

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

ALINE KELLY QUEIROZ DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E
ALTERNATIVAS DE CONTROLE DO *Papaya lethal yellowing virus***

**FORTALEZA – CE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

ALINE KELLY QUEIROZ DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E
ALTERNATIVAS DE CONTROLE DO *Papaya lethal yellowing virus***

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Orientador: Prof. José Albersio de Araújo Lima, PhD

**FORTALEZA – CE
2010**

N193c Nascimento, Aline Kelly Queiroz do
Caracterização biológica e molecular de isolados e alternativas de controle do *Papaya lethal yellowing virus* / Aline Kelly Queiroz do Nascimento, 2010.
64 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. PhD. José Albérico de Araújo Lima
Área de concentração: Fitotecnia
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Fitotecnia, Fortaleza, 2010.

1. *Papaya lethal yellowing virus*. 2. *Carica papaya*. 3. Varibilidade molecular. I. Lima, José Albérico de Araújo (Orient.). II. Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Agronomia. III. Título

CDD 631

ALINE KELLY QUEIROZ DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS E
ALTERNATIVAS DE CONTROLE DO *Papaya lethal yellowing virus***

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração Fitotecnia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Aprovada em: 26. 02. 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. José Albersio de Araújo Lima, PhD (Orientador)
Universidade Federal do Ceará -UFC

Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior
Universidade Estadual do Piauí – UESPI

Dra. Carmem Dolores Gonzaga Santos
Universidade Federal do Ceará -UFC

Dedico

*A Deus e Nossa Senhora
por me guiarem em cada passo*

*A minha mãe
Raimunda Queiroz*

*A meus irmãos
Tayanne, Robe e Valda*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. José Albersio de Araújo Lima pelo ser humano especial, pelo incentivo, confiança em meu trabalho, amizade e por me orientar sabiamente desde o curso de graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. José Evando Aguiar Beserra Júnior pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, orientação, paciência e presença na banca examinadora.

A Prof^a. Carmem Dolores Gonzaga Santos pela presença na banca e pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso de mestrado sempre com o mesmo entusiasmo em ensinar.

Ao Everton Nogueira, pelo apoio, paciência, dedicação, e companheirismo oferecido diariamente.

A minha amiga Fátima, por sempre está presente quando preciso e pelos valiosos conselhos.

A minha família pelo incondicional apoio e incentivo durante toda minha vida.

Aos amigos do curso de mestrado (Glauber, Maria, Ravena, Kelly, Haynna e Afranio) pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal pelo apoio no decorrer deste trabalho.

“O futuro tem muitos nomes: para os fracos, ele é inatingível; para os temerosos, ele é desconhecido; para os corajosos, ele é a chance...”

Vítor Hugo

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma importante fruteira tropical cuja produção vem crescendo no Nordeste do Brasil. Amarelo letal é uma moléstia do mamoeiro ocasionada pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) que ocorrer somente Nordeste. Os sintomas ocasionados pelo PLYV têm início com um amarelecimento progressivo das folhas do no terço superior da copa, as quais murcham e morrem. Manchas circulares, inicialmente esverdeadas aparecem nos frutos as quais se tornam amareladas quando os frutos amadurecem. O PLYV possui partículas isométricas com 30 nm de diâmetros, genoma do tipo ssRNA de ac. $1,6 \times 10^6$ Da, com a capa protéica composta de uma única proteína de ac. 35 Da. Embora não exista confirmação da existência de um vetor biológico para o vírus, o mesmo está se disseminando rapidamente no Nordeste brasileiro, possivelmente por mudas de plantas infetadas e ferramentas contaminadas. O vírus pode ser transmitido através do solo, água de irrigação, ferramentas agrícolas e mãos contaminadas. A presente pesquisa teve como objetivos: avaliar a possibilidade do vírus ser transmitido por sementes e por afídeos; avaliar a possibilidade do PLYV infetar outras espécies da família Caricaceae; avaliar o efeito da solarização na inativação do vírus em restos de cultura e analisar a variabilidade molecular e biológica de isolados de PLYV. Nos ensaios de transmissão do vírus por afídeos, o mesmo não foi transmitido por *Aphis craccivora* e *A. gossypii* de forma persistente nem de forma não persistente. Nos experimentos de transmissão por sementes, o vírus não foi detectado por ELISA indireto em 1.680 plântulas originadas de sementes de frutos infetados com o PLYV. O PLYV infetou as espécies de *Jacaratia heterophila*, *J. spinosa*, *Vasconcella quercifolia* e *V. monoica*, confirmando que sua gama de hospedeiras está, provavelmente, restrita à família Caricaceae. O PLYV foi inativado em folhas e raízes de plantas infetadas e erradicadas, quando submetidas à solarização, por um período de 12 dias, enquanto que permaneceu ativo em folhas e raízes de plantas infetadas e erradicadas, mantidas sem solarização, até um período de 32 dias. O uso de extrato de juazeiro (*Caesalpinia ferrea*) inativou o PLYV quando misturado ao extrato de plantas infetadas, porém não apresentou nenhum efeito no processo de infecção em plantas já inoculadas com PLYV e pulverizadas com extrato de juazeiro e em plantas pulverizadas e em seguida inoculadas. Os isolados de PLYV obtidos de diferentes regiões do estado do Ceará: PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – DIBAU), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) e PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré) apresentaram baixa variabilidade molecular, quando comparados através das seqüências nucleotídicas de parte dos genes RpRd/CP. Quando comparado com membros dos gêneros *Sobemovirus* e do *Tombusvirus*, o PLYV apresentou maior similaridade com vírus do gênero *Sobemovirus*.

Palavras-chave: *Carica papaya*, *Papaya lethal yellowing virus*, Variabilidade molecular.

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya*) is an important tropical fruit crop which production is increasing in irrigated areas of Northeast of Brazil. Lethal yellowing is a papaya disease caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) that occurs only in the Northeast of Brazil. The virus symptoms begin with a progressive leaf yellowing in the third superior part of the plant canopy, which wilt and finally die. Greenish circular spots also appear on the fruits which turn yellowish when the fruits are ripping. The PLYV has isometric particles with ac. 30 nm in diameter, genomic ssRNA of ac. 1.6×10^6 Da and a coat protein composed of a single component of ac. 35 Da. Although no biological vector has been confirmed for the virus, it is spreading every year in the Northeast of Brazil, probably by infected young plants and contaminated tools. The virus can be transmitted through the soil, irrigated water, agriculture tools and contaminated hands. The present research had the following objectives: evaluate the possibility of the virus to be transmitted by seeds and aphids; evaluate its possibility to infect other plant species from the family Caricaceae; evaluate the effects of solarization in the virus infectivity and analyze the molecular and biological variability among the virus isolates. In the aphid transmission studies, the virus was not transmitted by *Aphis craccivora* neither by *A. gossypii* in persistent and non-persistent manners. In the seed transmission experiments, the virus was not detected by indirect ELISA in a total of 1,680 seedlings originated from PLYV infect fruits. The PLYV infected the plant species *Jacaratia heterophila*, *J. spinosa*, *Vasconcella quercifolia* and *V. monoica*, confirming that its host range is probably restricted to Caricaceae species. The virus was inactivated in leaves and roots eradicated from infected plants when they were submitted to a solarization for a period of 12 days, but maintained its infectivity when the leaves and the roots were maintained without solarization at natural conditions for a period of 32 days. The use of extract from fruits of *Caesalpinia ferrea* inactivated PLYV when it was mixed with extract from infected plants, although the *C. ferrea* extract did not interfered with the virus infection when it was sprayed on the plant leaves before or after the virus inoculation. The PLYV obtained from different regions from the State of Ceará: PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – DIBAU), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) and PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré) showed low molecular variability when compared by its nucleotide sequences involving part of the genes RpRd/CP. When compared with members from the genera *Sobemovirus* and *Tombusvirus*, the PLYV showed more similarity with members from the genus *Sobemovirus*.

Key words: *Carica papaya*, *Papaya lethal yellowing virus*, Molecular variability.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento entre seqüências de nucleotídeos do genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). O número em cada ramo representa valores de bootstrap (1,000 repetições)..43
- FIGURA 2** Árvore filogenética baseada nas seqüências de nucleotídeos de parte dos genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), mais seqüências adicionais de espécies de vírus do gênero *Sobemovirus* obtidas no GenBank. Distâncias horizontais: são proporcionais a distância genética entre os isolados. Distâncias verticais: são arbitrárias. O número em cada ramo representa valores de bootstrap (1.000 repetições). As espécies analisadas e seu número de acesso no GenBank incluem: *Southern bean mosaic virus* isolado de São Paulo (SBMV, DQ875594); *Sesbania mosaic virus* (SeMV, AY004291); *Turnip rosette virus* (TuRV, AY177608); *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV, AY376453); *Ryce yellow mottle virus* (RYMoV, AM883054) e *Ryegrass mottle virus* (RMoV, DQ481606), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, NC001554).....44
- FIGURA 3** Espécies da família Caricaceae inoculadas com *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV): A- *Jacaratia spinosa*, B- *Jacaratia heterophila*, C- *Vasconcella quercifolia*, D- *Vasconcella monoica*, E- *Vasconcella cauliflora*, F- *Carica papaya* e G- *Carica papaya* sem inoculação45
- FIGURA 4** Fragmentos amplificados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para parte da região RdRp/CP do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), observado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. M –marcador molecular (1Kb DNA); espécies de Caricaceae inoculadas com PLYV: 1- *Vasconcella monoica*, 2- *Vasconcella quercifolia*, 3- *Jacaratia spinosa*, 4 - *Jacaratia heterophila*, 5 - *Vasconcella cauliflora*, 7- *Carica papaya*; 6– *Carica papaya* sadia.....46

FIGURA 5 Frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) exibindo sintomas de infecção por *Papaya yellowing lethal virus* (PLYV). Pontuações amarelas na casca e ausência de sintomas nas respectivas polpas de frutos de mamoeiro coletados no município de Limoeiro do Norte (A) e no município de Marco (B)..... 47

FIGURA 6 Efeito da solarização na eliminação de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) de folhas e raízes erradicadas de plantas infetadas de mamoeiro (*Carica papaya*), demonstrado por ELISA indireto..... 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sintomatologia observada em plantas de mamoeiro (*Carica papaya*) inoculadas com isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV): PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – DIBAU), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) e PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré).....41
- Tabela 2** Percentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos do fragmento de parte dos genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellow virus* (PLYV) obtidos no Ceará.42
- Tabela 3** Percentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos do fragmento de parte dos genes RdRp/CP do *Papaya lethal yellow virus* (PLYV) isolado de Marco (PLYV_M) com alguns vírus do gênero *Sobemovirus*.43

LISTA DE VÍRUS CITADOS E SEUS ACRONIMOS

BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>
CABMV	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CpSMV	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>
PANV	<i>Papaya apical necrosis virus</i>
PLDMV	<i>Papaya leaf distortion mosaic virus</i>
PLYV	<i>Papaya lethal yellowing virus</i>
PMeV	<i>“Papaya meleira virus”</i>
PMV	<i>Papaya mosaic virus</i>
PMYLV	<i>Papaya mild yellow leaf virus</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
PWV	<i>Passion fruit woodiness virus</i>
RMoV	<i>Ryegrass mottle virus</i>
RYMoV	<i>Ryegrass yellow mottle virus</i>
SBMV	<i>Southern bean mosaic virus</i>
SCMoV	<i>Subterranean clover mottle virus</i>
SesMV	<i>Sesbania mosaic virus</i>
SqMV	<i>Squash mosaic virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TuRV	<i>Turnip rosette virus</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE VÍRUS CITADOS E SEUS ACRONIMOS

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
A cultura do mamoeiro.....	18
Problemas fitossanitários no mamoeiro	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Obtenção de Isolados de PLYV.....	30
3.2 Variabilidade Biológica de Isolados de PLYV.....	31
3.3 Variabilidade Molecular de Isolados de PLYV	32
3.4 Novas Espécies Hospedeiras da Família Caricaceae	35
3.5 Estudo de Transmissão do PLYV por Afídeos e por Sementes	36
3.6 Efeito de Extrato de Jucá na Inativação do PLYV.....	37
3.7 Efeito da Solarização na Inativação do PLYV em Restos de Cultura	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Obtenção de Isolados de PLYV.....	41
4.2 Avaliação da Variabilidade Biológica de Isolados de PLYV.....	40
4.3 Análise da Variabilidade Molecular de Isolados de PLYV.....	41
4.4 Novas Espécies Hospedeiras da Família Caricaceae	44
4.5 Estudo de Transmissão do PLYV por Afídeos e por Sementes	46
4.6. Efeito de Extrato de Jucá na Inativação do PLYV.....	48

4.7 Efeito da Solarização na Inativação do PLYV em Restos de Cultura	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

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

De acordo com a FAOSTAT (2009), o Brasil é o maior produtor mundial de mamão, seguido do México, Nigéria, Índia e Indonésia. O México e o Brasil são os maiores exportadores dessa fruta, porém o Brasil exporta mais mamão do grupo Solo, enquanto o México mais frutos do grupo Formosa (FAOSTAT, 2009).

No Brasil, o estado da Bahia é o maior produtor, com 863.828 ton, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009). O Espírito Santo é o segundo maior produtor, com 646.273 ton no mesmo ano. No entanto esse estado é o maior exportador brasileiro de mamão do grupo Solo.

Os principais municípios produtores do estado do Espírito Santo são Pinheiros com 62,7% da área cultivada com mamão Formosa e 37,3% com o Havaí, e Linhares que detém 20,9% da área cultivada com o Formosa e 79,1% com Havaí (CEPEA, 2009). Estes valores resultam do alto nível tecnológico adotado pelos produtores e a utilização de práticas fitossanitárias eficientes, com destaque para o 'roquing', ou seja, a erradicação de plantas doentes, no manejo das diversas viroses que incidem sobre a cultura (COSTA *et al.*, 2005).

Semelhante a inúmeras outras espécies vegetais exploradas economicamente pelo homem, a cultura do mamoeiro pode ser prejudicada por diversas infecções causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus, que podem ocasionar sérios problemas fitossanitários à cultura (CAMARÇO, 1997; LIMA *et al.*, 2001a). Entre os principais patógenos que infetam a cultura destacam-se os vírus que reduzem a longevidade da planta, bem como a produção quantitativa e qualitativa dos frutos. Os principais vírus que infetam o mamoeiro, em diferentes partes do mundo pertencem às seguintes famílias e gêneros: *Potyviriidae*, gênero

Potyvirus: vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV) (PURCIFULL *et al.*, 1984); vírus do mosaico distorcido do mamoeiro (*Papaya leaf distortion mosaic virus*, PLDMV) (KAWANO; YONAH, 1992); possível família *Sobemoviridae*, gênero *Sobemovirus* vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV) (SILVA *et al.*, 2000); família *Rhabdoviridae*, gênero *Rhabdovirus*: vírus da necrose apical do mamoeiro (*Papaya apical necrosis virus*, PANV) (LASTRA; QUINTERO, 1981); gênero *Potexvirus*: vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya mosaic virus*, PMV) (COOK; ZETTLER, 1970); família *Bunyarividae*, gênero *Tospovirus*: vírus do vira cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (GONSALVES; TRUJILLO, 1986); gênero *Tenuivirus*: vírus do amarelecimento leve das folhas (*Papaya mild yellow leaf virus*, PMYLV) (MARYS *et al.*, 1995) e o vírus da meleira do mamoeiro (*Papaya meleira virus*, PMeV), ainda sem classificação taxonômica (KITAJIMA *et al.*, 1993; MARCIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2000).

