrana) acrescentado de 200 ng.mL⁻¹ da sonda para o PMeV previamente sintetizadas. As lâminas foram colocadas em chapa aquecida a 95 °C durante 2 min para desnaturação da sonda e do dsRNA viral e mantidas as 55 °C no escuro por 18 horas. Posteriormente, foi feita lavagem seriada com solução SSC 1X à temperatura ambiente por 15 min e duas lavagens em SSC 0,5X a 65 °C 15 min. Em seguida as lâminas foram coradas com solução de DAPI 0,001 g.mL⁻¹ por 10 min, lavadas e montadas em água deionizada. Após seladas com lamínula e esmalte as lâminas foram visualizadas em microscópio invertido NIKON® Ti-Eclipse utilizando uma combinação de filtros TRITC HYQ composto de um filtro de excitação (530-560 nm - bandpass), um espelho dicromático (570 nm – longpass) e um filtro de emissão (590-650 nm - bandpass) ambos já equipados no microscópio. As imagens foram fotografadas e analisadas com auxílio do software Nis-Elements AR 4.20.00.

6.8. Diagnóstico do PMeV por RT-PCR

Para averiguar a capacidade de transmissão vertical do PMeV, amostras foliares das plantas-mãe e plântulas emergentes foram submetidos a ensaios de RT-PCR. Para a extração do RNA total optou-se pelo método de extração por CTAB (do inglês: Cetyl trimethyl ammonium bromide) devido o alto teor de açúcares em sementes. Cem miligramas de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e adicionada a uma solução de 1 ml de tampão de extração composto de 1 % (p/v) de CTAB, 1,4M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 µl de solução de 1M de tris-HCl pH 6,8 e 1 % de β-mercaptoetanol suplementado com 1,5 % de PVP em microtubos de 2 ml. A solução foi homogeneizada em agitador tipo vortex por 1 min e centrifugada a 16.128 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante coletado foi

submetido a uma extração com 500 µl de fenol pH 4,3 saturado em de tampão citrato 0,1 M/ clorofórmio/ álcool isoamílico (24:12:1) seguida de uma extração com 500 µl de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) sempre mantendo as condições de agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante já descritas. O sobrenadante final foi precipitado em 600 µl de etanol absoluto gelado e 60 µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 em ultrafreezer por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.128 g por 1 h a 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado resultante foi lavado com 300 µl de etanol 70 % (v/v) e centrifugado a 16128 g por 5 min. O álcool foi descartado e o precipitado foi seco ao ar por aproximadamente 1 hora e depois ressuspendido em 20 µl de água ultra-pura.

O RNA total foi quantificado em NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA) e posteriormente tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA) conforme o fabricante. Para a síntese de cDNA foi preparado uma solução com 5,5 µL RNA tratado, 0,5 µg do oligonucleotídeos hexâmero randômico e 1 µL de dNTP 25 mM, e incubados por 3 minutos a 96 °C. Após esse tempo, o cDNA obtido de amostras foliares da plantas doadoras de semente foram sintetizadas com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (RT) conforme o fabricante. O cDNA de amostras de plântulas foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) conforme o fabricante. Oligonucleotídeos para o gene actina (F: 5' ATCTGCTGAACGGGAAATTG 3' e R: 5' TGATGGCTGGAAGAGAACCT 3') foram projetados como descrito por SANTOS (2005) utilizada como controle da reação de RT-PCR. Oligonucleotídeos específicos descrito por ANTUNES *et al.* (2016) foram utilizados nas reações de PCR para diagnóstico do PMeV.

Na reação de PCR utilizou-se a Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) conforme o fabricante. Adicionou-se 1 µl do cDNA para um volume final de 10 µl. As reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, USA) com o seguinte programa: 94 ° C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C durante 45 s, 62 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 1 min, e uma extensão final de 10 min a 72 ° C. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1 % (p/v).

7. RESULTADOS

7.1. Diagnóstico molecular

Com o objetivo de avaliar a capacidade de transmissão vertical do PMeV foi conduzido o diagnóstico molecular por RT-PCR em amostras foliares das plantas-mãe doadoras de sementes e plântulas emergentes. Os resultados utilizando o conjunto de oligonucleotídeos específicos para o PMeV mostraram que todas as amostras foliares das plantas-mãe assintomáticas amplificaram um fragmento de aproximadamente 500 pb confirmando a infecção pelo vírus (Fig. 15 A).

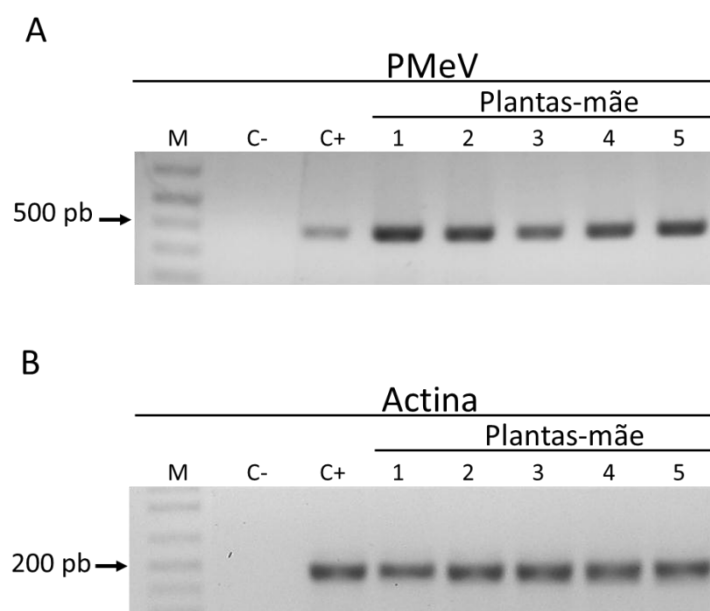


Figura 15: **A-** Reações de RT-PCR convencional realizadas com oligonucleotídeos específicos para o PMeV, a partir de RNA de amostras foliares das plantas-mãe assintomáticas (n=5). Os fragmentos de 500 pb indicam a infecção do vírus. **B-** A amplificação do gene actina foi utilizada como controle da reação de RT-PCR. C+: Controle positivo (planta com sintomas). C-: controle negativo (água). M: marcador molecular (1Kb plus DNA ladder Termofisher®, Waltham, EUA).

Cinquenta sementes foram submetidas à desinfestação superficial antes da germinação para eliminar a possibilidade de contaminação através da superfície externa. Após 45 dias de incubação, plântulas inteiras (raiz, hipocótilo e folha cotiledonar) foram maceradas individualmente em nitrogênio líquido para a extração do RNA total. Contudo, não foi possível obter 100 mg de material vegetal para o diagnóstico molecular como sugerido por ABREU *et al.* (2012). Desta forma, cada amostra de RT-PCR foi constituída pela união de duas plântulas emergentes, totalizando 25 diagnósticos.

O fragmento correspondente ao PMeV foi visualizado em 84 % das amostras (Fig. 16 A) indicando que o vírus é eficientemente transmitido por sementes. Todas as amostras de

plântulas foram submetidas a ensaios de RT-PCR para a amplificação do gene da actina como controle da qualidade do RNA extraído. As amostras que não amplificaram para o PMeV apresentaram o fragmento de 200 pb (Fig. 16 B) correspondente a actina confirmando a qualidade do RNA.

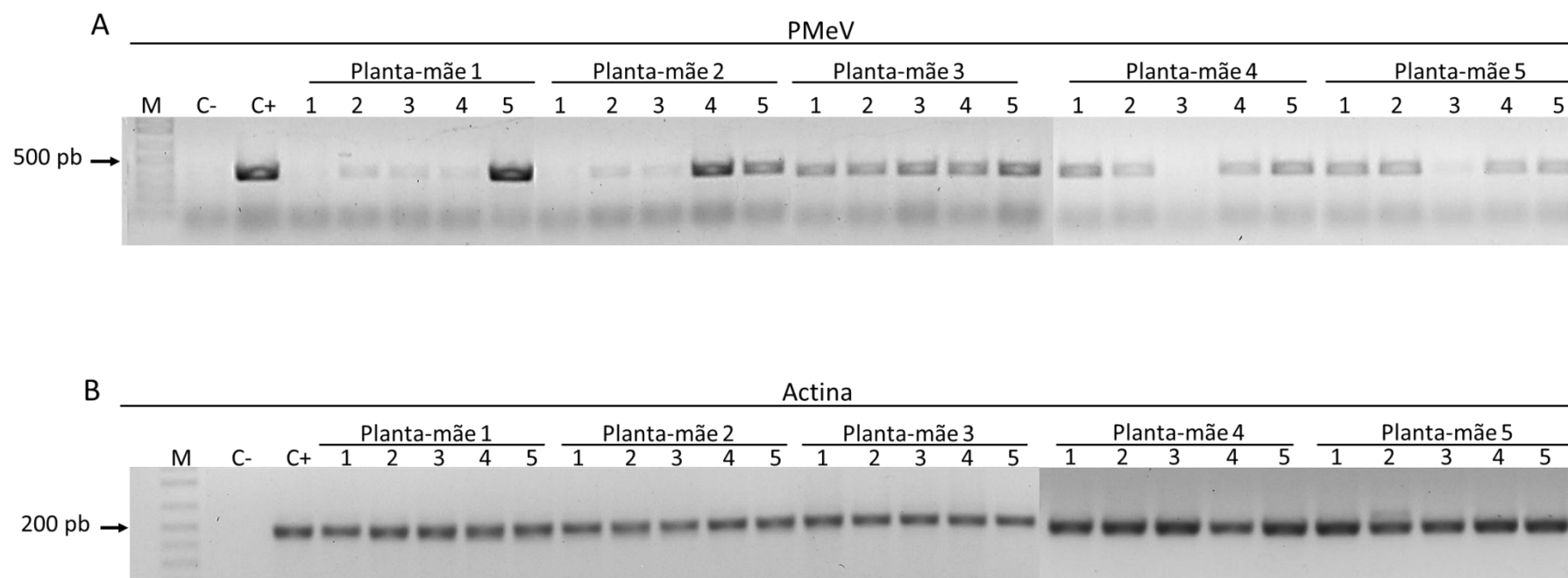


Figura 16: Avaliação da transmissão do Papaya meleira virus (PMeV) através de sementes de *Carica papaya*. **A-** RT-PCR convencional, realizada com oligonucleotídeos específicos para o PMeV, a partir de RNA extraído de amostras constituídas de duas plântulas inteiras contendo raiz, hipocótilo e folha cotiledonar (n = 25). Os fragmentos de 500pb indicam a infecção do vírus. **B-** A amplificação do gene actina, fragmento de 200 pb, foi utilizada como controle da reação de RT-PCR C+: Controle positivo (planta com sintomas). C-: controle negativo (água). M: marcador molecular (1Kb plus DNA ladder Termofisher®, Waltham, EUA).

7.2. Identificação dos tecidos embrionários

Com o objetivo de localizar o dsRNA do P_{MeV}, foram conduzidos testes histo-citoquímicos em amostras de sementes dormentes e plântulas com 15 dias de germinação para a identificação dos tecidos embrionários e seus constituintes. Após 15 dias de cultivo, foi possível observar nas sementes, a emissão da radícula indicando o desenvolvimento da plântula. Entretanto, as folhas cotiledonares das plântulas não encontravam-se expandidas como mostra o esquema a seguir.

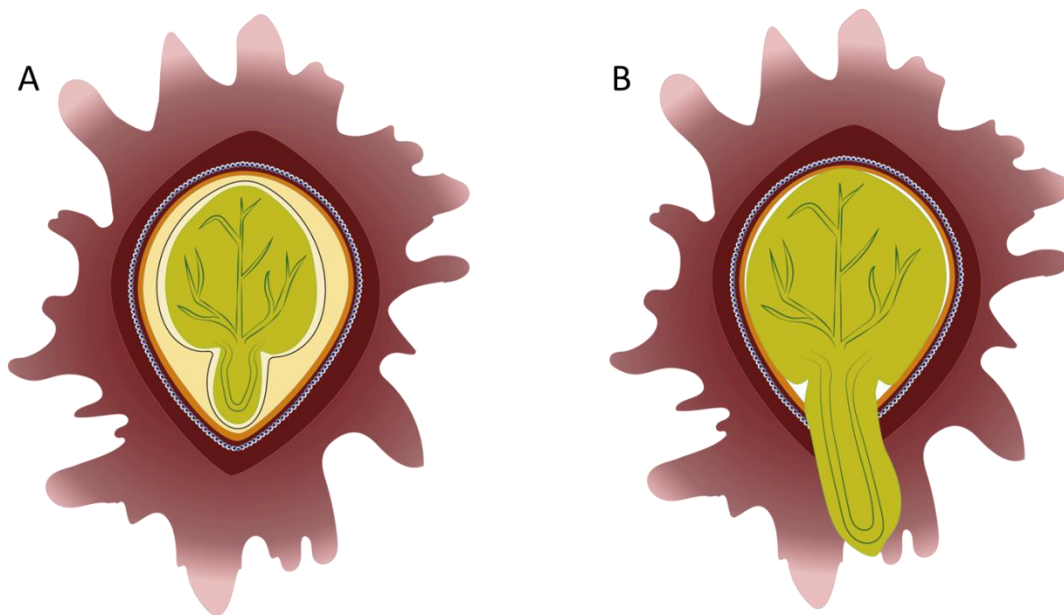


Figura 17: **A**- Esquemas de semente dormente e, **B**-plântula após 15 dias de cultivo.

