

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

SILAS PESSINI RODRIGUES

**INTERAÇÃO ENTRE O *PAPAYA MELEIRA VIRUS*
(PMeV)
E O MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)**

VITÓRIA
2006

SILAS PESSINI RODRIGUES

**INTERAÇÃO ENTRE O *PAPAYA MELEIRA VIRUS* (PMeV)
E O MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

VITÓRIA
2006

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

R696i Rodrigues, Silas Pessini, 1981-
Interação entre o *Papaya meleira virus* (PMeV) e o mamoeiro
(*Carica papaya* L.) / Silas Pessini Rodrigues. – 2006.
107 f. : il.

Orientadora: Patrícia Machado Bueno Fernandes.

Co-Orientador: José Aires Ventura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Fitopatologia. 2. Fisiologia vegetal. 3. Frutas - Fisiologia. I.
Fernandes, Patrícia Machado Bueno. II. Ventura, José Aires. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e
Naturais IV. Título.

CDU: 57

SILAS PESSINI RODRIGUES

**INTERAÇÃO ENTRE O PAPAYA MELEIRA VIRUS (PMeV)
E O MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)**

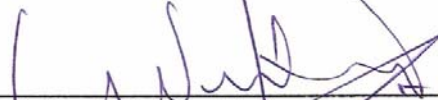
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 25 de agosto de 2006.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



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



Prof.ª Dr.ª Maura Da Cunha
Universidade Estadual do Norte Fluminense



Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo

Aos meus pais, Adelma Pessini e Honório Pícoli, e a minha família, como forma de gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Professora Patricia Fernandes, por todos os anos de orientação, pela oportunidade de trabalhar neste projeto de pesquisa e, sobretudo, pela referência de dedicação e profissionalismo.

Ao meu co-orientador, Professor José A. Ventura, pelo apoio e disposição em ajudar sempre.

Aos amigos Olavo Galvão e Josimar Andrade, que trabalharam comigo em grande parte deste trabalho.

À Professora Maura da Cunha (LBCT/UENF) pela confiança e boa vontade na colaboração com as análises de microscopia eletrônica e histoquímica.

Ao Professor Alberto Fernandes pelo apoio com as questões relacionadas ao Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e pelas conversas sempre importantes sobre a profissão de pesquisador.

Aos amigos Tatiana, Fernando, Mirela Pupo, Eliomara, Umberto, Gloria, Adriana, Fernanda, Mirela Lima, Carolina, Júlio, Germana, Poliana, João, Paolla, Lívia, Thais, Jamile e Carlos pelo excelente ambiente de trabalho e pela compreensão e amizade diária.

Aos professores e amigos da Pós-Graduação pelas discussões sempre proveitosas e pela amizade.

A Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de fazer o curso de Graduação e de Mestrado.

Ao Setor de Genética e ao Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da UFES pela colaboração com os sistemas de foto-documentação.

Ao Professor Alberto Redins pela disponibilidade do microscópio óptico.

Aos funcionários Sônia, Evaldo, Elias, Maria Helena e Nino pelo apoio e pela boa vontade de sempre em ajudar.

À minha namorada Milena pelo amor, compreensão, ajuda e companhia permanentes.

Aos meus primos Ademar e Priscilla que acompanharam todos os meus passos na Universidade. Muito obrigado principalmente pela paciência.

Ao meu Tio Ademar Pessini pela confiança.

À minha família que eu amo e que me acompanhou integralmente até aqui e vai me acompanhar sempre.

RESUMO

A meleira do mamoeiro é causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV), de genoma de dsRNA, que induz uma exsudação espontânea de látex fluido à partir de frutos e folhas. Inicialmente, objetivou-se estabelecer uma metodologia molecular simplificada para o diagnóstico precoce do vírus. A metodologia baseou-se na extração e análise do dsRNA viral, a partir de látex e tecidos da planta. A transmissão do vírus pela mosca-branca *Trialeurodes variabilis* foi avaliada, observando-se que o inseto não transmitiu o vírus, embora tenha sido capaz de adquirí-lo a partir de mamoeiros infectados. Foi confirmado que a infecção ocorre quando o látex infectado é injetado no ápice do caule do mamoeiro. A avaliação da distribuição do PMeV em mamoeiros em diferentes fases da infecção revelou a ocorrência do vírus, principalmente, nos órgãos ricos em laticíferos. Neste tipo de célula, o vírus reduziu a quantidade e alterou a morfologia superficial dos polímeros presentes no látex, ligando-se fortemente à estes polímeros. O PMeV induziu um acúmulo dos elementos potássio e fósforo no látex, que também apresentou teores mais elevados de água. Observou-se também no látex infectado a síntese de alcalóides e um acúmulo de cristais de oxalato de cálcio. Este acúmulo foi positivamente correlacionado com a síntese de H_2O_2 nos laticíferos de plantas doentes, que também foi observada nas células companheiras do floema. Os resultados obtidos sugerem a existência de um mecanismo de defesa do mamoeiro contra o PMeV que envolve a síntese de H_2O_2 pelos laticíferos e células do floema.