O PLYV foi encontrado inicialmente em Pernambuco (LORETO *et al.*, 1983), em seguida na Bahia, Rio Grande do Norte e Paraíba (VEGA *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1989; CAMARÇO *et al.*, 1996). Possui partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro, com genoma do tipo ssRNA de aproximadamente $1,6 \times 10^6$ Da, sendo o capsídeo formado por uma única proteína de 35 Da (KITAJIMA *et al.*, 1992a; CAMARÇO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2002). Estudos moleculares indicam a possibilidade desse vírus pertencer a família *Sobemoviridae*, gênero *Sobemovirus* (SILVA *et al.*, 2000).

Os sintomas do amarelo letal em mamoeiro iniciam com amarelecimento das folhas mais novas do terço superior da copa, que ficam cloróticas, retorcidas, amarelecem por completo, murcham e caem, causando a morte da planta. Os frutos também podem ser afetados exibindo pequenas manchas cloróticas (LIMA; SANTOS 1991; LIMA *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2001a).

Até o momento não se conhece um vetor biológico para o PLYV, no entanto o mesmo pode sobreviver infectivo em solo, água de rega e superfícies de sementes e ser transmitido por ferramentas e mãos contaminadas (CAMARÇO *et al.*, 1998; LIMA; LIMA 2002; SARAIVA *et al.*, 2006).

Como formas de controle do PLYV são recomendadas a produção de mudas de mamoeiro em áreas livres do vírus, eliminação de plantas infetadas, desinfestação de ferramentas agrícolas e a prática do 'roguing' (LIMA; LIMA 2002).

O presente trabalho teve como objetivos: estudar as características biológicas e a variabilidade molecular de isolados PLYV; avaliar a possibilidade do PLYV infectar outras espécies da família Caricaceae, efetuar o estudo da transmissão do PLYV por afídeos e por sementes; avaliar o efeito de extratos de jucazeiro na inativação do PLYV e avaliar o efeito da solarização como forma de inativação do vírus em restos de cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Cultura do Mamoeiro

O mamoeiro é uma das fruteiras mais cultivadas no mundo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais onde a temperatura média é de 25 °C. É uma planta com centro de origem na bacia Amazônica Superior, onde a diversidade genética é máxima, o que caracteriza o mamoeiro como planta tipicamente tropical (SILVA, 2001).

Segundo o CEPEA (2009) o Brasil exportou cerca de 25,6 mil toneladas de mamão no período de janeiro a outubro de 2008, volume semelhante ao do mesmo período em 2007, e que correspondeu a uma receita de US\$ 33,7 milhões, 20,7% superior ao obtido em 2007, segundo a Secretaria de Comércio Exterior (SECEX, 2008).

Por se tratar de uma fruteira tropical e em razão das excelentes condições para o cultivo, o Brasil é o maior produtor mundial de mamão, com produção de 1,89 milhão de toneladas no ano de 2007 (FAOSTAT, 2007). O mamoeiro é cultivado em quase todo o território brasileiro, merecendo destaque o estado da Bahia que é o maior produtor, com um produção de 863.828 ton em 2007. Por conta do alto nível tecnológico, da capacidade empresarial instalada e do grau de profissionalização empregados na cultura, o Espírito Santo é o segundo maior produtor brasileiro e o principal estado exportador, com licença para exportar mamão para os Estados Unidos (IBGE, 2009). Os principais pomares de mamoeiro do Espírito Santo estão localizados nos municípios de Pinheiros e Linhares (CEPEA, 2009). Os estados da Bahia e do Espírito Santo produzem, em conjunto, mais de 85% de todo o mamão brasileiro, seguidos dos estados do Ceará (57.741 ton), Rio Grande do Norte (33.773 ton), Paraíba (30.937 ton), Pará (16.909 ton), Minas Gerais (12.932 ton), Pernambuco (12.913 ton), Sergipe (9.882 ton) e São Paulo (9.871 ton) (IBGE, 2009).

O mamão brasileiro apresenta excelente qualidade, tais como, ótimo sabor e boa aparência, podendo ser produzido e exportado durante os 12 meses do ano. Essa regularidade de suprimento é uma das grandes vantagens competitivas do fruto brasileiro, diante dos demais países produtores.

O mamão é um excelente alimento, pois a polpa é muito rica em nutrientes, constituindo uma importante fonte de energia, cálcio, fósforo, proteínas, vitaminas A e C, além de possuir propriedades digestivas e medicinais (INEGI, 1995). Os frutos de mamão apresentam um conteúdo de umidade variando entre 87 a 94% e carboidratos de 2 a 12%. O conteúdo de sacarose, glicose e frutose flutuam de 7 a 50%, 14 a 78% e 13 a 50%, respectivamente, do total de açúcares. Em frutos maduros, o açúcar predominante é a sacarose (48,3%). Durante o processo de maturação, os sólidos insolúveis em álcool, amido e vários minerais decrescem, enquanto ocorre um incremento no conteúdo de açúcares totais. A acidez total e os teores dos ácidos orgânicos, málico e cítrico são reduzidos desde a colheita até a maturação completa do fruto, enquanto os volumes de vitamina A e proteínas se elevam com o amadurecimento do fruto. Cem gramas de polpa de mamão contêm 39 calorias, 10 g de carboidratos, 1,1 g de gordura, 0,6 g de proteínas e 0,9 g de fibra (SANLUNKHE; DESAI, 1992; SANKAT; MAHARAJ, 1997).

O mamoeiro insere-se na classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica* (MANICA, 1982). O mamoeiro é o membro mais conhecido da família Caricaceae que é composta por seis gêneros: *Carica*, *Horovitzia*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Vasconcellea* e *Cylicomorpha* (Van Droogenbroeck *et al.*, 2002) O gênero *Cylicomorpha*, que ocorre no Oeste do Continente Africano, é o único dos seis que ocorre fora da região neotropical. Figueiras; Pereira (1994) relatam a presença de *Jacaratia* sp. (planta de Mata de Galeria) no Distrito Federal. No bioma Cerrado, segundo Mendonça *et al.* (1998), encontram-se três espécies da família Caricaceae, sendo elas: *Carica glandulosa* Pav. ex DC., *C. quercifolia* Benth. & Hook f. ex Hieron e *Jacaratia dodecaphylla* (Vell.) A. DC., todas de ambientes florestais. Segundo Badillo (1971), a espécie *Jacaratia heptaphylla* (Vell.) A. DC só é encontrada no Brasil meridional, sendo detectada na mata Atlântica.

A planta de mamoeiro inicia seu florescimento de três a quatro meses após o plantio e continua produzindo flores durante todo o seu ciclo de vida. É considerada uma frutífera de crescimento rápido e elevada precocidade. É uma árvore de caule verde com até 8 m de altura, folhas grandes recortadas, flores brancas ou amareladas e látex leitoso. Os primeiros frutos são formados de 140 a 210 dias após o florescimento e sua produção continua durante todo o ciclo da planta (LYRA *et al.*, 2007).

O mamoeiro cultivado possui três tipos de flores: feminina, masculina e hermafrodita (TRINDADE, 2000). O sexo das flores do mamoeiro determina formatos diferentes aos frutos (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Flores hermafroditas formam frutos alongados e flores femininas frutos arredondados. No entanto, o mercado de mamão prefere frutos com formato piriforme ou alongado. As plantações comerciais de mamoeiro apresentam somente plantas femininas, as quais têm frutos de tamanho inferior aos demais e com pequeno número de sementes, devido a uma polinização natural ineficiente (de frutos de plantas femininas por pólen de plantas hermafroditas) (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

A falta de conhecimento dos tipos de flores do mamoeiro em plantios comerciais faz com que ocorra a presença de um número elevado de plantas masculinas e femininas, as quais produzem frutos sem valor comercial. Esse fato representa uma redução do número de plantas produtivas por área e como conseqüência queda acentuada na produtividade do pomar. Para reduzir o número dessas plantas improdutivas é necessário identificar o sexo das flores, na época do primeiro florescimento para realizar o desbaste. O desbaste das plantas indesejáveis ou improdutivas (masculinas e femininas) consiste na identificação das plantas hermafroditas e eliminação das demais, permitindo assim aumento da produtividade e, conseqüentemente, da rentabilidade da cultura (TRINDADE, 2000).

Os frutos oriundos de plantas hermafroditas têm polpa mais espessa que frutos de plantas femininas, representando até 1/3 do diâmetro médio do fruto. A densidade é menor nos frutos provenientes de flores femininas que nos frutos originados de flores hermafroditas. Trata-se de um aspecto relevante no transporte, pois frutos com peso específico maior ocupam menor espaço por unidade de área, proporcionalmente àqueles de menor peso específico, permitindo maior ganho no volume da produção dos frutos a serem transportados (TRINDADE, 2000).

O fruto do mamoeiro apresenta polpa macia, adocicada e bastante aromática, com cor, variando entre o amarelo-pálido e o vermelho, além de diversos tons de laranja e salmão. A casca geralmente é fina, bastante resistente, aderida à polpa, lisa, de cor verde escura, que vai se tornando amarelada ou alaranjada à medida que o fruto amadurece. O formato do fruto também varia dependendo da cultivar. Em geral, o mamoeiro é classificado conforme a característica do fruto, sendo dividido em dois grandes grupos: ‘Solo’ e ‘Formosa’. O grupo ‘Formosa’ abrange híbridos F1, entre eles se encontra o Taninung 01, resultado do cruzamento

de um tipo de mamão de polpa vermelha, da Costa Rica com o Sunrise Solo (TRINDADE, 2000).

O mamoeiro desenvolve-se melhor em solo de textura média, sem impedimento físico, bem drenado e rico em matéria orgânica. Exige pH entre 5,5 a 6,5. Quando plantado em fileira simples, o espaçamento varia de 3,0 a 4,0 m entre fileiras e de 1,80 a 2,50 m entre plantas e quando plantado em fileiras duplas o espaçamento varia de 3,6 a 4,0 m entre fileiras e 1,8 a 2,0 m entre plantas (COSTA; PACOVA, 2003).

Problemas Fitossanitários da Cultura do Mamoeiro

Com a expansão da cultura do mamoeiro em áreas irrigadas do Nordeste brasileiro, as doenças causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus trouxeram sérios problemas de ordem sanitária para a cultura (CAMARÇO, 1997; COSTA; RITZNGER, 2000; LIMA *et al.*, 2001a; LIBERATO; TATAGIBE, 2001; LIMA; LIMA, 2002).

Entre os vários problemas fitossanitários que comprometem a cultura do mamoeiro no Brasil, destacam-se as doenças ocasionadas por vírus. Praticamente em todas as partes do mundo onde se cultivava o mamoeiro, as ocorrências de vírus têm causado grandes perdas no seu rendimento, ocasionando, por vezes, a destruição de muitas plantações. A incidência de vírus tem impedido muitos Estados brasileiros de obterem um bom rendimento por hectare, causando uma mudança constante dos locais de plantio (BARBOSA; PAGUIO, 1982a, 1982b; GOMES, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 1994, LIMA *et al.*, 2001b; LIMA; LIMA, 2002).

As principais viroses que afetam o mamoeiro no mundo são ocasionadas por vírus das seguintes famílias e gêneros: família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV) (PURCIFULL *et al.*, 1984); vírus do mosaico distorcido do mamoeiro (*Papaya leaf distortion mosaic virus*, PLDMV) (KAWANO; YONAHARA, 1992); possível família *Sobemoviridae*, gênero *Sobemovirus*: vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV) (SILVA *et al.*, 2000); família *Rhabdoviridae*, gênero *Rhabdovirus*: vírus da necrose apical do mamoeiro (*Papaya apical necrosis virus*, PANV) (LASTRA; QUINTERO, 1981); gênero *Potexvirus* vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya mosaic virus*, PMV) (COOK; ZETTLER, 1970) família *Bunyarividae*,

gênero *Tospovirus*: vírus do vira cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (GONÇALVES; TRUJILLO, 1986); gênero *Tenuivirus*: vírus do amarelecimento leve das folhas (*Papaya mild yellow leaf virus*, PMYLV) (MARYS *et al.*, 1995) e o vírus da meleira do mamoeiro (*Papaya meleira virus* PMeV), ainda sem classificação taxonômica (KITAJIMA *et al.*, 1993; MARCIEL- ZAMBOLIM *et al.*, 2000).

A seguir, serão apresentadas características biológicas, moleculares e epidemiológicas dos três principais vírus que infetam o mamoeiro no Brasil bem como seus sintomas.

***Papaya ringspot virus*, PRSV**

O causador da mancha anelar do mamoeiro, PRSV, pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. Foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1969 no estado de São Paulo (COSTA *et al.*, 1969) e, posteriormente, em diversos estados brasileiros, inclusive no Ceará (LIMA; GOMES, 1975).

A família *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, contendo cerca de 30 % dos vírus descritos. O PRSV possui partículas alongadas e flexuosas com comprimento médio de 750 nm e 12 nm de diâmetro. O ácido nucléico é do tipo RNA fita simples sentido positivo, com cerca de 10.320 nucleotídeos (YEH *et al.*, 1999; NOA-CARRAZANA *et al.*, 2007). O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por aproximadamente 2.200 cópias de um polipeptídeo com massa molecular em torno de 34 kDa (SHUKLA *et al.*, 1994).

No processo de replicação, o RNA genômico do vírus é traduzido numa longa poliproteína que é auto-processada por enzimas proteolíticas (proteínases), com a conseqüente produção das proteínas necessárias a infecção viral (HULL, 2002). As proteínas P1, HC-Pro, P3, CI, 6K2, VPg-Pro e Nib estão, direta ou indiretamente envolvidas na replicação do genoma viral. Embora as proteínas P1, HC-Pro e P3 não sejam essenciais, aumentam significativamente a taxa de replicação, sendo por tanto consideradas fatores de amplificação do genoma viral. Diante da estratégia genômica utilizada, a produção da proteína capsidial (CP) requerida em maior quantidade, resulta na produção elevada das demais, algumas

exigidas em menor quantidade a exemplo, da replicase viral (NIb). Como o vírus não necessita de grandes quantidades de NIb esta se acumula na célula infetada induzindo a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas, também denominadas “cata-vento”, constituindo propriedade intrínseca à família *Potyviridae* que pode ser utilizada na diagnose (FAUQUET *et al.*, 2005). Essa estratégia de replicação e expressão gênica é bastante danosa para a célula, implicando em um grande dreno de metabólitos, o que reflete em sintomas severos na planta infetada (ZERBINI; MARCIEL-ZAMBOLIM, 1999).