7.2.1. Revestimento da semente

Testes histo-citoquímicos não revelaram diferenças estruturais no revestimento da semente em amostras de sementes dormentes e plântulas com 15 dias de germinação. Quando ambas as amostras foram submetidas à coloração com safranina-azul de metileno, células com parede secundária espessa e lignificada foram identificadas em vermelho (Fig. 18 A). Deposição de calose também foi evidenciada nessas células em coloração púrpura (Fig. 18 B). Em reação com azul de toluidina, compostos fenólicos foram visualizados no tégmen, região mais interna da testa (Fig. 18 C), e nenhum conteúdo citoplasmático foi detectado na testa (Fig. 18 C).

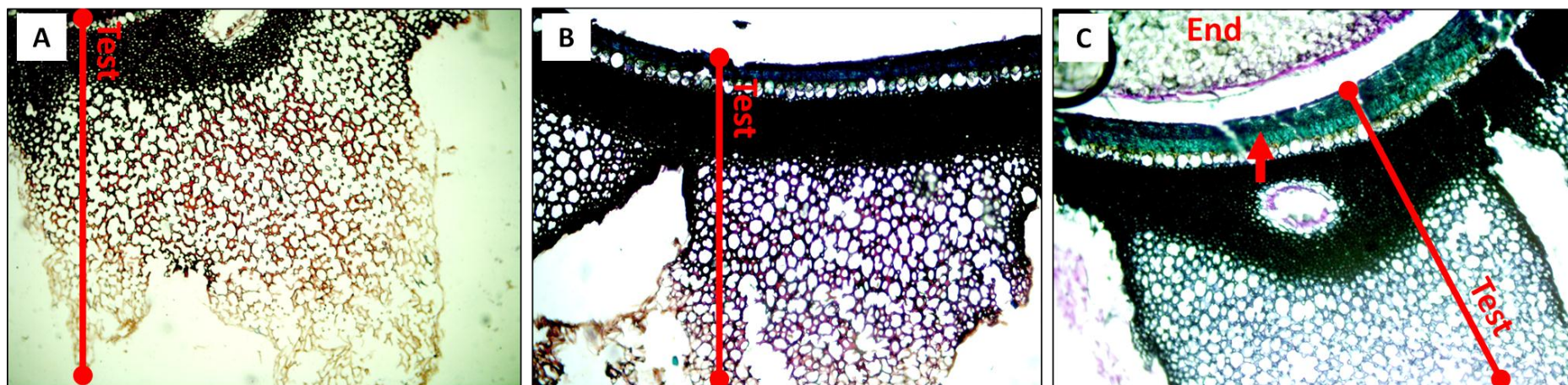


Figura 18: Secções longitudinais na região da testa de sementes de *Carica papaya*. **A**- Reação positiva com safranina-azul de metileno mostrando parede secundária lignificada em vermelho. **B**- Reação positiva com safranina-azul de metileno mostrando regiões com deposição de calose em púrpura. **C**- Coloração com azul de toluidina mostrando células contendo compostos fenólicos (azul-esverdeado) na região do tégmen (seta). Legenda: **Test**- testa da semente; **End**- endosperma.

7.2.2. Endosperma

Como descrito por SANTOS *et al.* (2009), os lipídios consistem no principal composto de armazenamento energético do endosperma de sementes de *C. papaya* apresentando coloração preto ao Sudan Black B. Em sementes dormentes, o endosperma apresentou-se rico em vesículas de lipídios (Fig. 19 A) enquanto que pouco conteúdo foi observado em plântulas com 15 dias de germinação (Fig. 19 B).

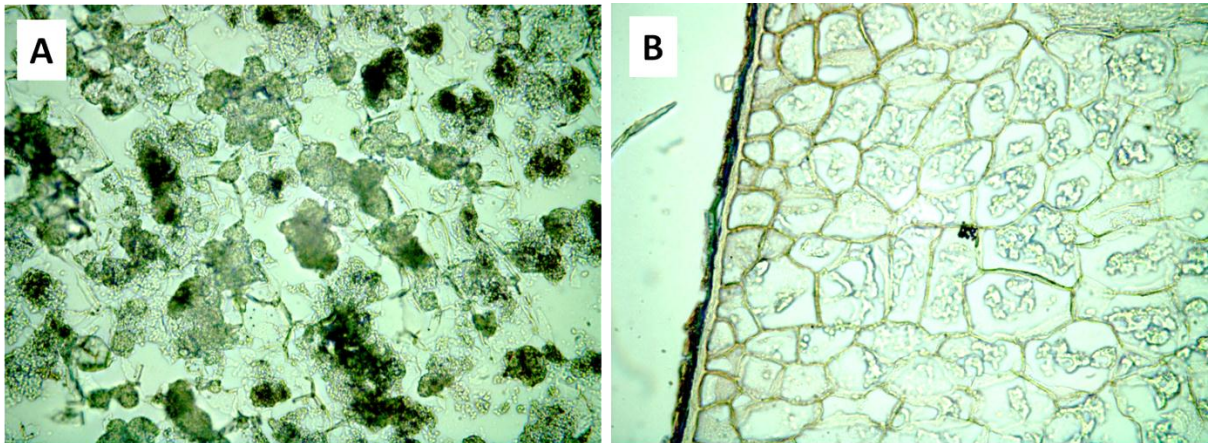


Figura 19: Reação positiva com Sudan Black B em cortes longitudinais de sementes de *Carica papaya*. **A**- Endosperma de sementes dormentes mostrando vesículas de lipídios em coloração preta. **B**- Endosperma de plântulas com 15 dias de germinação mostrando células endospermáticas com pouco conteúdo lipídico.

7.2.3. Embrião

Em folhas cotiledonares, células estomáticas localizadas na epiderme foram evidenciadas ao corante Sudan Black B indicando que os estômatos de sementes em desenvolvimento possuem elevado conteúdo lipídico (Fig. 20).

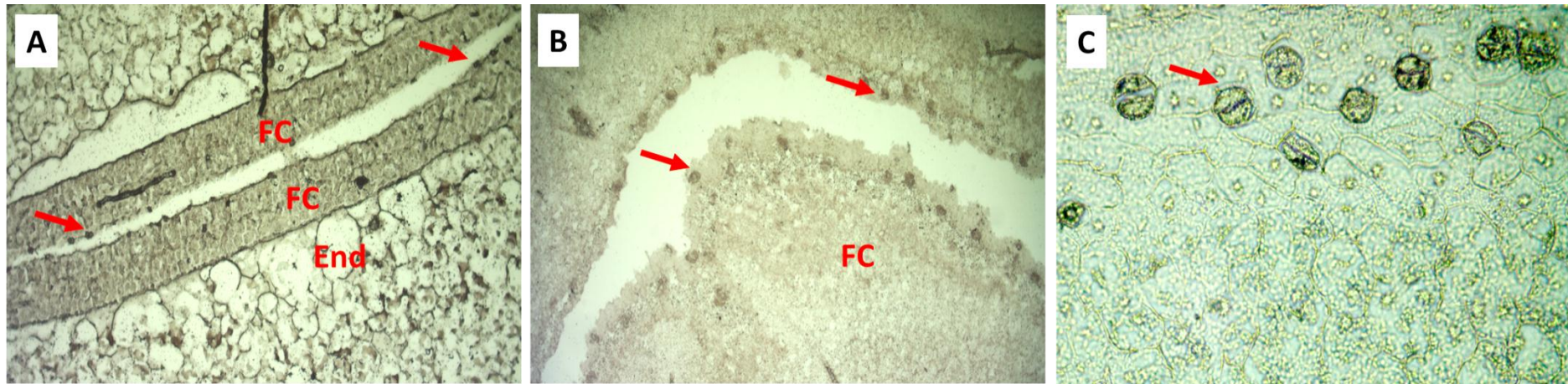


Figura 20: **A**- Corte longitudinal da folha cotiledonar de sementes dormentes com estômatos ricos em lipídios (seta). **B**- Corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação. **C**- Foto ampliada de corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação enfatizando células estomáticas. **A**- sementes dormentes. **B** e **C**- plântulas com 15 dias de germinação. As setas mostram estômatos ricos em lipídeos.

O tecido fundamental parenquimático foi evidenciado, em reação com azul de toluidina, preenchendo as folhas cotiledonares (Fig. 21 A) e o eixo embrionário (Fig. 21 B) de sementes dormentes e plântulas com 15 dias de germinação. Em ambas as amostras, vasos condutores do xilema foram visualizados ramificando-se entre as células do parênquima fundamental de folhas cotiledonares (Fig. 21 C), enquanto que no eixo embrionário (Fig. 21 D) e no ápice radicular (Fig. 21 E) o xilema concentra-se na região do procâmbio. No ápice radicular de plântulas com 15 dias de germinação coradas com lugol foram visualizadas células com grãos de amido em seu interior (Fig. 21 F).

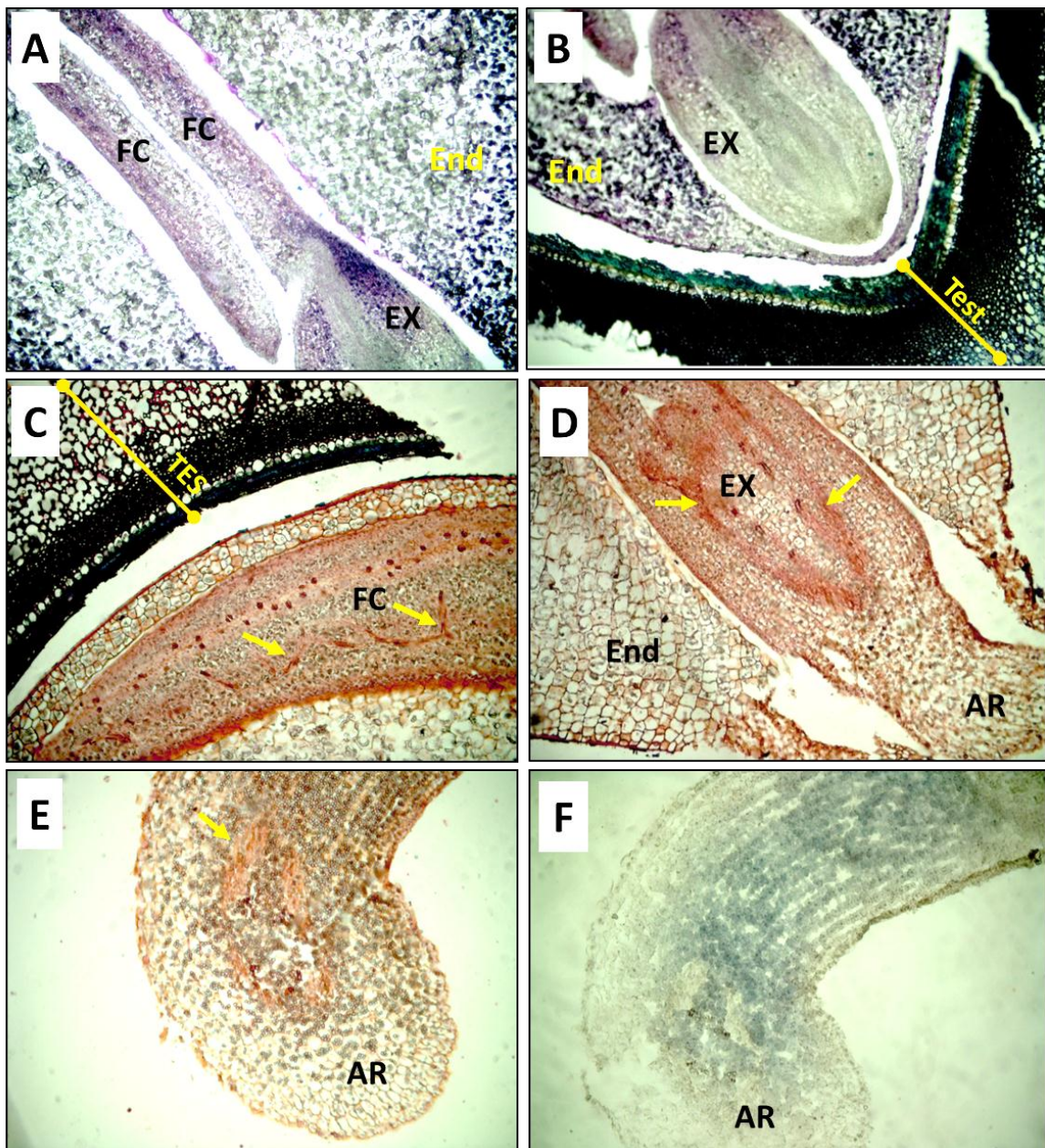


Figura 21: Testes histo-citoquímicos em sementes de *Carica papaya*. **A-** Sementes dormentes submetidas à coloração com azul de toluidina evidenciando células parenquimáticas localizadas na folha cotiledonar em coloração púrpura. **B-** Sementes dormentes submetidas à coloração com azul de toluidina evidenciando células parenquimáticas localizadas no eixo embrionário em coloração púrpura. **C-** Corte longitudinal lateral de

