



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

ASTRID VIVIANA SANTACRUZ BENAVIDES

**AVALIAÇÃO DAS GRAMÍNEAS *BRACHIARIA
DECUMBENS* E *PENNISETUM CLANDESTINUM* COMO
HOSPEDEIRAS DO *PAPAYA MELEIRA VIRUS***

VITÓRIA-ES

2015

ASTRID VIVIANA SANTACRUZ BENAVIDES

**AVALIAÇÃO DAS GRAMÍNEAS *BRACHIARIA
DECUMBENS* E *PENNISETUM CLANDESTINUM* COMO
HOSPEDEIRAS DO *PAPAYA MELEIRA VIRUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração do agronegócio.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura

Co-orientadora: Profa Dra. Patrícia M. B. Fernandes

VITÓRIA-ES

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B456a Benavides, Astrid Viviana Santacruz, 1984 -
AVALIAÇÃO DAS GRAMÍNEAS *Brachiaria
decumbens* e *Pennisetum clandestinum* COMO HOSPEDEIRAS
DO *PAPAYA MELEIRA VIRUS* / Astrid Viviana Santacruz
Benavides – 2015.
55 f. : il.

Orientador: José Aires Ventura.

Coorientador: Patrícia Machado Bueno Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Gramíneas. 2. Papaya. 3. Vírus. 4. Carica.

I. Ventura, José Aires. II. Fernandes, Patrícia Machado Bueno.

III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

ASTRID VIVIANA SANTACRUZ BENAVIDES

**AVALIAÇÃO DAS GRAMÍNEAS *BRACHIARIA
DECUMBENS* E *PENNISETUM CLANDESTINUM* COMO
HOSPEDEIRAS DO *PAPAYA MELEIRA VIRUS***

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.

Aprovada em 17 de março de 2015.

Prof. Dr. José Aires Ventura
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural
Orientador

Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Alberto A. R. Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA-ES

2015

DEDICATÓRIA

*A Colombia mi tierra querida y a Brasil
que me enseñó a vivir mágicas realidades...
Mi gratitud total siempre!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus, meu amigo fiel, quem faz meu caminho mais fácil e que renova minha força cada manhã. Minha vida inteira e cada sonho realizado são por Ele e para Ele.

Ao Professor. Dr. José Aires Ventura pela colaboração, disposição, paciência e os ensinamentos essenciais para a realização deste trabalho.

À Professora. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes pela orientação, paciência e oportunidade de aprendizagem em seu grupo de trabalho. Foi um grande treinamento que irão contribuir no desenvolvimento da minha região.

Ao Professor. Dr. Alberto Ribeiro Fernandes que sempre foi muito disposto em me ajudar. Obrigada pelo exemplo de sabedoria e humildade.

Aos meus pais, Luz Marina e Jesús pelo grande amor, pelas palavras e pelo apoio incondicional, porque cada uma das minhas realizações é o resultado de sua dedicação e sacrifício, são o melhor presente que Deus me deu. Aos meus irmãos Cristian e Grisel pelas motivações que sempre chegaram no momento preciso, sem eles nada seria igual. Às três maiores alegrias da minha família: Nicolás, Rut e Elizabeth que enchem meu coração de alegrias infinitas. Por você também Nancy, minha linda cunhada.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia pela ajuda em todo o meu processo de chegada ao Brasil. Gratidão por me ensinar do seu bonito país. À Dra. Aline Vaz pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

A minhas queridas Cecy, Laura e Sandra pelo carinho, apoio, o tempo compartilhado e sua inteira compressão. Nossa amizade é de aquelas que duram e são lembradas para o resto da vida. A Eliza, pelas dicas no português.

À maravilha secretaria da Biotec: Kárita, obrigada pela amabilidade e eterna disposição.

À Universidade Federal do Espírito Santo, e à Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Programa de Alianças para Educação e a Capacitação (PAEC OEA) pela oportunidade na continuação e realização dos meus estudos.

Às instituições de fomento CAPES, FAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FINEP pelo financiamento da pesquisa desenvolvida.

À INCAPER pela ajuda na aquisição das mudas e do material necessário para a execução de nosso trabalho.

Por fim, agradeço a todos os que de uma forma ou de outra contribuíam para a culminação deste trabalho, em especial aqueles que desde Colômbia nunca se esqueceram de mim.

RESUMO

Brasil é um dos principais produtores de mamão, mas sua produção é seriamente afetada por patógenos virais, como o *Papaya meleria virus* (PMeV) que causa perdas significativas e constitui um fator limitante para a cultura. Algumas plantas podem tornar-se hospedeiras dos vírus, funcionar como reservatórios contínuos dos vírus e contribuir na disseminação da virose. Atualmente não se conhecem relatos sobre o diagnóstico do PMeV em outras espécies que sejam potencialmente hospedeiras do vírus. O objetivo deste estudo foi avaliar duas espécies de gramíneas frequentes nos pomares de mamão como possíveis hospedeiras do PMeV e detectar a presença e distribuição do vírus em diferentes períodos após a inoculação (15, 30, 45, 60 dias). Plantas de *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* foram indexadas e inoculadas com o complexo viral. Através da PCR convencional foi detectada a presença do PMeV em folhas localizadas na região basal e apical nas duas gramíneas, que se comportaram como suscetíveis ao vírus pela injeção de látex desde os 15 dias após da inoculação. Adicionalmente foi observada a distribuição do vírus em distintas partes da planta sem manifestação de sintomas em nenhum tempo de avaliação. Esta é a primeira confirmação da detecção do PMeV em gramíneas por meio de PCR convencional e os primeiros resultados de hospedeiros alternativos da meleira. Os resultados alcançados são contribuições importantes para o diagnóstico do PMeV em gramíneas e abrem uma melhor compreensão das diferentes interações do vírus, sua biologia para os estudos de epidemiologia e o desenvolvimento de novas estratégias no manejo da doença.

Palavras chaves: *Papaya meleira virus*. Gramíneas. *Carica papaya*, Hospedeiros alternativos.

ABSTRACT

Brazil is a leading papaya producer and their production is affected by viral pathogens such as *Papaya meleria virus* (PMeV), which cause significant losses and are a limiting factor in papaya orchards. Some plants may become hosts and reservoirs of the virus and contribute to the incidence and spread of the virus. Nowadays, do not have reports about the PMeV diagnosis in grass or other species that are potential hosts. In this context, the main goal of this study is evaluate two grass species present in papaya orchards as potential hosts of PMeV and to detect the presence and distribution the virus in different periods after inoculation (15, 30, 45 and 60 days). *Brachiaria decumbens* propagative material and *Pennisetum clandestinum* were indexed and inoculated with the virus complex. In study, by PCR was detected the presence of PMeV in sheets located in the basal and apical regions of the two types of grasses, that behaved as susceptible to the virus by the latex injection since 15 days after inoculation. Additionally, was observed the virus distribution in different parts of the plant symptomless in the time of evaluation. This work constitutes the first confirmation of the PMeV detection in grass using conventional PCR and the first results of alternative virus hosts. The results contributes for the diagnosis studies of the PMeV in grasses, and open a better understanding about the different interactions of viruses, their biology and for epidemiologic studies, to develop new management strategies for the disease control.

Keywords: *Papaya meleira virus*. Grasses. *Carica papaya*. Alternative hosts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sintomas em folhas e frutos do <i>Papaya meleira virus</i> (PMeV)	18
Figura 2: Gramíneas <i>Pennisetum clandestinum</i> e <i>Brachiaria decumbens</i>	20
Figura 3: Partes das brachiarias coletadas para o diagnóstico do PMeV	26
Figura 4: Grupos de gramíneas inoculados pelo método de inoculação por abração	27
Figura 5: Manifestação de sintomas <i>Brachiaria decumbens</i> após de 15 dias da inoculação do PMeV	33
Figura 6: Gramíneas assintomáticas em diferentes tempos de avaliação	34
Figura 7: Diagnóstico do <i>Papaya meleira virus</i> (PMeV) mediante PCR nas gramíneas <i>Brachiaria decumbens</i> e <i>Pennisetum clandestinum</i>	35
Figura 8: Diagnóstico do <i>Papaya meleira virus</i> (PMeV) em estolões coletados 60 dias após da inoculação mediante PCR em <i>Brachiaria decumbens</i> e <i>Pennisetum clandestinum</i>	35
Figura 9: Diagnóstico do <i>Papaya meleira virus</i> (PMeV) mediante PCR em gramíneas pelo método de inoculação por abrasão.....	36
Figura 10: Mesófilo infectado do <i>Rice yellow mottle vírus</i> (RYMV) em plantas de arroz	42
Figura 11: Distribuição sistêmica dos vírus pela inoculação mecânica	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 IMPORTÂNCIA DA FRUTICULTURA NA AMÉRICA LATINA	14
1.2 GARGALOS DA FRUTICULTURA.....	15
1.3 PRODUÇÃO DO MAMÃO NO BRASIL.....	15
1.4 PRINCIPAIS VÍRUS NA CULTURA DO MAMOEIRO NO BRASIL.....	16
1.4.1 Meleira do mamoeiro	17
1.5 IMPORTÂNCIA DAS BRAQUIÁRIAS E SEU PAPEL COMO HOSPEDEIRAS DE VÍRUS	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 OBTENÇÃO DAS GRAMÍNEAS	24
3.2 VÍRUS PMeV	24
3.3 INOCULAÇÃO DO VÍRUS	25
3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	28
3.5 QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS	29
3.6 ELETROFORESE DO RNA TOTAL.....	29
3.7 TRATAMENTO COM DNase	29
3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	30
3.9 RT-PCR CONVENCIONAL.....	30
3.10 ELETROFORESE DOS FRAGMENTOS DE PCR.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 MULTIPLICAÇÃO DAS GRAMÍNEAS E INDEXAÇÃO	32
4.2 MANIFESTAÇÕES DE SINTOMAS.....	32
4.3 DIAGNÓSTICO DO PMeV POR PCR NAS GRAMÍNEAS BRACHIARIA DECUMBENS E PENNISSETUM CLANDESTINUM	34
4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VÍRUS PMeV EM GRAMÍNEAS E SUA IMPORTÂNCIA NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	36