Palavras-chave: estresse biótico; fitopatologia; fisiologia vegetal; doenças.

ABSTRACT

'Papaya sticky disease' is caused by *Papaya meleira virus* (PMeV) which has a dsRNA molecule as genome. It induces an exudation of fluid latex from the fruits and leaves. Initially, this work aimed to establish an easy molecular diagnostic method to early virus detection. The established method was based on virus dsRNA extraction from papaya latex and tissues. Afterwards, the PMeV transmission by *Trialeurodes variabilis* whitefly was evaluated. Our observation was that as far as the insect carried the virus, it did not transmit it to the papaya plant. We also established that PMeV infection occurs only when latex from diseased plants was injected in healthy ones. The evaluation of PMeV allocation within papaya at different infection stages demonstrated that the virus was present mainly in laticifers richly tissues. In this cell type, the virus strongly reduced the amount of latex polymers, also altering their superficial morphology. Using transmission electron microscopy, PMeV was observed strongly linked to the polymers. The virus induced an increase in water and potassium and phosphorous elements levels in the latex. Also, it was observed an increase in alkaloids and calcium oxalate crystal accumulation. This accumulation was positively correlated with H₂O₂ synthesis, which was also observed at phloem companion cells. Taken together, these results suggest the existence of papaya defense mechanism against PMeV involving the H₂O₂ synthesis by laticifers and phloem cells.

Keywords: papaya disease; biotic stress; plant physiology; phytopathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado do Espírito Santo.....	18
Figura 2 -Principais sintomas da meleira do mamoeiro.....	20
Figura 3 - Vias de síntese e degradação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em células vegetais.....	32
Figura 4 – Representação esquemática do procedimento de extração de dsRNA pelo método cromatográfico, a partir de tecidos vegetais.....	38
Figura 5 – Representação esquemática do procedimento proposto neste trabalho para a extração de dsRNA do PMeV a partir de tecidos do mamoeiro.....	39
Figura 6 - Representação esquemática do experimento de transmissão do PMeV pela mosca <i>T. variabilis</i>	42
Figura 7 – Representação esquemática das partes da semente do mamoeiro em corte longitudinal.....	44
Figura 8 - Avaliação de diferentes tratamentos sobre a integridade de ácidos nucléicos presentes no látex do mamoeiro e extração destes ácidos	52

nucléicos, utilizando-se solventes orgânicos.....	
Figura 9 - Tratamento enzimático dos ácidos nucleicos extraídos a partir do látex de mamoeiro com meleira.....	53
Figura 10 - Avaliação das condições de diluição e do tempo de armazenamento do látex sobre a integridade do dsRNA do PMeV.....	54
Figura 11 - Ácidos nucleicos extraídos a partir do látex de mamoeiro com meleira e tratamento destes com DNase I.....	55
Figura 12 - Extração de dsRNA à partir dos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o método cromatográfico.....	56
Figura 13 - Extração de dsRNA à partir dos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o método proposto neste trabalho.....	57
Figura 14 - Avaliação de diferentes métodos de inoculação do PMeV através de ferimentos nos tecidos das plantas.....	60
Figura 15 - Avaliação da capacidade de transmissão do PMeV	62

para diferentes cultivares de mamoeiros pela mosca <i>T. variabilis</i> , sob condições controladas.....	
Figura 16 - Detecção do dsRNA do PMeV no látex coletado a partir de diferentes órgão do mamoeiro, em diferentes fases da infecção.....	64
Figura 17 - Detecção do dsRNA do PMeV em diferentes tecidos de mamoeiros com meleira.....	66
Figura 18 - Identificação dos tecidos do caule do mamoeiro.....	67
Figura 19 - Detecção do dsRNA do PMeV em sementes do mamoeiro.....	68
Figura 20 - Histoquímica do látex do mamoeiro.....	71
Figura 21- Histoquímica do látex do mamoeiro.....	72
Figura 22 - Reação de marcação do H ₂ O ₂ produzido pelos tecidos vegetais, utilizando o reagente DAB (3,3'-diaminobenzidina) como substrato.....	73
Figura 23 - Detecção dos sítios de produção de H ₂ O ₂ nos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o reagente DAB.....	75