plântulas com 15 dias de germinação submetida à coloração com safranina-azul de metileno mostrando reação positiva (seta), em coloração vermelha, células lignificadas de vasos condutores do xilema ramificando-se pelo tecido parenquimático em folha cotiledonar. **D**- Corte longitudinal de plântulas com 15 dias de germinação submetida à coloração com safranina-azul de metileno mostrando reação positiva (seta), em coloração vermelha, células lignificadas de vasos condutores do xilema concentrado na região do procâmbio do eixo embrionário e, **E**- no ápice radicular. **F**- Corte longitudinal do ápice radicular de plântulas com 15 dias de germinação coradas com lugol evidenciando células com grão de amido (azul-arroxeadado) em seu interior. **A** e **B**: sementes dormentes. **C**- **F**: plântulas com 15 dias de germinação. Legenda: **FC**- folha cotiledonar; **EX**- eixo embrionário; **End**- endosperma; **AR**- ápice radicular; **Test**- testa da semente.

Não foi possível identificar células de laticíferos em sementes dormentes (Fig. 22 A) ou plântulas com 15 dias de germinação (Fig. 22 B) utilizando o reagente oil red. Entretanto as células-guardas dos estômatos reagiram positivamente apresentando coloração vermelha indicando presença de lipídeos.

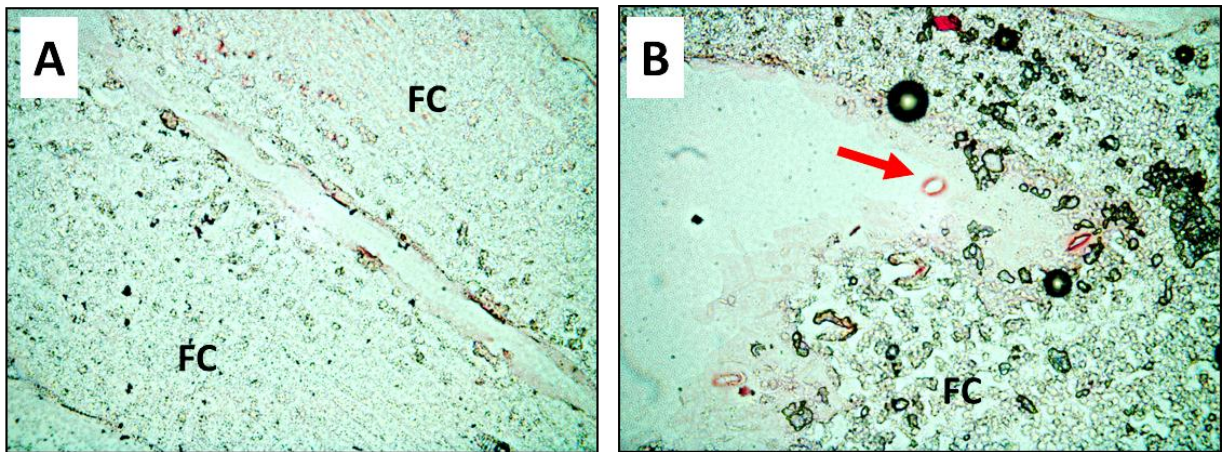


Figura 22: Folha cotiledonar de *Carica papaya* corado com oil red. **A**- Corte longitudinal de folha cotiledonar de sementes dormentes. **B**- Corte longitudinal lateral de folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação. Legenda: **FC**- folha cotiledonar.

7.3. Localização do dsRNA do PMeV

Em sementes dormentes o PMeV foi capaz de infectar células do parênquima esponjoso da folha cotiledonar (Fig. 23), endosperma (Fig. 23 e 24), meristema fundamental do eixo embrionário e procâmbio (Fig. 24 e 25).

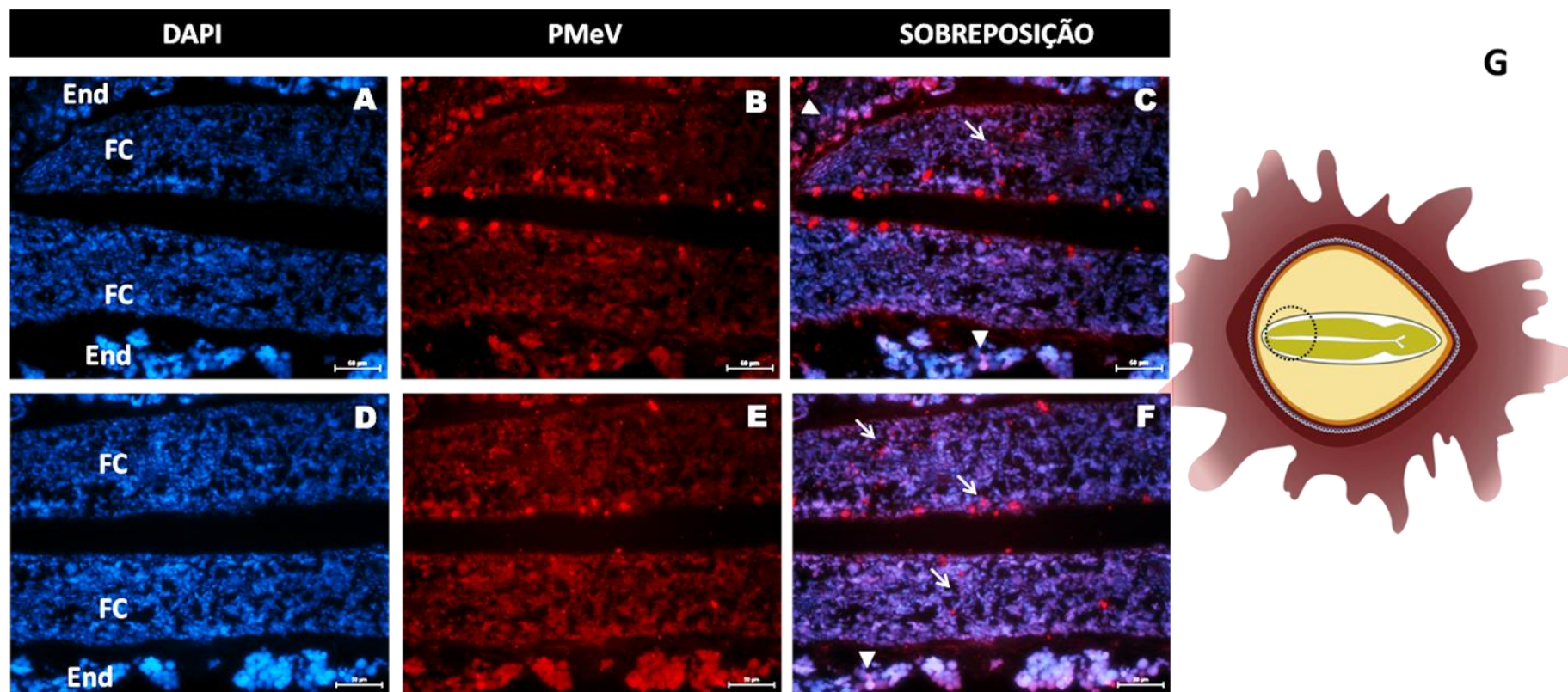


Figura 23: Localização do PMeV em células da folha cotiledonar de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes, provenientes de plantas saudáveis, foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. **A e D**- DAPI. **B e E**- Rodamina. **C e F**- Sobreposição. **G**- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Legenda: **FC**- folha cotiledonar; **End**- endosperma. Setas indicam células do parênquima esponjoso infectadas. Ponta da seta indica células do endosperma infectadas. Escala: 50 μ m

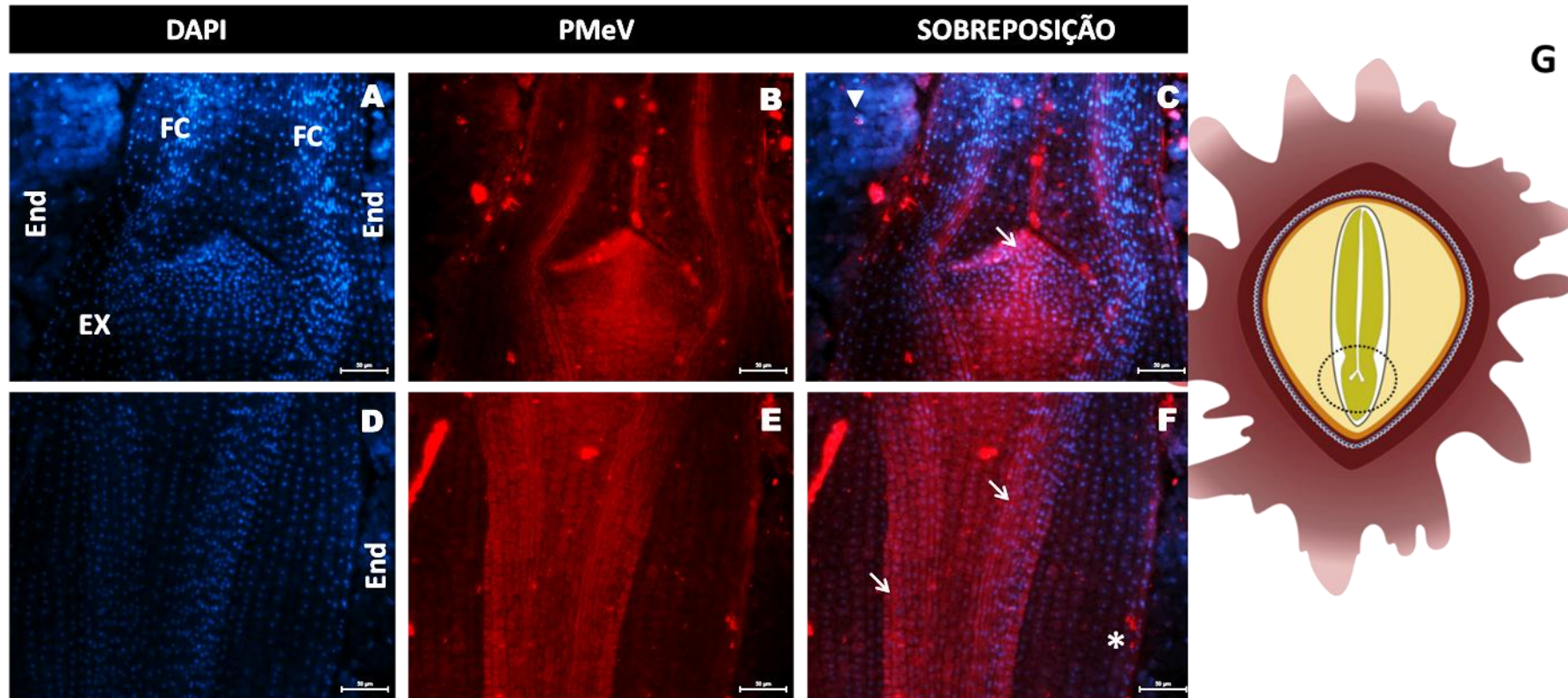


Figura 24: Localização do PMeV em células do eixo embrionário de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes provenientes de plantas saudáveis foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. **A e D**- DAPI. **B e E**- Rodamina. **C e F**- Sobreposição. **G**- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Legenda: **FC**- folha cotiledonar; **EX**- eixo embrionário; **End**- endosperma. Setas indicam células na região do procâmbio infectadas. Ponta da seta indica células do endosperma infectadas. Asterisco indica células do parênquima cortical infectadas. Escala: 50µm.