4.5	TRANSLOCAÇÃO DO VÍRUS PMeV NAS GRAMÍNEAS.....	38
4.5.1	Transferência de genomas dos sites de replicação aos sistemas de transporte intracelular.....	40
4.5.2	Transporte intracelular de genomas para os plasmodesmos	40
4.5.3	Transporte intracelular através dos plasmodesmos	40
5	CONCLUSÕES	45
6	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão expostas a inúmeros fatores que podem causar doenças ou morte das mesmas. Os agentes patógenos que as infectam pertencem a diferentes espécies; entre as quais podemos citar fungos, bactérias, insetos, fitoplasmas e vírus, sendo este último de grande importância devido as perdas que causam na produção agrícola de várias culturas.

Os vírus de plantas vêm sendo amplamente investigados com o intuito na procura 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).

A biotecnologia constitui uma ferramenta importante na pesquisa de vírus de plantas e apesar dos debates gerados, avança com ritmo próprio e diferente dentro de cada país de acordo às capacidades de cada região (KATZ; BÁRCCENA, 2004).

Os investimentos do setor público e privado na tecnologia na América Latina são atualmente mais destacados no Brasil e no México, países que recebem a maior parcela de investimento, com 52% e 16%, respectivamente, estando à Colômbia entre os quatro países da América do Sul com maiores recursos investidos em ciência e tecnologia (ARTUNDU, 2013).

Para o Brasil, a inovação tecnológica continua sendo uma estratégia que contribuirá no desenvolvimento econômico e social da região. Como tecnologia revolucionária, a biotecnologia fornece neste processo uma melhora das técnicas de produção em diferentes âmbitos da economia do país (TIDD et al, 2008).

1.1 IMPORTÂNCIA DA FRUTICULTURA NA AMÉRICA LATINA

A fruticultura é uma atividade de importância não só por sua contribuição nutricional como fonte de vitaminas e minerais, mas também por cooperar nos aspectos sociais, econômico e no crescimento do PBI dos países produtores (ODEPA, 2010).

A Ásia foi considerada uma das principais zonas produtora de frutas no ano 2010, com mais do 56% da produção, seguido pela América Latina com um 32%, África com um 11% e os Estados Unidos, Europa e Oceania com o 1% da produção mundial de frutas (FAO, 2010). Contudo, a América Latina detém uma enorme parcela da produção de frutas tropicais tais como manga, abacaxi, mamão e abacate, que estão representados em um 75% do total produzido (FAO, 2010).

Nesse cenário, as exportações de frutas frescas cultivadas no Brasil registraram uma queda de 6,91% em volume no ano de 2011 e uma recuperação nas exportações em 1,73% no ano seguinte. (ANUARIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013). Pelo clima e extensão territorial, o Brasil é considerado um dos maiores produtores de frutas e o terceiro produtor mundial com 45 milhões de toneladas produzidas ao ano (IBGE, 2011).

Para Brasil, em 2011 as exportações mundiais de fruta fresca tiveram uma queda de 6,91% em volume, mas em 2012 as exportações aumentaram 1,73% (ANUARIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013). Pelo clima e pela extensão territorial, o Brasil é considerado um dos maiores produtores de frutas e o terceiro produtor mundial com 45 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2011). Apesar disso, sua presença no comércio internacional é baixa, sendo quase a totalidade da produção voltada para o mercado interno (IBGE, 2011).

Para o Estado do Espírito Santo (ES), a fruticultura promove a geração de emprego e renda, além de criar um espaço de inovação do setor agropecuário ao atrair investimentos, com a implantação de pacotes agroindustriais para o processamento de frutas, potencializando o desenvolvimento do agronegócio no Estado. Apesar da pequena extensão territorial, que equivale a 0,53% do território nacional, o ES obtém grandes benefícios que permitem produzir frutas de alta qualidade (INCAPER, 2010).

1.2 GARGALOS DA FRUTICULTURA

Ademais da importância da fruticultura no agronegócio a nível mundial, os novos desafios nesta atividade estão relacionados com a qualidade, peso, sabor, aparência e origem dos produtos comercializados. Além disso, as enfermidades incluem os aspectos que afetam seriamente as produções nas culturas e são os fatores mais relevantes na produção (BUAINAIN; BATALHA, 2007), especialmente aqueles gerados pelos vírus que tem sido responsáveis pela redução da qualidade das frutas (ANUARIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013).

1.3 PRODUÇÃO DO MAMÃO NO BRASIL

Desde o 2010 a produção do mamão registrou crescimento de 12,4 milhões de toneladas, das quais cerca de 8 toneladas (65%) foram produzidas na América Latina e na região Caribe, 3,7 toneladas (30%) na Ásia, e 0,62 toneladas (5%) na África (FAO, 2010). O clima predominante em algumas regiões da América Latina, faz do Brasil, México, República Dominicana, Colômbia e Guatemala parte dos dez principais territórios produtores de mamão no mundo (FAO, 2012).

Conforme a Food and Agriculture Organization (FAO), em 2014, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial desta fruta, ficando atrás apenas da Índia (FAO, 2014). Desde o ano 2010, problemas econômicos e no clima afetaram a produção

passando de 1,87 para 1,85 milhões de toneladas nos períodos de 2011 e 2012 respectivamente (ANUARIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013). Na agricultura brasileira o mamoeiro (*Carica papaya* L.), é uma das frutas de grande importância econômica pelas suas propriedades nutricionais e por seu agradável sabor, sendo a sétima fruta *in natura* mais exportada. Considerada como fonte de vitaminas B1, B2 e B3 niacina e cálcio, fortalece os músculos e o coração, protege a pele e cabelo e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento (DE OLIVERIA; VITORIA, 2011).

Relativo à produção nacional de mamão no ano 2010, os principais Estados produtores incluem a Bahia com 718.726 toneladas, o Espírito Santo com 404.720 toneladas, Ceará com 118.372 toneladas e Rio Grande do Norte com 69.925 toneladas (IBGE, 2014; SERRANO; CATTANEO, 2010).

Para o ano de 2013, segundo o Ministério de Agricultura, o Estado do Espírito Santo é o maior exportador de mamão do Brasil e o segundo Estado onde mais se produz fruta pelo uso de tecnologias modernas e pelo manejo adequado das plantações. Informações indicam que do 1,85 milhão de toneladas a nível nacional, o Espírito Santo obteve 560 mil toneladas produzidas em onze municípios do Norte do Estado, dentre as quais se destacam os municípios de Linhares, Sooretama, Jaguaré e Pinheiros (IBGE, 2013).

1.4 PRINCIPAIS VÍRUS NA CULTURA DO MAMOEIRO NO BRASIL

As doenças de origem viral são um dos fatores mais limitantes da produção dos mamoeiros, posto que originam grandes perdas nas produções e afetam negativamente o desenvolvimento da planta. Conforme o manejo da cultura e as condições ambientais, os vírus podem causar perdas de até um 100% na produção (REZENDE; FANCELLI, 1997; TAVARES et al., 2004; SARAIVA et al., 2006)

Dentre os vírus prevalecentes e registrados nas regiões produtoras de mamão no Brasil relata-se o *Papaya ringspot virus* (PRSV), o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) e o *Papaya meleira virus* (PMeV) (LIMA; CAMARÇO, 1997; REZENDE; FANCELLI, 1997).

1.4.1 Meleira do mamoeiro

A *meleira* é uma doença relacionada a um vírus que tem como característica particular a exsudação excessiva de látex de consistência mais fluida que o habitual (KITAJIMA et al. 1993; VENTURA et al., 2003). Foi relatada pela primeira vez em 1980 afetando pomares de mamão no sul da Bahia e no norte do Espírito Santo (NAKAGAWA et al., 1987; CORREA et al., 1988; RODRIGUES et al., 1989). Dois anos depois, difundiu-se rapidamente, causando sérios danos nas culturas de mamão (RODRIGUES et al., 1989). Posteriormente, foi relatada nos estados de Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte (BARBOSA et al., 1998) e fora do Brasil, apenas no México (PEREZ BRITO et al., 2012).

Nos primeiros relatos da doença surgiram dúvidas quanto à sua etiologia viral. Mas Kitajima et al. (1993), por meio de microscopia eletrônica de transmissão, analisaram o látex de folha de plantas com sintomas evidentes da meleira e observaram a presença de partículas isométricas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. Nos mesmos estudos, por eletroforese, foi identificada a presença de dsRNA no látex de plantas sintomáticas, o que provavelmente estava relacionada a uma doença de origem viral.