Figura 24 - Análise do látex do mamoeiro por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	79
Figura 25 - Composição elementar dos polímeros presentes no látex do mamoeiro.....	80
Figura 26 - Análise do látex do mamoeiro por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 PRODUÇÃO DE MAMÃO (<i>CARICA PAPAYA L.</i>) NO BRASIL E NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.....	17
1.2 MELEIRA DO MAMOEIRO.....	19
1.2.1 Sintomas.....	19
1.2.2 Distribuição geográfica.....	21
1.2.3 Etiologia.....	21
1.2.4 Hospedeiros do PMeV.....	23
1.2.5 Transmissão do PMeV.....	23
1.2.6 Distribuição do PMeV em mamoeiros.....	25
1.2.7 Manejo da Meleira.....	27
1.3 RESPOSTAS DE DEFESA DE PLANTA.....	30
1.3.1 Respostas primárias.....	31
1.3.2 Respostas secundárias.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	36
3.2 EXTRAÇÃO DO dsRNA A PARTIR DO LÁTEX.....	36
3.2.1 Avaliação de diferentes soluções sobre a fluidez do látex.....	36
3.2.2 Extração do dsRNA.....	36
3.2.3 Avaliação das condições de armazenamento do látex.....	37
3.3 EXTRAÇÃO DO dsRNA A PARTIR DOS TECIDOS VEGETAIS.....	37
3.3.1 Método cromatográfico.....	37
3.3.2 Método proposto neste trabalho.....	39
3.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	40
3.5 ANÁLISE POR ELETROFORESE HORIZONTAL.....	40
3.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DO PMeV.....	40
3.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSMISSÃO DO PMeV PELA MOSCA BRANCA <i>T. VARIABILIS</i>	41
3.8 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO: ANÁLISE DO LÁTEX.....	42
3.9 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV NA PLANTA: ANÁLISE DOS TECIDOS.....	43
3.10 ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO LÁTEX.....	44
3.10.1 Alcalóides.....	44

3.10.2 Açúcares redutores.....	45
3.10.3 Amido.....	45
3.10.4 Proteínas.....	45
3.10.5 Lipídeos.....	46
3.10.6 Compostos fenólicos.....	46
3.10.7 Cristais de oxalato de cálcio.....	46
3.11 DETECÇÃO DE H ₂ O ₂ TECIDUAL UTILIZANDO DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINA).....	46
3.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÁTEX.....	47
3.12.1 Teor de água.....	47
3.12.2 pH.....	47
3.12.3 Teor total de proteínas.....	47
3.12.4 Teor total de açúcares.....	48
3.13 QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NO LÁTEX....	48
3.14 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DO LÁTEX E TECIDOS DA PLANTA.....	49
3.14.1 Microscopia óptica.....	49
3.14.2 Microscopia eletrônica.....	49
3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
4 RESULTADOS.....	51

4.1 DIAGNÓSTICO DO PMEV.....	51
4.1.1 Extração do dsRNA a partir do látex.....	51
4.1.2 Avaliação das condições de armazenamento do látex.....	53
4.1.3 Extração do dsRNA a partir dos tecidos vegetais.....	55
4.1.3.1 Método cromatográfico.....	55
4.1.3.2 Método proposto neste trabalho.....	57
4.2 TRANSMISSÃO DO PMeV.....	58
4.2.1 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO.....	58
4.2.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSMISSÃO PELA MOSCA BRANCA <i>T. variabilis</i>	61
4.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM MAMOEIROS.....	63
4.3.1 Distribuição em diferentes fases da infecção.....	63
4.3.2 Distribuição do vírus na planta: análise dos tecidos.....	65
4.4 INTERAÇÃO PMeV <i>VERSUS</i> MAMOEIROS.....	69
4.4.1 Testes histoquímicos.....	69
4.4.1.1 Histoquímica do látex.....	69
4.4.1.2 Detecção de H ₂ O ₂ tecidual.....	73
4.4.2 Dosagens de compostos bioquímicos do látex.....	76
4.4.3 Quantificação de elementos químicos presentes no látex.....	78
4.4.4 Análises do látex por microscopia eletrônica.....	78