Baseado na especificidade de hospedeira, o PRSV está classificado em dois biótipos diferentes: PRSV-P, biótipo P (papaya) e PRSV-W, biótipo W (watermelon), este anteriormente identificado como *Watermelon mosaic virus 1* (PURCIFULL *et al.*, 1984; REZENDE; FANCELLI 1997; BONILHA, 2007). O PRSV-P infeta tanto plantas de mamoeiro como de cucurbitáceas, enquanto o PRSV-W não infeta mamoeiro. Diversos autores demonstraram que o relacionamento filogenético mais próximo de isolados de PRSV-P e PRSV-W são oriundos de uma mesma região geográfica (BATESON *et al.*, 1994, 2002; JAN *et al.*, 2004, LU *et al.*, 2008). A transmissão do PRSV-P em condições naturais é feita por várias espécies de afídeo, de forma não circulativa e não persistente, dentre as quais destacam-se *Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli, *A. citrola* Van Der Goot, *A. craccivora* Koch, *A. rumicis* Linnaeus, e *Myzus persicae* Sulzeer (REZENDE; COSTA, 1986; REZENDE; FANCELLI, 1997; LIMA; LIMA, 2002).

As plantas de mamoeiro infetadas com PRSV inicialmente apresentam um amarelecimento das folhas mais novas que, posteriormente, apresentam um aspecto de mosaico, podendo ocorrer intensas deformações e bolhosidades, que se caracterizam como áreas elevadas de coloração verde normal. Os frutos apresentam manchas sob a forma de pequenos anéis concêntricos, verdes bem nítidos, com aspecto oleoso, que em estádios mais avançados, podem ficar necrosados e esbranquiçados. Na região do caule e nos pecíolos das folhas podem aparecer manchas irregulares de cor verde intensa e aparência oleosa (LIMA, 2001a; LIMA; LIMA, 2002; REZENDE; FANCELLI, 2005).

Pela característica endêmica da mancha anelar do mamoeiro, a procura por métodos de controle e convivência com o patógeno vem sendo pesquisada em diversos países. Diversas estratégias de controle da mancha anelar tem sido adotadas, dentre elas o uso de mudas certificadas, plantio em áreas livres do vírus, instruções para se evitar o consórcio com cucurbitáceas, programas de erradicação, premunização e uso de plantas transgênicas

(REZENDE; MULLER, 1995, REZENDE; FANCELLI, 1997; GONSALVES, 1998, LIMA; LIMA, 2002, COSTA *et al.*, 2005)

A obtenção de variedades resistentes e/ou tolerantes, tanto dentro das variedades cultivadas de *C. papaya*, como através de tentativas de transferência de fatores de imunidade encontrados em espécies selvagens do gênero *Vasconcellea*, tem sido motivo de investigação (DREW *et al.*, 2006). Porém, os resultados para a obtenção de resistência dentro da espécie não são satisfatórios como método de controle. Diversas tentativas de cruzamento entre espécies falharam devido a existência de barreiras genéticas causando principalmente o aborto de embriões e conseqüentemente inabilidade de realizar retrocruzamentos (DREW *et al.*, 2006).

O controle químico dos afídeos também não tem sido promissor devido ao grande número de espécies envolvidas na transmissão e pela forma de relação vírus/vetor do tipo não persistente, sendo os períodos de aquisição e inoculação de curta duração (COSTA, 2005).

A pré-munização no controle da mancha anelar do mamoeiro, na qual as plantas previamente infetadas por uma estirpe fraca do PRSV ficam protegidas contra a posterior infecção e/ou manifestação de sintomas por estirpes severas do mesmo vírus tem demonstrado êxito restrito, inviabilizando um controle duradouro, econômico e seguro (REZENDE *et al.*, 1981; LIMA *et al.*, 2001a).

A erradicação sistemática de plantas infetadas (roguing), associado com o isolamento parcial do pomar, há décadas é considerada por diversos autores como uma forma de controlar o problema preventivamente (COSTA *et al.*, 1978; LIMA *et al.*, 2001a). Esta prática vem sendo realizada no estado do Espírito Santo, demonstrando ser bastante promissora, com grande êxito no controle da mancha anelar (LIMA *et al.*, 2001a).

Papaya meleira virus, PMeV

A doença conhecida como Meleira foi relatada na década de 1980 afetando pomares no sul da Bahia (NAKAGAWA *et al.*, 1987; CORREA *et al.*, 1988) e norte do Espírito Santo (RODRIGUES *et al.*, 1989a; 1989b). A partir de 1989, disseminou-se rapidamente atingindo 100% de incidência em algumas plantações, tornando-se fator limitante

à produção nas regiões onde ocorre (RODRIGUES *et al.*, 1989a; 1989b). Atualmente o agente causal está disseminado também nos estados de Pernambuco e Ceará (LIMA *et al.*, 2001b; LIMA; LIMA, 2002).

O sintoma característico da doença é a exsudação espontânea de látex nos frutos que posteriormente se oxida, resultando em um aspecto “borrado” e “melado”. Os primeiros sintomas surgem normalmente aos seis meses, nas extremidades das folhas novas, provocando queima e alterações na sua forma (RODRIGUES *et al.*, 1989a). Essa sintomatologia também é apresentada nos pecíolos e margens das folhas novas, antes da frutificação. Os frutos afetados apresentam má formação, com manchas claras na parte externa da polpa, depreciando o seu valor comercial.

Inicialmente, a etiologia da doença foi controversa, atribuindo-se a causas abióticas. Posteriormente, foram isoladas bactérias do tipo *Bartonella* de plantas sintomáticas, porém sua patogenicidade não foi comprovada (AKIBA *et al.*, 1989). Kitajima *et al.* (1993), examinando o látex de folhas, frutos e hastes do mamoeiro com sintomas evidentes da meleira, em microscopia eletrônica de transmissão, observaram a presença de partículas isométricas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro, distribuídas em massas amorfas ou formando agregados de tamanho variado. Neste mesmo estudo, foi possível detectar, por eletroforese, a presença de RNA de fita dupla (dsRNA) em tecidos de plantas infetadas. A transmissão experimental do agente da doença foi possível a partir da injeção do látex dos frutos atacados no ponteiro de mamoeiros sadios, reproduzindo os sintomas e derrubando a teoria do envolvimento de fatores abióticos na etiologia da doença (BARBOSA *et al.*, 2000). Posteriormente MACIEL-ZAMBOLIN *et al.* (2000) conseguiram a purificação do vírus a partir de plantas infetadas, e após cumprir todas as etapas previstas nos Postulados de Koch, concluíram que o vírus por eles estudado era o agente causal da meleira do mamoeiro, para o qual sugeriram o nome “*Papaya meleira virus*” (PMeV), e que possivelmente representava um novo grupo de vírus não relacionado a nenhum outro que infeta plantas, vertebrados, invertebrados ou procaríotos (MACIEL-ZAMBOLIN *et al.*, 2000; 2003). O vírus é composto dsRNA de aproximadamente 12.000 pares de nucleotídeos, porém não existe nenhuma outra informação sobre a sequência ou organização dos genes no genoma viral.

Verificações em campo sugeriram a existência de um inseto vetor, pois no campo a disseminação inicial do vírus normalmente se inicia pelas bordas, progredindo até atingir todo o talhão, indicando que o provável vetor trás o vírus de fora do plantio. Para comprovar

esta hipótese, Nascimento *et al.* (2000) realizaram estudos de campo comparando duas parcelas de plantas de mamoeiro sadias, sendo uma parcela das plantas mantidas protegidas em gaiolas com telas anti-afídeos e outra parcela exposta à infecção natural. Foi constatado que todas as plantas da parcela que permaneceu exposta foram infetadas enquanto que as da parcela protegida não desenvolveram sintomas. Estudos posteriores confirmaram que o inseto responsável pela transmissão do vírus é a mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (VIDAL, 2005).

Em estudos para determinar a gama de hospedeiros do vírus, utilizando-se diversas espécies de plantas constataram a presença de dsRNA viral apenas em mamoeiro e em *Brachiaria decumbens* Stapf, cujas plantas permaneceram assintomáticas (MACIEL-ZAMBOLIN, *et al.*, 2003). Em trabalho anterior, Barbosa *et al.* (1999) já haviam detectado a presença de dsRNA, que poderia ser de origem viral, em amostras de *B. decumbens* coletadas em campos de mamoeiro com meleira.

Um fato que agrava os problemas relacionados com a meleira é a comprovação de que em pomares infetados a infestação dos frutos pela mosca-das-frutas *Ceratitidis capitata* (Wied.) é elevada (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Frutos verdes obtidos de plantas infetadas, quando infestados artificialmente, resultavam em grande número de pupas, enquanto que em frutos verdes sadios, a infestação foi nula. Os autores sugerem que nas plantas infetadas pelo PMeV, a concentração de BITC (Benzil-isotiocianato), composto ovicida e repelente (SEO; TANG, 1982), é drasticamente reduzido no fruto, permitindo o desenvolvimento das larvas. A associação da meleira com a mosca-das-frutas pode transformar o mamoeiro, atualmente hospedeiro ocasional deste inseto, em um hospedeiro primário. Sendo assim, torna-se necessário um rigoroso controle da meleira para se evitar a necessidade de realizar o tratamento pós-colheita dos frutos para exportação. (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Papaya lethal yellowing virus, PLYV

O PLYV foi constatado inicialmente em variedades de mamoeiro do grupo ‘Solo’ no estado de Pernambuco (LORETO *et al.*, 1983). Posteriormente, a virose foi identificada nos

estados da Bahia (VEGA *et al.*, 1988), do Rio Grande do Norte (KITAJIMA *et al.*, 1989), do Ceará (LIMA; SANTOS, 1991; LIMA *et al.*, 1994) e da Paraíba (CAMARÇO *et al.*, 1996).

Essa virose tem se tornado uma constante preocupação dos produtores, pelo fato do PLYV esta sendo disseminado para áreas ainda não atingidas (OLIVEIRA *et al.*, 1989; KITAJIMA *et al.*, 1992a, 1992b; LIMA *et al.*, 2001; LIMA; LIMA, 2002). A origem do vírus é desconhecida, podendo ter-se originado de plantas nativas da região, onde o mesmo vinha ocorrendo (LORETO *et al.*, 1983).

Exames eletro-microscópicos de preparações "leaf dip" de folhas e frutos de plantas com sintomas revelaram a presença de grande número de partículas isométricas de 25 - 30 nm de diâmetro, características de vírus da família *Tombusviridae* (KITAJIMA *et al.*, 1992b; SILVA *et al.*, 1997). Entretanto, estudos moleculares indicam a possibilidade do vírus pertencer ao gênero *Sobemovirus* (SILVA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2009). A caracterização molecular parcial do PLYV foi baseada na análise de nucleotídeos de uma região do genoma que codifica a polimerase viral (RdRp), a proteína VPg e a capa protéica (CP). A comparação das sequências parciais da RdRp e da VPg apresentou maior homologia (51%) com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), vírus tipo do gênero *Sobemovirus*, enquanto que a maior homologia encontrada para o *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), família *Tombusviridae*, gênero *Tombusvirus* foi de 39%. Outra comparação é com o gene CP do PLYV, o qual possui homologia de 48% em comparação ao SBMV e de apenas 38% em relação ao TBSV (SILVA *et al.*, 2000). Além disso, motivos conservados, tanto na sequência de aminoácidos como na de nucleotídeos presentes em todos os sobemovírus também estão presentes na sequência do PLYV, reforçando o relacionamento entre o PLYV e outros membros do gênero *Sobemovirus*.

Os sobemovírus, assim como os tombusvírus possuem genoma composto por uma molécula de RNA fita simples (ssRNA) de 4.000 a 5.000 nucleotídeos empacotado em uma partícula isométrica de tamanho similar. Além disso, todos os genes codificados por espécies de tombusvírus estão presentes no genoma dos sobemovírus, porém organizados de forma diferente (HULL *et al.*, 2000).

A ocorrência do SBMV já foi relatada no Brasil, infectando feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal (CUPERTINO *et al.*, 1982) e no Estado de São Paulo (COSTA, 1987).

Estudos sorológicos envolvendo testes de reciprocidade de dupla difusão em agar demonstraram que o PLYV não possui nenhum tipo de relacionamento sorológico com vírus da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: vírus do endurecimento dos frutos do maracujá (*Passion fruit woodiness virus*, PWV), vírus do mosaico do caupi transmitido por afídeo (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV), vírus do mosaico comum do feijoeiro (*Bean common mosaic virus*, BCMV); com vírus da família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*: vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) e com os vírus da família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*: vírus do mosaico severo do caupi (*Cowpea severe mosaic virus*, CpSMV) e o vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus*, SqMV) (LIMA; SANTOS, 1991; LIMA *et al.*, 2002).

Os sintomas ocasionados pelo PLYV iniciam com o amarelecimento das folhas mais novas do terço superior da copa, que se tornam cloróticas, retorcidas, amarelecem, murcham e caem, induzindo a morte da planta. Os frutos apresentam pequenas manchas cloróticas. Todos estes sintomas já foram observados em mamoeiros naturalmente infetados em diferentes campos de produção do Estado do Ceará (LIMA; SANTOS, 1991; LIMA *et al.*, 2001b), Paraíba (CAMARÇO, 1997; CAMARÇO *et al.*, 1998), Pernambuco (LORETO *et al.*, 1983) e Rio Grande do Norte (KITAJIMA *et al.*, 1992a; 1992b; TEIXEIRA, 1997).

Testes de transmissão conduzidos com o PLYV, empregando as espécies dos afídeos *A. gossypii* Glover de maneira não persistente e *M. persicae*, de forma circulativa persistente e não circulativa não persistente e ainda com besouros das espécies *Diabrotica bivittula* Kirs e *D. speciosa* Germar, revelaram resultados negativos, indicando que estes insetos não estão envolvidos na disseminação do vírus no campo (LIMA; SANTOS, 1991; SILVA, 1996). Estudos realizados para se avaliar as formas de sobrevivência e de transmissão do PLYV, demonstraram a presença do vírus infectivo em solo, água de rega e superfície de sementes de frutos infetados, e sua transmissão por ferramentas de corte (CAMARÇO, 1997; CAMARÇO *et al.*, 1998; SARAIVA *et al.*, 2006). O vírus não foi transmitido via semente, entretanto foi confirmado que é eficientemente transmitido por mãos contaminadas, mesmo após serem lavadas em água corrente, demonstrando grande estabilidade da partícula viral (SARAIVA *et al.*, 2006).

Experimentos em casa de vegetação para avaliar a gama de hospedeiros do PLYV, demonstraram a incapacidade do vírus em infectar mais de 30 espécies vegetais pertencentes a oito famílias botânicas, indicando, com isso, que a gama de hospedeiro do vírus deva ser

restrita ao gênero *Carica* (LIMA *et al.*, 1994; CAMARÇO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2001a; LIMA, LIMA, 2002).