O vírus é composto de RNA dupla fita (dsRNA), com partículas isométricas de 40 e 50 nm de diâmetro, com aproximadamente 12.000 pb e encontram-se presentes no látex das plantas infectadas (KITAJIMA et al, 1993;.. ZAMBOLIN et al, 2003; TAVARES et al., 2004)

Além da exsudação excessiva de látex nos frutos, os pecíolos das folhas mais novas tornam-se necróticos com deformação das bordas das folhas (VENTURA et al., 2003) (Figura 1). Os primeiros sintomas manifestam-se quando a planta tem em torno de seis meses de idade ocasionando alterações das folhas e nos frutos da planta (RODRIGUES et al., 1989; VENTURA et al., 2003).



Figura 1 Sintomas do *Papaya meleira virus*: a) Folha com deformações e ápice necrótico; b) Exsudação excessiva e espontânea de látex de frutos infectados. Fonte: VENTURA, et al., 2004.

O controle do PMeV é limitado ao uso de um sistema integrado de medidas preventivas como: a desinfecção constante de ferramentas agrícolas, erradicação de pomares com 50% de incidência da doença e utilização de mudas certificadas e livres do patógeno (LIMA., et al 2001). Uma vez os primeiros sintomas sejam confirmados, a eliminação de plantas sintomáticas, conhecida como *roguing*, é a técnica mais comumente utilizada por diminuir as fontes de inóculo em campo (LIMA., et al 2001; VENTURA et al., 2003).

Ainda mesmo sem conhecer os hospedeiros e vetores da meleira, sabe-se que para ocorrer à disseminação é necessária a presença de plantas hospedeiras que

crecem no entorno dos pomares, constituindo-se fonte de inoculo e reservatórios longevos da doença em campo (VENTURA et al., 2003).

1.5 IMPORTÂNCIA DAS BRAQUIÁRIAS E SEU PAPEL COMO HOSPEDEIRAS DE VÍRUS

As braquiárias pertencem à ordem *Cyperales*, família *Poacea*. Nesta família encontram-se as espécies de gramíneas mais relevantes pela importância econômica como por exemplo: *Triticum* (trigo), *Oryza* (arroz), *Zea* (milho), *Saccharum* (cana de açúcar), *Sorghum* (sorgo), *Hordeum* (cevada), *Panicum* e a *Brachiaria* (JUDD et al. 1999) (Figura 2). A última tem uma grande contribuição por serem espécies de grande qualidade e importância na alimentação de gado. A América do Sul possui cerca de 250 milhões de hectares, sendo o Brasil o país com maior área de braquiárias plantadas (16% do total da área cultivada no America do Sur) (RIVAS; HOLMANN, 2004).



Figura 2: a) Gramínea *Pennisetum clandestinum* b) Gramínea *Brachiaria decumbens*. Fonte: <http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/>. Acesso em: 9. mar. 2015.

As plantas hospedeiras alternativas são de grande importância na epidemiologia e sobrevivência dos vírus. A permanência das partículas virais como fonte primária de inóculo está ligada a este tipo de plantas e aos vetores como agentes de disseminação para as cultivares nas áreas produtoras (KIMATI et al., 1997). Desempenham um papel importante na disseminação do vírus, ao constituírem-se em reservatórios virais, que são transmitidos pelos insetos vetores ou pelo próprio homem nos tratos culturais (CREAMER et al., 1996; CAPINERA, 2005; WISLER; NORRIS, 2005). De acordo com o seu ciclo reprodutivo e capacidade de adaptação, podem ser consideradas focos de infecção nas diferentes estações do ano, garantindo a sobrevivência e perpetuação do vírus no campo (MARCIA ROYE et al., 1997).

Os vírus são parasitos obrigatórios e para que sua sobrevivência tenha sucesso, a disseminação para plantas hospedeiras é de vital importância. Desta forma, Brow e Czosnek (2006), relatam que a habilidade de dispersão de um vírus de um hospedeiro ao outro, é componente fundamental no ciclo de infecção, por isso os vírus têm desenvolvido estratégias especializadas e particulares para sua transmissão e sua sobrevivência. Os vetores são considerados o caminho mais frequente de transmissão, depois de se alimentarem eles completam seu ciclo de vida em plantas que sejam potencialmente hospedeiras da doença (BROW; CZONSNEK, 2006).

Cada vírus tem um grupo relativamente estreito de espécies que pode infectar de forma natural, fortuita ou experimental na transmissão de plantas cultivadas para plantas hospedeiras alternativas ou de maneira contrária (RAJ et al., 2003; ARANHA et al., 2011) . Para que um vírus possa se replicar, ele deve ingressar em uma célula específica, processo conhecido como tropismo. Também pode ser definido pela predisposição do vírus em interagir com as moléculas da célula, chamadas moléculas receptoras que fazem parte do metabolismo celular (RODAS; DAVID, 2012).

Em pomares de mamão tem sido comprovada a existência de uma ampla gama de plantas invasoras, entre elas as gramíneas que têm potencial de ser hospedeiras do vírus no campo (MARTINS; COSTA, 2003). Pesquisas de epidemiologia da meleira do mamoeiro demonstraram que os focos iniciais da doença ocorriam próximo das áreas com gramíneas, o que vem fortalecer a importância destas plantas como um elemento fundamental na epidemiologia dos vírus ao serem fontes de inóculo primário e reservatórios ao longo do tempo (JOHNSON et al., 1996; HOBBS et al., 2000; ROELFS et al., 2014; VENTURA et al., 2003).

O envolvimento das gramíneas e em especial o gênero *Brachiaria* foi reforçado com a detecção de dsRNA em plantas inoculadas com o vírus da meleira. Neste estudo foi avaliada a susceptibilidade de 47 diferentes espécies de plantas ao

PMeV, e do total testado apenas em *Carica papaya* e *Brachiaria decumbens* foi confirmada a sua presença sem a manifestação de sintomas (ZAMBOLIM et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* como possíveis hospedeiros do *Papaya meleira virus* (PMeV).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Multiplicar vegetativamente gramíneas das espécies *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum*;
- Avaliar a presença do vírus no estalão e em folhas das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum*;
- Determinar a distribuição temporal do PMeV nas gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum*;
- Avaliar o potencial da *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* na epidemiologia da doença;
- Sugerir novas medidas para o manejo da meleira nos pomares de mamão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e nos laboratórios de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.1 OBTENÇÃO DAS GRAMÍNEAS

A obtenção e propagação das gramíneas *Brachiaria decumbens* Stapf. e *Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov., foi realizada através da multiplicação vegetativa natural de plantas fornecidas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). As plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 8 kg que continham substrato (Fourth) e areia na proporção de 2:1 p/p, respectivamente. Os procedimentos experimentais com as gramíneas foram totalmente conduzidos em casa de vegetação. As plantas foram colocadas em bancadas, com irrigação diária e adubadas com o fertilizante FOURTH COTE na formulação NPK 19-06-10 em doses de 2g/L, com frequência de aplicação cada quinze dias durante todo o experimento, depois foram indexadas com a metodologia posteriormente descrita para o diagnóstico das gramíneas utilizando o reagente (Trizol® Invitrogen) para a extração dos ácidos nucleicos e a técnica de diagnóstico PCR.

3.2 VÍRUS PMeV

Frutos de plantas previamente diagnosticadas com meleira foram utilizados como fonte do vírus. Com o auxílio de agulhas estéreis, foram realizadas injúrias nos frutos e o látex exsudado foi coletado em microtubos contendo o tampão citrato de

sódio (pH 5, 1M), de acordo à metodologia descrita por Rodrigues et al. (2009), e armazenado 4°C.

3.3 INOCULAÇÃO DO VÍRUS

As gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* foram divididas em quatro grupos contendo três exemplares de cada como descrito a seguir:

- Grupo 1 (Controle negativo): Gramíneas inoculadas apenas com 10 µL de tampão citrato de sódio (pH 5, 1M);
- Grupo 2 (Controle negativo): Gramíneas inoculadas com 10 µL de látex sadio adicionado em tampão citrato de sódio pH 5 (1:1 v/v);
- Grupo 3 (Controle positivo): Gramíneas inoculadas com 10 µL de látex infectado adicionado em tampão citrato de sódio pH 5 (1:1 v/v);
- Grupo 4 (Controle negativo): Testemunha absoluta.

As inoculações foram realizadas com uma seringa estéril injetando látex e tampão (citrato de sódio pH 5) no ápice do colmo das gramíneas, de acordo na metodologia desenvolvida por Zambolim (2003).

Folhas das regiões apical, basal e dos estolões (Figura 3) foram coletadas aos 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação (DAI). Ao final de cada período de coleta o material vegetal foi colocado em sacos de papel, imersos em nitrogênio líquido e mantidos nessa condição até a extração dos ácidos nucleicos, processo realizado no mesmo dia da coleta.

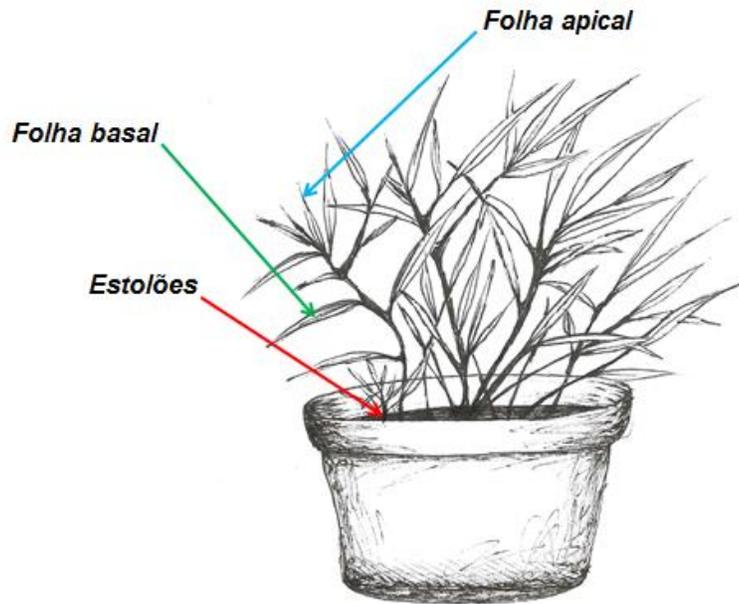


Figura 3: Partes da planta que foram coletadas para o diagnóstico do PMeV em gramíneas.