5 DISCUSSÃO.....	82
5.1 DIAGNÓSTICO DO PMeV.....	82
5.1.1 Diagnóstico a partir do látex.....	82
5.1.2 Diagnóstico nos tecidos.....	85
5.2 TRANSMISSÃO DO PMeV.....	86
5.2.1 Avaliação de diferentes métodos de inoculação.....	86
5.2.2 Avaliação da capacidade de transmissão pela mosca branca <i>T. variabilis</i>	88
5.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM MAMOEIROS.....	89
5.4 INTERAÇÃO PMeV <i>VERSUS</i> MAMOEIROS.....	91
5.4.1 Influências sobre a bioquímica do látex.....	91
5.4.2 Influência sobre o potencial osmótico dos laticíferos e fluidez do látex.....	93
6 CONCLUSÕES.....	95
7 REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUÇÃO DE MAMÃO (*Carica papaya* L.) NO BRASIL E NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

A fruticultura brasileira apresentou um grande avanço nos últimos anos devido, principalmente, à disponibilidade de novas tecnologias de produção que favoreceram, entre outros aspectos, um aumento na produção e exportação de frutos (LIMA, 2001). O Brasil ocupa o primeiro lugar na produção de mamão, com cerca de 3.500.000 toneladas (t) produzidas em 2002. Neste mesmo ano, a Índia produziu aproximadamente 1.820.000 t, seguida pela Nigéria, com 748.000 t, países que ocupam o segundo e terceiro lugares em produção, respectivamente. Entretanto, considerando a elevada exigência do mercado externo, o montante do mamão brasileiro exportado foi de apenas 23.000 t, volume abaixo daqueles apresentados pelo México (69.000 t) e Malásia (54.000 t), os dois principais exportadores de mamão (FAO, 2002).

Na década de 70, as áreas brasileiras produtoras de mamão localizavam-se nos Estados de São Paulo, onde estavam concentrados os maiores pomares do Brasil, Rio de Janeiro e Pará. Por volta de 1967, o surgimento do mosaico do mamoeiro, causado pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV-p), induziu a migração da cultura para diferentes regiões do país. Dessa forma, plantações de mamão foram estabelecidas, principalmente, nos Estados da Bahia e do Espírito Santo, que juntos representam mais de 70% da área produtora deste fruto (RUGGIERO et al., 2003). O Estado do Rio Grande do Norte também merece destaque por apresentar, nos últimos anos, um significativo crescimento desta cultura, após sediar a instalação de grandes empresas capixabas produtoras de mamão (Caliman Agrícola S.A. e Gaia Importação e Exportação Ltda.) (MARTINS, 2003).

No Espírito Santo, a área cultivada com mamoeiro ultrapassa 10 mil hectares, concentrando-se principalmente nos municípios da Região Norte (Figura 1). O Estado é o principal exportador nacional de mamão, respondendo por 70% da quantidade dos frutos exportados em 2005, de acordo com dados do INCAPER. Em 1998, a