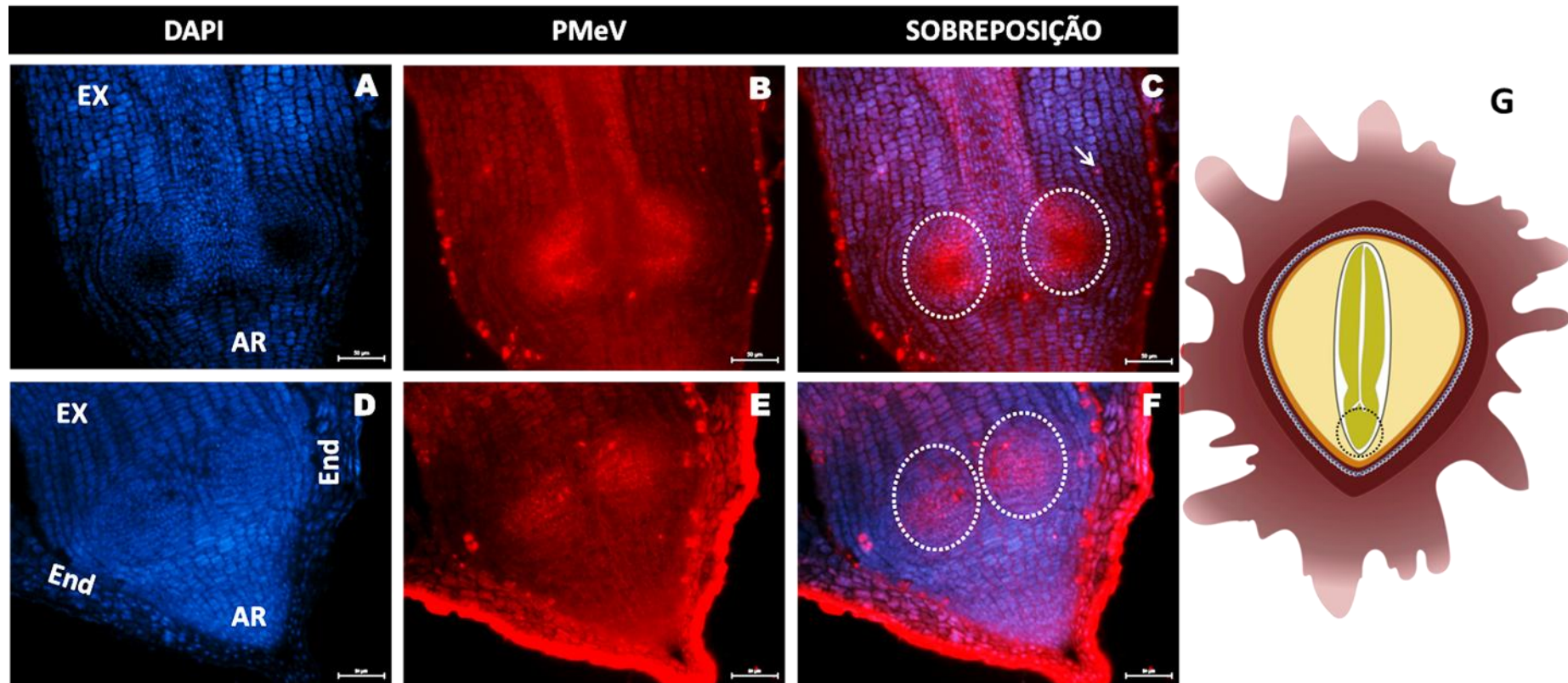


Figura 25: Localização do PMeV em células do eixo embrionário de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de sementes dormentes provenientes de plantas saudáveis foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. **A e D**- DAPI. **B e E**- Rodamina. **C e F**- Sobreposição com círculo pontilhado indica infecção em células do procâmbio. **G**- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal; círculo pontilhado indica a área analisada nas imagens A-F. Legenda: **EX**- eixo embrionário; **End**- endosperma; **AR**- ápice radicular. Setas indicam células do parênquima cortical infectadas. Escala: 50µm.

Em amostra de plântulas com 15 dias de emergência, sinais de hibridização foram visualizados apenas nas células do parênquima esponjoso, próximo e dentro dos feixes vasculares da folha cotiledonar (Fig. 26). Em secções do revestimento de sementes dormentes ou plântulas com 15 dias de germinação não foram visualizados sinais de hibridização (Fig. 27).

A tabela a seguir mostra resumidamente os tecidos da semente infectados pelo PMeV.

Tabela 2 - Secções de semente dormentes e sementes com 15 dias de germinação foram submetidas a reações de hibridização *in situ* para analisar a distribuição do PMeV nos tecidos embrionários. Os sinais + indicam células infectadas enquanto o sinal – indica célula não infectadas.

Órgão	Tecido	Sementes Dormentes	Plântulas com 15 dias pós germinação
Folha cotiledonar	Parênquima esponjoso	+	+
	Feixe Vascular	-	+
Eixo Embrionário	Meristema fundamental	+	-
	Procâmbio	+	-
Endosperma	Parênquima	+	-
Revestimento	Testa	-	-

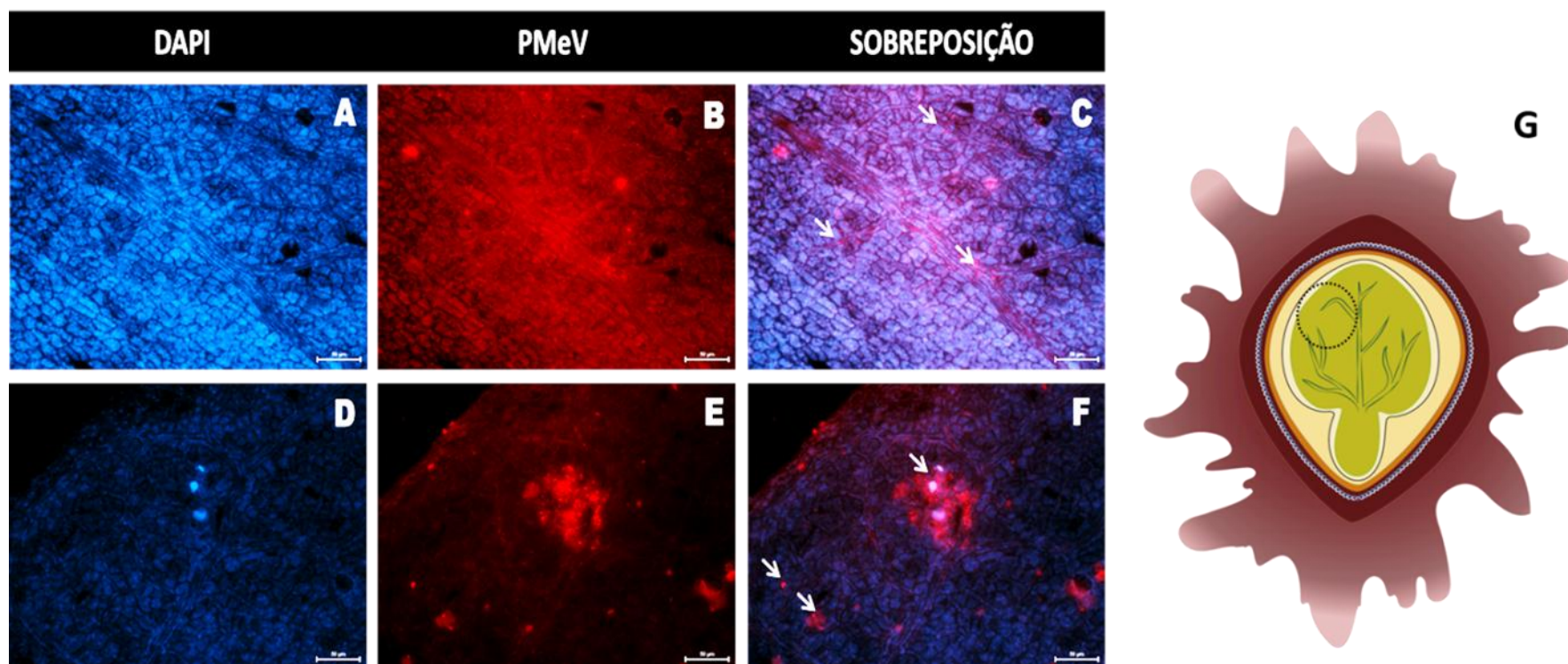


Figura 26: Localização do PMeV em células de folha cotiledonar de *Carica papaya* por meio de hibridização *in situ*. Secções longitudinais obtidas de plântulas com 15 dias germinação provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. **A e D**- DAPI. **B e E**- Rodamina. **C e F**- Sobreposição. **G**- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal lateral com círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-F. Setas indicam células infectadas. Escala: 50µm.

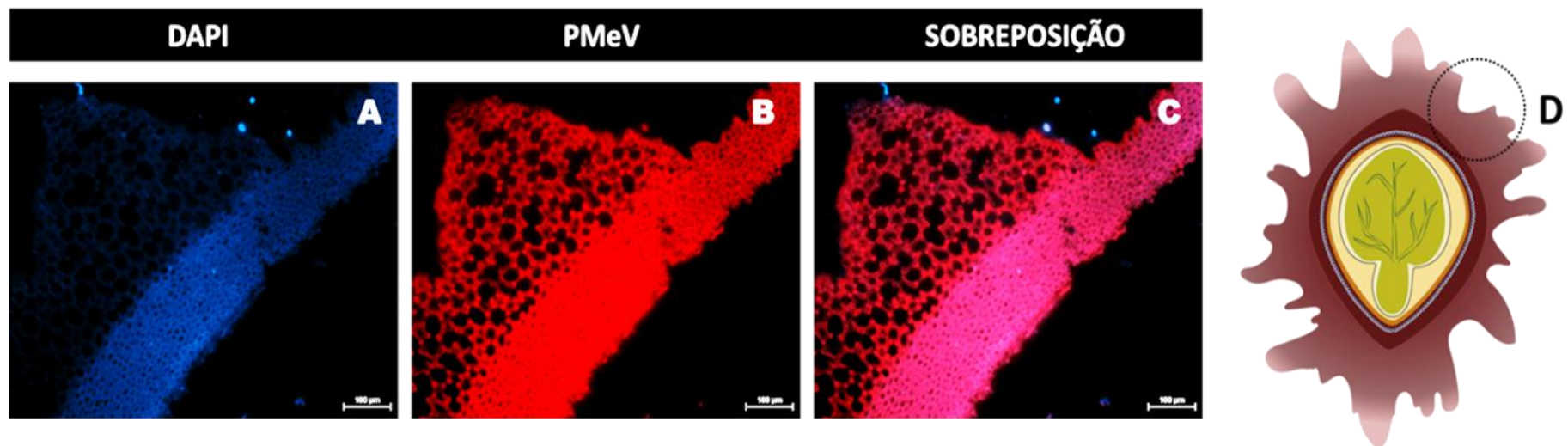


Figura 27: Secções longitudinais da testa de sementes de *Carica papaya*, obtidas de sementes provenientes de plantas sadias foram hibridizadas com sonda específica para o PMeV e observadas em microscópio de fluorescência. Nenhum sinal de hibridização foi visualizado. **A**- DAPI. **B**- Rodamina. **C**- Sobreposição. **D**- Esquema de semente de mamão em secção longitudinal lateral com círculo pontilhado indica a área analisadas nas imagens A-C. Escala: 100µm.

8. DISCUSSÃO

8.1. Transmissão vertical

No presente trabalho retomamos a investigação da transmissão do PMeV por sementes baseado em ensaios de RT-PCR elaborado por ABREU *et al.* (2012) utilizando o par de oligonucleotídeos descrito por ANTUNES *et al.*, (2016). O RNA total foi extraído em amostras de plântulas cultivadas por 45 dias.

Nossos resultados confirmam a transmissão do PMeV para a geração seguinte através de sementes infectadas visto que todas as plantas doadoras de sementes, bem como, 84 % das amostras de plântulas amplificaram o fragmento de aproximadamente 500 pb. As amostras de plântulas que não amplificaram para o PMeV foram positivas para o gene actina confirmando que estas amostras não apresentaram infecção pelo vírus ou, a carga viral estava abaixo do limite de detecção.

A identificação do PMeV em plântulas obtidas a partir de sementes mostra que o vírus utiliza a semente como uma via dispersão. A transmissão de vírus através de sementes, também, foi observado em *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (AFTAB *et al.*, 2018) e *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) (ZHANG *et al.*, 2011) como um mecanismo de dispersão extremamente eficiente. Sementes dormentes podem sobreviver por vários anos, o que prolonga o período de transmissão em potencial entre as estações de cultivo. Além disso, os possíveis efeitos restritivos do ambiente sobre o desenvolvimento da doença são minimizados (BAKER e SMITH, 1996).

