



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARCOS VINICIUS HELL

**IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DO COMPLEXO DE VÍRUS DA
MELEIRA DO MAMOEIRO (PMeV e PMeV2)**

VITÓRIA-ES

2021

MARCOS VINICIUS HELL

**IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DO COMPLEXO DE VÍRUS DA
MELEIRA DO MAMOEIRO (PMeV e PMeV2)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Prof. Dr. Jose Aires Ventura
Orientador
Incaper/Ufes-PPGBioTec

Prof. Dra. Patricia M. Bueno Fernandes
Co-orientador
Ufes-PPGBioTec

VITÓRIA-ES

2021

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

Hell, Marcos Vinicius, 1993-

IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DO COMPLEXO DE VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO

(PMeV e PMeV2) / Marcos Vinicius Hell. - 2021.

37 f.

Orientador: Jose Aires Ventura.

Coorientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade

Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mamão. 2. Virus. 3. Fitopatologia. I. Ventura, Jose Aires. II. Fernandes, Patricia Machado Bueno. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

MARCOS VINICIUS HELL

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS PLANTAS HOSPEDEIRAS DO COMPLEXO DE VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO (PMeV e PMeV2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 31 de Março de 2021.

Prof. Dr. Prof. Dr. Jose Aires Ventura
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural-Incaper/
Universidade Federal do Espírito Santo-Ufes
Orientador

Prof. Dr. Prof. Dra. Patricia M. Bueno
Fernandes
Co-orientadora
Universidade Federal do Espírito Santo-Ufes

Prof. Dra Diolina Moura Silva.
Membro Interno
Universidade Federal do Espírito Santo-Ufes

Prof. Dr. Hélcio Costa
Membro Externo
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural (Incaper)

VITÓRIA, ES

2021

AGRADECIMENTOS

Ao Professor. Dr. José Aires Ventura pela colaboração, disposição, paciência e os ensinamentos essenciais para a realização deste trabalho e a Professora. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes pela orientação, paciência e oportunidade de aprendizagem em seu grupo de trabalho.

Aos Professores Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes e Dr. Alexandre Martins Costa Santos que sempre foram muito dispostos em me ajudar. Obrigado pelo exemplo de sabedoria e humildade.

Aos meus familiares pelo grande amor, pelas palavras e pelo apoio incondicional, porque cada uma das minhas realizações é o resultado de sua dedicação e sacrifício.

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;

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de estudo. Às instituições de fomento CAPES, FAPES e CNPq pela concessão da bolsa e financiamento da pesquisa desenvolvida.

Por fim, agradeço a todos os que de uma forma ou de outra contribuíam para a culminação deste trabalho.

HELL, M. V. **Identificação de potenciais plantas hospedeiras do complexo de vírus da meleira do mamoeiro (PMeV e PMeV2)**. 2020. 39f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) tem expressiva participação na produção nacional da fruticultura, sendo a terceira fruta mais consumida no País. Uma das principais doenças que afeta as plantações de mamão no Brasil é a meleira, causada pelo complexo viral papaya meleira virus (PMeV) e papaya meleira virus 2 (PMeV2). Até então, a melhor estratégia disponível para controlar a doença é erradicação de plantas infectadas. Entretanto, acredita-se que o vírus seja capaz de permanecer em espécies secundárias, como as plantas invasoras e consorciadas. A identificação de plantas-modelo hospedeira do complexo PMeV visa proporcionar avanços no estudo da interação vírus-planta. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar plantas hospedeiras do complexo viral. Oito espécies de plantas (*Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Momordica charantia* e *Carica papaya*) foram inoculadas, mecanicamente, por ação abrasiva e injeção no ápice caulinar, com inóculo obtido a partir de látex de plantas de mamoeiro infectadas, com quatro repetições. Adicionalmente em *C. papaya* foi realizada também a inoculação com o corte da folha. Foram coletadas amostras antes da inoculação e aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação para a indexação por RT-PCR. Aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação realizou-se a avaliação visual das plantas, para sintomas locais e sistêmicos. As espécies *C. lanatus*, *C. moschata* e *N. benthamiana* mostraram-se positivas para a presença do PMeV e PMeV2 na reação de RT-PCR. Aos 30 dias, as plantas de *C. lanatus* e *C. moschata* apresentaram lesões na margem das folhas e *N. benthamiana* exibiu sintomas de clorose entre as nervuras. Não houve diferença entre os métodos de inoculação nas plantas de *C. papaya*. Esta é a primeira vez que se confirmaram plantas hospedeiras para os vírus PMeV e PMeV2, o que viabiliza novas possibilidades de investigação da interação planta vírus em condições controladas e estabelecer novas estratégias de manejo da doença.

Palavras Chave: *Carica papaya*; Vírus; Hospedeiro.

HELL, M. V. **DETECTION OF POTENTIAL HOST PLANTS OF THE PAPAYA STICKY DISEASE VIRUSES COMPLEX (PMeV E PMeV-2)** 2020. 36f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

ABSTRACT

The papaya culture (*Carica papaya* L.) has an expressive participation in the national fruit production, being the third most consumed fruit in the country. One of the main diseases that affects papaya plantations in Brazil is the papaya sticky disease, caused by the viral complex papaya meleira virus (PMeV) and papaya meleira virus 2 (PMeV2). Until then, the best strategy available to control the disease is to eradicate infected plants. However, it is believed that the virus is able to remain in secondary species, such as invasive and intercropped plants. The identification of model host plants of the PMeV complex aims to provide advances in the study of virus-plant interaction. Thus, the objective of this work was to identify host plants of the viral complex. Eight species of plants (*Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Momordica charantia* and *Carica papaya*) were inoculated, mechanically, by abrasive action and injection in the stem apex, with inoculum obtained from latex of infected papaya plants, with four replications. Additionally, in *C. papaya*, the inoculation was also performed with the leaf cut. Samples were collected before inoculation and at 15, 30 and 45 days after inoculation for indexing by RT-PCR. At 15, 30 and 45 days after inoculation, a visual assessment of the plants was performed, for local and systemic symptoms. The species *C. lanatus*, *C. moschata* and *N. benthamiana* were positive for the presence of PMeV and PMeV2 in the RT-PCR reaction. At 30 days, the plants of *C. lanatus* and *C. moschata* showed lesions in the leaf margin and *N. benthamiana* exhibited symptoms of chlorosis between the veins. There was no difference between the inoculation methods in the plants of *C. papaya*. This is the first time that host plants for the PMeV and PMeV2 viruses have been confirmed, which enables new possibilities for investigating the plant virus interaction under controlled conditions and establishing new disease management strategies.