Para avaliar a presença de manifestação de sintomas, foi observada a presença de lesões locais cloróticas; deformação foliar; bolhosidade, cloroses ou sua ausência total segundo a metodologia descrita por Chung (2007).

Uma segunda metodologia foi desenvolvida utilizando o método de inoculação por abrasão, com o propósito de verificar a efetividade da transmissão e garantir que no processo de diagnóstico não tenha sido detectado o inoculo empregado no momento da inoculação. Neste método, a fonte de inoculo do vírus foi o mesmo látex coletado com diagnose confirmada na fase inicial do experimento. Usaram-se luvas na manipulação das gramíneas e em cada etapa do processo de inoculação.

Na fase inicial, a folha a ser inoculada foi lavada com água destilada, em seguida a superfície foi friccionada suavemente como uma lixa fina (600 de granulação) nova e esterilizada. Cada ferimento entrou em contato com a suspensão de látex e

o excesso foi retirado por lavagem. Para cada tratamento foram deixadas duas plantas distribuídas nos grupos (Figura 4) descritos adiante:

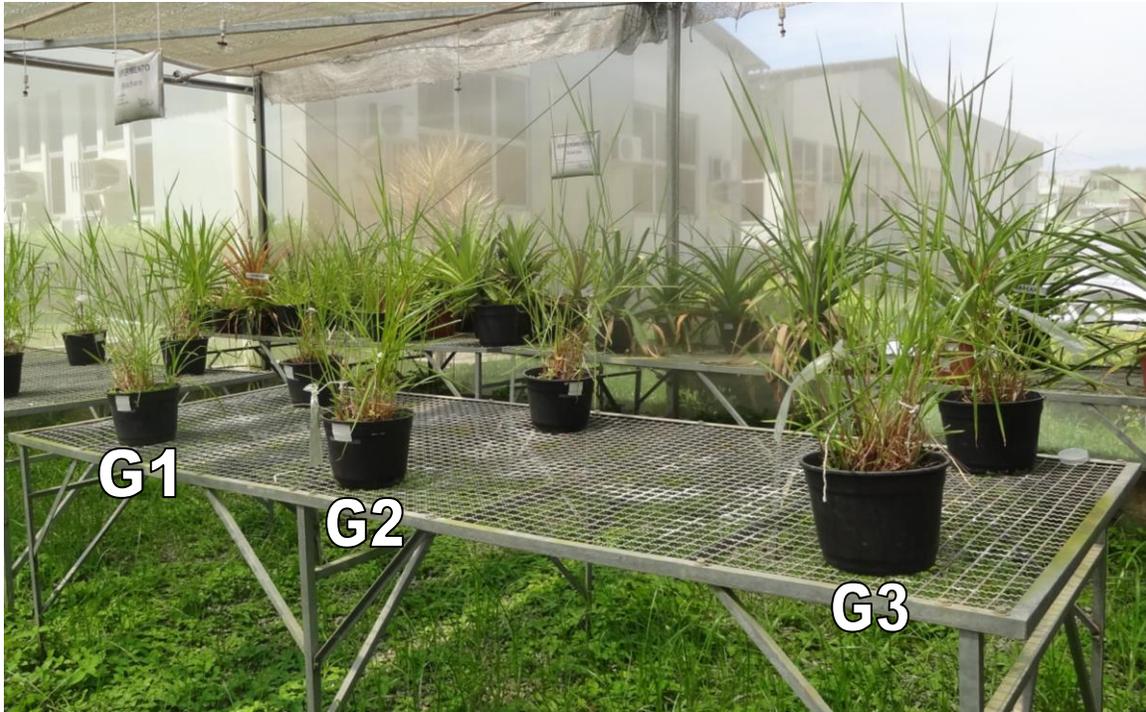


Figura 4: Gramíneas das espécies *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* inoculadas pelo método de abração. G1) Plantas inoculadas com 10 μL de tampão citrato de sódio (pH 5, 1M); G2) Plantas inoculadas com 10 μL de látex infectado adicionado em tampão citrato de sódio pH 5; G3) Plantas testemunha sem inoculação

- Grupo 1 (Controle negativo): Plantas inoculadas com 10 μL de tampão citrato de sódio (pH 5, 1M);
- Grupo 2 (Controle positivo): Plantas inoculadas com 10 μL de látex infectado adicionado em tampão citrato de sódio pH 5 (1:1 v/v);
- Grupo 3 (Controle negativo): Plantas testemunha sem inoculação.

Para o primeiro método de inoculação testado, o experimento e cada etapa do procedimento foram replicados duas vezes. A segunda técnica avaliada não teve replicações.

3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

O RNA total foi extraído utilizando o método baseado no composto químico tioisocianato de guanidina (Trizol® Invitrogen), utilizando 1 mL para cada 100 mg de tecido, conforme descrito por Bitencourt (2011).

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 1 minuto 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 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2 mL), e adicionou-se 500 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 rpm 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 30 µl de água ultrapura. O RNA isolado foi quantificado e posteriormente estocado em ultra freezer a -80 °C.

3.5 QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A qualidade do RNA foi medida baseando-se na presença de contaminantes proteicos por espectrometria utilizando 1 μ L do extrato de RNA em cada leitura de 260 e 280 nm em um espectrofotômetro no aparelho Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EU). Supondo valores de 2.0 para extratos puros (STAUB *et al.*, 1995 GREEN; SAMBROOK, 2012), foi calculada a relação 260/280 nm procurando valores superiores de 1.8 em cada leitura.

3.6 ELETROFORESE DO RNA TOTAL

Após a extração dos ácidos nucleicos das folhas das gramíneas, foi estimada a qualidade do extrato por eletroforese em géis de agarose 1,2%, em solução tampão TAE 1X e corado com brometo de etídeo a uma concentração de 10 ng/mL; durante 25 minutos em uma voltagem de 80 mV. Em cada poço do gel foram adicionados 10 μ l de cada amostra diluídos em 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).

3.7 TRATAMENTO COM DNASE

Na síntese da DNase, (1 μ g) de RNA extraído foi misturado com a DNase (RQ1 RNase – Free DNase Promega) de acordo com a recomendação do fabricante. Foi adicionado 1 μ L de tampão para DNase e 1 μ L da enzima e o volume completado para 8 μ L 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 65°C.

3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Ao RNA tratado com DNase, foi adicionado 0,5 µg do primer hexâmero randômico e 1 µL de dNTP 25 mM, e incubados por 5 minutos a 65°C. Após esse tempo, foram adicionados 4 µl tampão da reação (10x), 2 µl de DTT 10mM e 1,5 de água ultra-pura. Foi incubada por 3 minutos a 96 °C e posteriormente a enzima *M-MLV* Reverse Transcriptase (RT) foi adicionada e também incubada a 25 °C por 10 minutos e posteriormente a 37 °C por 50 minutos. Consecutivamente a transcriptase-reversa foi inativada a 70 °C por 15 minutos.

3.9 RT-PCR CONVENCIONAL

Os cDNAs foram submetidos e avaliados por RT-PCR utilizando os *primers* específicos conforme descrito por Abreu (2012).

Para a reação da RT-PCR foi preparada uma solução mix composta de 4 µL de tampão 5X para a enzima, 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 0,2 MI de dNTPs 25 mM; 1,6 µl do iniciador (125 ng/µl), cDNA 0,1 µl de enzima (5 u/µl) e água ultrapura livre de RNase completando-se 20 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 min e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos (ARAÚJO et al., 2007), no termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf).

3.10 ELETROFORESE DOS FRAGMENTOS DE PCR

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1,2%, em solução tampão TAE e corado com 10 µL de brometo de etídio a uma concentração de 10 ng/mL; durante 25 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). Foram aplicadas 10 µL de cada amostra em cada poço e 2 µL 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 E DISCUSSÃO

4.1 MULTIPLICAÇÃO DAS GRAMÍNEAS E INDEXAÇÃO

Para determinar a susceptibilidade das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* ao PMeV, foram multiplicadas 12 plantas de cada espécie por propagação vegetativa natural. Durante o seguimento diário não foi observado nenhum tipo de alteração na fisiologia das duas espécies de plantas estudadas. O fornecimento de fontes minerais contribuiu ao normal desenvolvimento das plantas durante cada etapa do experimento.

As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação por aproximadamente 30 dias antes de serem indexadas e posteriormente inoculadas.

4.2 MANIFESTAÇÕES DE SINTOMAS

Na avaliação da segunda replicação realizada no experimento, foi observada uma linha púrpura no borda das folhas localizadas na região basal da planta (Figura 5) no Grupo 3 (Controle positivo) na espécie *Brachiaria decumbens*. O sintoma estava presente em duas das três plantas inoculadas. Entretanto devido ao baixo número de plantas e de não ter ocorrido na primeira replicação do experimento, não é possível determinar se este sintoma está relacionado a alguma alteração provocada pelo vírus ou pela influencia de aspectos ambientais. O desenvolvimento das plantas inoculadas para *Pennisetum clandestinum* foi normal, não sendo possível visualizar sintomas.