A transmissão vertical de vírus permite que o patógeno permaneça em plantas por muitas gerações co-evoluindo com seu hospedeiro e estabelecendo relações ecológicas muito complexas (ROOSSINCK, 2015). Vários vírus de plantas causadores de doenças foram descritos como mutualista condicional, ou seja, em condições ótimas para a sobrevivência da planta o vírus causa um efeito patogênico, mas em condições de estresse são capazes de prolongar a sobrevivência de seu hospedeiro (XU *et al.*, 2008; ROOSSINCK, 2015). Em beterraba, por exemplo, o *Cucumber mosaic virus* (CMV) promove redução na produção. No entanto, em condições de estresse por seca ou congelamento o CMV promove um drástico aumento no acúmulo de antioxidantes e osmoprotetores conferindo tolerância ao estresse do hospedeiro (XU *et al.*, 2008). Estudos metagenômicos revelaram a presença de vírus com genomas de dsRNA não retrovirais do gênero de totivirus e partitivirus sendo transmitidos

para a geração seguinte através da integração do seu genoma no genoma nuclear da planta (STAGINNUS *et al.*, 2007; ROOSSINCK, 2015). As plantas incorporam os genes de vírus persistentes que infectam núcleo ou citoplasma para o seu próprio gene e podem usar estes vRNAs como material epigenético para muitas funções (ROOSSINCK, 2010). Portanto, os vírus de RNA podem desempenhar papéis significativos na sobrevivência da planta (LIU *et al.*, 2010).

Em mamoeiros, o PMeV foi detectado em todos os estádios de desenvolvimento da planta (estádio vegetativo e reprodutivo (RODRIGUES, 2006), sementes e plântulas) e, em infecção simples, não induziu sintomas visíveis em seu hospedeiro (ANTUNES *et al.*, 2016) indicando uma possível relação mútua entre a planta e o vírus. Entretanto, essa relação pode tornar-se patogênica na presença do PMeV2 desencadeando sintomas em plantas no estágio de pós-floração (ABREU *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2016).

A presença do complexo PMeV em plantas doentes promove alterações organolépticas nas frutas (KITAJIMA *et al.*, 1993) e redução do vigor das sementes (SALGADO, 2015). Desconhecendo a existência de dois vírus associado a meleira, SALGADO (2015) investigou a interferência do PMeV no vigor de sementes obtidas de plantas com sintomas da doença e plantas assintomáticas (controle). Sementes provenientes de plantas doentes apresentaram redução na germinação, no crescimento caulinar e radicular, na sobrevivência e na biomassa das plântulas quando comparadas com o controle. Logo, sementes obtidas de planta sintomáticas originam plântulas de baixa qualidade. SALGADO (2015) postulou que a presença do PMeV na planta doadora de sementes pode afetar a formação das sementes e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetativo e o comprometimento do vigor das sementes pode estar associado a um possível mecanismo de transmissão vertical do PMeV. Desta forma, de acordo com os recentes estudos, onde todas as plantas sintomáticas analisadas eram infectadas pelo PMeV e pelo PMeV2 (ABREU *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2016), podemos deduzir que as plantas sintomáticas analisadas por SALGADO (2015) também estavam infectadas pelo complexo PMeV. Sua associação com o mamoeiro afetou negativamente o desenvolvimento e qualidade das sementes. Em contrapartida, conhecendo o mecanismo de transmissão do PMeV por sementes, postulo que as amostras de sementes obtidas de plantas sadias estavam infectadas pelo vírus. Possivelmente, o PMeV não causa efeitos negativos sobre a qualidade das sementes visto que as sementes obtidas de plantas sadias apresentaram as maiores taxas de germinação comparando com sementes obtida de plantas doentes com meleira ou mosaico.

A confirmação do mecanismo de transmissão vertical para o PMeV, tal como sua presença em plantas assintomáticas, evidenciam sua estreita relação com vírus persistentes. Este grupo de vírus está distribuído em três gêneros da família *Partitiviridae*: *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus* e *Deltapartitivirus* (NIBERT *et al.*, 2014). Os *Totivírus* comumente descritos infectando fungos e protistas, também foram encontrados infectando plantas, provavelmente, de maneira persistente (ROOSSINCK *et al.*, 2010; ROOSSINCK, 2012).

Vírus persistentes são transmitidos por sementes em taxas que podem chegar a 100 % transmissão e geralmente apresentam-se em baixa carga viral. Comumente, apresentam RNA genômico de fita dupla, codificam uma RdRp e uma CP. Estes não se movem entre as células vegetais devido à ausência de proteína de movimento. Mas, são distribuídos pela planta através da divisão celular. Em infecção simples, não induz sintomas em seu hospedeiro e alguns foram claramente descritos como benéficos (ROOSSINCK, 2010; 2012; 2019).

Embora vírus de planta com comportamento persistente tem sido descritos como mutualistas, as condições específicas dos ecossistemas agrícolas podem modular as interações vírus-planta de prejudicial para benéfico para o hospedeiro e vice-versa (FRAILE e GARCÍA-ARENAL, 2016). Isto é verdade para a interação entre *Arabidopsis thaliana* e o CMV onde condições ambientais definidas por diferenças na temperatura e intensidade da luz modulam diferencialmente o resultado da interação de modo que a infecção viral pode ser prejudicial, neutra ou benéfica para a planta hospedeira em termos de produção viável de sementes (HILY *et al.*, 2016).

Visto que a formação dos pomares de mamoeiro ocorre por semeadura, as sementes pode desempenhar um papel significativo na epidemiologia do PMeV, pois a utilização de sementes infectadas pode fornecer, aleatoriamente ao longo do campo, numerosos focos de infecção primária (JOHANSEN, EDWARDS e HAMPTON, 1994; VENTURA, COSTA e TATAGIBA, 2004). Recentemente, membros de totivirus também foram identificados infectando insetos vetores (ZHAI *et al.*, 2010) deste modo, a disseminação do PMeV dentro dos pomares pode ser potencializada devido à presença de insetos vetores associados à doença (VENTURA *et al.*, 2003).

O aumento do intercâmbio de sementes pode introduzir o PMeV em locais antes livre do vírus permitindo que este se dissemine pela região produtora e/ou encontre novos hospedeiros em potencial. Embora, em infecção simples o PMeV não induz sintomas visíveis

em mamoeiro (ANTUNES *et al.*, 2016) sua interação com novos ecossistemas agrícolas pode acarretar grandes perdas econômicas para o produtor de plantas (FRAILE e GARCÍA-ARENAL, 2016).

8.2. Localização do dsRNA em tecidos embrionários

A fim de localizar o dsRNA do PMeV, secções semifinas de sementes de *C. papaya* foram submetidas a reações de hibridização *in situ*, bem como, testes histo-citoquímicos para a identificação dos tecidos infectados e seus componentes. Com o objetivo de prever os possíveis mecanismos de movimentação e sobrevivência do vírus, as sementes foram divididas em dois grupos: sementes dormentes e plântulas com 15 dias de emergência.

Os resultados apontam que o PMeV é capaz de infectar os tecidos embrionários antes e/ou durante o desenvolvimento das sementes sendo detectado nas células do endosperma, parênquima esponjoso, próximo e dentro dos feixes vasculares da folha cotiledonar, parênquima cortical do eixo embrionário e procâmbio. Estes resultados refutam os dados encontrados por Rodrigues (2006) que detectou o dsRNA do PMeV apenas na carúncula de sementes de *C. papaya*.

Os mecanismos adotados pelo PMeV para infectar embriões não estão claros. Entretanto, em plantas sistemicamente infectadas, o vírus pode seguir duas vias de infecção embrionária (MAULE e WANG, 1996). Na primeira via, o vírus pode invadir o embrião indiretamente como ocorre, por exemplo, com o PNRSV. Este vírus codifica uma MP que lhe confere a capacidade de movimentar-se dos tecidos vegetativos da planta mãe para os tecidos reprodutivos infectando grão de pólen (AMARI *et al.*, 2007) e ovário, como do damasqueiro, em seus estágios iniciais de desenvolvimento (AMARI, BURGOS e PALLÁS, 2009).

Por outro lado, o PMeV pode infectar diretamente o embrião de *C. papaya* usufruindo de uma segunda via de infecção embrionária como demonstrado no caso do PSbMV. Incapaz de infectar os gametas de ervilha, o PSbMV utiliza sua MP para alcançar diretamente o embrião através do suspensor que conecta a planta-mãe ao saco embrionário (MAULE e WANG, 1996). Contudo, não foi identificado uma MP para o PMeV (ANTUNES *et al.*, 2016). Desta forma, para invadir o embrião da semente o PMeV deve se comportar como vírus persistente infectando células com potencial meristemático que irão se diferenciar para formar os gametófitos femininos e masculino.

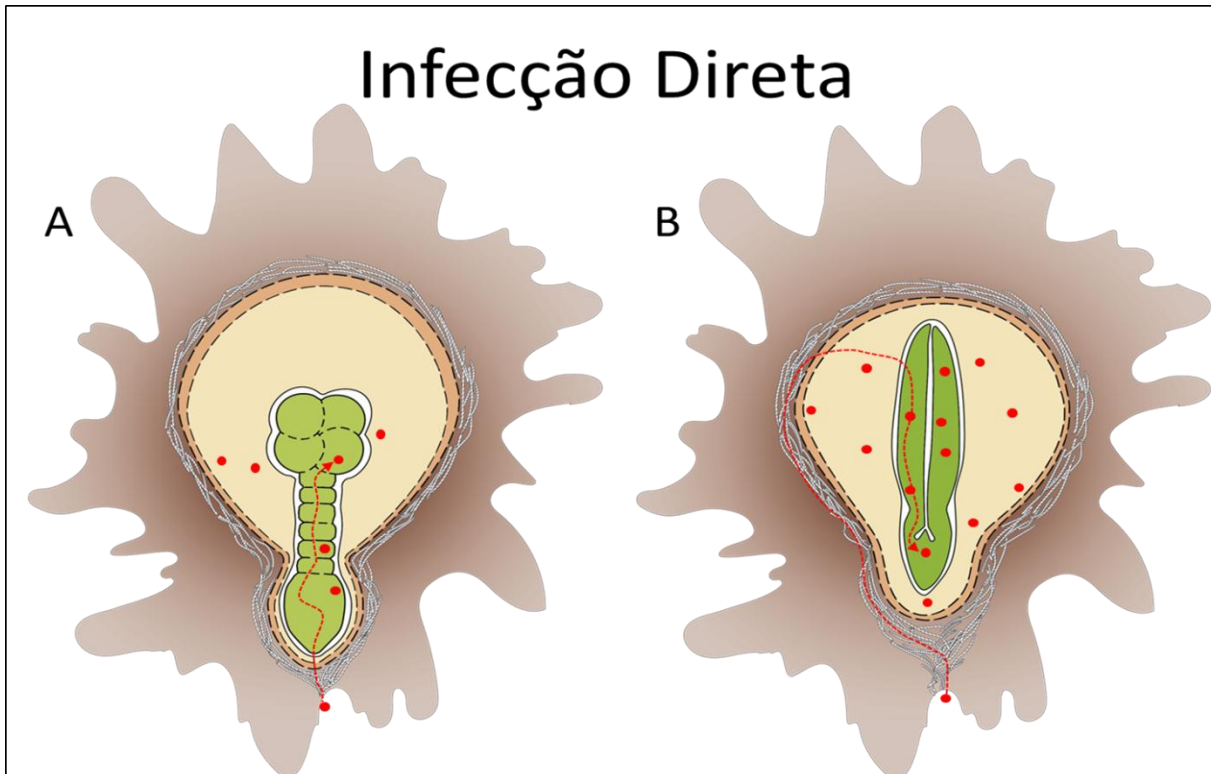


Figura 28: Possivelmente, quando associado a uma proteína de movimento, o PMeV pode infectar diretamente o embrião de *Carica papaya* movimentando-se pelos canais plasmodesmáticos existentes entre células adjacentes. A- Por meio dos vasos condutores que se ramificam pelas camadas mais internas do revestimento da semente, o vírus pode alcançar o suspensor e infectar células do embrião durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Posteriormente, o vírus pode atravessar o limite do embrião para o endosperma. B- Entretanto, no decorrer da maturação da semente, o suspensor passa por morte celular programada. Na ausência desta estrutura, o PMeV pode atravessar o limite do revestimento da sementes para o endosperma e, posteriormente, infectar o embrião.