Keywords: *Carica papaya*; Virus; Papaya sticky disease. Alternative hosts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas observados em plantas hospedeiras do PMeV e PMeV2, inoculadas por abrasão e injeção com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV ao DAI 45 dias. (a) <i>Cucurbita moschata</i> ; (b) <i>Citrullus lanatus</i> e (c) <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
Figura 2. Incidência de plantas de mamoeiro (<i>Carica papaya</i>) submetidas a três métodos de inoculação (abrasão, injeção e corte/gota) com látex de plantas infectadas com os vírus PMeV e PMeV2.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detecção do vírus PMeV em diferentes espécies de plantas inoculadas com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV.	26
Tabela 2. Detecção do vírus PMeV2 em diferentes espécies de plantas inoculadas com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV2.....	27
Tabela 3. Detecção do vírus PMeV em plantas de mamoeiro (Carica papaya) cv. Golden submetidas a três métodos de inoculação com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV2.....	29
Tabela 4. Detecção do vírus PMeV2 em plantas de mamoeiro (Carica papaya) cv. Golden submetidas a três métodos de inoculação com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV2.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA	RNA fita dupla (do inglês Double-stranded RNA)
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês <i>Open reading frame</i>)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)
PMeV	Papaya meleira vírus
PMeV-Mx	Papaya meleira vírus isolado mexicano do PMeV
PMeV-Br	Papaya meleira vírus isolado brasileiro do PMeV
M	MLV murine leukemia virus
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do Inglês RNA dependent RNA polimerase)
ssRNA	RNA fita simples (do inglês Single-stranded RNA)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MELEIRA DO MAMOEIRO	13
1.2 ETIOLOGIA DA MELEIRA	14
1.3 TRANSMISSÃO MECÂNICA DO P _{MeV}	15
1.4 PLANTAS HOSPEDEIRO DE VÍRUS	16
1.5 HOSPEDEIROS DO P _{MeV}	17
1.6 DETECÇÃO DOS VÍRUS	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO DE PLANTAS INOCULADAS	21
3.2 INÓCULO E INOCULAÇÃO	21
3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS VÍRUS	22
3.3.1 Extração de ácidos nucleicos	22
3.3.2 Tratamento com dnase	22
3.3.3 Transcrição reversa	23
3.3.4 PCR convencional	23
3.3.5 Eletroforese dos fragmentos de PCR	23
4. RESULTADOS	25
4.1 HOSPEDEIROS POTENCIAIS DO P _{MeV}	25
4.2 HOSPEDEIROS POTENCIAIS DO P _{MeV2}	26
4.3 SINTOMAS OBSERVADOS NAS PLANTAS	28
4.4 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM <i>CARICA PAPAYA</i>	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da FAO (2021), em 2019 o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de mamão, com produção superior a 1 milhão de toneladas.

No Brasil a cultura tem significativa participação na produção nacional da fruticultura. Sendo a terceira fruta mais consumida no País, possui grande relevância econômica e social, principalmente na geração de emprego e renda (BARBOSA, 2012).

O mamão destaca-se, dentre os frutos tropicais produzidos no Brasil, ocupando a sexta posição na pauta de exportações, em 2018 alcançando uma receita total de US\$ 50 milhões (SECEX/MDIC, 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de mamão, com mais de 1,161 milhões de toneladas, produzidas em mais de 27,5 mil ha, concentrando-se essa produção nos estados do Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Norte (IBGE, 2018). Atualmente, o cultivo de mamão ocorre na maioria dos estados brasileiros, mas é na Bahia e Estado do Espírito Santo onde está mais concentrada, juntos respondem com 65,2% da produção brasileira (IBGE, 2018).

Entretanto, a cultura sofre perdas devido a fatores abióticos e bióticos. Alguns fatores limitam a produção de mamão, acarretando severas perdas na produção, comercialização e exportação de frutos *in natura*. Dentre os fatores bióticos destaca-se a meleira do mamoeiro que pode promover perdas de até 70 % da produção. A meleira do mamoeiro, tem como agente causal o complexo viral formado por papaya meleira virus (PMeV) e papaya meleira virus 2 (PMeV2) (ANTUNES *et al.* , 2016; VENTURA *et al.* , 2003).

1.1 MELEIRA DO MAMOEIRO

A meleira é uma doença que provoca a exsudação espontânea de látex aquoso e fluido nos frutos, em consequência da ruptura dos laticíferos pelo aumento da turgência. Também são observadas alterações morfológicas do látex derivadas da presença do patógeno (VENTURA, *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

A exsudação pode ocorrer também na extremidade de folhas novas, independentemente da idade das plantas. Os frutos doentes apresentam sabor e consistência da polpa alterada, tornando-se inúteis para o consumo *in natura* (VENTURA, *et al.*, 2004).

No início a doença foi associada a um desequilíbrio na absorção de cálcio ou boro, decorrente de estresse hídrico ou desbalanceamento desses elementos no solo (NAKAGAWA *et al.*, 1987). Além dos fatores abióticos, foi sugerido o envolvimento de microorganismos na indução dos sintomas da meleira, após o isolamento de bactérias do gênero *Bartonella* a partir de plantas doentes (AKIBA, 1989). A patogenicidade dessas bactérias, entretanto, não foi comprovada. Posteriormente, com a maior compreensão da sintomatologia da doença, verificou-se que 45 dias após a inoculação de látex infectado, plantas inicialmente saudáveis apresentavam os primeiros sintomas da meleira sugerindo que o agente causador da doença estivesse presente no látex das plantas (RODRIGUES *et al.*, 1989; VENTURA *et al.*, 2001).

1.2 ETIOLOGIA DA MELEIRA

A análise do látex de plantas doentes indicou a presença de partículas isométricas de aproximadamente 42 nm de diâmetro, que foram visualizadas em células de laticíferos e fortemente aderidas a polímeros do látex de planta doentes (KITAJIMA *et al.*, 1993). Neste mesmo trabalho foi proposto que um vírus seria o agente causador da meleira. Finalmente, a etiologia viral da doença foi confirmada após purificação das partículas isométricas presentes no látex, seguida de inoculação das partículas virais em mamoeiros saudáveis, que se tornaram doentes (MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2003).

A sequência completa de um isolado de PMeV coletado no estado do Rio Grande do Norte foi relatada por Abreu *et al.*, 2015b. A análise *in silico* do genoma de 8,7 kb revelou que a sequência de aminoácidos deduzida do PMeV ORF2 contém os domínios conservados característicos de RdRps de membros dos gêneros *Luteovirus*, *Totivirus* e *Rotavirus*.