A inoculação mecânica do agente causal da meleira nas gramíneas mostrou a ausência no aparecimento de sintomas em todos os tempos de avaliação 30, 45 e

60 dias após da inoculação para todos os grupos (Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 e Grupo 4) (Figura 6). É possível que esse efeito seja decorrente à influencia das condições ambientais (temperatura, umidade relativa etc.) que segundo Agrios (2005), podem facilitar os mecanismos de dispersão, expressão dos sintomas e proliferação do agente causal afetando os processos fisiológicos normais do hospedeiro.



Figura 5: Manifestação de sintomas *Brachiaria decumbens* após de 15 dias da inoculação do *Papaya meleira virus* (PMeV).



Figura 6: Gramíneas assintomáticas em diferentes tempos de avaliação.

4.3 DIAGNÓSTICO DO PMeV POR PCR NAS GRAMÍNEAS *BRACHIARIA DECUMBENS* E *PENNISETUM CLANDESTINUM*

Obtido o RNA do tecido das três amostras coletadas, foi realizado o diagnóstico por PCR de modo a detectar a presença de fragmentos de 300 pb nos controles positivos (Figura 7), semelhante aos padrões de eletroforeses reportados por Abreu (2012) em extrações do PMeV. Estes tipos de bandas leves foram visíveis em todos os tempos da avaliação e não foi observado nas amostras coletadas dos estolões (Figura 8).



Figura 7: Diagnóstico do PMeV por PCR em gramíneas. A faixa 1 corresponde ao marcador 1 kb (Invitrogen. Life Tecnologies), a número 2: controle positivo folhas de mamão com meleira. A faixa número 3: o branco. As faixas 4 (Folhas apicais *Brachiaria decumbens*), 5 (Folhas basais *Brachiaria decumbens*), 9 (Folhas apicais *Pennisetum clandestinum*), 10 (Folhas basais *Pennisetum clandestinum*) representam os controles inoculados com látex infectado. Enquanto as faixas 6, 7, 8, 11, 12, 13 correspondem os controles negativos. Nota: A amostra positiva amplifica um fragmento de 300 pb para o PMeV.

As plantas das duas espécies desenvolveram-se normalmente no transcorrer do tempo, entretanto, foi possível comprovar a existência de movimento viral a curta e longa distância para o método de inoculação por injeção em todos os tempos de avaliação.



Figura 8: Diagnóstico do PMeV em estolões coletados 60 dias após da inoculação por PCR em gramíneas. A faixa 1 corresponde ao marcador 1 kb (Invitrogen. Life Tecnologies), a número 2: branco. A faixa 3: controle positivo. As faixas 4, 8 correspondem aos controles inoculados com látex infectado com PMeV em *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum*, respectivamente. As faixas 5, 6, 7, 9, 10, 11 são os controles negativos.

Para o método de inoculação do PMeV por abraço, os resultados observados foram positivos para *Brachiaria decumbens* nas amostras correspondentes às folha coletadas da região apical da planta 30 após da inoculação (Figura 9).

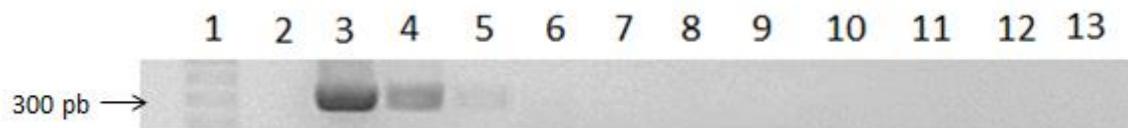


Figura 9: Diagnóstico do PMeV por PCR em gramíneas pelo método de inoculação por abrasão. A faixa 1 corresponde ao marcador 1 kb (Invitrogen, Life Technologies), faixa número 2: branco. Faixa número 3: controle positivo. As faixas 4, 5 são amostras de folhas de *Brachiaria decumbens*. Enquanto as faixas 6, 7, 8 correspondem aos controles negativos. As faixas 9, 10 são amostras de folhas de *Pennisetum clandestinum*. Faixas 11, 12, 13 correspondem aos controles negativos. Nota: A amostra positiva amplifica um fragmento de 300 pb para o PMeV.

Para a espécie *Brachiaria decumbens* a detecção do PMeV foi confirmada com os dois métodos de inoculação. Sugere-se que a presença de tricomas facilita a infecção e penetração do vírus pelas injúrias ocasionadas ao momento da fricção no processo de inoculação por abrasão.

Para o *Pennisetum clandestinum* no método de inoculação por abrasão o resultado foi negativo para as plantas inoculadas do grupo 3. A possível causa desta variação, conforme aos dados obtidos no primeiro método de inoculação testado, é a interferência de um ou vários elementos ambientais que afetam a suscetibilidade da gramínea a uma infecção.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VÍRUS PMeV EM GRAMÍNEAS E SUA IMPORTÂNCIA NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Durante o período de estudo, a presença do vírus foi diagnosticada nas folhas das duas espécies de gramíneas, mas não nos estolões. Desta forma pode ser demonstrado a translocação das partículas virais nas folhas apicais e, posteriormente, o seu movimento para as folhas basais da planta, admitindo-se que o vírus se replicou no local que foi inoculado e se transloucou para as folhas,

mas não se movimentou para os estolões. Sugere-se que o vírus provavelmente precisa de mais tempo para atingir esses tecidos, o que exige maior tempo de avaliação em estudos futuros.

Nossos resultados são corroborados por um estudo realizado por Barbosa (1999), que relata a presença de partículas semelhantes às de meleira nas espécies de gramíneas *Trichacne insulares* e *Brachiaria decumbens*, presentes em amostras coletadas em pomares de mamão infectados pela doença no Estado da Bahia. No entanto a técnica de diagnóstico usada não permitiu estabelecer que o vírus isolado era o PMeV. Zambolim et al. (2003) avaliaram a suscetibilidade do vírus em 47 espécies de plantas através da inoculação de látex de mamoeiros infectados com PMeV. Entre todas as espécies testadas, apenas foi detectado um dsRNA em *Carica papaya* e *Brachiaria decumbens*, o que vem reforçar o potencial desta espécie como hospedeira do PMeV.

Supomos que o vírus PMeV está presente na *Brachiaria decumbens*, mas de forma assintomática, e sugere-se que a presença desta planta nas proximidades dos pomares de mamão constituem uma potencial fonte de inóculo, ou seja, podem ser um hospedeiro intermediário na transmissão do vírus.

No que se refere a interação patógeno-hospedeiro estabelecida entre PMeV e *Brachiaria decumbens*, respectivamente, e sua disseminação dentro dos pomares comerciais de *Carica papaya*, supõe-se que a disseminação esteja relacionada com a existência de insetos vetores que estejam envolvidos no processo de transmissão (SOUZA, 2002). A existência de vetores aéreos e sua associação com a doença foi relatada por Ventura (2004) e constitui um elemento chave para os estudos de disseminação e epidemiologia da meleira (TATAGIBA et al, 2002)

O possível envolvimento de insetos vetores do PMeV foi considerado com base em estudos de epidemiologia realizados em condições de campo observando-se o padrão de distribuição temporal e espacial da doença (RODRIGUES et al., 1989). Estudos relatam a presença de dsRNA em insetos, como a mosca branca

(*Trialeurodes variabilis*), presentes em plantas infectadas com meleira e, embora sejam relatadas grandes populações desta mosca nos pomares de mamão, este inseto não é considerado vetor do vírus no mamoeiro (ANDRADE et al., 2003; RODRIGUES et al., 2009). Apesar do debate gerado sobre a participação de vetores na transmissão do vírus, supomos sua participação e importância ao ser transmissores do PMeV entre *Brachiaria decumbens* e *Carica papaya* o que explica o fato da presença da doença em culturas novas e na falta de plantas de mamão infectado com o vírus.

Para Vidal (2004), na maioria das áreas estudadas, a alta incidência da meleira estaria associada as pastagens que se localizam as bordas da cultura e possíveis insetos vetores responsáveis pela transmissão do vírus PMeV. Estes dados são corroborados por Zambolim et al. (2003), que relatam ser comum encontrar estes tipos de gramíneas principalmente nas áreas externas do pomar, fator que favoreceria a disseminação e a permanência do vírus no campo.

4.5 TRANSLOCAÇÃO DO VÍRUS PMeV NAS GRAMÍNEAS

A inoculação do complexo viral do PMeV nas gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* foi eficiente para o método de inoculação por injeção e isto evidenciou que as duas espécies de gramíneas são potencialmente hospedeiras do vírus. A detecção foi feita desde a primeira avaliação (15 dias após da inoculação), sem desenvolvimento de sintomas característicos de virose. Nas três amostras o vírus foi detectado nas folhas coletadas da região basal e apical das plantas inoculadas. Para os estolões o diagnóstico foi negativo, o que indica efetiva replicação e translocação do PMeV em gramíneas, como também é o primeiro relato desta espécie como hospedeira alternativa do vírus.