As medidas de controle mais adequadas são as de caráter preventivo, como a eliminação de pomares velhos, a produção de mudas em viveiros posicionados em locais isolados e livres de vírus, efetuar a erradicação de plantas apresentando sintomas típicos da doença (roguing) e a desinfestação das ferramentas utilizadas nos processos de desbrota, desbaste de frutos e colheita em solução de hipoclorito de sódio a 10% (CAMARÇO *et al.*, 1998). Devido à capacidade de sobrevivência do vírus no solo, água de rega e superfícies de sementes deve-se ter cuidado para evitar a disseminação do vírus dentro do pomar e ou introdução via mudas produzidas em locais contaminados.

Na busca de um controle alternativo eficiente para vírus de planta, diversos estudos envolvendo a utilização de extratos vegetais com atividade inibidora de infecção viral vem sendo desenvolvidos (DUARTE, 2007). Extratos foliares de diversas espécies pertencentes a ordem Caryophyllales, foram testadas sobre a infecção induzida pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV), gênero *Tobamovirus* em *Nicotiana glutinosa* L., destacando as espécies *Bougainvillea spectabilis* Willd, *Mirabilis jalapa* L. e *Phytolacca thyriflora* Fenzl ex Schm que reduziram em 50% as lesões locais causadas por TMV (NORONHA, 1980; DUARTE, 2007).

Extratos foliares de *B. spectabilis* e *M. jalapa* também foram testados, em várias diluições e intervalos de tempo, antes da inoculação do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, em abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.), demonstrando que os extratos foliares de ambas as espécies vegetais induziram em cerca de 100% dos casos a inibição da infecção causada pelo ZYMV, quando diluídos a 1/10 e pulverizados 24 h antes da inoculação do vírus (TOZETTO *et al.*, 2002).

Estudos recentes revelaram eficiência de 50% na inibição da infectividade do PLYV quando extratos de folhas de eucalipto (*Eucalypto tereticornis* Smith) foram adicionados ao extrato de planta infetada com PLYV (NASCIMENTO, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de Isolados de PLYV

Amostras foliares de plantas de mamoeiro exibindo sintomas com folhas amareladas típicas de infecção pelo PLYV foram coletadas das regiões produtoras de mamão dos municípios de Fortaleza, Horizonte, Limoeiro do Norte, Marco, Paraipaba e Quixeré no Estado do Ceará.

As amostras foliares foram testadas para confirmar a presença de PLYV através do teste sorológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) indireto com anti-soro policlonal específico (ALMEIDA, 2001). As amostras foliares foram, também, testadas por ELISA indireto contra anti-soro para PRSV.

Nos testes de ELISA indireto, folhas das amostras de plantas reconhecidamente infetadas com PLYV e de plantas sadias de mamoeiro foram maceradas em tampão carbonato de sódio (0,15M Na₂CO₃, 0,035 M de NaHCO₃ e 0,007 M de dietilcarbamato, pH 9,6) na diluição de 1:10 (p:v). Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram depositadas nos poços de placas de ELISA. Em seguida, as placas foram incubadas a 4 °C por um período de 18 h. Após a incubação, as placas foram submetidas a três lavagens consecutivas com PBS-Tween 20 (0,8% de NaCl, 0,02% de KH₂PO₄, 0,11% de Na₂HPO₄, 0,02% de KCl e 0,05% Tween-20) e mais uma lavagem com água destilada. Em etapa seguinte, foram adicionado 100 µL do anti-soro específico para PLYV previamente absorvido com extrato foliar de planta sadia de mamoeiro, para remoção de possíveis anticorpos reativos com proteína de plantas, diluído na proporção de 1:1000 em tampão do anti-soro (PBS-Tween 20 com 0,5 M polivinilpirrolidona, 0,2% de ovoalbumina, 0,03 M de azida de sódio, 0,17% de dietilcarbamato). As placas foram incubadas a 37 °C por 1 h e, logo depois, lavadas com PBS-Tween 20. Em seguida, foram adicionados 100 µL de imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA Anti rabbit, IgG, A-80225), diluída na proporção 1:2000, em tampão do conjugado (0,5 M polivinil pirrolidona, 2% de ovoalbumina e 0,03 M de azida de sódio) e novamente incubadas a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBS-Tween 20, 100 µL

do substrato p-nitrofenil fosfato (SIGMA S-0942) na concentração de 0,5 mg/mL dissolvido em tampão do substrato (MgCl_2 0,005M, pH 9,8, contendo 12% de dietanolamina) foram depositados nos poços das placas. As quais foram incubadas por 30 min no escuro para possibilitar a ocorrência da reação enzimática. As reações de cada poço foram avaliadas em um comprimento de onda de 405 nm em leitor de ELISA Labsystems Multiskam MS. Obedecendo ao critério adotado para as análises no Laboratório de virologia Vegetal da UFC (ALMEIDA, 2001), foram considerados positivas os valores de absorbância que corresponderam ao dobro dos valores registrados para os extratos de plantas sadias usados como testemunhas.

As amostras foliares que apresentaram reação positiva para PLYV e não reagiram com anti-soro para PRSV, foram selecionadas como isolados de PLYV de diferentes regiões do Ceará e inoculadas em plantas sadias de mamoeiro. Nas inoculações, alíquotas de 1,0 g de folhas foram maceradas em almofariz na presença de tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,5, na proporção 1:2 (p/v), filtradas com auxílio de gaze dupla e, após a adição do abrasivo carborundum (400 mesh), foram inoculadas em mudas de mamoeiro sadio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e acompanhadas até o surgimento dos sintomas, sendo cada isolado viral mantido durante todo o período dos experimentos, mediante inoculações periódicas em plantas sadias.

3.2.Variabilidade Biológica de Isolados de PLYV

Os isolados de PLYV mantidos em plantas de mamoeiro em casa de vegetação: PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – DIBAU), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) e PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré) foram separadamente inoculados em cinco plantas de mamoeiro da mesma idade e cinco plantas sadias de mamoeiro foram mantidas como controle. As plantas foram mantidas em vaso contendo uma parte de esterco e duas de solo, esterilizados em autoclave a 120 °C. As concentrações do vírus nos inóculos foram padronizadas com base nos valores das absorbâncias em testes de ELISA indireto com o propósito de inocular as plantas sadias com a mesma concentração de vírus

para todos os isolados. As respostas sintomatológicas das plantas inoculadas foram acompanhadas diariamente após a inoculação durante um período de 30 dias. Todas as plantas inoculadas foram, também, testadas por ELISA indireto contra anti-soro para PLYV após 25 dias da inoculação.

3.3 Variabilidade Molecular de Isolados de PLYV

A variabilidade molecular dos isolados de PLYV: PLYV_{FC}, PLYV_{FQ}, PLYV_H, PLYV_{LN}, PLYV_M, PLYV_{MD}, PLYV_P, PLYV_Q e PLYV_{BE} foi avaliada mediante a comparação das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos genômicos de cada isolado, correspondendo a uma porção da capa protéica e da replicase (Rd/Rp)

3.3.1 Extração de RNA Viral a Partir de Tecido Vegetal Infetado com PLYV

Para cada um dos nove isolados do PLYV mantidos em plantas de mamoeiro foi procedida a extração de RNA total a partir de tecido foliar infetado, através do método de extração com Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Alíquotas de 100 mg de tecido foliar infetado de cada isolado viral e de plantas sadias foram maceradas em nitrogênio líquido e os macerados foram transferidos para microtubos de 2 mL. Um total de 1,0 mL do reagente Trizol foi adicionado em cada extrato e as misturas foram homogeneizadas em vortex, de forma que o volume de cada amostra não excedesse 10% do volume do Trizol. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4 °C e incubados por 5 min à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do complexo nucleoprotéico. A cada extrato foram adicionados a 200 µL de clorofórmio, e as misturas foram agitadas vigorosamente por 15 s e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, sendo adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As misturas foram incubadas novamente por 10 min em temperatura

ambiente e posteriormente centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4 °C. Os ‘pellets’ foram lavados com 1 mL etanol (70%), seco ao ar e ressuspensos em 20 µL de água ultra-pura livre de nucleases, tratada com dietilpircarbonato (DEPC) e posteriormente, acondicionados em ultra-freezer (-80 °C).

3.3.2 Amplificação e Clonagem de Fragmentos do Genoma de Isolados de PLYV

Para a síntese de uma fita simples de cDNA a partir de cada RNA viral extraído através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram utilizados oligonucleotídeos específicos da região da capa protéica (CP) do PLYV: PLYV-1 (5'CTGAAGCGGATATTTCTGG3') e PLYV-2 (5'GTGTATGGCATAACAGTTATC3') (Silva *et al.*, 2000).

Para síntese do cDNA foram adicionados em um microtubo 5 µg de RNA total, 2 pmol do oligonucleotídeo ‘antisense’ específico ao vírus e água livre de nucleases completando o volume para 12 µL. As misturas foram incubadas em termociclador por 5 min a 65 °C, resfriadas em gelo e, em seguida, foram adicionados os demais componentes da reação tampão de transcrição reversa 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 2 µL de ditiotreitol (0,1M) e 1 µL (200 u) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). As misturas foram incubadas a 37 °C por 1 h e, em seguida, a 70 °C por 15 min.

Na reação da PCR foram utilizados 2,5 µL do cDNA amplificado, 5 µL do tampão da PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL dos dNTPs (10 mM), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo senso e antisense, 0,5 µL (5 u/µL) da Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI), sendo o volume completado para 50 µL com água ultra-pura. O programa de amplificação consistiu de um aquecimento inicial a 94 °C por 3 min seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo (0,1 ug/mL) e posteriormente visualizado em luz ultravioleta.

Os fragmentos obtidos por PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA), de acordo com as especificações do fabricante. Para cada fragmento amplificado misturou-se 3 μL do DNA amplificado, 5 μL de tampão ligase 2X, 1 μL do vetor e 1 μL de ligase DNA T4. A reação foi incubada em banho-maria a 4 °C por 16 h para otimização da reação.

Cada ligação foi transferida para tubos de ensaio e em cada tubo foram adicionados 50 μL de células competentes de *Escherichia coli* JM109 (PROMEGA). As células permaneceram por 20 min no gelo e posteriormente foram incubadas a 42 °C por 50 seg. A mistura foi imediatamente recolocada em gelo por 2 min e foram adicionados 800 μL de meio de cultura LB (1% tripitona, 0,5% extrato de levedura 1% NaCl). Após a incubação por 1 h a 37 °C, com agitação constante de 150 rpm, a mistura foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm. De cada mistura, foram retirados 750 μL de meio líquido e as células foram ressuspendidas no volume restante de 100 μL e plaqueadas em meio de cultura LB sólido com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 80 μL de X-Gal (20 mg/mL) por placa. Após o plaqueamento, as placas foram colocadas invertidas e incubadas em estufa a 37 °C durante 16 h.

As colônias brancas, recombinantes, de cada isolado foram repicadas para tubos de ensaios previamente autoclavados contendo 2 mL de meio de cultura LB líquido com ampicilina. Os tubos de ensaios com as bactérias transformadas foram incubadas a 37 °C com agitação constante de 200 rpm por 16 h.

O DNA plasmidial dos clones de cada isolado de PLYV foi extraído utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System (PROMEGA), de acordo com recomendações do fabricante.

A confirmação da presença de fragmento de PCR recombinante foi realizada por clivagem com a enzima de restrição *Eco* RI que libera o inserto no sitio de clonagem do vetor pGEM-T. Para cada DNA plasmidial extraído utilizou-se 1 μL de tampão H 10X, 0,3 μL da enzima *Eco*RI, 3 μL do DNA completando-se para um volume final de 10 μL com água estéril, incubando-se a 37 °C por 1 h. O DNA plasmidial clivado e o inserto de DNA foram visualizados em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo.

O inserto viral foi seqüenciado utilizando o BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer), de acordo com as instruções do fabricante.

As seqüências de DNA geradas foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados mundial de seqüências (GenBank) buscando similaridades com outros vírus já

descritos do gênero *Sobemovirus* e da família *Tombusviridae*. As seqüências foram analisadas utilizando os programas DNAMAN 4.0 e Blast (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Em seguida, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal W acessado através do endereço www.ebi.ac.uk/clustalw e a árvore filogenética foi obtida com o programa MEGA v. 4.0. (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) disponível em www.megasoftware.net.

3.4 Novas Espécies Hospedeiras da Família Caricaceae

Considerando a possibilidade de a gama de plantas hospedeiras do PLYV está restrita a espécies vegetais da família Caricaceae (NASCIMENTO, 2009) quatro novas espécies desta família, *Jacaratia heterophila*, *J. spinosa* Aublet A. DC., *Vasconcella quercifolia* Jacq. e *V. monoica* (Desf.) A. DC. foram avaliadas como possíveis hospedeiras do vírus.

Seis, duas, quatro e 13 plantas respectivamente de *J. heterophila*, *J. spinosa*, *V. quercifolia* e *V. monoica* cultivadas em vasos de polietileno, contendo uma mistura de terra e esterco bovino esterilizados na proporção de 3:1, foram inoculadas mecanicamente com PLYV_M quando exibiam seis folhas expandidas. Duas plantas de cada espécie foram mantidas sem inoculação e quatro plantas de mamoeiro e de *Vasconcella cauliflora* (Jacq.) A. DC foram inoculadas com PLYV_M, como testemunhas.

Após as inoculações as plantas foram mantidas em casa de vegetação durante um período de 30 dias, para observação de sintomas e confirmação da infecção, por ELISA indireto com anti-soro específico para PLYV e por RT-PCR com os oligonucleotídeos específicos PLYV-1 (5'CTGAAGCGGATATTTCTGG3') e PLYV-2 (5'GTGTATGGCATAACAGTTATC3') (SILVA *et al.*, 2000). Plantas sadias de mamoeiro foram retro-inoculadas com extrato vegetal obtido de folhas de cada uma das quatro espécies inoculadas com o vírus para confirmação da infecção.

3.5 Estudo de Transmissão do PLYV por Afídeos e por Sementes

Diante das informações negativas, sobre a existência de vetores biológico do PLYV e da constatação do vírus em diferentes pomares de mamoeiros isolados, inclusive em plantas de residências e terrenos na cidade de Fortaleza, foram planejadas atividades de pesquisa visando avaliar a possibilidade da transmissão do PLYV por sementes de plantas infetadas e por espécies de afídeos.

3.5.1- Transmissão por Sementes

Neste ensaio foram empregadas sementes obtidas de 20 frutos de mamão, exibindo manchas circulares amarelas na casca, com a infecção confirmada por ELISA indireto. Os frutos foram coletados em pomares de mamoeiro dos municípios de Limoeiro do Norte (sete frutos) e Marco (13 frutos). As sementes foram retiradas e divididas em dois grupos, com e sem mucilagem.