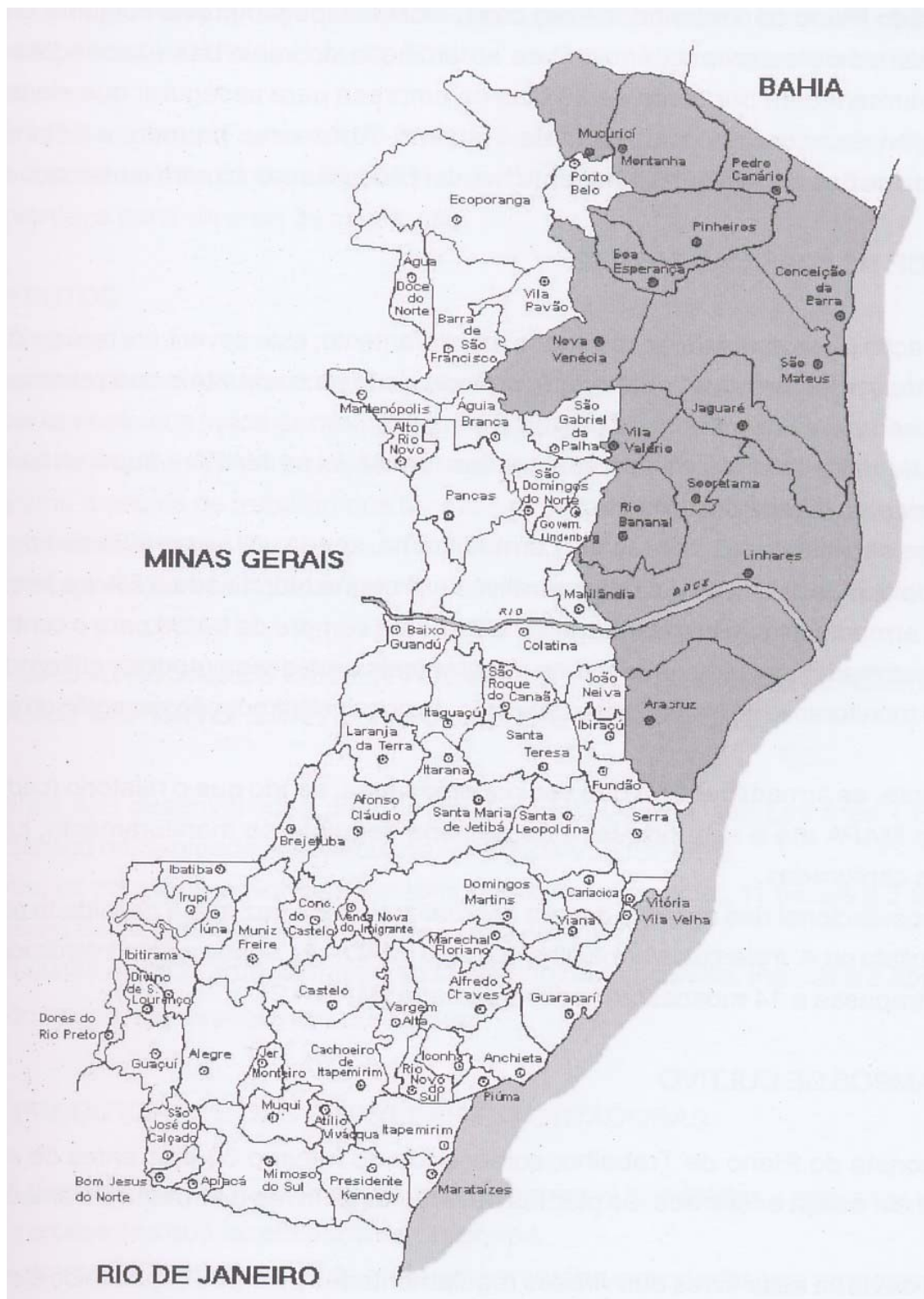


Figura 1 - Mapa do Estado do Espírito Santo, com destaque, em cinza, para os municípios produtores de mamão do Norte do Estado (PRATES, 2005).

implantação do Sistema de Mitigação de Riscos (*Systems Approach*), que assegura a eliminação das moscas-das-frutas sem o uso de agroquímicos, adequou o mamão capixaba às normas de exportação norte americanas (APHIS/USDA), liberando as exportações para os Estados Unidos (PRATES, 2005). Adicionalmente, desde 2000, o cultivo de mamão vem sendo feito no sistema de Produção Integrada de Frutas (PIF) que objetiva a produção econômica de frutos de alta qualidade através de métodos que minimizam os efeitos colaterais do uso de agroquímicos para o ambiente e para a saúde humana, expandindo as exportações capixabas para o comércio europeu (MARTINS, 2003). Por outro lado, alguns fatores limitam a produção de mamão, acarretando severas perdas na produção, comercialização e exportação de frutos *in natura*. Entre eles destacam-se economicamente as doenças, cuja ocorrência pode chegar a 100% em algumas plantações. Uma das principais doenças que afetam as plantações de mamão no Brasil é conhecida como meleira do mamoeiro, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV) (VENTURA et al., 2003).

1.2 MELEIRA DO MAMOEIRO

1.2.1 Sintomas

Os primeiros sintomas da meleira são a queima e deformações nas bordas de folhas jovens (Figura 2A). Estes sintomas devem-se à necrose das pontas das folhas ocasionada pela exsudação de látex translúcido e pouco viscoso, se comparado ao látex “leitoso” de plantas saudáveis, seguida de oxidação do látex em contato com o ar. A exsudação também ocorre na superfície dos frutos, conferindo-lhes um aspecto “melado” (Figura 2B), originando o nome da doença. Os frutos podem também apresentar manchas zonadas superficiais de cor verde-clara (VENTURA et al., 2001). O sabor e a consistência dos frutos são alterados, tornando-os impróprios ao comércio (VENTURA; COSTA, 2002).