Recentemente, um estudo realizado no Núcleo de Biotecnologia da Ufes, Brasil, mostrou que a doença decorre de uma dupla infecção com PMeV, o primeiro vírus identificado e relatado, relacionado a membros da família *Totiviridae*, e um segundo vírus, papaya meleira virus 2 (PMeV2), relacionado com membros do gênero *Umbravirus* e que possui um genoma de RNA fita simples (ssRNA) de aproximadamente 4,5 kb (ANTUNES *et al.*, 2016).

Antunes *et al.*, 2016 constataram que a presença dos dois vírus associados levam a manifestação da 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 codificou para proteína capsidial (CP, do inglês *capsid protein*) enquanto que a ORF2 codificou para RNAs polimerase dependentes de RNA (RdRp, 34 do inglês RNA-dependent RNA polymerase) (ABREU *et al.*, 2015; 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). Em plantas com dupla infecção, a CP sintetizada pelo PMeV é capaz de encapsidar o próprio genoma de dsRNA bem como transencapsidar o ssRNA do PMeV2 (ANTUNES *et al.*, 2016).

Evidências indicam que o PMeV pode ser um vírus endófito 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 vírus endófito e não induzir sintomas de meleira (ABREU *et al.*, 2015a; ANTUNES *et al.*, 2016).

1.3 TRANSMISSÃO MECÂNICA DO PMEV

As etapas de transmissão das viroses em plantas podem ser compreendidas em três processos: 1) aquisição, a partir de uma fonte de inóculo, 2) transporte até um hospedeiro compatível, e 3) inoculação do vírus neste hospedeiro. A fonte de inóculo

do PMeV é obtida pelo látex de mamoeiros com meleira, já que nele o vírus encontra-se em alta concentração (KITAJIMA *et al.*, 1993; ZAMBOLIM *et al.*, 2003).

A transmissão mecânica dos vírus associados a meleira pode ocorrer com eficiência, injetando o látex de plantas doentes nos ápices de caules de mamoeiros sadios, com sintomas da doença aparecendo aproximadamente 45 dias após a inoculação; no entanto, a transmissão mecânica por fricção com o látex não foi eficiente (VENTURA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Observações de campo demonstram que os mamoeiros infectados pelo PMeV apresentam distribuição agregada na plantação, ao longo das linhas de plantio, sugerindo que a transmissão do vírus também ocorra durante os tratos culturais, através de ferimentos nas plantas seguidos de inoculação de látex infectado (VENTURA *et al.*, 2003). Estes ferimentos podem ser provocados, por exemplo, durante os procedimentos de desbaste de brotos e raleio de frutos, com o uso de ferramentas de corte ou através do movimento de tratores durante a colheita, que, por abrasão, causa lesões nas folhas das plantas.

1.4 PLANTAS HOSPEDEIRO DE VÍRUS

O controle das doenças virais em plantas depende da eliminação das fontes de inóculo e da limitação da multiplicação do inóculo e dispersão. Portanto, o conhecimento da biologia do vírus da planta, particularmente fontes de inóculo e sobrevivência na ausência da colheita, é essencial para a implementação de estratégias de controle eficientes (SACRISTÁN *et al.*, 2004). Para vírus transmitidos com persistência, reservatórios e fontes de inóculo podem estar próximas ou não das áreas de cultivo. No entanto, os hospedeiros alternativos podem ocasionar múltiplas pressões de seleção sobre o patógeno, levando a uma especialização em uma ou poucas espécies de plantas ou adaptando-se para sobreviver em muitas espécies de plantas, evoluindo em uma ampla variedade de hospedeiros e mantendo uma diversidade populacional mais ampla (DAWSON; HILF, 1992).

Nicotiana benthamiana é o modelo de hospedeiro experimental mais utilizado em virologia vegetal, devido principalmente ao grande número de vírus que podem

infectá-la, além disso, está ganhando popularidade na biologia vegetal por ser geneticamente transformada e regenerada facilmente, passível de métodos fáceis para silenciamento de genes induzidos por vírus e expressão transitória de proteínas (GOODIN *et al.*, 2008).

Os vírus de plantas vêm sendo amplamente investigados com o intuito de conhecer seus mecanismos de infecção e suas interações com os hospedeiros e assim desenvolver novas estratégias de manejo e controle que sejam eficazes e economicamente viáveis (GOTTULA; FUCHS, 2009).

Mesmo que a evolução favoreça uma específica gama de hospedeiro, a capacidade de infectar diferentes hospedeiros fornece ao patógeno mais oportunidades de transmissão e sobrevivência (MALPICA *et al.*, 2006).

1.5 HOSPEDEIROS DO PMeV

Há poucas informações sobre hospedeiros alternativos do patógeno e epidemiologia da doença. Estudos anteriores para determinar a gama de hospedeiros da meleira, mostrou a presença de dsRNA do vírus em amostras de *Urocloa decumben* (Sin.: *Brachiaria decumbens*) porém nenhum sintoma foi observado neste hospedeiro (BARBOSA *et al.*, 1999).

Através da inoculação mecânica de látex coletado a partir de plantas de mamoeiro infectadas, 47 diferentes espécies vegetais foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao PMeV: *Acanthospermum hispidum*, *Amaranthus deflexus*, *Bidens pilosa*, *B. decumbens*, *Canavalia ensiformis*, *Capsicum annum*, *C. papaya*, *Cenchrus echinatus*, *Chamaesyce hirta*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Commelina benghalensis*, *Cucumis sativus*, *C. anguria*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Emilia sonchifolia*, *Euphorbia heterophylla*, *Galinsoga ciliata*, *Gomphrena globosa*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Hibiscus esculetus*, *Ipomoea acuminata*, *I. setosa*, *Lactuca sativa*, *Leonotis nepetaefolia*, *Leonurus sibiricus*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *Panicum maximum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus segetum*, *Ricinus communis*, *Senna obtusifolia*, *Sida rhombifolia*, *Solanum americanum*, *Sonchus oleraceus*,

Stilozobium sp., *Vicia faba*, *Vigna sinensis* e *V. unguiculata* (ZAMBOLIM *et al.* , 2003). Entre estas espécies, apenas *C. papaya* e *B. decumbens* (Sin.: *Urocloua decumbens*) apresentaram o dsRNA do PMeV, confirmando os resultados descritos por Barbosa e outros (1999).