Para um grupo de 3.000 sementes, sendo 1.000 de frutos provenientes do município de Limoeiro do Norte e 2.000 de frutos colhidos em pomares do município de Marco, as sementes foram lavadas para a retirada da exotesta (sarcotesta) (SANTOS *et al.*, 2009), proteção mucilaginoso que reveste a semente. Iguais quantidades de sementes sem remoção da mucilagem, proveniente de frutos dos dois municípios, foram dispostas diretamente sobre papel absorvente para secagem durante um período de 15 dias sob temperatura ambiente e na ausência do sol.

Após a secagem as sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato PLANTMAX, produto estéril elaborado a base de vermiculita expandida e material orgânico, contendo macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento inicial das plântulas. Logo após a germinação, 1.680 plântulas dos dois grupos de sementes, sendo 950 plântulas originadas de sementes com mucilagem e 730 de sementes sem mucilagem, foram testadas sorologicamente por ELISA indireto contra anti-soro específico para o PLYV.

3.5.2- Teste de Transmissão por Afídeos

Os testes de transmissão de PLYV por afídeos foram conduzidos com as espécies *A. craccivora* e *A. gossypii*, para avaliar a possibilidade de transmissão de forma não-persistente e de forma persistente.

Colônias de *A. craccivora* livres de vírus foram mantidas em plantas de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e colônias de *A. gossypii* em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), mantidas em gaiolas com tela anti-afídeos, em condição de casa de vegetação. Os afídeos foram manipulados com o auxílio de um pincel de pelo fino e macio. Depois de coletados, os afídeos foram mantidos em jejum em Erlemmayers tampados com algodão por um período de aproximadamente 1 h. Na avaliação da transmissão não-persistente, foi utilizado um período de acesso de aquisição (PAA) de 60s em plantas de mamoeiro infetadas com PLYV. Após o PAA, os insetos foram transferidos em grupos de cinco espécimes por planta de mamoeiro sadio (planta teste) com três meses de idade, utilizando-se um total de cinco plantas por espécie de afídeo. Na avaliação da transmissão de forma persistente, foi adotado um PAA de 2 h e cinco afídeos por planta teste de mamoeiro. Tanto para a forma persistente e não persistente o período de acesso de inoculação foi de 24 h.

Para cada experimento realizado, foram utilizados como controle, insetos provenientes das mesmas colônias, submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos, exceto que o PAA, foi realizado em planta sadia de mamoeiro. Após o termino dos períodos de aquisição e de inoculação para cada forma de transmissão as plantas foram mantidas em gaiolas anti-afídeos sob condição de casa de vegetação por um período de 30 dias para observação do surgimento de sintomas e realização de teste de ELISA indireto com anti-soro específico para PLYV.

3.6 Efeito de Extrato de Jucá na Inativação do PLYV

Este experimento foi realizado com o propósito de avaliar a ação inibidora de extrato etanólico de fruto de jucazeiro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) sobre a infetividade

do PLYV, por ter apresentado ação inibidora contra CpSMV em experimento realizado anteriormente no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará (Dados não publicados).

Para tanto, o extrato etanólico de fruto de jucazeiro foi obtido a partir de 30 g da amostra seca e moída do fruto, a qual foi misturada a 300 mL de etanol 96 GL. A mistura foi deixada em repouso por 4 horas e filtrada em filtro de papel para a separação das partículas sólidas restantes. O procedimento foi repetido três vezes, antes do descarte final da amostra. O filtrado total foi rota evaporado até a retirada total do solvente, sob temperatura constante de 70 °C, e colocado em placas de Petri para congelamento e liofilização. O extrato etanólico foi diluído em tampão de fosfato de potássio 0.05 M, pH 7.5, usado para preparação do extrato de folhas infetadas com o PLYV.

Inicialmente, o extrato de PLYV na diluição de 1:2 foi acrescentado ao extrato etanólico nas concentrações de 1:2 e 1:10, e a mistura foi incubada por 10 min em condições de laboratório. Em seguida, as misturas foram inoculadas em cinco plantas saudáveis de mamoeiro.

Em outro experimento, o extrato de jucazeiro na diluição de 1:10 foi pulverizado em três grupos compostos de cinco plantas de mamoeiro saudáveis e, em seguida, as plantas de cada grupo foram inoculadas com extrato de plantas infetadas com PLYV, seis e 24 h após a pulverização com extrato de jucazeiro.

3.7 Efeito da Solarização na Inativação do PLYV em Restos de Cultura

A fim de avaliar o efeito da solarização na inativação do PLYV em restos de plantas infetadas após a erradicação, a parte aérea e o sistema radicular envolvido em solo de 12 plantas de mamoeiro infetadas com PLYV foram erradicadas e depositadas sobre terreno agrícola e coberto com plástico transparente (solarização). As bordas do plástico foram recobertos com solo para evitar a troca de calor com o exterior. Da mesma forma, a parte aérea e as raízes de outras 12 plantas infetadas com PLYV foram mantidas sob o terreno a céu aberto sob a ação direta do sol, em condições naturais.

A cada quatro dias, amostras de resto de plantas solarizadas e dos restos de plantas mantidas a céu aberto foram testadas por ELISA indireto. Para cada tratamento e período de avaliação foram testadas 15 amostras de folhas e 15 amostras de raízes. As amostras testadas por ELISA foram também inoculadas em plantas saudáveis de mamoeiro, para avaliar a infetividade do vírus. As variações de temperaturas foram monitoradas durante todo o experimento.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de Isolados de PLYV

A partir de amostras provenientes dos municípios de Fortaleza, Horizonte, Limoeiro do Norte, Marco, Paraipaba, e Quixeré foram obtidos os seguintes isolados de PLYV, assim designados: PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – DIBAU), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) e PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré). Os isolados obtidos foram mantidos em plantas de mamoeiro em condição de casa de vegetação durante todos os experimentos, mediante inoculação mecânica. Após 25 dias da inoculação as plantas exibiram sintomas característico de infecção por PLYV, amarelecimento, deformação foliar e bolhosidade.

4.2 Avaliação da Variabilidade Biológica de Isolados de PLYV

De acordo com a sintomatologia observada, durante três semanas após a inoculação, foi constatado que apenas as plantas inoculadas com os isolados PLYV_M e PLYV_Q exibiram bolhosidade nas folhas mais novas com surgimento de pontuações amarelas. Para os demais isolados, os primeiros sintomas surgiram apenas quatro semanas após a inoculação. Para todos os isolados os sintomas evoluíram para bolhosidade, deformação foliar, mosaico e pontuações (Tabela 1).

4.3 Análise da Variabilidade Molecular de Isolados de PLYV

As comparações das sequências nucleotídicas entre os isolados PLYV_{FC}, PLYV_{FQ}, PLYV_H, PLYV_{LN}, PLYV_M, PLYV_{MD}, PLYV_P, PLYV_Q e PLYV_{BE} revelaram uma percentagem de identidade que variou de 96 a 99%, indicando baixa variabilidade molecular (Tabela 2).

A construção de uma árvore filogenética (Figura 1) baseada nas comparações das sequências nucleotídicas entre os isolados de PLYV confirmou menor identidade (96%) entre os isolados PLYV_H e PLYV_{LN}, bem como entre PLYV_Q e PLYV_{MD}, enquadrando os isolados PLYV_H e PLYV_{MD} em ramos distantes de PLYV_{LN} e de PLYV_Q (Figura 1).

Tabela 1. Sintomatologia observada em plantas de mamoeiro (*Carica papaya*) inoculadas com isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV): PLYV_{FC} (Fortaleza-Centro), PLYV_{FQ} (Fortaleza – Edson Queiroz), PLYV_H (Horizonte), PLYV_{LN} (Limoeiro do Norte), PLYV_M (Marco), PLYV_{MD} (Marco – Dibau), PLYV_P (Paraipaba), PLYV_Q (Quixeré) e PLYV_{BE} (Boa Esperança- Quixeré). Os inóculos foram preparados usando 0,1 g de tecido infetado em 900 uL de tampão fosfato de potássio 0,05 M.

ISOLADO	SINTOMATOLOGIA* (três semanas após a inoculação)	SINTOMATOLOGIA* (quatro semanas após a inoculação)	ABSORBÂNCIAS EM ELISA (quatro semanas após a inoculação)
PLYV _{FC}	S/S	Mo, Bol, Def	3.767
PLYV _{FQ}	S/S	Mo, Bol	3.858
PLYV _H	S/S	Mo, Bol, Pts	3.603
PLYV _{LN}	S/S	Mo, Bol	4.069
PLYV _M	Bol, Pts	Mo, Bol, Pts, Def	4.071
PLYV _{MD}	S/S	Mo, Bol, Def	3.520
PLYV _P	S/S	Mo, Bol, Def	3.583
PLYV _Q	Bol, Pts	Mo, Bol, Def	3.659
PLYV _{BE}	S/S	Mo, Bol	3.254
Planta sadia	S/S	S/S	0.342

*S/S – sem sintoma; Bol – bolhosidade; Pts – pontuações; Mo – mosaico e Def - deformação foliar

Alta identidade foi observada entre os isolados PLYV_{FQ}, e PLYV_{BE}, que ao serem comparados com os demais apresentaram o mesmo comportamento, com uma similaridade de 99% com os isolados PLYV_H, PLYV_M, PLYV_{FC} e PLYV_{MD}, de 97% com PLYV_Q e PLYV_{LN} e de 98% com PLYV_P (Tabela 2)

De outra parte, a análise filogenética revelou, o agrupamento de alguns isolados de acordo com a região geográfica, como foi o caso dos isolados de Limoeiro do Norte e Quixeré (PLYV_{LN} e PLYV_Q), municípios vizinhos da região Jaguaribana do Estado. No entanto, o isolado PLYV_{BE} obtido da localidade de Boa Esperança, no município de Quixeré, foi alinhado em ramo diferente do isolado PLYV_Q obtido em outra localidade do mesmo município (Figura 1).

Tabela 2. Identidade (%) entre as seqüência de nucleotídeos do fragmento de parte dos genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellow virus* (PLYV) obtidos no Ceará.

Isolados de PLYV	PLYV _{FQ}	PLYV _H	PLYV _{LN}	PLYV _M	PLYV _{FC}	PLYV _{MD}	PLYV _Q	PLYV _P	PLYV _{BE}
PLYV _{FQ}	--								
PLYV _H	99	--							
PLYV _{LN}	97	96	--						
PLYV _M	99	99	97	--					
PLYV _{FC}	99	98	97	99	--				
PLYV _{MD}	99	99	97	99	98	--			
PLYV _Q	97	97	99	97	97	96	--		
PLYV _P	98	98	98	98	98	98	98	--	
PLYV _{BE}	99	99	97	99	99	99	97	98	--

As análises das seqüências nucleotídicas do fragmento clonado (RdRp/CP) do PLYV_M indicam maior identidade com os vírus do gênero *Sobemovirus Ryegrass mottle virus* (RMoV) (55%) e *Turnip rosette virus* (TRoSV) (54%), do que com o TBSV (46%), vírus tipo do gênero *Tombusvirus* (Tabela 3).

Quando a seqüência nucleotídica de parte dos genes RdRp/CP dos isolados de PLYV foram alinhadas com as seqüências de espécies de vírus do gênero *Sobemovirus*, todos os isolados virais ficaram localizados no mesmo ramo, enquanto que TBSV do gênero *Tombusvirus*, foi incluída em um ramo diferente e bem distante (Figura 2)

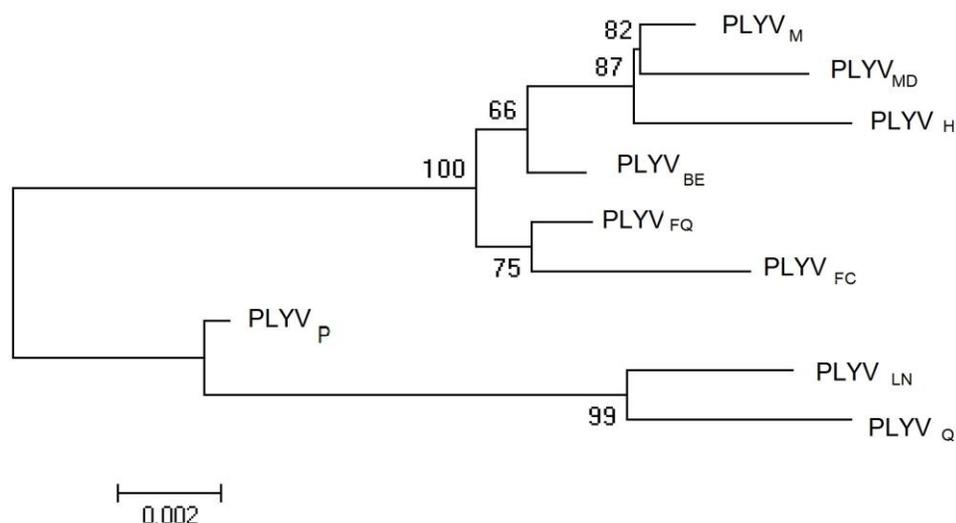


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento entre seqüências de nucleotídeos do genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). O número em cada ramo representa valores de bootstrap (1,000 repetições).

Tabela 3 Percentagens de similaridades entre as seqüências de nucleotídeos do fragmento de parte dos genes RdRp/CP do *Papaya lethal yellow virus* isolado de Marco (PLYV_M) com alguns vírus do gênero *Sobemovirus*.

Vírus*	PLYV _M	TBSV	RMoV	RYMoV	SBMV	SesMV	SCMoV	TuRV
PLYV _M	--							
TBSV	46	--						
RMoV	55	41	--					
RYMoV	51	41	49	--				
SBMV	52	40	49	49	--			
SesMV	52	41	48	48	72	--		
SCMoV	51	41	48	48	45	50	--	
TuRV	54	41	46	46	41	49	50	--

*PLYV_M *Papaya lethal yellowing virus* isolado de Marco; RMoV *Ryegrass mottle virus*; RYMoV *Ryce yellow mottle virus*; SBMV *Southern bean mosaic virus*; SesMV *Sesbania mosaic virus*; SCMoV *Subterranean clover mottle virus*; TRoSV *Turnip rosette virus*; TBSV *Tomato bushy stunt virus*, espécie do gênero *Tombusvirus* usada para fins de comparação.

4.4 Novas Espécies Hospedeiras da Família Caricaceae

Das quatro espécies vegetais da família Caricaceae avaliadas, *V. monoica* foi a única que exibiu sintomas uma semana após a inoculação, apresentando mosaico, amarelecimento e deformação foliar. As espécies de *J. heterophila*, *J. spinosa* e *V. quercifolia* não apresentaram sintomas mesmo após quatro semanas da inoculação. As plantas de *C. papaya* e de *V. cauliflora* apresentaram sintomas 15 dias após a inoculação com PLYV (Figura 3).