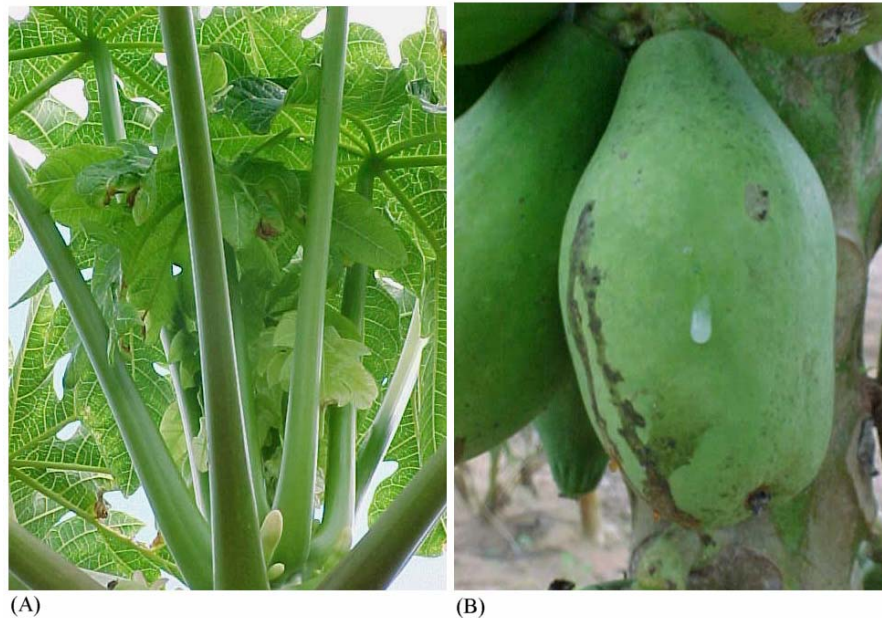


Figura 2 - Principais sintomas da meleira do mamoeiro. (A) Queima na ponta das folhas jovens. (B) Exsudação espontânea de látex aquoso na superfície dos frutos. Note o látex oxidado, ao lado esquerdo do fruto, com um aspecto “melado” (VENTURA et al., 2001).

Diferente do observado em plantas saudáveis, as plantas com meleira exsudam látex espontaneamente, sugerindo alguma influência do PMeV sobre os laticíferos do mamoeiro, alterando possivelmente o potencial osmótico dessas células. O processo de exsudação do látex está diretamente relacionado com a pressão de turgência dentro dos laticíferos (MOUTIN et al., 1999), que por sua vez é influenciada pelos componentes do látex, como íons e compostos orgânicos (HUNTER, 1994). O vírus parece também dificultar o processo de coagulação do látex, que ocorre rapidamente quando o mesmo é exsudado a partir de tecidos saudáveis (MELO; RIGGIERO, 1988; MOUTIN et al., 1999). Curiosamente, todos estes sintomas descritos manifestam-se apenas após a fase de sexagem dos mamoeiros infectados (VENTURA et al., 2001; VENTURA; COSTA, 2002).

1.2.2 Distribuição geográfica

A ocorrência da meleira foi notada pelos produtores de mamão do Sul da Bahia na década de 70, embora pouca importância tenha sido atribuída à doença (VENTURA et al., 2003). Na década seguinte, foram feitos os primeiros relatos oficiais da ocorrência de meleira em pomares comerciais do município de Teixeira de Freitas (BA) (NAKAGAWA et al., 1987; CORREA et al., 1988). No Espírito Santo, a doença ocorre desde 1984, embora tenha sido registrada oficialmente apenas em 1989 (RODRIGUES et al., 1989a). Atualmente, além dos estados do Espírito Santo e da Bahia, a meleira pode ser detectada em alguns municípios de Minas Gerais, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (VENTURA et al., 2003).

1.2.3 Etiologia

Primeiramente, os sintomas da meleira foram atribuídos a um distúrbio na absorção de cálcio e boro, associado a estresse hídrico resultante da falta de água no solo (NAKAGAWA et al., 1987). Já Correa e outros (1988) associaram a doença a um desbalanciamento de bases trocáveis no solo. Além dos fatores abióticos, foi sugerido o envolvimento de microorganismos na indução dos sintomas da meleira, após o isolamento de bactérias do gênero *Bartonella* a partir de plantas doentes (AKIBA, 1989). A patogenicidade dessas bactérias, entretanto, não foi comprovada.