A capacidade do PMeV infectar células meristemática foi comprovada por MAURASTONI (2018). O pesquisador detectou o dsRNA do vírus em células meristemáticas de calos embriogênicos obtidos a partir de explante foliar de plantas sistemicamente infectadas pelo complexo PMeV. Curiosamente, RODRIGUES (2006) detectou o PMeV em látex extraído dos tecidos de flores, também, de plantas sistemicamente infectadas. Portanto, podemos induzir que o PMeV é capaz de infectar células meristemáticas das flores que, posteriormente, formaram os gametófitos. Contudo, não avaliamos neste trabalho a presença do PMeV no grão de pólen ou ovário. A detecção do vírus nessas estruturas poderia esclarecer alguns mecanismos de infecção embrionária adotado pelo patógeno.

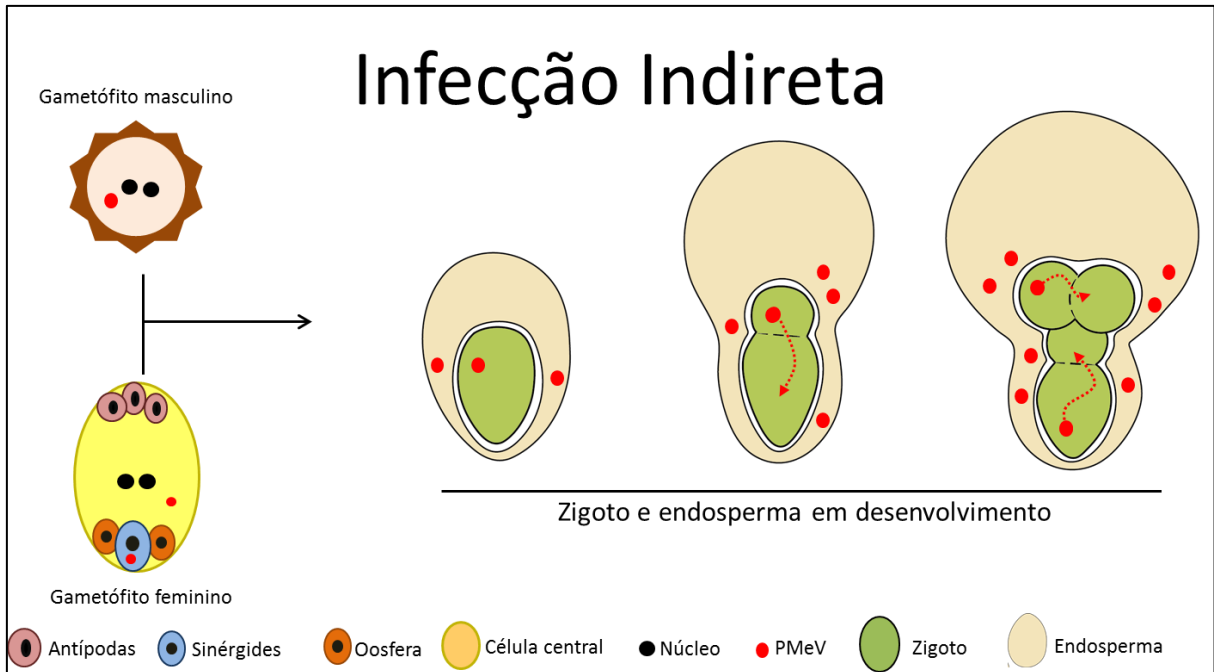


Figura 29: Devido a ausência de uma proteína de movimento (MP), o PMeV seria incapazes de movimentar-se célula a célula. Deste modo, para infectar embriões de *Carica papaya*, o PMeV deve apresentar um comportamento semelhante à vírus persistentes. Seu movimento ocorreria por meio de divisões celulares de células já infectadas. Portanto, o vírus infecta células meristemáticas das flores que, posteriormente, formaram os gametófitos. O processo de fecundação envolvendo um (feminino ou masculino) ou ambos gametófitos infectados, acarretaria na formação de um zigoto infectado. Desta forma, o vírus pode ser encontrado nos diferentes tecido que constitui a semente.

Determinados vírus de plantas foram descritos infectando células do revestimento da semente, mas foram eliminados durante o processo de maturação e dessecação. Isso é verdade para o *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) em sementes de *A. thaliana* que somente é transmitido para as progênes quando ocorre a infecção embrionária (FILHO e SHERWOOD, 2000). Em mamoeiro, nenhum sinal de fluorescência foi visualizado nas células do revestimento de sementes dormentes ou de plântulas com 15 dias de germinação, indicando que o PMeV não infecta ou não é capaz de sobreviver nesses tecidos. A ausência do vírus no revestimento pode ser justificada pelas propriedades das células que o compõe.

Testes histo-citoquímicos revelaram que o revestimento é constituído por células com protoplasto ausente, parede secundária espessa e lignificada. Tais características são atribuídas ao tecido esclerenquimático que podem ser classificados em três categorias: fibras, esclereides e elementos traqueais do xilema. As esclereides são frequentemente encontradas no revestimento das sementes e, geralmente, não apresentam protoplasto vivo em sua maturidade. O espessamento da parede celular, dentre outros fatores, pode acarretar na morte do protoplasto devido a reduções drástica do seu volume (CRANG, LYONS-SOBASKI e WISE, 2018). Visto que vírus de planta exploram o maquinário celular para permanecer ativo

e replicar-se (ROBERTS *et al.*, 2003), a sobrevivência do PMeV em células de esclereides maduras é improvável.

Na semente, o tecido esclerenquimático estabelece uma camada rígida que protege o embrião das influências externas como danos mecânico e invasão de patógenos (SHIN-HWA, 1981; SHENA *et al.*, 2019) e, em alguns casos, o esclerênquima armazena compostos fenólicos com ação alelopática e antimicrobiana (MAGALHÃES, RODRIGUES e DURÃES, 1997; LORENZ *et al.*, 2018). Compostos fenólicos identificado por SANTOS *et al.* (2009), como tanino, foram visualizados nas células do tégmen e poderiam atuar na defesa da planta contra a invasão por vírus. Além disso, deposição de calose foi identificada nos canais plasmodesmáticos indicando a interrupção do movimento de moléculas e, provavelmente, de vírus entre as células.

Apesar do PMeV não ter sido detectado no revestimento de sementes dormentes ou no revestimento de plântulas com 15 dias de germinação, não podemos excluir a possibilidade de o vírus movimentar-se pelas esclereides para invadir o endosperma durante o desenvolvimento da semente.

Nas sementes imaturas de mamão, os plasmodesmas é a única rota de conexão disponível para vírus entre os tecidos embrionários e os maternos. Feixes vasculares da planta-mãe atravessam o funículo do ovário e se ramificam pelo integumento interno, que corresponde ao tégmen em sementes maduras (FOSTER, 1943). Contudo, não são identificados conexões vasculares entre o integumento (origem materna) e os tecidos embrionários (FOSTER, 1943; SANTOS *et al.*, 2009) e portanto, o transporte de moléculas deve ocorrer de célula para célula (KARMANN, MÜLLER e HAMMES, 2018).

Durante a maturação as esclereides são altamente ativas e numerosos canais plasmodesmáticos comunicam as células vivas entre si (RAVEN, EICHHORN e EVERT, 2014). O vírus poderia explorar os plasmodesmas para ultrapassar o limite entre o integumento e o tecido nucelar e, em seguida, alcançar o endosperma. O tamanho limite de exclusão (TLE) dos plasmodesmas permite a passagem de micromoléculas, solutos e íons. Contudo, os vírus podem formar um complexo que envolve seu ácido nucléico viral com sua MP para mover-se pelo canal. Este complexo interage com as proteínas do hospedeiro para aumentar o TLE dos plasmodesmas e potencializar o seu transporte para as células vizinhas (NERVA *et al.*, 2017). No entanto, não foi identificado uma MP codificada pela PMeV e, os

mecanismos de movimentação intracelular e extracelular de totivirus que infectam plantas ainda são desconhecidos (NERVA *et al.*, 2017).

Em dicotiledônea, o endosperma é constituído por células vivas que após a dupla fecundação e durante o desenvolvimento do embrião, importa e armazena compostos energéticos descarregados pelo floema da planta-mãe (CASTRO, BRADFORD e HILHORST, 2004). O descarregamento do floema é pouco compreendido em nível molecular, mas pode ocorrer em duas rotas: (1) os assimilados podem ser exportados da camada vascularizada do integumento interno e absorvido pelo endosperma e (2) os assimilados são importados pelo endosperma através do suspensor (KARMANN, MÜLLER e HAMMES, 2018). Estas vias poderiam ser exploradas pelo vírus para invadir o endosperma, visto que, sinais de fluorescência foram visualizados nas células do endosperma de semente dormente, principalmente, próximo ao embrião.

Os lipídios, evidenciados em reação ao Sudan Black B, representam o principal composto energético do endosperma corroborando com os resultados encontrados por Santos, Silva, *et al.* (2009). Embora estes correspondam aproximadamente 54 % do conteúdo endospermático (NGUYENAND e TARANDJIISKA, 1995), outros compostos energéticos como amido, polissacarídeos de reserva de parede celular e proteínas foram descritos no endosperma e também podem ser utilizados pelo embrião durante a germinação (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

O endosperma das sementes que foram incubadas em B.O.D por 15 dias apresentou-se com pouco conteúdo indicando a mobilização de compostos energéticos para o desenvolvimento da plântula. Curiosamente, nenhum sinal de fluorescência foi encontrado no endosperma sugerindo que o PMeV é eliminado durante o processo de germinação ou aproveita a mobilização de substâncias para movimentar-se para o embrião. Contudo, o endosperma e o embrião de *C. papaya* são separados por uma bainha conspícua e nenhuma conexão vascular ou plasmodesmas foram identificados entre os tecidos (WANG e MAULE, 1994; MAULE e WANG, 1996; LEE e LUCAS, 2001). Desta forma o apoplasto é a única via de transporte disponível.

Em sementes de *A. thaliana* a importação de compostos energéticos e aminoácidos pelo embrião ocorre pelo apoplasto. Este transporte é facilitado por proteínas de membrana e requer gasto energético (KARMANN, MÜLLER e HAMMES, 2018). Proteínas associadas à replicação, expressão gênica ou MP de vírus podem interagir com as proteínas de membrana

do hospedeiro para atravessá-la (SCHOELZ, HARRIES e NELSONC, 2011). Entretanto, os mecanismos pelos quais os vírus podem atravessar a parede celular sem formar plasmodesmos não estão claros (WAN e LALIBERTÉ, 2015; KUMARI *et al.*, 2016).

Apesar do isolamento anatômico entre o endosperma e embrião (FOSTER, 1943), o PMeV foi identificado no cotilédone e no eixo embrionário de sementes dormentes. Possivelmente, o vírus infecta embriões através do suspensor em uma via de nutrição que ocorre após a fecundação ou pelos gametas infectados antes da fertilização, mecanismo comum para vírus persistente. Incapazes de movimentarem-se célula a célula, os vírus persistentes infectam o gametófito feminino e masculino através de divisões celulares de células já infectadas (ROOSSINCK, 2010).

Células do parênquima cortical de sementes dormentes apresentaram sinais de hibridização. Estas células preenchem o eixo embrionário da plântula e pode se diferenciar em outros tecidos fundamentais e vasculares, incluindo laticíferos (SCATENA e SCREMINDIAS, 2012). Sinais do PMeV também foram detectados na região do procâmbio onde estão presentes vasos de xilema e floema. Estes resultado corroboram com os achados por RODRIGUES (2006) que detectou o dsRNA em secção de caule de planta adultas contendo tecidos do xilema, câmbio vascular e floema, regiões com grandes quantidades de laticíferos associados.

Por meio de hibridização *in situ* MAURASTONI (2018) detectou sinais dispersos e em frequências baixas nas células da nervura principal em pecíolos de folhas. No presente trabalho, sinais de hibridização foram identificados dentro dos feixes vasculares localizados na folha cotiledonar de plântulas com 15 dias de germinação. Tal resultado afirma que, o PMeV pode utilizar os vasos condutores para o movimento a longa distância (RODRIGUES, 2006) alterando a expressão de genes relacionados ao transporte e estabelecendo a infecção sistêmica (MADROÑERO *et al.*, 2018).

Além do parênquima cortical e procâmbio, o PMeV infecta células do parênquima esponjoso da folha cotiledonar. Estas células abrigam os cloroplastos, organela responsável pela síntese de fotoassimilados e alguns fitohormônios importantes para o desenvolvimento das plantas. Além disso, os cloroplastos desempenha um papel ativo na resposta de defesa contra vírus (BHATTACHARYYA e CHAKRABORTY, 2018).