Mais recentemente, as gramíneas *Urocloua decumbens* e *Pennisetum clandestinum* foram inoculadas com o látex infectado. Através da PCR convencional foi detectada a presença do PMeV em folhas localizadas na região basal e apical nas duas gramíneas, que mostraram-se suscetíveis ao vírus pela injeção de látex desde os 15 dias após da inoculação. A distribuição do vírus em diferentes partes da planta foi analisada, porém não observou-se aparecimento de sintomas em nenhum tempo de avaliação (BENAVIDES *et al.*, 2015).

Posteriormente mudas de melancia (*Citrullus lanatus*) foram inoculadas com látex de mamão infectado com uma variante mexicana de PMeV (PMeV-Mx), e a infecção foi confirmada por transcrição reversa, onde por volta de 10 a 12 dpi, foram observadas lesões necróticas nas bordas das folhas (GARCIA-CAMARA *et al.* , 2017).

1.6 DETECÇÃO DOS VÍRUS

O diagnóstico do complexo PMeV é de grande importância para o controle da doença, principalmente para a redução das fontes de inóculo, pois até agora não existem variedades conhecidas de mamão resistente ao complexo PMeV

Métodos moleculares foram desenvolvidos e descritos para detecção de vírus. Inicialmente foram desenvolvidos dois métodos para o diagnóstico da doença, com base na extração de ácidos nucleicos do látex de mamão infectado e na visualização do dsRNA em gel de agarose a 1% (p/v). Esses métodos são rápidos, fáceis, baratos e permitem a análise de um grande número de amostras simultaneamente. Além disso, eles exigem entre 350 e 500 µL de látex de mamão (TAVARES *et al.*, 2004). Entretanto, em comparação com métodos moleculares, requererem grandes quantidades de látex e uma alta concentração do vírus, tornam-se inadequados para a detecção nos estágios iniciais da infecção ou quando apenas uma pequena quantidade do material vegetal está disponível (ABREU *et al.*, 2015a).

Araujo *et al.*, (2007) desenvolveram um método baseado na transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), que oferece vantagens sobre os métodos de detecção e diagnóstico anteriores, uma vez que requer apenas 1 µg de ácido nucleico extraído do látex. Entre as vantagens desse método estão sua velocidade, sensibilidade e capacidade de analisar um grande número de amostras. Um método ainda mais sensível para a detecção do vírus por meio da RT-PCR em tempo real, foi desenvolvido por Abreu *et al.*, (2012), o que permite maior sensibilidade à baixa titulação do vírus em plantas doentes, bem como à quantificação e análise simultâneas de um grande número de amostras.

Após o completo sequenciamento do dsRNA e ssRNA extraído a partir de látex de plantas sintomáticas ao complexo PMeV, novos oligonucleotídeos foram desenhados possibilitando a detecção em plantas sintomáticas e assintomáticas (ANTUNES *et al.*, 2016). Recentemente uma nova metodologia de diagnóstico, multiplex RT-PCR foi desenvolvida capaz de detectar os dois vírus associados a meleira em uma única reação, diminuindo os custos e tempo dispensados no processo de diagnóstico (MAURASTONI *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e identificar espécies de plantas potencialmente hospedeiras do complexo viral PMeV e PMeV2 associados a meleira do mamoeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por meio de dois métodos de inoculação plantas potencialmente hospedeiras do PMeV e PMeV2.
- Detectar a presença do PMeV e PMeV2 em plantas inoculadas.
- Observar os sintomas provocados pela inoculação mecânica de látex infectado nas espécies avaliadas.
- Relacionar a presença dos sintomas à infecção pelo PMeV e PMeV2.
- Comparar métodos de inoculação do complexo PMeV em *C. papaya*

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e no laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, em Vitória-ES, no período de julho de 2019 a janeiro de 2020. A incidência de plantas infectadas foi determinada com base na porcentagem de plantas inoculadas e plantas positivas.

3.1 OBTENÇÃO DE PLANTAS INOCULADAS

Foram utilizadas plantas de 4 Famílias (*Caricaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* e *Solanaceae*) selecionando-se as espécies *Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Momordica charantia* e *Carica papaya* como controle positivo. Para espécie foram cultivadas cinco plantas em vasos separados. As plantas foram cultivadas em vasos contendo mistura de substrato orgânico com terra de subsolo na proporção de 1:2, respectivamente. A irrigação foi fornecida diariamente no período da manhã e a noite. O fotoperíodo foi mantido em condições naturais.

3.2 INÓCULO E INOCULAÇÃO

Amostras de látex de mamoeiros com sintomas típicos de meleira foram coletadas em Sooretama, Espírito Santo (ES), Brasil. O látex foi coletado a partir de cada planta usando uma lâmina de bisturi esterilizado e diluído (1:1, v/v) em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 (RODRIGUES *et al.* , 2005). A confirmação de que o látex estava infectado foi realizada pelo mesmo método utilizado no diagnóstico das amostras.

As mudas com aproximadamente quatro pares de folhas foram submetidas a dois métodos de inoculação, a) Abrasão: as folhas do ápice das plantas foram lesionadas por abrasão com carborundum 600 mesh, juntamente com 20 µL de látex infectado; b) Injeção: injeção direta de 20 µL de látex infectado no ápice do caule. As plantas controle foram inoculadas com 20 µL de tampão citrato de sódio (0,1 M pH 5,0).

Adicionalmente as plantas de *C. papaya*, da cv. Golden, foram submetidas uma inoculação adicional com corte do tecido foliar com o auxílio de um bisturi estéril e seguida deposição de 20 µL de látex infectado (corte/gota).

Amostras de folhas foram coletadas em todas as plantas antes da inoculação e aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação (DAI) para a indexação por RT-PCR. Aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação também foi realizada a avaliação visual das plantas, para detecção de sintomas locais e sistêmicos.

3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS VÍRUS

3.3.1 Extração de ácidos nucleicos

O RNA total foi extraído de amostras utilizando o reagente Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Uma folha de cada amostra foi colocada em tubos de eppendorf (2 mL) e pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado 1 mL do reagente Trizol® e agitado vigorosamente no vortex durante 10 segundos e mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C). A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e posteriormente homogeneizado no vortex por 1 min. Após serem incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2 mL), e adicionou-se 400 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão durante 2 minutos e mantidos em temperatura ambiente por 8 minutos.

Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75% a 4 °C e as amostras foram centrifugadas a 7.500 g durante 5 min a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* na câmara de fluxo laminar. Para sua ressuspensão, utilizaram-se 20 µl de água ultrapura. O RNA isolado foi quantificado e posteriormente estocado em ultra freezer a -80 °C.