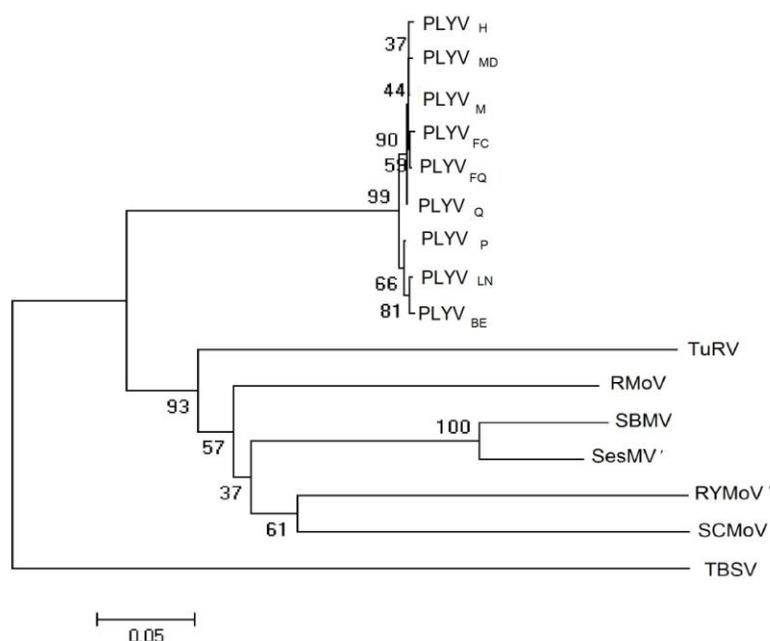


Figura 2. Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos de parte dos genes RdRp/CP de isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), mais sequências adicionais de espécies de vírus do gênero *Sobemovirus* obtidas no GenBank. Distâncias horizontais: são proporcionais a distância genética entre os isolados. Distâncias verticais: são arbitrárias. O número em cada ramo representa valores de bootstrap (1.000 repetições). As espécies analisadas e seu número de acesso no GenBank incluem: *Southern bean mosaic virus* isolado de São Paulo (SBMV, DQ875594); *Sesbania mosaic virus* (SeMV, AY004291); *Turnip rosette virus* (TuRV, AY177608); *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV, AY376453); *Ryce yellow mottle virus* (RYMoV, AM883054) e *Ryegrass mottle virus* (RMoV, DQ481606), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, NC001554).

No entanto, a presença do PLYV foi confirmada por ELISA em todas as plantas inoculadas independentemente da ausência ou presença de sintomas. A infecção do PLYV foi também confirmada por RT-PCR, com a obtenção de um fragmento de DNA de 900 pb das plantas inoculadas de *C. papaya*, *J. heterophila*, *J. spinosa*, *V. cauliflora*, *V. monoica* e *V. quercifolia*. Não foi observada amplificação do fragmento de DNA das plantas saudáveis usadas como testemunhas (Figura 4).

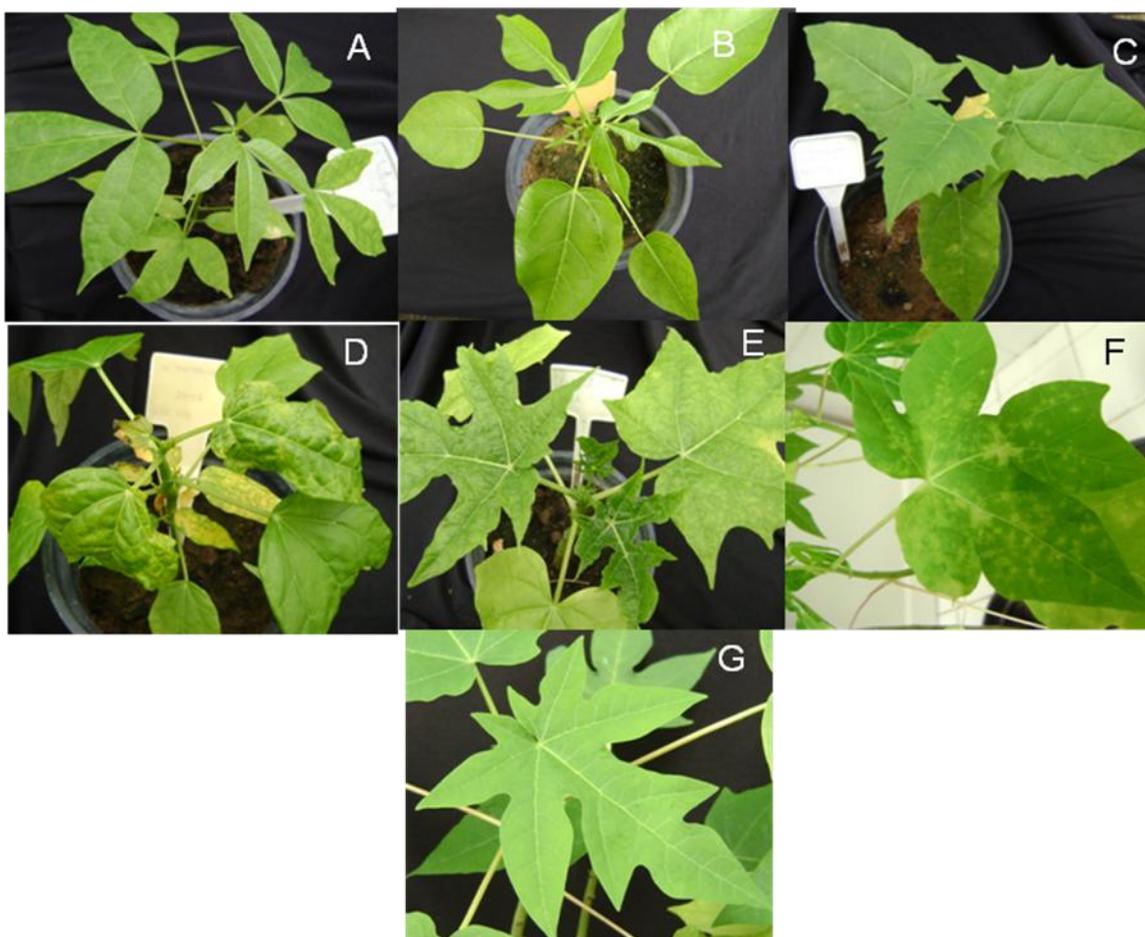


FIGURA 3. Espécies da família Caricaceae inoculadas com *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV): A- *Jacaratia spinosa*, B- *Jacaratia heterophila*, C- *Vasconcella quercifolia*, D- *Vasconcella monoica*, E- *Vasconcella cauliflora*, F- *Carica papaya* e G- *Carica papaya* sem inoculação.

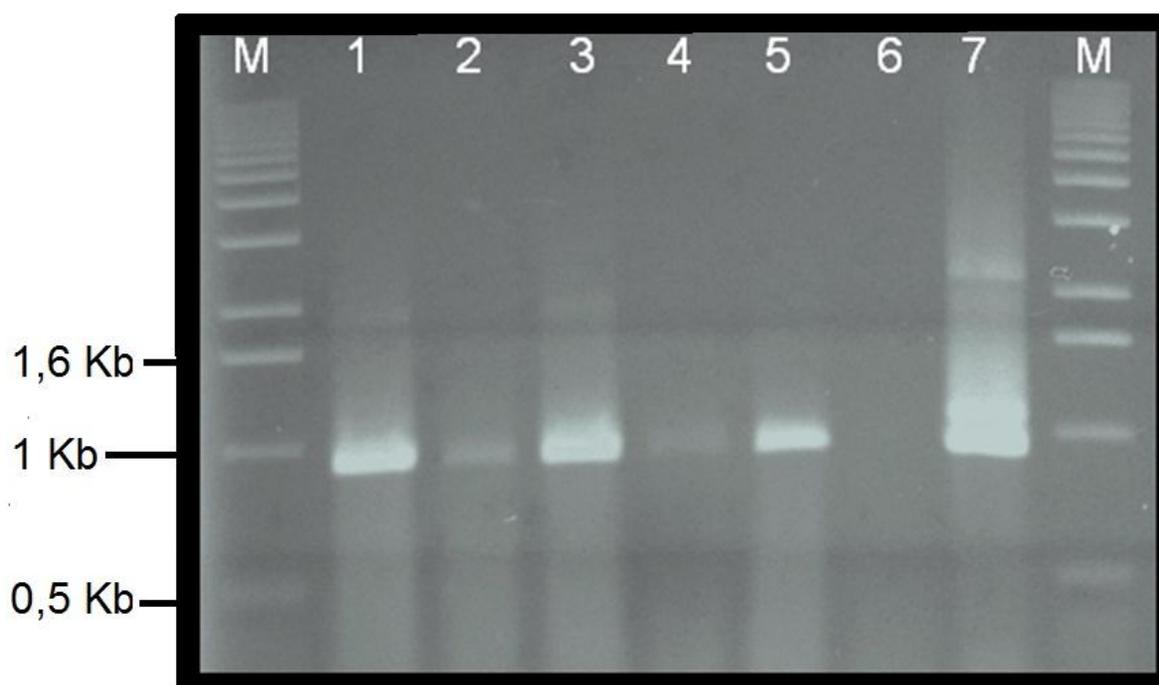


FIGURA 4. Fragmentos amplificados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para parte da região RdRp/CP do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), observado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. M –marcador molecular (1Kb DNA); espécies de Caricaceae inoculadas com PLYV: 1- *Vasconcella monoica*, 2- *Vasconcella quercifolia*, 3- *Jacaratia spinosa*, 4 - *Jacaratia heterophila*, 5 - *Vasconcella cauliflora*, 7- *Carica papaya*; 6– *Carica papaya* sadia.

4.5 Estudo de Transmissão do PLYV por Afídeos e por Semente

Todos os frutos com sintomas típicos de PLYV selecionados para coleta de sementes tiveram a infecção do vírus confirmada por ELISA indireto. Os sintomas da infecção do PLYV nos frutos apresentaram-se apenas na casca, sem sintomas evidentes de empedramento na poupa (Figura 5) confirmando observações anteriores (LIMA; LIMA 2002;

NASCIMENTO, 2009). Das 6.000 sementes de mamão com e sem mucilagem submetidas a germinação, foram obtidos 1.680 plântulas as quais não apresentaram sintomas do PLYV até 25 dias após o plantio. A ausência de infecção do PLYV nas plântulas foi confirmada por ELISA indireto, confirmando a ausência de transmissão do vírus por sementes de mamoeiro.

As absorvâncias dos extratos das plântulas nos testes de ELISA foram todas iguais ou inferiores às absorvâncias das plantas sadias de mamoeiro (0,2 a 0,3) usadas como controle. Os valores das absorvâncias dos extratos de plantas infetadas com PLYV foram todas acima de 2,5 mesmo quando os extratos foram preparados usando 0,1 g de tecido infetado com 0,9 g de tecido sadio, confirmando a alta sensibilidade de ELISA indireto para PLYV (NASCIMENTO, 2009).

Resultados negativos foram também obtidos com os estudos de transmissão do vírus por *A. craccivora* e *A. gossypii* em experimentos de transmissão persistente e não-persistente. Todas as plantas inoculadas pelos afídeos de forma persistente e não-persistente não apresentaram sintomas até 30 dias após as inoculações e a ausência do vírus nas plantas foi confirmada por ELISA indireto.

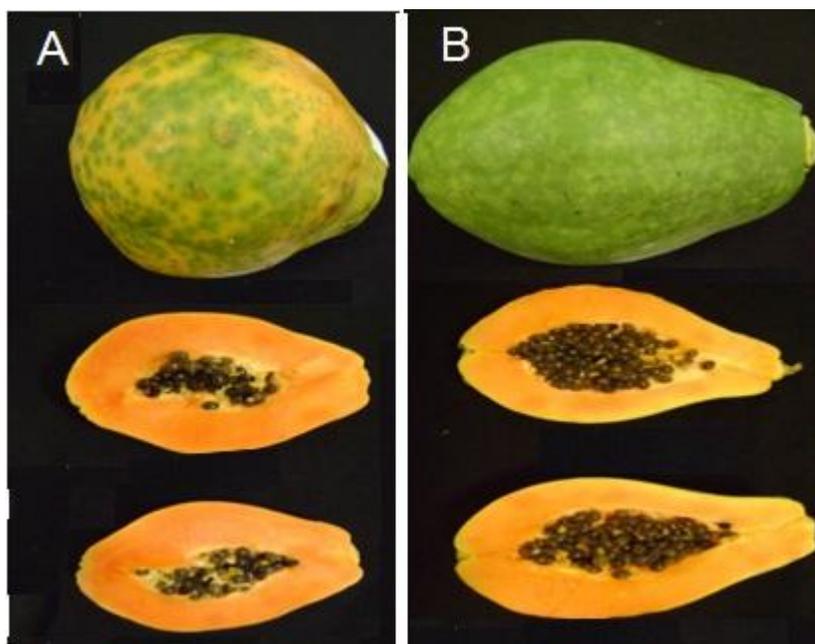


FIGURA 5. Frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) exibindo sintomas de infecção por *Papaya yellowing lethal virus* (PLYV). Pontuações amarelas na casca e ausência de sintomas nas respectivas polpas de frutos de mamoeiro coletados no município de Limoeiro do Norte (A) e no município de Marco (B).

4.6. Efeito de Extrato de Jucá na Inativação do PLYV

As plantas jovens de mamoeiro inoculadas com extrato de plantas infetadas com PLYV misturado ao extrato etanólico da casca do fruto de juazeiro na proporção de 1:2 (v/v) não exibiram sintomas de infecção viral e a ausência do PLYV foi confirmada por ELISA. No entanto, as plantas inoculadas com PLYV após a pulverização com extrato de juazeiro foram infetadas pelo vírus à semelhança das plantas não pulverizadas e inoculadas com PLYV como testemunhas. Da mesma forma, o extrato do juazeiro não afetou o processo infectivo do PLYV quando pulverizado em plantas inoculadas com o vírus.

4.7 Efeito da Solarização na Inativação do PLYV em Restos de Cultura

Os resultados dos testes de ELISA indireto revelaram que a solarização do material vegetal infetado com PLYV erradicado foi eficiente para degradação do vírus tanto da parte aérea, como do sistema radicular das plantas infetadas. Doze dias após as folhas e raízes serem submetidas à solarização, os valores das absorbâncias em ELISA indireto foram iguais aos valores obtidos com extratos de plantas sadias (Figura 6).

Embora os valores da absorbância para as folhas infetadas e solarizadas aos 12 dias tenham caído mais drasticamente do que os das raízes, no 16 dia de solarização os valores se igualaram, indicando a degradação total do vírus (Figura 5). De outra parte, as folhas e as raízes de plantas infetadas e expostas à incidência direta dos raios solares ainda apresentaram valores de absorbância elevadas contra PLYV, mesmo após 32 dias de exposição. Os testes biológicos de inoculação em plantas sadias de mamoeiro confirmaram os resultados em ELISA, uma vez que as plantas de mamoeiro inoculadas com folhas e raízes de restos de plantas submetidas a solarização não exibiram sintomas e a ausência do PLYV foi confirmada por ELISA, revelando a eficiência da solarização na inativação do PLYV em restos de cultura infetadas pelo vírus. Por outro lado, as plantas inoculadas com folhas e raízes de restos de plantas expostas à incidência dos raios solares apresentaram sintomas e reagiram positivamente contra PLYV (Figura 6).