Alguns vírus de plantas foram descritos infectando e replicando no cloroplasto causando danos estruturais e funcionais que fragilizam as respostas de defesa da planta, facilitando a propagação viral (BHATTACHARYYA e CHAKRABORTY, 2018). O estabelecimento do PMeV em organelas desprovidas de mecanismos de silenciamento como o cloroplasto poderia favorecer a replicação do vRNAs (AHLQUIST *et al.*, 2003; LALIBERTÉ, 2010), considerando que uma das ameaças mais severas enfrentadas pelos vírus dentro de uma célula vegetal é o silenciamento de vRNAs (BHATTACHARYYA e CHAKRABORTY, 2018).

Na semente dormente os sinais de hibridização na folha cotiledonar apresentaram-se como numerosos pontos isolados distribuídos por todo o parênquima esponjoso. Em folhas totalmente expandidas obtidas de plantas adultas infectadas pelo PMeV, os sinais de hibridização em células parenquimáticas mostraram uma distribuição semelhante a amostras de sementes dormentes (MAURASTONI, 2018). Entretanto, em folhas cotiledonares de plântulas com 15 dias de germinação, os sinais de fluorescência exibiram um nível mais alto de acumulação nas células do parênquima esponjoso localizadas próximo aos vasos condutores. Devido à alta atividade de divisão celular, os órgãos em crescimento demandam de assimilados provenientes do floema (FOSTER, 1943). O intenso sinal nas células do parênquima localizadas próximo aos vasos condutores pode estar relacionado com a velocidade que estas importam assimilados do floema. O transporte entre as células do parênquima esponjoso ocorre pelos plasmodesmas e quanto maior a distância entre a célula e os vasos condutores, maior será o tempo que esta levará para receber os assimilados (KARMANN, MÜLLER e HAMMES, 2018).

O PMeV foi descrito em laticíferos de mamoeiro onde formam partículas virais (MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2003) e modifica os níveis de íons fósforo, potássio e açúcares redutores (RODRIGUES *et al.*, 2009). Devido a sua íntima associação com células de laticíferos, esperávamos visualizar seu dsRNA nestas células. Entretanto, não conseguimos identificar os laticíferos em testes histo-citoquímicos ou em ensaios de HIS.

As células dos laticíferos formam um sistema de canais que exhibe alta pressão de turgor. A excisão de tecidos vegetais causa rompimento nestas células diminuindo sua pressão de turgor e, conseqüente, perda de seu conteúdo. A utilização de fixadores químicos após e extração do tecido vegetal minimiza as perdas de látex. Contudo, as partículas de látex são particularmente sensíveis ao tipo de manipulação química (CONDON e FINERAN, 1989).

Em *Calystegia silvatica*, por exemplo, o uso de fixadores de aldeído e a posterior liofilização do tecido vegetal resulta na extrusão de látex (CONDON e FINERAN, 1989). No presente estudo, utilizamos a solução de paraformaldeído para fixar os tecidos da semente. Diferentes células permaneceram integras e seus conteúdos puderam ser identificados em testes histoquímica, mas nenhum conteúdo de látex identificado. Com isso, faz-se necessário alterações no protocolo de fixação de sementes para uma investigação minuciosa em laticíferos de sementes.

9. CONCLUSÃO

- O PMeV é transmitido para as progêneses sendo detectado em plântulas com 45 dias de emergência;
- O revestimento de sementes dormentes e plântulas com 15 dias de germinação são constituídas por células de esclereides que não são infectadas pelo PMeV;
- Os lipídios consistem no principal composto de armazenamento energético do endosperma de sementes dormentes, e sinais de HIS são detectados em células próximos ao embrião. Em contrapartida, as células do endosperma de plântulas com 15 dias de emergência são pobres em lipídio e nenhum sinal de HIS foi detectado sugerindo que o PMeV é eliminado durante o processo de germinação, ou aproveita a mobilização de substâncias para movimentar-se para o embrião;
- O PMeV é capaz de infectar embriões de sementes reforçando seu comportamento como um vírus persistente;
- No embrião de sementes dormentes, o PMeV foi detectado em células do parênquima cortical, na região do procâmbio e , principalmente, no parênquima esponjoso da folha cotiledonar apresentando-se como numerosos pontos isolados distribuídos por todo o parênquima;
- Em plântulas com 15 dias de germinação, os sinais de fluorescência exibiram um nível mais alto de acúmulo nas células do parênquima esponjoso localizadas próximo aos vasos condutores;
- A diferente distribuição do dsRNA em tecidos de semente dormentes e plântulas com 15 dias de emergência apontam possíveis estratégias de infecção, sobrevivência e movimento adotados pelo PMeV;
- Células de laticíferos e seus constituintes não foram identificados em sementes dormentes ou plântulas 15 dias de emergência por meio de testes histo-citoquímicos ou em ensaios de hibridização.

10. REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F. M.; DALTRO, C. B.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; ANDRADE, E. C.; ARAGÃO, F. J. L. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, p. 3143–3147, 2015.
- ABREU, P. M. V.; PICCIN, J. G.; RODRIGUES, S. P.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 180, n. 1-2, p. 11-17, 2012.
- ABREU, P. M. V.; ANTUNES, T. F. S.; ÁLVAREZ, A. M.; BRITO, D. P.; TUSSEL, R. T.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. A Current Overview of the Papaya meleira virus, an Unusual Plant Virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853-1870, 2015.
- AFTAB, M.; NANCARROW, N.; FREEMAN, N.; DAVIDSON, J.; RODONI, B.; TREBICKI, P. Natural infection of *Cucumber mosaic virus*, *Pea seed-borne mosaic virus* and *Turnip yellows virus* in a fenugreek crop (*Trigonella foenum-graecum*). **Australasian Plant Disease Notes**, p. 1-6, 2018.
- AHLQUIST, P.; NOUEIRY, A. O.; LEE, W.M.; KUSHNER, D. B.; DYE, B. T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **Journal Virology**, v. 77, p. 8181–8186, 2003.
- AMARI, K.; BURGOS, L.; PALLAS, V.; SANCHEZ-PINA, M. A. Prunus necrotic ringspot virus Early Invasion and Its Effects on Apricot Pollen Grain Performance. **Phytopathology**, v. 97, p. 892-899, 2007.
- AMARI, K.; BURGOS, L.; PALLÁS, V. Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus*: hitch-hiking from gametes to seedling. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1767–1774, 2009.
- ANDRADE, J. DE S.; VENTURA, J. A.; RODRIGUES, S. P.; COUTO, A. O. F.; LIMA, R. C. A.; TATAGIBA, J. DA S.; COSTA, H.; FERNANDES, P. M. B.; MARTINS, D. S. Evidência da não-transmissão do vírus da meleira do mamoeiro por mosca-branca *Trialeurodes variabilis* (Quaintance, 1900). In: MARTINS, D. S.(Org.). **Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 605-608.
- ANTUNES, T. F. S.; AMARAL, R. J. V.; VENTURA, J. A.; GODINHO, M. T.; AMARAL, J. G.; SOUZA, F. O.; ZERBINI, P. A.; ZERBINI, F. M.; FERNANDE, P. M. B. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **Plos one**, v. 11, p. 1-14, 2016.
- ARAÚJO, M. M. M.; TAVARES, E. T.; SILVA, F. R.; MARINHO, V. L. A.; JÚNIOR, M. T. S. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 305–310, 2007.
- BAKER, K. F.; SMITH, S. H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Plant Pathology**, v. 4, p. 311-332, 1996.
- BASTOS, M. S. R. **Processamento Mínimo de Frutas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

BENNETT, C. W. Seed Transmission of Plant Viruses. **Advances in Virus Research Volume**, v. 14, p. 221-261, 1969.

BHATTACHARYYA, D.; CHAKRABORTY, S. Chloroplast: the Trojan horse in plant–virus interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 2, p. 504–518, 2018.

BOWERS, G. R.; GOODMAN, R. M. Soybean mosaic virus: Infection of soybean seeds parts and seed transmission. **Phytopathology**, v. 69, p. 569-572, 1979.

BRESINSKY, A.; KORNER, C.; KADEREIT, J. W.; NEUHAUS, G.; SONNEWALD, U. **Tratado de Botânica de Strasburger**. 36^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

BRITO, D. P.; TUSSELL, R. T.; VELAZQUEZ, A. C.; RAMAYO, A. Q.; GARCEZ, A. N.; MEX, R. M. First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 13564-13570, 2012.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. Mobilização de reserva. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **GERMINAÇÃO: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.

CÁMARA, I. G.; BRITO, D. P.; VALENZUELA, O. M.; ÁLVAREZ, A. M.; FERNANDES, P. M. B.; TUSSEL, R. L. T. Evidências moleculares e experimentais da melancia (*Citrullus lanatus*) como hospedeiro da variante mexicana do vírus da papaia meleira. **Revista Europeia de Patologia Vegetal**, v. 151, n. 1, p. 117–123, 2018.

CARD, S. D.; PEARSON, M. N.; CLOVER, G. R. G. Pollen transmission of plant pathogens. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 455–461, 2007.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **GERMINAÇÃO: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

COCUCCI, A. E.; MARIATH, J. E. A. Gametogêneses, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 15-30.

CONDON, J. M.; FINERAN, B. A. The effect of chemical fixation and dehydration on the preservation of latex in *Calystegia silvatica* (Convolvulaceae). Examination of exudate and latex *in situ* by light and scanning electron microscopy. **Journal of experimental botany**, v. 40, n. 217, p. 925-939, 1989.

CORREA, F. J. F.; FRANCO, B. J. D. C.; WATANABE, H. S.; SAKAY, M. Y.; YAMASHITA, E. M. A. Estudo preliminar sobre exsudação do látex do mamoeiro -Teixeira de Freitas. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DA CULTURA DO MAMOEIRO. **Anais**. Jaboticabal: UNESP, 409-428, 1988.

CORTEZ, P. A.; SILVA, D. C.; CHAVES, A. L. F. **Manual prático de morfologia e anatomia vegetal**. Ilheus: EDITUS, 2016.

COSTA, J. E. B.; SOUZA, J. L. Cenários do mercado brasileiro e internacional de frutas e do mamão. In: VII SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO: Produção e Sustentabilidade Hídrica. **Anais**. Vitória: Incaper, 1-7, 2018.

CRANG, R.; LYONS-SOBASKI, S.; WISE, R. Parenchyma, Collenchyma, and Sclerenchyma. **Plant Anatomy**, p. 181-213, 2018.

CRUZ, S. S. C. Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules – what goes in must come out. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 6, p. 237-241, 1999.

DOMIER, L. L.; STEINLAGE, T. A.; HOBBS, H. A.; WANG, Y.; HERRERA-RODRIGUEZ, G.; HAUDENSHIELD, J. S.; MCCOPPIN, N. K.; HARTMAN, G. L. Similarities in seed and aphid transmission among *Soybean mosaic virus* isolates. **Plant Disease**, v. 91, p. 546-550, 2007.

FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, L. J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. **HISTOQUÍMICA E CITOQUÍMICA EM PLANTAS**: princípios e protocolos. 1. ed. Lisboa: Faculdade de Ciência da Uniersidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007.

FILHO, F. M. A.; SHERWOOD, J. L. Evaluation of Seed Transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Pathology**, v. 90, p. 1233-1238, 2000.

FOSTER, L. T. Morphological and cytological studies on *Carica papaya*. **Botanical Gazette**, v. 105, n. 1, p. 116–126, 1943.

FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Environment and evolution modulate plant virus. **Current Opinion in Virology**, v. 17, p. 50–56, 2016.

FRANCO, J. F. C.; QUINTO, R. A. A.; AVILA, D. F. Q. Transmission of the umbra-like Papaya virus Q in Ecuador and its association with meleira-related viruses from Brazil. **Crop Protection**, v. 110, p. 99-102, 2018.

GOUVEA, R. R.; VITÓRIA, R. Z.; ROSA, R.; ALVES, W. S. B.; GIURIATTO, N.; CALATRONI, D.; FANTON, C. J.; MARTINS, D. S.; QUEIROZ, R. B. Flutuação populacional de cigarrinhas (hemiptera: cicadellidae) e ocorrência do vírus da meleira do mamoeiro. In: VII SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO: Produção e Sustentabilidade Hídrica. **Anais**. Vitória: Incaper, 1-6, 2018.

HILY, J.M.; POULICARD, N.; MORA, M.Á.; PAGÁN, I.; GARCÍA-ARENAL, F. Environment and host genotype determine the outcome of a plant–virus interaction: from antagonism to mutualism. **New Pathologist**, v. 209, p. 812–822, 2016.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4. ed. New York: Academic Press, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal - PAM**. Brasília: 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=o-que-e>. Acesso em: 16 fev. 2019.

ISOGAI, M.; YOSHIDA, T.; NAKANOWATARI, C.; YOSHIKAWA, N. Penetration of pollen tubes with accumulated *Raspberry bushy dwarf virus* into stigmas is involved in initial infection of maternal tissue and horizontal transmission. **Virology**, v. 452–453, p. 247-253, 2014.