3.3.2 Tratamento com dnase

No tratamento com DNase, 1 µg de RNA extraído foi misturado com a DNase (RNase – Free DNase Promega) de acordo com a recomendação do fabricante. Foi adicionado 1 µL de tampão para DNase e 1 µL da enzima e o volume completado para 8 µL com água ultra pura. Em seguida a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente adicionado 1 µL de EDTA 20 mM e novamente incubada por 10 minutos a 75°C.

3.3.3 Transcrição reversa

Ao RNA tratado com DNase, foi adicionado 0,5 µg do primer hexâmero randômico e incubados por 3 minutos a 96°C. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima M-MLV, e 1,25 µL de dNTP 25 mM, e 1 µl da enzima M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl) (Promega) em um volume final de 25 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 37 °C por 60 min para a síntese do cDNA e 70 °C por 10 min para a desativação da enzima.

3.3.4 PCR convencional

Os cDNAs foram submetidos e avaliados por RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos (ANTUNES *et al.*, 2016). Para a reação da RT-PCR foi preparada uma solução mix composta de 4 µL de tampão 10X para a enzima, 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 0,2 µL de dNTPs 25 mM; 1,25 µl do oligonucleotídeo iniciador (125 ng/µl), 1 µL de cDNA, 0,1 µl de enzima (5 U/µl) e água ultrapura livre de RNase completando-se 10 µL na solução final. A mistura foi submetida a uma temperatura preliminar de 94° C por 3 minutos e posteriormente 32 ciclos de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos (ARAÚJO *et al.* , 2007), no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

3.3.5 Eletroforese dos fragmentos de PCR

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), em solução tampão TAE (tris base 0,1 M; ácido acético glacial 1 M e EDTA 0,5M) e corado com 10 μ L de brometo de etídio a uma concentração de 10 ng/mL, durante 70 minutos em uma voltagem de 80 mV. O peso molecular foi calculado por comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen Carlsbad, USA). Foram aplicadas 10 μ L de cada amostra em cada poço e 2 μ L do tampão Blue/Orange (Promega).

As imagens dos géis foram digitalizadas e fotografadas no sistema ultravioleta digital de captura de imagens L-PIX (Loccus Biotecnologia® Molecular Imaging).

4. RESULTADOS

4.1 HOSPEDEIROS POTENCIAIS DO PMeV

Para determinar a susceptibilidade ao PMeV, amostras foliares de 15 plantas de cada espécie foram submetidas a diagnóstico molecular por RT-PCR. Na tabela 1 estão representados o diagnóstico para cada espécie em função do tipo de inoculação (abrasão ou injeção) e dias após a inoculação - DAI (0, 15, 30 e 45), sendo que DAI 0 corresponde ao momento precedido da inoculação.

Os resultados mostram que as espécies *C. lanatus*, *C. moschata* e *N. benthamiana* adquiriram o PMeV por meio de inoculação por abrasão. Plantas de *C. lanatus* foram infectadas por ambos métodos em todas as amostras no DAI 30, porém no método abrasivo não foi diagnosticado infecção no DAI 45.

Em *C. moschata* o PMeV foi adquirido apenas pelo o método abrasivo, mantendo em mesma relação planta inoculada/planta infectada entre o DAI 15 ao 45. O diagnóstico em *N. benthamiana* mostrou um aumento acumulativo de plantas infectadas ao longo do tempo, onde no DAI 45 100% das inoculadas pelo método injeção e 80 % no método abrasivo foram positivas.

Em ambos métodos de inoculação, *N. tabacum*, *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *M. charantia* não foram diagnosticadas com PMeV. Em *C. papaya* todas as plantas foram diagnosticadas com o PMeV no DAI 45, embora ele tenha sido encontrado antes da inoculação (DAI 0).

Tabela 1. Detecção do PMeV em diferentes espécies de plantas inoculadas por dois diferentes métodos com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV.

Espécie da Planta	Avaliação (dias)	Método de Inoculação	
		Abrasivo	Injeção
<i>Carica papaya</i>	0	5/4 ¹	5/2
	15	5/4	5/3
	30	5/4	5/3
	45	5/5	5/5
<i>Citrullus lanatus</i>	0	5/0	5/0
	15	5/3	5/2
	30	5/5	5/5
	45	5/0	5/5
<i>Cucurbita moschata</i>	0	5/0	5/0
	15	5/1	5/0
	30	5/1	5/0
	45	5/1	5/0
<i>Momordica charantia</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0	5/0	5/0
	15	5/1	5/0
	30	5/1	5/2
	45	5/4	5/5
<i>Nicotiana tabacum</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Vigna unguiculata</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0

¹ Relação entre Plantas inoculadas/Plantas infectadas.

4.2 HOSPEDEIROS POTENCIAIS DO PMeV2

A resposta a infecção do PMeV2 também foi verificada através de diagnóstico molecular por RT-PCR em amostras foliares e os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Detecção do PMeV2 em diferentes espécies de plantas inoculadas por diferentes métodos com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV2.

Espécie da Planta	Avaliação (dias)	Método de Inoculação	
		Abrasivo	Injeção
<i>Carica papaya</i>	0	5/0 ¹	5/0
	15	5/2	5/0
	30	5/2	5/2
	45	5/5	5/5
<i>Citrullus lanatus</i>	0	5/0	5/0
	15	5/5	5/5
	30	5/0	5/3
	45	5/1	5/4
<i>Cucurbita moschata</i>	0	5/0	5/0
	15	5/3	5/4
	30	5/2	5/4
	45	5/0	5/2
<i>Momordica charantia</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0	5/0	5/0
	15	5/1	5/3
	30	5/1	5/4
	45	5/0	5/0
<i>Nicotiana tabacum</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0
<i>Vigna unguiculata</i>	0	5/0	5/0
	15	5/0	5/0
	30	5/0	5/0
	45	5/0	5/0

¹ Relação entre Plantas inoculadas/Plantas infectadas.

Em relação ao PMeV2, as espécies *C. lanatus*, *C. moschata* e *N. benthamiana* adquiriram o vírus pelos dois métodos da inoculação, sendo as mesmas espécies que também foram infectadas pelo PMeV. Em *C. lanatus* observou-se que todas as plantas adquiriram o vírus no DAI 15, porém houve um decréscimo no número de plantas diagnosticadas em função do tempo independentemente do método de

inoculação, observando-se no método abrasivo um decréscimo mais acentuado até o DAI 45.

Em *C. moschata* ocorreu uma diminuição no número de plantas diagnosticadas positivamente no decorrer do tempo em ambos os métodos de inoculação, porém no método de injeção um número menor de plantas foram diagnosticadas. Sendo comportamento próximo aos observados em *C. lanatus*.