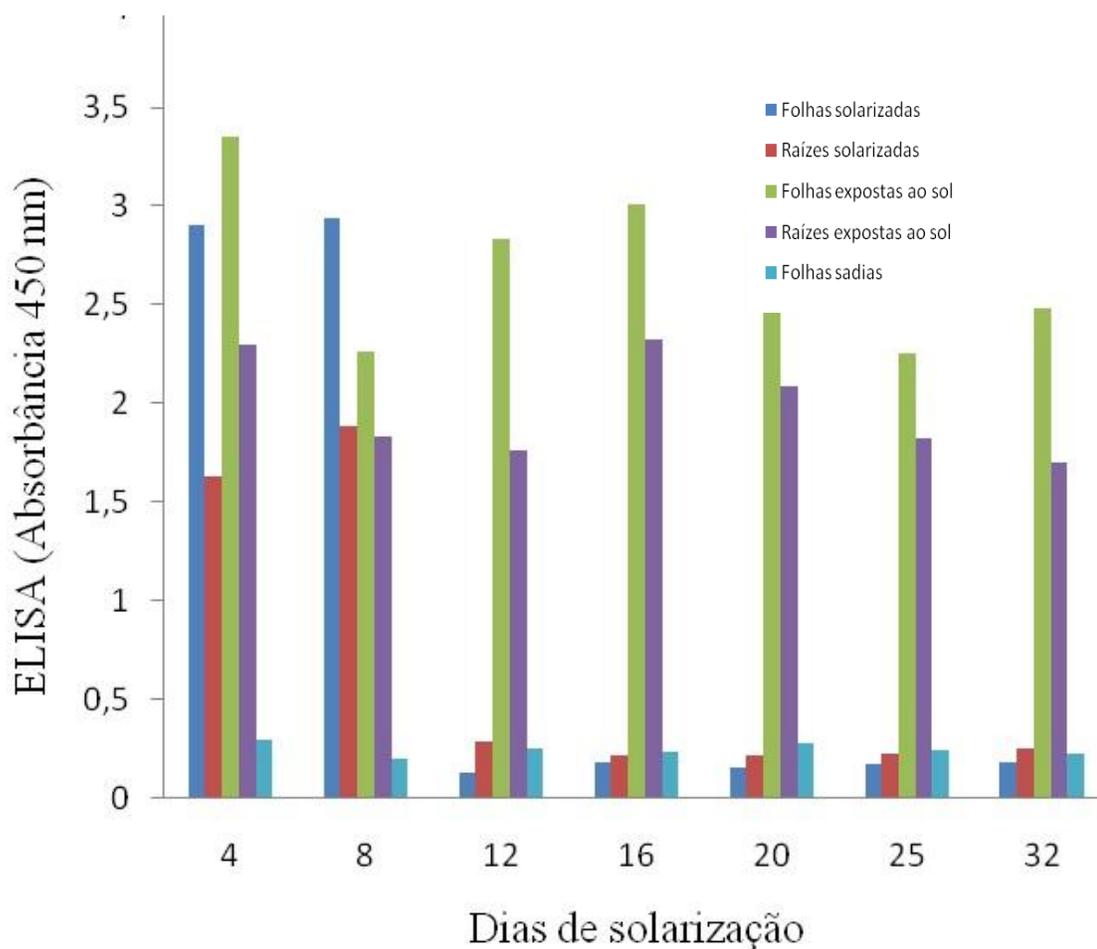


Figura 6. Efeito da solarização na eliminação de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) de folhas e raízes erradicadas de plantas infetadas de mamoeiro (*Carica papaya*), demonstrado por ELISA indireto.

Durante todo o experimento, observou-se que a temperatura variou de 30 a 55 °C junto ao material solarizado e de 30 a 42 °C junto ao material exposto às condições naturais, demonstrando que um aumento de 13 °C na temperatura máxima do material solarizado foi suficiente para a inativação do vírus..

DISCUSSÃO

O gene da capa protéica (cp) tem sido o mais estudado e tem se mostrado bastante eficiente na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus (YIE;TIEN, 1998). Por tanto, a obtenção do seqüenciamento de parte do gene da capa proteica do PLYV e a baixa variabilidade genética encontrada entre os isolados de PLYV: PLYV_{BE}, PLYV_{FC}, PLYV_{FQ}, PLYV_H, PLYV_{LN}, PLYV_M, PLYV_{MD}, PLYV_P e PLYV_Q (Tabela 2) darão subsídios aos programas de melhoramento do mamoeiro visando a produção de plantas transgênicas, com uma resistência genética mais duradoura, pois quanto menor a variabilidade existente em uma população do patógeno, menores as chances de surgirem isolados capazes de “quebrar” a resistência vertical do hospedeiro (SILVA; BISOGNIN, 2004), proporcionando plantios com alta produtividade.

Apesar de estudos anteriores sugerirem a possibilidade do PLYV pertencer ao gênero *Tombusvirus* baseados no tamanho da proteína capsial (36 KDa) e do RNA (4.8 kb), bem como na análise da seqüência de aminoácidos da capa protéica que em comparação com TBSV demonstrou identidade de até 80% (SILVA *et al.*, 1997), os resultados da presente pesquisa revelaram maior identidade com vírus do gênero *Sobemovirus* (Tabela 3, Figura 2). As comparações das sequências de 900 nucleotídeos de parte dos genes RpRd/CP dos isolados de PLYV apresentaram identidade de 55% com RMoV e 54% com TRoSV do gênero *Sobemovirus* e apenas 46% com TBSV vírus tipo do gênero *Tombusvirus* (Tabela3, Figura 2). Estes resultados confirmam estudos anteriores indicam a forte possibilidade do PLYV pertencer ao gênero *Sobemovirus* (SILVA *et al.*, 2000; DALTRO *et al.*, 2009). No entanto, o enquadramento taxonômico definitivo do PLYV somente será possível após o completo seqüenciamento do seu genoma.

Os resultados dos ensaios com as espécies *J. heterophila*, *J. spinosa*, *V. quercifolia* e *V. monoica* reforçam os dados de estudos anteriores indicativos da restrição da infectividade do PLYV a espécies da família Caricaceae (LIMA; CARMARÇO, 1997; CAMARÇO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, 2006, SARAIVA *et al.*, 2006; NASCIMENTO 2009). Nascimento (2009) avaliando 40 espécies/variedades dentro das famílias Caricaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Malvaceae, Passifloraceae, Quenopodiaceae e Solanaceae observou que o PLYV_M infetou somente variedades de *C. papaya*. Amaral *et al.* (2006)

constatarem que a espécie *V. cauliflora* pode ser infetada por PLYV através de inoculação mecânica, sendo, juntamente com a espécie *C. papaya*, as duas hospedeiras deste vírus já relatadas. Os sintomas foram, também confirmados por RT-PCR utilizando primers específicos para PLYV

Semelhantemente, os vírus do gênero *Sobemovirus* possuem gama relativamente restrita de plantas hospedeiras, apesar de infetar tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Um exemplo que pode ilustrar esta afirmação é o caso do SBMV espécie tipo deste gênero, que infeta apenas espécies de plantas da família Leguminosae (TREMAINE; HAMILTON, 1983; FAUQUET *et al.*, 2005).

Segundo Badillo (1993), as espécies *J. heterophylla* e *V. monoica* não são encontradas crescendo naturalmente no Brasil, não constituindo, portanto fonte natural do PLYV. No entanto, as espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia* são cultivadas, sem grande importância econômica na região Centro Oeste e Sul do Brasil, respectivamente, com objetivo comercial de confecção de doces a partir do caule (FERREIRA *et al.*, 2005), representando potenciais fontes de sobrevivência do PLYV.

A ausência do vírus em plântulas oriundas de sementes com e sem mucilagem de frutos infetados com PLYV reforça a afirmativa da não transmissão do vírus por sementes de mamoeiro (CAMARÇO, 1997; CAMARÇO *et al.*, 1998, SARAIVA *et al.*, 2006), embora Camarço (1997) e Camarço *et al.* (1998) tenham verificado a presença do vírus no tegumento das sementes.

Apesar das partículas virais aderidas ao tegumento poderem ser transportadas pelas sementes e penetrarem nas plântulas através de eventuais ferimentos do sistema radicular no momento do transplante, à semelhança do que ocorre com o TMV (WALKEY, 1985). A ausência do PLYV nas plântulas oriundas de sementes com e sem tegumento no decorrer dos experimentos indica a baixa possibilidade que esse tipo de transmissão esteja ocorrendo com o PLYV. Tais resultados demonstram que as sementes, mesmo que provenientes de frutos de plantas infetadas não possuem nenhuma ligação com a crescente incidência do PLYV em pomares de mamoeiro no Ceará.

Embora os insetos representem 61% dos vetores biológicos dos vírus de plantas e os afídeos constituam o grupo mais importante de vetores naturais dos vírus (COSTA, 2005), o PLYV não foi transmitido pelo afídeos *A. craccivora* e *A. gossypii* nos experimentos envolvendo transmissão persistente e não-persistente, confirmando resultados de pesquisas

anteriores com *M. persicae* (LIMA; SANTOS, 1991). A ausência de vetores biológicos também foi, confirmada em experimentos com as espécies de coleópteros *D. Bivitulla* e *D. speciosa* (SILVA, 1996). Por outro lado, a maioria das espécies de vírus do gênero *Sobemovirus* é transmitida por besouros (Polyphaga: Chrysomelidae) e mirídeos (Heteroptera: Miridae), sendo alguns, como é o caso do *Blueberry shoestring virus* (BSSV) transmitido por afídeos (FAUQUET *et al.*, 2005). Esses resultados em associação com a não transmissibilidade do PLYV por sementes e elevado grau de estabilidade do vírus (SARAIVA *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2009) são evidências de que o homem tem sido o responsável direto pela disseminação do vírus a longa distância e dentro dos pomares.

Embora os extratos do fruto de jucazeiro quando acrescidos ao extrato viral e inoculados mecanicamente em plantas de mamoeiro tenham inibido a ação do PLYV, a pulverização do extrato não apresentou nenhum efeito no processo de infecção, demonstrando possibilidade remota do seu uso como controle alternativo do PLYV, evidenciando que se trata de um vírus com elevada estabilidade. Os mesmos resultados foram encontrados utilizando extratos virais de CpSMV (Dados não publicados). De outra parte, Lima *et al.* (1996) avaliando o efeito da pulverização de extrato de folhas de goiabeiras (*Psidium guajava* L), sobre a infectividade do CpSMV observaram índices de inibição da infecção do vírus de 91,7 a 100%.

Em razão da elevada estabilidade do PLYV em tecidos foliares e raízes secas (NASCIMENTO *et al.*, 2009), os quais podem permanecer no solo e serem levados por longas distâncias constituindo fonte de vírus no campo, o destino dos restos culturais de plantas infetadas resultantes da prática do “roguing” tem sido uma permanente preocupação dos produtores. Dessa forma, a prática da solarização de plantas infetadas com PLYV, demonstrou ser um eficiente método de eliminação do vírus dos restos culturais. A solarização mostrou-se eficiente na inativação do PLYV tanto nas folhas como no sistema radicular de plantas infetadas após um período de 12 dias (Figura 4), enquanto que o vírus permaneceu ativo nas folhas e raízes de plantas infetadas e erradicadas mantidas sobre o solo natural até um período de 32 dias (Figura 5). Apesar das temperaturas observadas junto ao material solarizado terem variado de 30 a 55 C, as quais são inferiores ao ponto de inativação térmica do PLYV (80 C) (NASCIMENTO, 2009), a inativação do vírus nos restos culturais é explicada pelo tempo de exposição destes tecidos a temperatura de 55 C.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa conclui-se que:

1. Isolados de PLYV de diferentes regiões do estado possuem baixa variabilidade molecular;
2. O PLYV apresentou maior identidade molecular com os vírus do gênero *Sobemovirus* do que com os vírus do gênero *Tombusvirus*, reforçando a idéia de ser um possível membro do gênero *Sobemovirus*;
3. O PLYV possui gama de hospedeira restrita a espécies da família Caricaceae;
4. O PLYV não é transmitido através de sementes oriundas de frutos de mamão infetados;
5. O PLYV não é transmitido pelos afídeos *A. craccivora* e *A. gossypii*;
6. Embora seja capaz de inativar o PLYV em mistura ao inoculo, o extrato do fruto de jucazeiro não apresentou alternativa de controle para o vírus;
- 7 A prática de solarização constitui um eficiente método de eliminação do PLYV de restos de cultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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, pp. 110 - 111, 1989.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas a fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Org.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em fitovirologia**. 1 ed. Fortaleza, v. 1, pp.33-62, 2001.

AMARAL, P. P. R., RESENDE, R. O.; SOUZA JUNIOR, M. T. *Papaya Lethal Yellowing Virus (PLYV) Infects Vasconcellea cauliflora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, pp. 517, 2006.

BADILLO, V. M. *Caricácea*: segundo esquema. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 43, pp.111, 1993.

BADILLO, V. **Monografía de la familia Caricaceae**. Maracay, Venezuela, 1971

BARBOSA, C. J., HABIBE, T. C., NASCIMENTO, A. S. Detecção de formas replicativas de vírus semelhantes às da meleira em gramíneas de pomares afetados. XXII **Congresso Paulista de Fitopatologia**. pp. 57. 1999. (resumo).

BARBOSA, C. J., PATROCÍNIO, E., HABIBE, T. C., NASCIMENTO, A. S., MATRANGO, W. J. R. Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com látex de plantas afetadas pela meleira. **Biotemas** v. 13, pp. 47-53, 2000.

BARBOSA, F. R.; PAGUIO, D. R. Identificação do vírus da mancha anelar do mamoeiro no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.1, pp.37-45, 1982a.

BARBOSA, F.R.; PAGUIO, D.R. Vírus da Mancha Anelar do Mamoeiro: Incidência e Efeito na produção do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** v. 7, pp. 365-373. 1982b.

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

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

BESERRA Jr., J.E. A. ; NASCIMENTO, A.K.Q.N. ; Andrade, E.C ; LIMA, J.A.A. Análise molecular de isolados de Papaya lethal yellowing virus (PLYV) obtidos no Ceará. **Tropical Plant Pathology** - v. 34. p. S277-S277. 2009 (Resumo).

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

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** v. 29, pp. 423, 1996. (Resumo).

CAMARÇO, R. F. E. A., LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. Transmissão e presença em solo do “*Papaya lethal yellowing virus*”. **Fitopatologia Brasileira** v. 4, pp. 453-458, 1998.

CAMARÇO, R.F.E.A. **Transmissão e sobrevivência do vírus do amarelo letal do mamoeiro *Carica papaya* L.** 67f, Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

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** v. 29, pp. 423, 1996. (Resumo).

SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A. Resistência a doenças em *Solanum tuberosum* L. – Solanaceae. **Caderno de Pesquisa série Biologia**. v. 16, n 2, PP. 117-129. 2009.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Revista Hortifruti Brasil**. Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil>>. Acesso em 01 de junho de 09.