- ISOGAI, M.; YOSHIDA, T.; SHIMURA, T.; YOSHIKAWA, N. Pollen tubes introduce *Raspberry bushy dwarf virus* into embryo sacs during fertilization processes. **Virology**, v. 484, p. 341-345, 2015.
- JIN, L.; LLOYD, R. V. *In situ* hybridization: Methods and applications. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 11, p. 2–9, 1997.
- JOHANSEN, E.; EDWARDS, M. C.; HAMPTON, R. O. Seed transmission of viruses: Current Perspectives. **Phytopathology**, v. 32, p. 363-386, 1994.
- KARMANN, J.; MÜLLER, B.; HAMMES, U. Z. The long and winding road: transport pathways for amino acids in Arabidopsis seeds. **Plant Reproduction**, v. 31, n. 3, p. 253-261, 2018.
- KAWASHIMA, T.; GOLDBERG, R. B. The suspensor: not just suspending the embryo. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 1, p. 23-30, 2009.
- KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, C. H.; SILVEIRA, J. S.; ALVES, F.; VENTURA, J. A.; ARAGÃO, F. J. L.; OLIVEIRA, L. H. R. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with Meleira (Sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 118-122, 1993.
- KUMARI, R.; KUMAR, S.; SINGH, L.; HALLAN, V. Movement Protein of *Cucumber mosaic virus* Associates with Apoplastic Ascorbate Oxidase. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. 1-24, 2016.
- LALIBERTÉ, J. F. A. S. H. Cellular remodeling during plant virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 69–91, 2010.
- LEE, J. Y.; LUCAS, W. J. Phosphorylation of viral movement proteins – regulation of cell-to-cell trafficking. **TRENDS in Microbiology**, v. 1, n. 9, p. 5-8, 2001.
- LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; BARBOSA, G. S.; GONÇALVES, M. F. B. Formas de transmissão de vírus de planta. In: Lima, J. A. A. (Org.). **Virologia essencial e viroses em culturas tropicais**. Fortaleza: UFC, 2015. p. 87-136.
- LIMA, R. DE C. A.; COUTO, A. DE O. F.; ANDRADE, J. DE S.; MARTINS, D. DOS S.; VENTURA, J. A.; TATAGIBA, J. DA 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. **Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 539-541.
- LIU, H.; FU, Y.; JIANG, D.; LI, G.; XIE, J.; CHENG, J.; PEND, Y.; GHABRIEL, S. A.; YI, X. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. **Jornal Virology**, v. 84, p. 11879-11887, 2010.
- LÓPEZ- OCHOA, L. A.; MORENO- VALENZUELA, O. A.; ZAMUDIO- MORENO, E. **Secuencia parcial y método de diagnóstico por RT- PCR del virus de la meleira de la papaya**. MX/a/2012/000081, jun. 2013, set. 2017. Gaceta de la Propiedad Industrial, México, 53.
- LORENZ, P.; HELLER, A.; BUNSE, M.; HEINRICH, M.; BERGER, M.; CONRAD, J.; STINTZING, F. C.; KAMMERER, D. R. Structure Elucidation of the Main

Tetrahydroxyxanthenes of Hypericum Seeds and Investigations into the Testa Structure. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 5, p.1-15, 2018.

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

MADROÑERO, J.; RODRIGUES, S. P.; ANTUNES, T. F. S.; ABREU, P. M. V.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. Transcriptome analysis provides insights into the delayed sticky disease symptoms in *Carica papaya*. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 967–980, 2018.

MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, W. A.; DURÃES, F. O. M. **Tanino no grão de sorgo bases fisiológicas e métodos de determinação**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1997.

MAGAÑA-ALVAREZ, A. **Evaluación de la transmisión de Papaya Meleira Virus (PMeV) por Semillas**. Maestría: Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, 2013.

MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. NEW YORK: McGRAW-HILL, 1950.

MARINOS, N. G. Embryogenesis of the pea (*Pisum sativum*) I: the cytological environment of the developing embryo. **Protoplasma**, v. 70, p. 261–279, 1970.

MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamoeiro**. Vitória-ES: Incaper, 2003.

MAULE, A. J.; WANG, D. SEED TRANSMISSION OF PLANT VIRUSES: a lesson in biological complexity. **Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 153-158, 1996.

MAURASTONI, M. A. **Localização do papaya meleira virus (PMeV) e papaya meleira virus 2 (PMeV2) em tecidos de *Carica papaya* L.** 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) -Universidade Federal do Espírito Santo- UFES, Vitória, 2018.

MEISSNER FILHO, P. E.; NETO, F. P. L.; OLIVEIRA, C. L. B. de; SANTANA, S. P. B.; DANTAS, J. L. L. Avaliação da resistência de genótipos de mamoeiro ao vírus da meleira no Semiárido. In: _____ **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 1. ed. Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2017. p. 5-19.

MORENO, E. Z.; PRADO, J. H. R.; VALENZUELA, O. A. M.; OCHOA, L. A. L. Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 1145-1154, 2015.

NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: IX Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais**. Campinas, SP: SBF/UNICAMP, 555- 559, 1987.

NAKAMURA, K.; YAMAGISHI, N.; ISOGAI, M.; KOMORI, S.; ITO, T.; YOSHIKAWA, N. Seed and pollen transmission of *Apple latent spherical virus* in apple. **Journal of General Plant Pathology**, v. 77, n. 1, p. 48–53, 2011.

NERVA, L.; VARESE, G. C.; FALK, B. W.; TURINA, M. Mycoviruses of an endophytic fungus can replicate in plant cells: Evolutionary implications. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

- NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 627-632, 2012.
- NGUYENAND, H.; TARANDJIISKA, R. Lipid Classes, Fatty Acids and 'Diglycerides in Papaya Seed Oil. **Fat Science Technology**, v. 97, n. 1, p. 20-26, 1995.
- NIBERT, M. L.; GHABRIAL, S. A.; MAIS, E.; LESKER, T.; VAINIO, E. J.; JIANG, D.; SUZUKI, N. Taxonomic reorganization of family *Partitiviridae* and other recent progress in partitivirus research. **Virus Research**, p. 1-14, 2014.
- RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- ROBERTS, I. M.; WANG, D.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. **Protoplasma**, v. 222, p. 31–43, 2003.
- RODRIGUES, C. H.; ALVES, F. L.; MARIN, S. L. D. Ocorrência e Sintomas da Meleira do Mamoeiro (*C. papaya*) No Estado Do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.14 (Supl.), p.118, 1989a.
- RODRIGUES, C. H.; VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.14 (Supl.), p.118, 1989b.
- RODRIGUES, S. P. **Interação entre o papaya meleira virus (PMeV) e o mamoeiro (Carica papaya L.)**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia molecular de plantas). Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Vitória, 2006.
- RODRIGUES, S. P.; CUNHA, M.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 861–871, 2009.
- ROOSSINCK, M. J. Lifestyles of plant viruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, p. 1899–1905, 2010.
- ROOSSINCK, M. J. Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. **Annual Review of Genetics**, v. 46, p. 359–69, 2012.
- ROOSSINCK, M. J. Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. **Virology**, v. 479-480, p. 271-277, 2015.
- ROOSSINCK, M. J. Evolutionary and ecological links between plant and fungal viruses. **New Phytologist**, n. 221, p. 86–92, 2019.
- ROOSSINCK, M. J.; SAHA, P.; WILEY, G. B.; QUAN, J.; WHITE, J. D.; LAI, H.; CHAVARRÍA, F.; SHEN, G.; ROE, B. A. Ecogenomics: using massively parallel pyrossequencing to understand virus ecology. **MOL ECOL**, v. 19, p. 81-88, 2010.
- SALGADO, R. P. P. **Análise do desenvolvimento de sementes de mamoeiros (Carica papaya L.) infectados com Papaya ringspot virus E Papaya meleira virus**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal do Espírito Santo- Ufes, Vitória, 2015.

- SANTOS, M. P. **Indução de sistema de defesa do mamoeiro como resposta à elicitores químico (óxido nítrico) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal do Espírito Santo- Ufes, Vitória, 2005.
- SANTOS, S. A.; SILVA, R. F.; PEREIRA, M. G.; ALVES, E.; MACHADO, J. C.; BORÉM, F. M.; GUIMARÃES, R. M.; MARQUES, E. R. Estudos morfo-anatômicos de sementes de dois genótipos de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31 , n. 2, p. 116-122, 2009.
- SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. In: GLORIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. (Org.). **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UVF, 2012.
- SCHIPPERS, B. Transmission of *Bean common mosaic virus* by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 12, p. 433-497, 1963.
- SCHOELZ, J. E.; HARRIES, P. A.; NELSON, R. S. Intracellular Transport of Plant Viruses: Finding the Door out of the Cell. **Molecular Plant**, v. 4, n. 5, p. 813–831, 2011.
- SHENA, Q.; WU, L.; ZHAO, X.; LI, Y. Comparative analysis of electron microscopic structure of seed testa, lignin and biosynthesis-related enzyme activities in hulled and hull-less seeds of *Cucurbita moschata*. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 137-143, 2019.
- SHIN-HWA, Y. A preliminary study on the structure of seed-shells and fruit-coats in *hodge-sonia macrocarpa* cogn. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 2, 1981.
- STAGINNUS, C.; GREGOR, W.; METTE, M. F.; TEO, C. H. A four-partner plant–virus interaction: enemies can also come from within. **BMC Plant Biology**, v. 7 , p. 24-1402, 2007.
- TAPIA-TUSSELL, R.; MAGAÑA-ALVAREZ, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; ITZA-KUK, G.; NEXTICAPAN-GARCEZ, A.; QUIJANO-RAMAYO, A.; MARTIN-MEX, R.; PEREZ-BRITO, D. Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. **Plant Pathology**, v. 64, p. 272–275, 2015.
- THOMAZ, L. D.; SILVIA, C. T. M.; PETERLE, P. L.; DUTRA, S. S.; LORENCINI, T. S. **MORFOLOGIA VEGETAL: Organografia**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo- UFES, 2009.
- VENTURA, J. A.; MARTINS, D. S.; FERREGUETTI, G.A. Meleira do mamoeiro: Etiologia, sintomas e epidemiologia. In: MARTINS, D. S. **Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno**. Vitória: Incaper, 2003. p. 267–276.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. M. H. **Diseases of Fruits and Vegetables**. New York: Kluwer Academic Publishers, v. 2, 2004. p. 201–268.
- VENTURA, J. A.; MARTINS, D. S.; FERREGUETTI, G. A. Eficiência do roguing como estratégia de manejo da meleira e mosaico do mamoeiro. VI SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO: Tecnologia de produção e mercado para o mamão brasileiro. **Anais**. Vitória: Incaper, 1-6, 2015.
- VIDAL, C. A.; NASCIMENTO, A. S.; BARBOSA, C. J.; MARQUES, O. M.; HABIBE, T. C. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro 1 ("Papaya sticky disease virus") por insetos. **Magistra**, v. 17, n. 2, p.101-106, 2005.

WAN, J.; LALIBERTÉ, J. F. Membrane-associated virus replication complexes locate to plant conducting tubes. **Plant Signaling Behavior**, v. 10, n. 8, 2015.

WANG, D.; MAULE, A. J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of *Pea seed-borne mosaic virus*. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1615-1620, 1992.

WANG, D.; MAULE, A. J. A Model for Seed Transmission of a Plant Virus: Genetic and Structural Analyses of Pea Embryo Invasion by *Pea seed-borne mosaic virus*. **The Plant Cell**, v. 6, p. 777-787, 1994.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Ácidos Nucleicos Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

XU, P.; CHEN, F.; MANNAS, J. P.; FELDMAN, T.; SUMNER, L. W.; ROOSSINCK, M. J. Virus infection improves drought tolerance. **New Phytologist**, v. 18, p. 911–921, 2008.

YANG, A. F.; HAMILTON, R. I. The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. **Virology**, v. 62, p. 26-37, 1974.

ZAMBOLIM, E. M.; ALONSO, S. K.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, p. 389 – 394, 2003.

ZHAI, Y.; ATTOULI, H.; MOHD, J.F.; WANG, H.Q.; CAO, Y.X.; FAN, S.P.; SUN, Y.X.; LIU, L.D.; MERTENS, P.P.; MENG, W.S.; WANG, D.; LIANG, G. Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family Totiviridae. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 2836-2845, 2010.

ZHANG, Y.; ZHAO, W.; LI, H.; CHEN, H.; ZHU, S.; FAN, Z. Real-time TaqMan RT-PCR for detection of *Maize chlorotic mottle virus* in maize seeds. **Journal of Virological Methods**, v. 171, p. 292–294, 2011.