Os vírus de plantas são partículas infecciosas, considerados parasitos intracelulares obrigatórios, no caso do PMeV, são composto por RNA de fita dupla

(dsRNA), que ingressam na célula vegetal através de ferimentos causados por dano físico ou pela ação de vectores (CAMARETTA, 2000). No citoplasma, o vírus é desmontado, se replica, traduz seus mensageiros para proteínas e é mobilizado local e sistemicamente. Para cumprir estes processos, o vírus usa a energia e as proteínas da célula hospedeira (STANGE, 2006).

Durante cada fase do ciclo viral, geram-se diferentes interações entre a planta hospedeira e o vírus. Se a planta desconhece a partícula viral, estabelece-se uma interação compatível entre a planta hospedeira e o vírus, sendo esta interação favorável para o vírus (HAMMOND et al., 1996). Já nos casos em que a planta reconhece a partícula viral, é estabelecida uma interação incompatível, desfavorável para o vírus. Sob estas condições, a planta reconhece o vírus, desencadeia mecanismos de defesa que podem limitar a replicação do vírus e limitam o patógeno ao foco inicial de infecção (HAMMOND et al, 1996). Isso pode explicar o fato de que o vírus teve a capacidade de mover-se de uma célula para outra através nas folhas do local da infecção, mas não conseguiu estabelecer-se em toda a planta.

Stange (2006) estabeleceu que o movimento do vírus ocorre célula à célula e, para longa distância, o vírus explora e modifica as vias de movimentação molecular dentro da célula, entre células e entre órgãos. Em conformidade como o exposto, a partícula viral dsRNA do PMeV, a partir do lugar da inoculação, teve um translocação de célula para célula através dos plasmodesmos facilitada pelos canais de transporte. Este mecanismo possibilita especular a presença do vírus na folha apical e basal do colmo das gramíneas.

Para Lewandowsky (2005), o movimento do vírus a partir de uma célula para outra é facilitada por diferentes processos:

4.5.1 Transferência de genomas dos sites de replicação aos sistemas de transporte intracelular

A replicação do genoma do vírus de RNA de fita dupla acontece no citoplasma ou no núcleo em estreita associação com as superfícies da membrana. Isto sucede porque a replicação do genoma viral permite alcançar as distâncias intracelulares que o genoma deve andar para atingir o plasmodesma (LEWANDOWSKY, 2005; MOLNAR, 1997). Um dos processos críticos na replicação viral é, por conseguinte, a interação da replicação e a maquinaria de transporte, incluindo as proteínas de movimento. Uma falha na interação destes mecanismos pode limitar a translocação do vírus através da planta, afetando apenas o sítio da inoculação.

4.5.2 Transporte intracelular de genomas para os plasmodesmos

Vários grupos de vírus que se replicam no citoplasma (Vírus de RNA) codificam proteínas de movimento com diferenças estruturais ou funções e sua união ao do hospedeiro constituem uma característica altamente conservada entre vírus. Ao menos quatro grupos de vírus possuem um grupo de três genes que codificam um conjunto de proteínas de movimento, e cada proteína participa na dispersão sistêmica através da planta (SANDERFOOT, 1996).

4.5.3 Transporte intracelular através dos plasmodesmos

Os plasmodesmos fornecem um meio para que o vírus atravesse facilmente a célula da planta, que apresenta barreiras físicas como a parede celular. Através do plasmodesma se estende o desmotúbulo, que liga o sistema endomembranas das células vizinhas. A membrana plasmática e o desmotúbulo estão associados com glóbulos de proteinase chamadas proteínas ponte, que formam uniões entre a

membrana plasmática e os glóbulos do desmotúbulo através da cavidade central (STANGE, 2006).

No espaço entre a membrana e o desmotúbulo, ocorre o movimento do vírus e outras macromoléculas. Através da combinação da imunocitoquímica com a microscopia pode-se observar a associação das proteínas de movimento semelhantes ao vírus do mosaico do tabaco no interior dos plasmodesmos (ATKINS, 1991).

O processo de infecção viral o transporte através de plasmodesmos. A utilização dos canais intracelulares para a dispersão do vírus, em lugar de liberar-se aos espaços extracelulares e unir-se aos receptores da superfície da célula, é talvez a adaptação evolutiva mais significativa que distingue aos vírus vegetais dos vírus dos animais (HIRAGURI, 2014).

Estes precedentes permitem determinar que o movimento do vírus nas gramíneas desde o sítio da inoculação até as folhas apicais e posteriormente às folhas basais, se deu mediante o processo de movimentação de célula para célula. Ainda assim, para o vírus disseminar-se em toda a planta, deve chegar ao floema; este processo precisa que o vírus seja capaz de entrar e sair das células do parênquima do floema e os tubos crivados. O movimento de longa distância envolve funções virais do hospedeiro que são diferentes às envolvidas na movimentação através de células (YOAN, 2011).

Conhece-se sobre a translocação do vírus, que para conseguir o movimento de longa distância, alguns deles entram no sistema vascular (floema e xilema), movimentando-se por dentro. No entanto, os mecanismos e sua migração para as áreas circundantes são ainda pouco compreendidos. O movimento de longa distância envolve mecanismos diferentes daqueles envolvidos no movimento entre o mesófilo e as células, e, em alguns casos, muitos vírus foram documentados por recorrer longas distâncias através do floema, mas são poucos os relatos de vírus

movimentando-se através do xilema (CHAMBER; FRANCKI, 1966; CRUZ; KOGANEZAWA, 1991).

O movimento sistêmico depende em maior porcentagem das interações específicas vírus-hospedeiro e a existência de uma proteína da cápside funcional para o movimento sistêmico é comum, mas não é necessária (MCGEACHY; BARKER, 2000; RYABOV et al., 2001).

Estudos histológicos em arroz demonstraram a presença do *Rice yellow mottle virus* (RYMV) na epiderme, mesófilo e nas células da bainha e sua capacidade de movimentar entre essas estruturas (Figura 10). No entanto, não se sabe se é transportado a diferentes partes da planta pelo xilema (OPALKA, 1998).

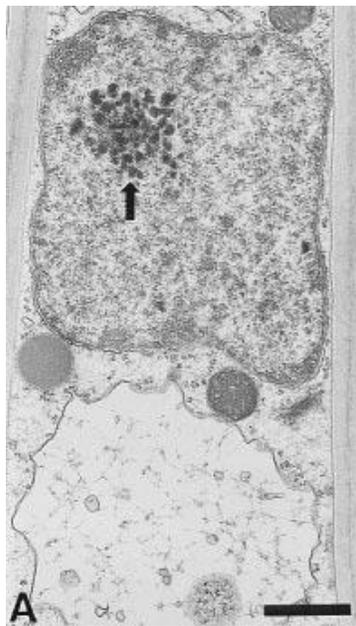


Figura 10 Mesófilo infectado com *Rice yellow mottle virus* (RYMV) 14 dias após a inoculação em plantas de *Oryza sativa*. Fonte: OPALKA , 1998.

Com base no exposto, a circulação sistêmica de longa distância dos vírus em gramíneas pode começar com a entrada do vírus no tecido vascular. Neste processo são distinguidas cinco etapas sequenciais: a entrada do vírus no

parênquima vascular através das células da bainha; translocação às células adjacentes e os elementos crivados; transporte para outras partes da planta através dos tubos crivados; transferência viral via tubos crivados; e o transporte desde o parênquima ao mesófilo através das células da bainha constituindo o ciclo da transmissão (MARTINEZ, 2008).

Segundo Owens (2001), o transporte sistêmico estaria influenciado pelos mesmos padrões que regulam o fluxo fotossintético, assim como a velocidade e direção no transporte do vírus depende de fatores como a proximidade do tecido maduro ao mais novo e as interconexões do sistema vascular.

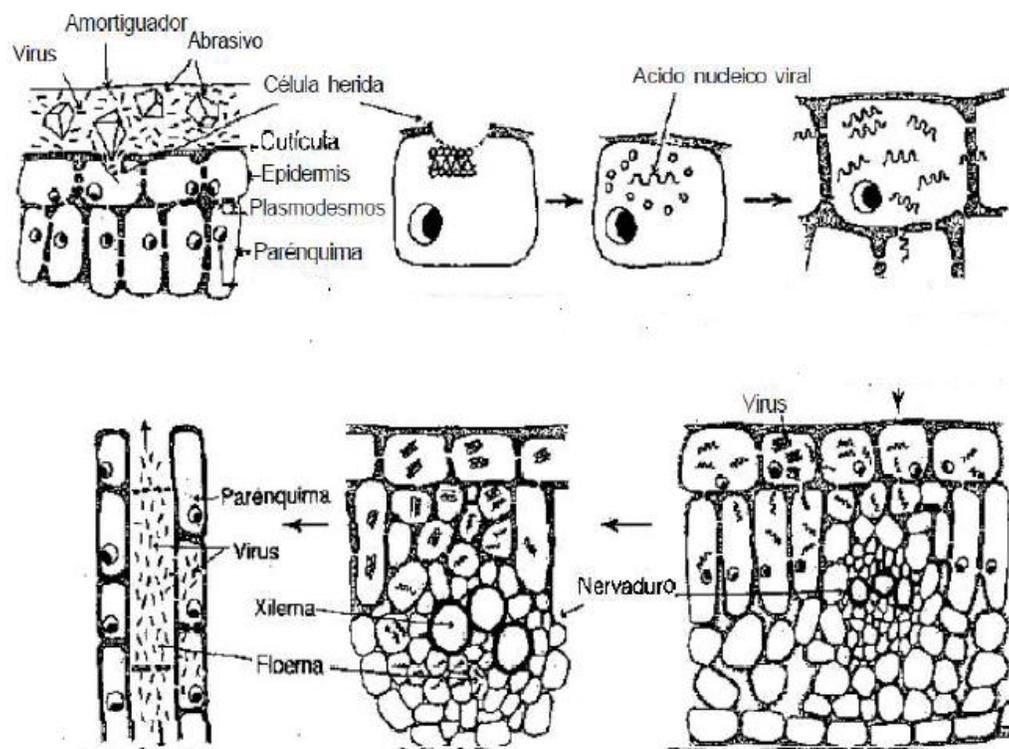


Figura 11 Distribuição sistêmica dos vírus pela inoculação mecânica Fonte: URBINA, 2011.