Daltro, C. B., Fiuzza, A., and Andrade, E. C. Estudo da variabilidade genética entre isolados do vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus* - PLYV). 2009. **Encontro Científico –Embrapa**. Available at: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo_CleidianeBD_Eduardo_CA_PLYV_rev_JR_ED_.pdf> Accessed 30 nov. 2009

YIE, Y.; TIEN, P. Controlling mosaic virus diseases under field conditions by using multiple-gene strategies. In: Hadidi, A., Khetarpal, R.K; Koganezawa, H. (Eds.). *Plant Virus Disease Control*. St. Paul: **APS Press**, pp.129-141. 1998.

COOK, A. A.; ZETTLER, F. W. Susceptibility of papaya cultivars to Papaya ringspot and Papaya mosaic viruses. **Plant Diseases Reporter**, v. 54, pp. 893-895, 1970.

NASCIMENTO, A. L. L. ; NASCIMENTO, A.K.Q.N. ; Cezar, M.A. ; LIMA, J. A. A. . Sobrevivência do vírus do amarelo letal do mamoeiro em folhas e raízes secas de plantas infetadas. In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, **Plant Pathology - Suplemento**. v. 34. p. S280-S280. 2009. (Resumo).

LIMA, J. A. A. ; DIÓGENES, E. M. L. ; LIMA, Roberto Caracas de Araujo . Inibicao do virus do mosaico severo do caupi por pulverizacao de extratos de folhas de goiabeira clarificados. In: **Reuniao Nacional de Pesquisa de Caupi**,. v. 4. p. 40-41. 1996.

CORREA, F. J. F., FRANCO, B. J. D. C., WATANABE, H. S., SAKAY, M. Y.; YAMASHITA, E. M. A. Estudo preliminar sobre exudação do látex do mamoeiro - Teixeira de Freitas. **Anais do 2º Simp. Bras. Cultura do mamoeiro** Jabuticaba, SP., pp. 409-428, 1988.

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

COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: **Incaper**, cap 3, pp. 59-102, 2003.

COSTA, A. S. Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In: Bulisani, E. A. Feijão: fatores de produção e qualidade. Campinas: **Fundação Cargil**.. p.173-256, 1987.

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

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

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

COSTA, D. C. C.; RITZINGER, C. H. S. P. Nematóides e seu controle. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. (Org.). **Abacaxi produção - Aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, p. 51-55, 2000.

CUPERTINO, F. P., LIN, M. T., KITAJIMA, E. W. & COSTA, C. L. Occurrence of southern bean mosaic virus in central Brazil. **Plant Disease**. v. 66, p. 742-743, 1982.

DANTAS, J. L. L. Introdução: Mamão produção. In: Trindade, A. V. Mamão produção: Aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura: Embrapa Comunicação para **Transferência de tecnologia**. p. 5-13, 2000.

DREW, R. A.; SIAR, S. V.; O'BRIEN, C. M.; SEJISE, A. G. C. Progress in backcrossing between *Carica papaya* x *Vasconcelales quercifolia* intergenic hybrids and *C. papaya*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 46, p. 419-429, 2006.

DUARTE, L. M. L. Extratos vegetais utilizados no controle de fitoviroses. 2007. Artigo em Hyper texto. **Infobios**. Disponível em: <http://www.infobios.com/Artigos/2007_2/extratos/Index.htm>. Acesso em: 11/1/2010

FAOSTAT. **Estatística do Fundo das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura**. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 15 de abril de 2007

FAOSTAT. **Estatística do Fundo das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura**. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 15 de abril de 2009.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANIHOFF, J.; DEESELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.) Virus taxonomy:- eight report of the international Comittee of Taxonomy of Virus. New York: **Elsevier Academic Press**. p 1162, 2005.

FERREIRA, F. R.; DANTAS, J. L. L.; MARTINS, V. A.; NORONHA, S. E. Ocorrência e distribuição de *Vasconcella* e *Jacaratia*, parentes silvestres de Mamão, no Sul e Centro-oeste do Brasil. **Papaya Brasil**, p. 293-297, 2005

FIGUEIRAS, T. S.; PEREIRA, B. A. S. Flora do Distrito Federal. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2. ed. Brasília: Ed. UnB/SEMATEC, p.345- 404. 1994.

GOMES, R.P. **Fruticultura Brasileira**, 11 ed São Paulo : Nobel 336p, 1986

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

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

HULL, R.; FAUQUET C. M.; GERGERICH, R. C.; LOMMEL, S. A.; THOTTAPPILLY G. Genus sobemovirus. In: REGENMORTEL VAN, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L., Editors, Virus Taxonomy—Classification and Nomenclature of Viruses, **Academic Press**, San Diego p. 764–769, 2000.

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

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em 29 de setembro de 2009.

INEGI. Exportaciones en Anuário Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. México: D.F., 21p., 1995. INEGI. Exportaciones en **Anuário Estadístico** del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. México: D.F., 21p., 1995.

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

KAWANO, S.; YONAHARA, T. The occurrence of papaya leaf distortion mosaic virus in Okinawa. **Technical Bulletin Food and Fertilizer Technology Center**, v. 132, p. 12-13. 1992.

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

KITAJIMA, E. W., REZENDE, J. A. M., VEJA, J.; OLIVEIRA, F. C. Confirmada identidade do vírus isométrico encontrado em mamoeiros do Rio Grande do Norte como sendo o do amarelo letal do mamoeiro solo. **Fitopatologia Brasileira** v. 17, p. 336-338, 1992.b

KITAJIMA, E. W., RODRIGUES, C., SILVEIRA, J., ALVES, F., VENTURA, J. A., ARAGÃO, F.J .L.; OLIVEIRA, L. H. R.. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with “Meleira” (“sticky disease”) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira** v. 8, p.118-122. 1993.

KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, F. C.; PINHEIRO, C. R. S.; SOARES, L. M.; PINHEIRO, K.; VASCONCELOS, M. F. Ocorrência do vírus do amarelo letal do mamoeiro no estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. 2, v.14, p.164, 1989. (Resumos)

LASTRA, R.; QUINTERO, E. Papaya apical necrosis, a new disease associated with a rhabdovirus. **Plant Disease**, v. 65, p. 439-440, 1981.

LIBERATO, R. J.; TATAGIBA, J. S. Avaliação de fungicidas *in vitro* e em pós-colheita para controle da antracnose e da podridão peduncular em frutos de mamão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, n. 4, v. 27, p. 409-414, 2001.

LIMA, J. A. A.; CAMARÇO, R. F. E. A. Viruses that infect papaya in Brazil. **Virus: Reviews & Research**, São Paulo, v. 2, n.1-2, p. 126-127, 1997.

LIMA, J. A. A.; GOMES, M. N. S. Identificação de papaya ringspot virus. No Ceará. **Fitossanidade**, Fortaleza, v.1, n.2, p.56-59, 1975.

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

LIMA, J. A. A.; SANTOS, C. D. G. Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. **Fitopatologia Brasileira** v. 16, p.27. 1991. (Resumo)

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

LIMA, R. C. A., LIMA, J. A. A.; LEAL, C. R. S. Presença de três vírus distintos em pomares irrigados de mamoeiro da Chapada do Apodi, Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.522. 2001b. (Resumo).

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

LIMA, R.C.A; LIMA, J.A.A. Guerra às viroses. Cultiar **Hortaliças e Frutas** III:30-33. 2002

LORETO, T. J. G.; VITAL, A. F.; REZENDE, J. A. M. Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. **O Biológico** v. 49, p 275-279. 1983.

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

LYRA, G. B.; PONCIANO, N. J.; SOUSA, E. F.; SUGAWARA, M. T. Modelo de crescimento aplicado ao mamoeiro (*Carica papaya* L.) cultivar UENF/CALIMAM 01. In: REUNIÃO DE PESQUISA DO FRUTIMAMÃO, 3., **Anais...** Campos dos Goytacazes: UENF/Caliman, . (Boletim Técnico) p. 146-149 2007.

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

MANICA, I. **Fruticultura tropical**: 3. Mamão. São Paulo: Agronômica Ceres, p.276, 1982.

MARCIEL- ZAMBOLIM, E. M., BARROS, D. R., MATSUOKA, K., KUNEIDA, S., CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Purification and partial characterization of papaya "meleira" virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 33, p. 442, 2000. (Resumo).

MARYS, E., CARBALLO, O.; IZAGNIRRE MAYARAL, M. L Properties of a previously undescribed supercoiled filamentous virus infecting papaya in Venezuela. **Archives of Virology**, v.140, p. 891-898, 1995.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do bioma Cerrado. In: S.M. Sano; S.P. Almeida (orgs.). **Cerrado ambiente e flora**. Planaltina, EMBRAPA - CPAC, Brasília p. 307-556. 1998.

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

NASCIMENTO, A. L. L. **Sobrevivencia propriedades sorológicas, físicas e biológicas do vírus do amarelo letal do mamoeiro**. 2009. 75 f. Dissertação Mestrado em fitotecnia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NASCIMENTO, A. S., MATRANGOLO, W. J. R., BARBOSA, C. J., MARQUES, O. M., HABIBE, T. C. Associação de Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) com a “Meleira do Mamoeiro” (*Carica papaya* L.) **An. Soc. Entomol. Brasil** v. 29, n. 4, p. 821-825. 2000.

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

NORONHA, A. B.; GIL, V. L.; VICENTE, M. Occurrence of plant virus inhibitors in species of Caryophyllales I - *Alternanthera ficoidea*, *Amaranthus deflexus*, *Bougainvillea spectabilis*, *Chenopodium ambrosioides* and *Mirabilis jalapa*. Arquivos do Instituto **Biológico**, São Paulo, v.47, p.71-76, 1980.

OLIVEIRA, A. M.G.; FARIAS, A. R. N.; SANTOS FILHO, H. P.; OLIVEIRA, J. R. P.; DANTAS, J. L.L.; SANTOS, L. B.; OLIVEIRA, M. A.; SOUZA JUNIOR, M. T.; SILVA, M. J.; ALMEIDA, O. A.; NICKEL, O.; MEDINA, V. M.; CORDEIRO, Z. J. M. Mamão para exportação: Aspectos técnicos da produção. Brasília: **Embrapa SPI (Séries publicações Técnicas FRUPEX, 9)** 1994.

OLIVEIRA, C. R. B.; RIBEIRO, S. G.; KITAJIMA, E.W. Purificação e propriedades químicas do vírus do amarelecimento letal do mamoeiro isolado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira** v. 14, p.114, 1989. (Resumo).

PURCIFULL, D. E.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. Kew:CMI-AAB, **Descriptions of Plant Viruses**, n. 292. p 8, 1984.

REZENDE, J. A. A.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: Kimati, H; Amorin, L.; Rezende, j.a.m.; Bergamin filho, A.; Camargo, l.e.a. (Ed). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronomica Ceres, cap32, p293-302, 2005.

REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S. Viroses de mamoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 12, p. 44-48, 1986.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. p. 486-496, 1997.

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

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

REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. pp. 486-496, 1997

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. In: *Selecta de Trabalhos sobre a Meleira do mamoeiro*. Linhares, **EMCAPA**. 1989a.

RODRIGUES, C. H., VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da Meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira** v. 14, p. 118. 1989b.

SANKAT, C. K.; MAHARAJ, R. Papaya. In: **Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits**, p. 167-186, 1997.

SANLUNKHE D. K.; DESAI, B. B. Papaya. In: **Postharvest Biotechnology of Fruits**. CRC-PRESS, v.2, p. 13-26, 1992.

SANTO, S. A.; SILVA, R. F.; PEREIRA, M. G.; ALVES, D.; MACHADO, J. C.; BORÉM, F. M.; GUIMARÃES, R. M.; MARQUES, E. R. Estudos morfo-anatômicos de sementes de dois genótipos de mamão (*Carica papaya* L.) **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n 2, p.116-122, 2009

SARAIVA, A. C. M., PAIVA, W. O., RABELO FILHO, F. A. C.; LIMA, J. A. A. Transmissão por mãos contaminadas e ausência de transmissão embrionária do vírus do amarelo letal do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.079-083. 2006.

SECEX. SECRETARIA DO COMERCIO EXTERIOR. Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/alice.asp>>. Acesso em 13 de maio de 2008.

SEO, S.T; TANG, C.S. Hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae): toxicity of benzil isothiocyanate against eggs or 1st instars of three species. **J. Econ. Entomol.** v.75, p. 1132-1135, 1982.

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

SILVA, A. M. R. "**Papaya lethal yellowing virus**": **Caracterização biológica e molecular**. Brasília:, 122f. Dissertação, (Mestrado) – Universidade de Brasília.1996.

SILVA, A. M. R., KITAJIMA, E. W., SOUZA, M. V.; RESENDE, R. *Papaya lethal yellowing virus*: a possible member of the *Tombusvirus* genus. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p. 529-534, 1997.

SILVA, A. M. R., KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O. Nucleotide amino acid analysis of the polymerase and the coat protein genes of the papaya lethal yellowing virus. **Virus: Review and Research** v. 11, p. 196, 2000. (Abstract)

SILVA, G. S. Podridão de raízes e dos frutos do mamoeiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BECERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 413-432, 2001.

TEIXEIRA, M.G.C. **Levantamento da incidência de vírus em mamoeiro (*Carica papaya* L.) em municípios do Rio Grande do Norte**, Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 37p (Dissertação, Mestrado). Mossoró, 1997

TOZETTO, A. R. P.; CATTAL, M. B.; DUARTE, L. M. L.; ALEXANDRE, M. A. V.; RIVAS, E. B. Controle do *Zucchini yellow mosaic virus* em abobrinha de moita com extrato foliar de *Mirabilis jalapa*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, p.185-187, 2002. Suplemento. **Reunião anual do instituto biológico**, 15., 2002. (resumo).

TREMAINE, J. H.; HAMILTON, R. I. *Southern bean mosaic virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, n. 274, 1983.

TRINDADE, A. V. (Org.). Mamão: produção e aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, 77p. 2000

VAN DROOGENBROECK, B.; BREYNE, P.; GOTGHEBEUR, P.; ROMEIJN-PEETERS, E.; KYNDT, T.; GHEYSEN, G. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.289-297, 2002.

VEGA, J., BEZERRA, J. L.; REZENDE, M. L. V. Detecção do vírus do amarelo letal do mamoeiro solo no estado da Bahia através de microscopia eletrônica. **Fitopatologia Brasileira** v. 21, p. 147, 1988. (Resumo).

VIDAL, C. A. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por insetos. **Magistra** v. 17, n.2, p. 101-106, 2005

WALKEY, D.G.A. **Applied Plant Virology**. Londres. Heinemam.1985.

YEH, S.D.; JAN, F.J.; CHIANG, C.H.; DOONG, P.J.; CHEN, M.C.; ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM-MACIEL, E. A família Potyviridae – Parte I **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 7p. 1-66, 1999

ZERBINI, F.M; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Família *Potyviridae* .parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** v. 7, p. 1-67, 1999.