O diagnóstico em *N. benthamiana* também mostrou redução de plantas infectadas ao longo do tempo, onde no DAI 45 100% das plantas inoculadas, independente do método, foram negativas para o PMeV2. *N. tabacum*, *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *M. charantia* não apresentaram o PMeV2. Em *C. papaya* todas as plantas foram diagnosticadas com o PMeV2 no DAI 45, diferentemente do PMeV, este não foi diagnosticado antes da inoculação (DAI 0).

4.3 SINTOMAS OBSERVADOS NAS PLANTAS

Avaliando as respostas causadas pela infecção do complexo pmev foram observados sintomas nas folhas. Os sintomas encontrados foram lesões na margem das folhas de *C. lanatus* e *C. moschata*. Em *Nicotiana benthamiana* foram observadas machas cloróticas em todo tecido foliar (Figura 1).

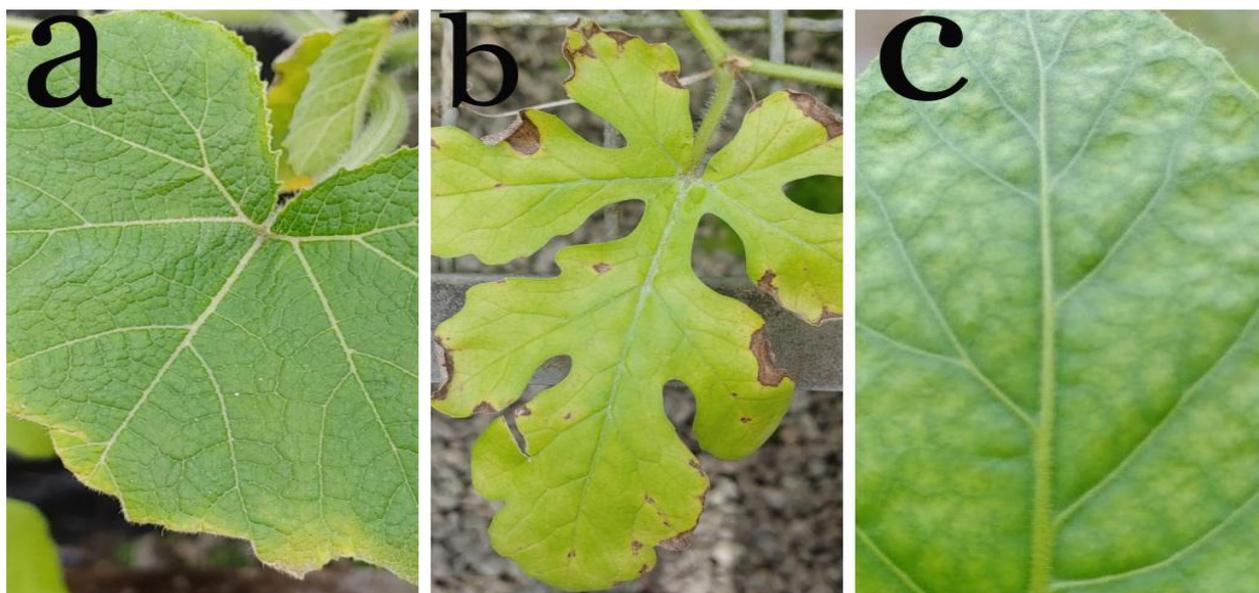


Figura 1. Sintomas observados em plantas hospedeiras do PMeV e PMeV2, inoculadas por abrasão e injeção com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV ao DAI 45 dias. (a) *Cucurbita moschata*; (b) *Citrullus lanatus* e (c) *Nicotiana benthamiana*

4.4 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM *CARICA PAPAYA*

A inoculação do agente infeccioso visa romper as barreiras de proteção naturais e promover sua entrada e consequente infecção no hospedeiro. Objetivando-se avaliar os métodos de inoculação que simulem as injúrias sofridas em campo pela planta, plantas de *C. Papaya* foram inoculadas mecanicamente com látex previamente diagnosticado positivamente para o complexo PMeV. O diagnóstico molecular por RT-PCR em amostras foliares está descrito para o PMeV (Tabela 3) e PMeV2 (Tabela 4).

Tabela 3. Detecção do PMeV em plantas de mamoeiro (*Carica papaya* cv Golden) submetidas a três métodos de inoculação com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV-2.

Métodos de Inoculação	Avaliação (DAI)			
	0	15	30	45
Abrasivo	5/4 ¹	5/4	5/4	5/5
Injeção	5/2	5/3	5/3	5/5
Corte/ gota	5/4	5/4	5/4	5/5

¹ Relação entre Plantas inoculadas/Plantas infectadas.

Tabela 4. Detecção do PMeV2 em plantas de mamoeiro (*Carica papaya* cv Golden) submetidas a três métodos de inoculação com látex de plantas infectadas com o complexo PMeV e PMeV-2.

Métodos de Inoculação	Avaliação (DAI)			
	0	15	30	45
Abrasivo	5/0 ¹	5/2	5/2	5/5
Injeção	5/0	5/0	5/2	5/5
Corte/ gota	5/0	5/1	5/3	5/5

¹ Relação entre Plantas inoculadas/Plantas infectadas.

Pelos resultados obtidos pode-se observar que não houve diferença entre os métodos de inoculação abrasivo, injeção ou corte/gota, onde todas as plantas foram diagnosticadas com complexo PMeV no DAI 45. Na figura 2 está representado graficamente o aumento proporcional de plantas infectadas em função dos dias após a inoculação. Para o vírus PMeV os métodos de injeção e corte/gota foram mais eficientes com maior número de plantas infectadas já com 30 e 45 dias.