Em um trabalho preliminar, a exsudação de látex fluido foi observada a partir de mamoeiros inicialmente saudáveis, cerca de 2 ou 3 meses após sofrerem a inoculação de látex coletado a partir de plantas doentes (RODRIGUES et al., 1989b). Posteriormente, com a maior compreensão da sintomatologia da doença, verificou-se que 45 dias após a inoculação de látex infectado, plantas inicialmente saudáveis apresentavam os primeiros sintomas da meleira (VENTURA et al., 2001), sugerindo que o agente causador da doença estivesse presente no látex das plantas. A partir disto, o látex de folhas e frutos de plantas doentes foi analisado, indicando a presença de partículas isométricas de aproximadamente 50 nm de diâmetro, através de microscopia eletrônica, e uma banda

de RNA dupla-fita (dsRNA) com aproximadamente 12.000 pares de bases (pb) (KITAJIMA et al., 1993). Neste mesmo trabalho foi proposto que um vírus seria o agente causador da meleira. Finalmente, a etiologia viral da doença foi confirmada após purificação das partículas isométricas presentes no látex, seguida de inoculação das partículas em mamoeiros sadios, que se tornaram doentes (ZAMBOLIM et al., 2003). Moléculas de dsRNA de 12.000 pb também foram extraídas a partir das partículas purificadas, fortalecendo a idéia de que o PMeV possui um genoma permanente de dsRNA.

A ocorrência de dsRNA como genoma é um aspecto incomum entre os vírus de planta, que apresentam, na grande maioria dos casos, um genoma composto por RNA fita simples (ssRNA), nas formas mensageiro *sense* (ssRNA+) ou mensageiro *anti-sense* (ssRNA-). Outros vírus possuem ainda genoma de DNA fita simples (ssDNA) ou fita dupla (dsDNA). Os vírus de dsRNA representam um pequeno grupo entre as viroses de planta, agrupados nas Famílias *Reoviridae*, *Birnaviridae* e *Cystoviridae*. Estes também são capazes de infectar vertebrados, invertebrados, fungos e bactérias (FAUQUET, 1994).

Como observado para outros vírus, os de dsRNA possuem uma capa protéica, chamada capsídeo, que atua, principalmente, protegendo o genoma viral (REINISCH, 2002). A interação entre as proteínas capsidiais e a associação do genoma do vírus com estas proteínas estabiliza fortemente a estrutura do capsídeo (GASPAR et al., 1997). Durante todo o ciclo de vida dos vírus de dsRNA o seu genoma permanece dentro do capsídeo, que é formado por algumas camadas de proteínas, sendo que a mais interna delas atua como um núcleo em miniatura. Este núcleo possui uma enzima polimerase (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRP), que produz novos dsRNAs durante a replicação do vírus. As RdRPs também integram um complexo de transcrição responsável pela síntese e processamento dos RNAs mensageiros, que comandam a produção de proteínas virais no citoplasma das células hospedeiras (REINISCH, 2002).

1.2.4 Hospedeiros do PMeV

Além de *C. papaya*, moléculas de dsRNA, semelhantes àquelas associadas à meleira, foram extraídas a partir de gramíneas da espécie *Trichacne insulares* (capim-açu) e *Brachiaria decumbens* (capim-braquiária), presentes em pomares de mamão com plantas infectadas pela meleira no Sul da Bahia (BARBOSA et al., 1999b). Em outro trabalho, através da inoculação mecânica de látex coletado a partir de plantas doentes, 47 diferentes espécies vegetais foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao PMeV: *Acanthospermum hispidum*, *Amaranthus deflexus*, *Bidens pilosa*, *B. decumbens*, *Canavalia ensiformis*, *Capsicum annum*, *C. papaya*, *Cenchrus echinatus*, *Chamaesyce hirta*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Commelina benghalensis*, *Cucumis sativus*, *C. anguria*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Emilia sonchifolia*, *Euphorbia heterophylla*, *Galinsoga ciliata*, *Gomphrena globosa*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Hibiscus esculetus*, *Ipomoea acuminata*, *I. setosa*, *Lactuca sativa*, *Leonotis nepetaefolia*, *Leonurus sibiricus*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *Panicum maximum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus segetum*, *Ricinus communis*, *Senna obtusifolia*, *Sida rhombifolia*, *Solanum americanum*, *Sonchus oleraceus*, *Stilozobium sp.*, *Vicia faba*, *Vigna sinensis* e *V. unguiculata* (ZAMBOLIM et al., 2003). Entre estas espécies, apenas *C. papaya* e *B. decumbens* apresentaram o dsRNA do PMeV, confirmando os resultados descritos por Barbosa e outros (1999b). Entretanto, os sintomas atribuídos à meleira não foram verificados a partir de *B. decumbens*. Esses resultados sugerem um grau elevado de especificidade do PMeV para *C. papaya*.