Sobre a forma como o vírus se transloca através do floema, observa-se uma possível implicação de diferentes proteínas floemáticas que interagem e facilitam a translocação do vírus (REQUENA, 2006).

As condições ambientais sobre as quais as plantas se desenvolvem antes, no momento da inoculação e durante o desenvolvimento da doença, podem ter efeitos no transcurso da infecção. Dessa forma, é possível pensar que determinadas partes da planta, podem permanecer livres do vírus durante a infecção sistêmica (GOSALVEZ, 2006).

Os diferentes fatores do hospedeiro que interagem com as proteínas virais e os ácidos nucleicos na infecção sistêmica, são diferentes daqueles envolvidos no movimento célula para célula. Portanto, os mecanismos de transporte do movimento célula para célula e de longa distância são significativamente distintos (STANGE, 2006).

Algumas classes de vírus, principalmente os de RNA movimentam-se eficientemente de célula para célula, mas apresentam dificuldade no transporte dependente do floema para longas distancias (VAEWHONG, 1995).

As infecções virais provocam uma alteração da fisiologia geral da planta. A infecção de *Brachiaria decumbens* pelo vírus PMeV não apresenta sintomatologia, mesmo assim é importante para estudos futuros uma avaliação minuciosa da infecção para estabelecer se o vírus é capaz de provocar sintomas da doença e levar a infecção sistêmica total de cada parte da planta. No entanto, a capacidade dos vírus em provocar uma infecção em toda a planta é variável devido às proteínas de movimento de varias famílias, as quais são geneticamente diversas, e em muitos casos o movimento eficiente de um vírus em um hospedeiro particular pode ser ineficiente em outro, limitando desta maneira a infecção sistêmica da planta (HUNG, 2003; HIRAGURI, 2012).

5 CONCLUSÕES

- Confirmou-se a capacidade do PMeV em infectar experimentalmente as gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Pennisetum clandestinum* e as plantas não manifestaram sintomas.
- Os resultados evidenciam o primeiro registro de plantas hospedeiras do *Papaya meleira virus* e a adaptação do vírus em gramíneas, constituindo potenciais reservatórios do vírus nas culturas de mamoeiro.
- A presença destas duas espécies de gramíneas em pomares comerciais de mamão passa a representar um fator adicional na epidemiologia da doença, que pode explicar a sua dispersão temporal e espacial, bem como a maior incidência de plantas infectadas nos pomares próximos à pastagens.
- A eliminação destas plantas dos pomares pode constituir em uma importante estratégia para o controle e manejo da doença.

6 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**, London, v. 180, n. 1, p. 11-17, 2012.

AGRIOS, G. **Plant Pathology** 5. ed. Oxford: Academic. 2005.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2013. **Brazilian Fruit yearbook** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 136 p. 2013.

ARANHA, S. D. A.; ALBUQUERQUE, L. C. D.; BOITEUX, L. S.; INOUE-NAGATA, A. K. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.36, n. 1, p.14-20, 2011.

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 RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v.146, n.1-2, p.305-310, 2007.

ARTUNDUAGA, S. R. Avances de la biotecnología y su impacto en la agricultura latino-americana. Bogotá. D.C: **Instituto Colombiano Agropecuario**, 2003. 34 p.

ATKINS, D.; HULL, R.; WELLS, B.; ROBERTS, K.; MOORE, P.; BEACHY, R. The Tobacco Mosaic Virus-30K Movement Protein in Transgenic Tobacco Plants is Localized to Plasmodesmata. **Journal of General Virology**, London, v.72, p.209-221, 1991.

MOLNÁR, A.; HAVELDA, Z.; DALMAY, T.; SZUTORISZ, H.; BURGYÁN, J. Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain DH and genes required for RNA replication and virus movement. **Journal of General Virology**, London, v.78, p.1235-1239, 1997.

BARBOSA, C.J., MEISSNER FILHO, P.E., HABIBE, T.C., PATROCÍNIO, E., TATAGIBA, J., NASCIMENTO, A.S. & MATRANGOLO, W.J.R.. Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com a meleira. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 24, p. 60, 1998. (Resumo)

BARBOSA, C. J.; HABIBE, T. C.; NASCIMENTO, A. Detecção de formas replicativas semelhantes as de meleira em gramíneas de pomares afetados. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 199, Botucatu. Programas e Resumos, Botucatu: 1999, p.16.

BÁRZAGA, I. P. Enfermedades virales en el cultivo del papayo (*Carica papaya* L.). **Citrifrut**, La Habana. ,v.25, p.13-23, 2008.

BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; VALLE, C. B.; LAURA, V. A.; MORO, J. R. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/920024/1/BP29.pdf>>. Acesso: 3 de marco. 2014.

BUAINAIN, A.; BATALHA, M. Cadeia produtiva de frutas. Brasília: Instituto Interamericano de Cooperacao para Agricultura no Brasil (IICA), 2007.

BROWN, J. K. Y H. CZOSNEK. Whitefly transmission of plant viruses. **Advances in Botanical Research**. San Diego, USA. Plumb. Academic Press, 2006. 100 p.

CAMARENA GUTIÉRREZ G. Transporte de virus en plantas. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Texcoco, v. 6, n. 2, p.119-124, 2000.

CAMARÇO, R. F. E. A.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Ocorrência do "papaya lethal yellowing virus" no município de Santa Rita, Estado da Paraíba, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.423, 1996. (Resumo).

CAPINERA, J. L. Relationships between insect pests and weeds: an evolutionary perspective. **Weed Science**, Lawrence, v.53, p.892-901, 2005.

CARRILLO, F. J.; CRUZ, O. J.; GARCIA, E. R.; GARCIA, Q. J.; MONTOJA, A. S., MONTOYA; C. C. Manual de practicas de virologia. Facultad de Agronomia. Universidad Autonoma de Sinaloa, Disponível em: <http://es.slideshare.net/jloveuas/manual-de-prcticas-fitopatologa-3025383>. Acesso 9 de maio. 2014.

CHAMBERS, T. C.; FRANCKI, R. I. B. Localization and recovery of lettuce necrotic yellows virus from xylem tissues of *Nicotiana glutinosa*. **Virology**, New York, v.29, p.673–676, 1966.

CHUNG, R.; AZEVED, J.; COLARICCIO, A. Reaction of *Lactuca sativa* L. lines to Lettuce mosaic virus (LMV). **Bragantia**, Campinas, v. 66, n 1, p. 61-68, 2007

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: **Anais, 2, Simpósio Brasileiro da Cultura do Mamoeiro**. Jaboticabal, SP. 1988. p. 409-428.

CREAMER, R.; LUQUE-WILLIAMS, M.; HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 5, p. 533-535, 1996.

CRUZ, F. C. S.; KOGANEZAWA, H. Presence of rice tungro bacilliform virus (RTBV) in xylem cells of tungro-infected rice. **International Rice Research Newsletter**, v.16,p.4, 1995.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production crops (papayas) by countries and year**: FAOSATAT: 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx#ancor>> . Acesso em: 17 Dez. 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production crops (papayas) by countries and year**: FAOSATAT: 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Medium-term prospects for agricultural commodities**: Tropical fruits. Roma, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e1a.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

GERGERICH, R.; DOLJA, W. Introducción a los Virus Vegetales, un enemigo invisible. Fayetteville, 2008. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirusesEspañol.aspx> Acesso: 10 de dezembro 2014.

GOSALVEZ, B.; GARCIA, C.; PALLAS, V.; SANCHEZ P. Distribution of carnation viruses in the shoot tip: Exclusion from the shoot apical meristem. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v.69, p.43-51, 2006.

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.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 2028 p.

HACKER, D. L.; PETTY, I. T.; WEI, N.; MORRIS, T. J. Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. **Virology**, New York, v.186, p.1-8, 1992.

HAMMOND-KOSACK, KIM E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, no 10, p. 1773. 1996.

HERMAN, B.; KAREN, G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.299-323, 1996.

HIRAGURI, A.; OSAMU, N.; NOBUMITSU, S.; HIROSHI, N.; TAKAHIDE, S. Recent progress in research on cell-to-cell movement of rice viruses. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v.5, p.1-10, 2014.

HIRAGURI, A.; HIBINO, H.; HAYASHI, T.; NETSU, O.; SHIMIZU, T.; UEHARA, I. The movement protein encoded by gene 3 of rice transitory yellowing virus is associated with virus particles. **Journal of General Virology**. London, v.93, p.2290- 2298, 2012.

HOBBS, H.A., D.M. EASTBURN, C.J. D'ARCY, J.D. KINDHART, J.B. MASIUNAS, D.J. Solanaceous weeds as possible sources of *Cucumber mosaic virus* in Southern Illinois for Aphid Transmission to Pepper. **Plant disease**, St. Paul,, v.84, p.1221-1224, 2000.