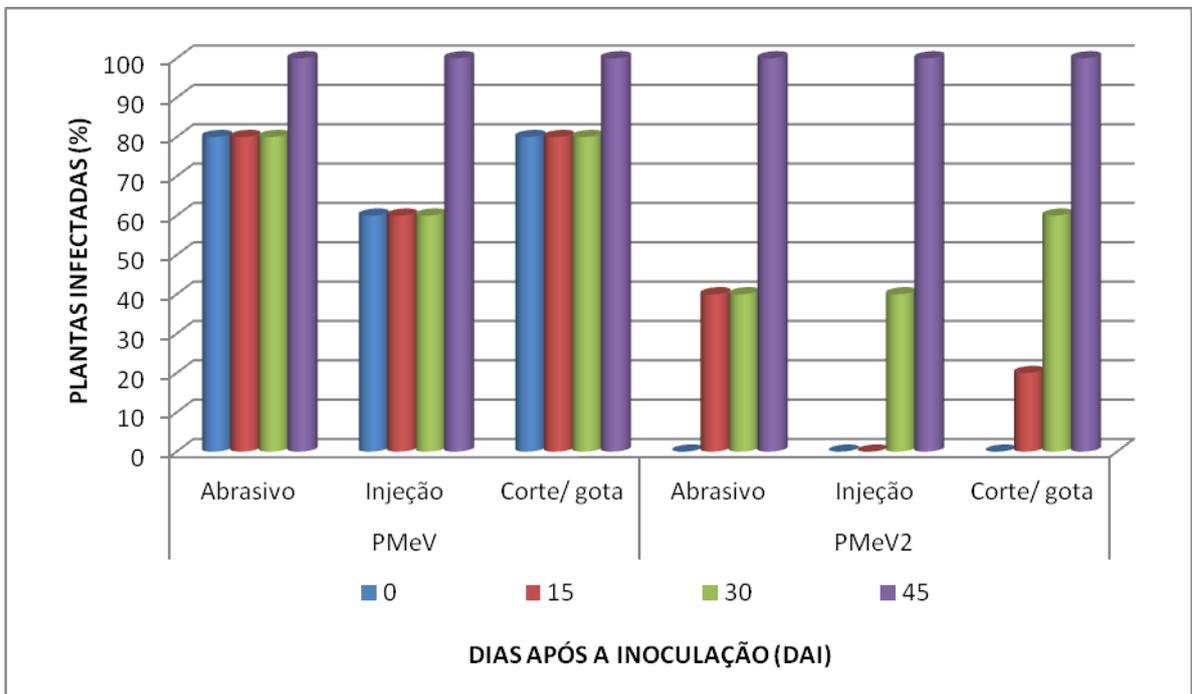


Figura 2. Incidência de plantas de mamoeiro (*Carica papaya*) submetidas a três métodos de inoculação (abrasão, injeção e corte/gota) com látex de plantas infectadas com os vírus PMeV e PMeV2.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o vírus PMeV possui diversificada gama de hospedeiros, sendo adicionadas duas novas espécies (*C. moschata* e *N.benthamiana*) aos relatos já publicados na literatura (MACIEL-ZAMBOLIN *et al.*, 2003; BENAVIDES *et al.*, 2015; GARCÍA-CÁMARA *et al.*, 2017).

O presente trabalho é o primeiro a investigar a gama de hospedeiros do vírus PMeV2. Evidências moleculares e experimentais demonstram as espécies *C.lanatus*, *C.moschata* e *N. benthamiana* como novos hospedeiros.

Relatos de García Cámara *et al.*, 2017, descrevem que plantas de *C. lanatus* puderam ser infectadas pelo PMeV-Mx ocasionando lesões necróticas nas pontas e bordas das folhas entre 10 e 12 DAI e ainda levando a morte de todas as mudas inoculadas com PMeV-Mx em aproximadamente 20-25 DAI. No presente estudo confirmamos que plantas de *C. lanatus* podem ser infectadas pelo complexo PMeV-Br e também desenvolveram sintomas semelhantes, embora nenhuma planta tenha morrido.

Neste experimento foi diagnosticada a presença dos vírus PMeV e PMeV2 em *C. moschata*, sendo o primeiro relato da infecção pelo complexo PMeV nesta planta. Esta espécie também é relatada como hospedeira de um outro vírus, o *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV) da família *Geminiviridae*, que também infecta *C. papaya* (KARKASHIAN *et al.*, 2002). Em nossas observações, os sintomas observados em *C. moschata* foram semelhantes aos encontrados em *C. lanatus*, mostrando uma resposta sintomatológica semelhante quando infectados pelo PMeV, possivelmente pelo fato de pertencerem a mesma família.

A *N. benthamiana* é uma das 64 espécies do gênero *Nicotiana* e destaca-se, quando comparada com outros membros do gênero, devido à sua extrema suscetibilidade a certos vírus (DAWSON; HILF, 1992). Os dados obtidos demonstraram a sua capacidade de ser infectada pelos vírus do complexo da meleira do mamoeiro e também de expressar sintomas cloróticos nas folhas associados a infecção viral.

N. benthamiana é uma das espécies amplamente utilizadas como modelo na pesquisa científica atualmente. Esta espécie é o foco de pesquisas na área da genética, bioquímica e fisiologia. Uma das vantagens de *N. benthamiana* um organismo modelo, em relação às plantas de mamoeiro, está relacionada ao porte da planta reduzido, curto tempo de geração, alta acessibilidade, fácil manipulação, entre outros. As plantas podem ser cultivadas em espaços reduzidos, como casas de vegetação ou câmaras de crescimento, possibilitando a condução de um grande número de plantas, com o custo reduzido.

Estas plantas surgem como possíveis modelos para desenvolver futuras pesquisas com a meleira, levando em consideração a facilidade de cultivo e ciclo das plantas. Considerando o ciclo do mamoeiro e de que as plantas só apresentam sintomas depois da floração/frutificação o que ocorre 7-9 meses após o plantio, ter uma planta modelo de fácil cultivo é muito importante para estudo, reduzindo tempo e custos. A utilização de plantas modelo ainda amplia a capacidade de realizar testes de interação entre planta/patógeno relacionado ao complexo PMeV.

Nas espécies *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* e *Momordica charantia* não foi detectada neste experimento, a presença dos vírus, permanecendo as plantas inoculadas sem sintomas durante o período de avaliação.

Os resultados da pesquisa destacam novas espécies como potenciais reservatórios para os vírus PMeV e PMeV2, justificando a necessidade e a importância de mais investigações, principalmente ampliar a investigação em potenciais plantas hospedeiras que possam estar presentes em lavouras de mamão consorciadas ou como invasoras, o que certamente vai possibilitar o entendimento da epidemiologia da meleira e o estabelecimento das estratégias de manejo da doença.

Em *C. papaya*, os resultados mostraram que o PMeV foi diagnosticado em DAI 0, corroborando com os resultados encontrados por Antunes *et al.*, 2016 que afirma se tratar de um vírus endófito ao mamoeiro.

Os métodos de inoculação mecânica buscam simular o ambiente de campo onde a planta entrar em contato com a fonte de inóculo. Rodrigues *et al.*, (2009) avaliaram cinco diferentes métodos de inoculação mecânica em *C. papaya*, baseada em

simulações de lesões causadas por atividades laborais no campo, como cortar as folhas e hastes, raspar a superfície das folhas, raspar a superfície das hastes e injetar o látex infectado no ápice do caule, sendo que apenas a última prática foi responsável pela transmissão do PMeV. Em nossos resultados não foram observados diferenças entre os métodos quanto a capacidade de *C. papaya* adquirir os vírus do complexo PMeV.