HUANG, Y.; ZHAO, H.; LUO, Z.; CHEN, X.; FANG, R. X. Novel structure of the genome of rice yellow stunt virus: Identification of the gene6 encoded virion protein. **Journal of General Virology**, London, v.84, p.2259-2264, 2003.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4a edição. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Banco de dados agregados 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=28&i=P>. Acesso em: 6 Jan. 2015.

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Informativo especial do instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural. 2010. Disponível em: <http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=952>. Acesso em: 10 Dez 2014.

JOHNSON, W. C.; TODD, J. W.; CULBREATH, A. K.; MULLINIX, B. G. Role of warm-season weeds in spotted wilt epidemiology in the southeastern coastal plain. **Agronomy Journal**, Madison, v.88, p.928-933, 1996.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Ecologia mediterranea**, Marseille, v.25, n. 2, p.215. 1999.

KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., & REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica ceres, 1997, 774 p.

KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, C. H.; SILVEIRA, J. S.; LIMA, F. A.; VENTURA, J. A.; ARAGÃO, F. J. L.; OLIVEIRA, L. H. R. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with Meleira of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.118-122, 1993.

LEWANDOWSKI, D.; ADKINS, S. The tubule forming NSm protein from tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long distance movement of tobacco mosaic virus hybrids. **Virology**, New York, v.342 p.26-37, 2005.

LOPES, M. D.; GONZAGA, C. D. G.; SANTOS, A. A.; ARAÚJO, J. A. Vírus da mancha amarela da gravioleira: transmissão, hospedeiros, purificação e produção de anti-soro. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v 37, n. 2, 160-165. 2008.

LUCAS, W. J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, New York, v.344, p.169-184, 2006.

McGEACHY, K. D.; BARKER, H. Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.13, p.125–128. 2000.

MARCEL, D.; SI-JUN, Z.; TJEERD, A.; SANDER W. H.; JOOP, J.; Disruption of plant carotenoid biosynthesis through virus-induced gene silencing affects oviposition behaviour of the butterfly *Pieris rapae*. **New Phytologist**, London, v. 186, n. 3, p. 733-745. 2010.

MARTÍNEZ-GIL, L.; SAURÍ, A.; VILAR, M.; PALLÁS, V.; MINGARRO, I. Membrane insertion and topology of the p7B movement protein of Melon Necrotic Spot Virus (MNSV). **Virology**, New York, v.367, p.348357, 2008.

MAULE, A. J.; PALUKAITIS, P. Virus movement in infected plants *Critical Reviews. Plant Sciences*, v.9, n. 6, p.457,473, 1991.

MORENO, L.; THOMPSON, J.; GARCÍA A. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v.85, n. 3, p.749-759, 2004.

NAKAGAWA, J., TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exsudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: **Anais, 9, Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Campinas, SP. 1987. p.555-559.

OPALKA, N.; BRUGIDOU, C.; BONNEAU, C.; NICOLE, M.; BEACHY, R. N.; YEAGER, M.; FAUQUET, C. Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n.6, p. 3323-3328, 1998.

OWENS, R.; BLACKBURN, M.; DING, B. Possible involvement of the phloem lectin in long distance viroid movement. **Molecular Plant-Microbe**, St. Paul, v.14, n.7, p.905-909, 2001.

PEREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; QUIJANO-RAMAYO, A.; NEXTICAPAN-GARCEZ, A.; MARTÍN-MEX, R. First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 71, p. 13564-13570, 2012.

RAJ, S. K.; SINGH, R.; PANDEY, S. K.; SINGH, B. P. Association of a geminivirus with a leaf curl disease of sunn hemp *Crotalaria juncea* in India. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 467-470, 2003.

REQUENA, A.; SIMON L.; SALCEDO, G.; GARCIA, F. Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 19, n. 7, p.734-746, 2006.

RIVAS, L.; HOLMANN, F.. Impacto económico potencial de la adopción de cultivares de *Brachiaria* resistentes a cercópidos. **Pasturas Tropicales**, Cali , v.26, n. 3 p.39, 2004.

RODAS, G.; DAVID, JUAN. **Bases de la replicación viral**. Antioquia, 2005. Disponível em: <http://200.24.23.197/index.php/biogenesis/article/viewFile/159/159>. Acesso em: 13 de janeiro. 2015.

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.; CUNHA, M.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Effects of the Papaya meleira virus on papaya látex structure and composition. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.28, n. 5, p.861-871, 2009.

RODRIGUES, S. P.; ANDRADE, J. S.; VENTURA, J. A.; LINDSEY, G. G. Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *trialeurodes variabilis*. **Journal of plant pathology**, Pisa, p.87-91, 2009.

ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. **Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control**. Orlando: Academic Press, 2014. 630 p.

ROYE, M. E.; MCLAUGHLIN, W. A.; NAKHLA, M. K.; MAXWELL, D. P. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida spp.*, *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n. 11, p.1251-1258, 1997.

RUGGIERO, C.; DURIGAN, J. F.; NATALE, W.; OLIVEIRA, C. A. L.; BENASSI, A. C. Mamão. In: DONADIO, L.C. **História da fruticultura paulista**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 210-234, 2010.

RYABOV, E. V.; ROBINSON, D. J.; TALIANSKY, M. Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. **Virology**, New York, v.288, n. 2, p.391–400, 2001.

SANDERFOOT, A.; INGHAM, D.; LAZAROWITZ, S. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, Lancaster, v.110, n. 1, p.23, 1996.

SARAIVA, A. C. M.; PAIVA, W. O.; RABELO FILHO, F. O. A. C.; LIMA, J. A. A. Transmissão por mãos contaminadas e ausência de transmissão embrionária do vírus do amarelo letal do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n. 1, p.79-83, 2006.

SERRANO, L.A.L.; CATTANEO, L.F.O. Cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas. v.32, n. 3, 2010.

SOUZA, M.T.; TAVARES, E.T.; ZAMBOLINI, E.; VENTURA, J. A. Studies aiming molecular characterization, early diagnosis and control of papaya stick disease. **Virus Reviews and Research**, Rio de Janeiro v. 7, p.43, 2002.

STANGE, C. Plant-virus interactions during the infective process. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 33, n. 1, p.18-21. 2006.

STAUB, U.; POLIVKA, H.; GROSS, H. J. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. **Journal of virological methods**, Amsterdam, v.52, n. 1, p.209-218, 1995.

TATAGIBA, J. S.; VENTURA, J. A.; COSTA, H.; COSTA, A. F. Evolução temporal dos sintomas da meleira do mamoeiro associada às condições climáticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v 27, p. 212, 2002.

TAVARES, E. T.; TATAGIBA, J. S.; VENTURA, J. A.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Two new systems of early diagnosis of papaya sticky disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n. 5, p.563-566, 2004.

TIDD, J.; BESSANT, J.; PAVITT, K. Caminhos: Exploração de trajetórias tecnológicas. In: Gestão da Inovação. Porto Alegre: Artmend. 2008. p.189 – 222.

TEXEIRA, S. J.; RASHID, Z.; DUONG, T.; SIVAKUMAR, D.; GERA. A.; TENNAT, P. Papaya (*Carica papaya* L.) **Biology and Biotechnology**, v. 1, n.1, p 47-73 2007.

TROPICAL FORAGES. Disponível em:
http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Brachiaria_decumbens.htm. Acesso em: 9 .mar. 2015.

URBINA, M. Enfermedades causadas por virus, micoplasmas y similares. Nicaragua, 2011. Disponível em:
<https://martinurbina.files.wordpress.com/2011/08/unidad-vi-virus-final1.pdf>.
 Acesso em: 15 de novembro 2014.

VAEWHONGS, A.; LOMMEL, S. Virion formation is required for long distance movement of red clover necrotic mosaic virus in movement protein transgenic plants. **Virology**, New York, v. 212, n. 2, p. 607- 613,1995.

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

VENTURA, J. A., COSTA, H., TATAGIBA, J. D. S., ANDRADE, J. D. S., & MARTINS, D. D. S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia. Papaya Brasil: **Qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória. Incaper. 2003. p. 267-276.

VIDAL. A. C.; LARANJEIRA. F. F.; NASCIMENTO. A. S.; HABIBE. T. C. Distribuição Espacial da Meleira do Mamoeiro em Zonas de Trópico Úmido e Trópico Semi-Árido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v 29.,p. 3. 2004.

VIDAL, C.A; NASCIMENTO,A.S. ; HABIBE,T.C. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por insetos. **Magistra**, Cruz das Almas, v.17, n.2, p.101-106, 2005.

WISLER, G. C.; NORRIS, R. F. Interaction between weeds and cultivated plants as related management of plant pathogens. **Weed Science**, Lawrence, v.53, p.914-917, 2005.

YUAN, Z.; CHEN, H.; CHEN, Q.; OMURA, T.; XIE, L.; WU, Z. The early secretory pathway and an actin-myosin VIII motility system are required for plasmodesmatal localization of the NSvc4 protein of rice stripe virus. **Virus Research**, Amsterdam, v 159, n. 1, p.62 – 68, 2011.

ZAMBOLIM, M.; KUNIEDA, A.; MATSUOKA, M.; CARVALHO, M. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 389-394, 2003.

ZEING, S.; SNOEREN T. A. L.; HOGEWONING, S. W.; vanLOON, J., J. A.; MARCEL, D. Disruption of plant carotenoid biosynthesis through virus-induced gene silencing affects oviposition behaviour of the butterfly *Pieris rapae*. **New Phytologist**, London, v.186, p.733-745, 2010.