6 CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi confirmada a detecção dos vírus da meleira (PMeV e PMeV2) em espécies de plantas das famílias Curcubitaceae (*Citrullus lanatus* e *Cucurbita moschata*) e Solanaceae (*Nicotiana benthamiana*), que sendo um fato novo merece investigação, para estabelecer novas estratégias de manejo da doença.

A ampliação da gama de hospedeiros possibilita usar estes novos hospedeiros para estudos da interação planta vírus em condições de casa de vegetação pela facilidade de cultivo e inoculação.

Não houveram diferenças entre os métodos de inoculação abrasivo, injeção e corte com gota em *C. papaya*. O PMeV mostrou-se um vírus endófito ao mamoeiro, sendo encontrado isoladamente antes da inoculação.

As espécies, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Momordica charantia* não foram diagnosticadas com o complexo viral PMeV.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. M., 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, p. 11-17, 2012.

ABREU, P. M. V.; ANTUNES, T. F. S.; MAGAÑA-ÁLVAREZ, A.; PÉREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; 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, p.1853-1870, 2015a.

ABREU, E. F., DALTRO, C. B., NOGUEIRA, E. O., ANDRADE, E. C., & ARAGAO, F. J. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of virology**, v. 160, n. 12, p. 3143-3147, 2015b.

AKIBA, F. Bactérias pleomórficas, Gram negativas, e de crescimento lento em meio de cultura, isoladas do sistema vascular de diversas espécies de plantas apresentando sintomas de declínio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 110-111, 1989.

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. TAVARES, E. T.; SILVA, F. R.; MARINHO, V.L. JÚNIOR, M.T. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RTPCR. **Journal of Virological Methods**, v.146, n.1-2, p. 305-310, 2007.

BARBOSA, C. J.; HABIBE, T. C.; NASCIMENTO, A. S. Detecção de formas replicativas de vírus semelhantes às de meleira em gramíneas de pomares afetados. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 1999, Botucatu. **Programas e Resumos**, Botucatu: SPF, 1999.

BARBOSA, JOYCE DE QUEIROZ. **Conservação pós-colheita de mamão ‘Sunrise Solo’ com uso de quitosana**. 2012. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Sistemas Produção Vegetal)-Universidade Federal do Acre. Rio Branco.

BARBOSA, C.J.; MEISSNER FILHO, P.E.; HABIBE, T.C.; VILARINHOS, A.D.; MATRANGOLO, W.L. Distribuição de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro afetadas pela meleira. In: **Congresso Paulista de Fitopatologia**. 1998. p. 64.

BENAVIDES, A. V. S.; MARTINS, M. M.; VAZ, A. B.; AMARAL, R. J. V. do; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Avaliação das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* como hospedeiras do Papaya meleira virus (PMeV). In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO, 6., 2015, Vitória., ES. Tecnologia de produção e mercado para o mamão brasileiro: **Anais...** Vitória, ES: Incaper, 2015.

DAWSON, W. O.; HILF, M. E. Host-range determinants of plant viruses. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 527-555, 1992.

GARCÍA CÁMARA, I.; PEREZ-BRITO, D.; MORENO-VALENZUELA, O.; MAGAÑA-ALVAREZ, A.; FERNANDES, P. M. B.; TAPIA-TUSSELL, R. "Molecular and experimental evidence of watermelon (*Citrullus lanatus*) as host of the Mexican variant of papaya meleira virus." **European Journal of Plant Pathology**. 2018: 117-123.

GOTTULA, J.; FUCHS, M. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. **Advances in Virus Research**, New York, v.75, p.161-183, 2009.

FAOSTAT. **Crop Production**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 23 mar. 2021.

KARKASHIAN, J. P.; MAXWELL, D. P.; RAMÍREZ, P. Squash yellow mottle geminivirus: a new cucurbit infecting geminivirus from Costa Rica. **Phytopathology**, v. 92, n. Suppl, p. S125, 2002.

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

HULL, R. **Comparative plant virology**. Academic press, 2009.

MACIEL-ZAMBOLIM.; KUNIEDA A. S.; MATSUOKA K.; DE 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, n. 3, p. 389-394, 2003.

MALPICA, J. M.; SACRISTÁN, S.; FRAILE, A.; & GARCÍA-ARENAL, F. Association and host selectivity in multi-host pathogens. **PloS one**, v. 1, n. 1, 2006.

MAURASTONI, M.; SÁ-ANTUNES, T. F.; OLIVEIRA, S. A.; SANTOS, A. M.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. A multiplex RT-PCR method to detect papaya meleira virus complex in adult pre-flowering plants. **Archives of Virology**, p. 1-4, 2020.

NAKAGAWA, J.; AKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, v. 9, p. 555-559, 1987.

OLIVEIRA, S. A. **Transmissão vertical e localização do papaya meleira virus (PMeV) em tecidos embrionários de *Carica papaya* L.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

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, C. H.; ALVES, F. L.; MARIN, S. L. D.; MAFFIA, L. A.; VENTURA, J. A.; GUTIERREZ, A. S. D. Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. Linhares: EMCAPA, In: **Selecta de Trabalhos sobre a meleira do mamoeiro**, 1989.

RODRIGUES, S. P.; DA CUNHA, M.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Rep.** 2009, 28, 861–871.

RODRIGUES, S. P.; GALVÃO, O. P.; ANDRADE, J. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P.M.B. Método molecular simplificado para o diagnóstico da meleira do mamoeiro em látex e tecidos de plantas infectadas. **Summa Phytopathologica**, 31(3):273-275. 2005.

RODRIGUES, S. P.; ANDRADE J. S.; VENTURA, J. A.; LINDSEY, G. G.; FERNANDES P. M. B.; *Papaya meleira virus* is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. **Journal of Plant Pathology**, p. 87-91, 2009.

SACRISTÁN, S.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Population dynamics of Cucumber mosaic virus in melon crops and in weeds in central Spain. **Phytopathology**, v. 94, n. 9, p. 992-998, 2004.

SECEX/MDIC. **Secretaria de Comércio Exterior do Ministerio do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Portal Comex Stat. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br>>. Acesso em: 28-04-2020.

SERRANO, Luiz Augusto Lopes; CATTANEO, Laercio Francisco. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Rev. Bras. Frutic**, v. 32, n. 3, 2010.

TAVARES, E. T.; TATAGIBA, J.S; VENTURA, J. A.; SOUZA JR, M. T. Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 563-566, 2004.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. da S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S.A.M. H. (ed.). **Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management**. v. 2, London: Klumer Academic Publishers. 2004. p. 201-268.