1.2.5 Transmissão do PMeV

A transmissão das viroses de planta pode ser artificial ou natural, compreendendo três processos: 1) aquisição, a partir de uma fonte de inóculo, 2) transporte até um hospedeiro compatível, e 3) inoculação do vírus neste hospedeiro. Uma fonte de inóculo considerável do PMeV é representada pelo látex de mamoeiros com meleira, já que o

vírus encontra-se em alta concentração neste exsudado (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003).

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

Alternativamente, as viroses de plantas podem ser transmitidas naturalmente, durante a sua propagação, através de mudas, provenientes de plantas infectadas, ou mesmo através de sementes. Esta última via é utilizada por 20% dos vírus conhecidos (MINK, 1993), que podem chegar até os tecidos reprodutivos da planta através dos gametas masculinos (grãos de pólen) ou durante o desenvolvimento embrionário. Foi demonstrado por Wang e Maule (1994) que o suspensório da semente, estrutura responsável pelo transporte de nutrientes da planta até o embrião, é uma via importante utilizada por alguns vírus. Contudo, a transmissão natural da maioria das viroses é feita por vetores, que podem ser fungos, nematóides ou, principalmente, artrópodes.

Os vetores das viroses de plantas são capazes de romper a barreira composta pela parede celular e a membrana plasmática das células vegetais, mantendo as células viáveis na maioria das vezes (CARRINGTON et al., 1996). Nos insetos vetores, as partículas virais podem permanecer na superfície do aparelho bucal por poucos minutos (vírus não-persistentes), por alguns dias ou semanas (vírus semi-persistentes) ou, mesmo, por toda a vida do vetor (vírus persistentes). Apenas os vírus persistentes se utilizam das células do vetor para a replicação, embora todos os tipos de relação vírus/inseto vetor sejam altamente complexos (GRAY; BARNEJEE, 1999). Alguns insetos, assim como os nematóides, possuem aparelho bucal do tipo perfurador/sugador e se alimentam da seiva da planta após romperem o tecido vegetal

através da ação de enzimas ou por força mecânica (HUNTER; ULLMAN, 1992). As partículas são liberadas a partir do vetor, no citoplasma das células.

O envolvimento de alguns insetos na transmissão do PMeV foi avaliado por Vidal e outros (2003). Sob condições controladas, as espécies *Toxoptera citricidus* e *Myzus persicae* (pulgões), *Empoasca bordia* (cigarrinha) e *Bemisia tabaci* (mosca-branca) foram testadas utilizando-se mudas de mamão (cv. Golden) inoculadas com o vírus e mudas sadias. As espécies de pulgão (*T. citricidus* e *M. persicae*) e cigarrinha (*E. bordia*) não foram capazes de transmitir o PMeV. No entanto, foi verificada a correlação positiva entre as curvas de flutuação populacional de cigarrinhas e a ocorrência da meleira em plantações de mamão no Estado do Espírito Santo (LIMA et al., 2003). Diferentemente, todas as plantas infestadas por *B. tabaci* apresentaram o dsRNA do PMeV três meses após exposição às moscas (VIDAL et al., 2003). Este resultado está de acordo com avaliações feitas abordando a transmissão de outras viroses, na qual observou-se que as moscas-brancas (Hemiptera: Aleyrodidae) são vetores eficientes de viroses de planta (VALVERDE et al., 2004). No mesmo trabalho, os autores destacam as espécies *B. tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutilonea*. Recentemente, altas populações da espécie *Trialeurodes variabilis* foram descritas ocorrendo em plantações de mamão de seis localidades no Estado do Espírito Santo (CULIK et al., 2004). O monitoramento da flutuação da população desta espécie ao longo do ano e a incidência de meleira, mostrou que aumentos no número de moscas aparentemente não estavam relacionados aos picos de incidência da doença (ANDRADE et al., 2003). Entretanto, experimentos controlados avaliando a capacidade vetorial de *T. variabilis* ainda não foram desenvolvidos.

1.2.6 Distribuição do PMeV em mamoeiros

Uma vez transmitidos para um hospedeiro compatível, os vírus dão início a um processo infeccioso a partir das células onde foram depositados, região chamada sítio de inoculação. Nesta fase, o grau de susceptibilidade das plantas à infecção é dependente dos seus genes de resistência, que resultam na síntese de proteínas ou

metabólitos celulares de defesa (RODRIGUES et al., 2006). Muitas vezes essa tentativa de defesa da planta é insuficiente, e os vírus colonizam outras células a partir do sítio de inoculação, através de uma rota de movimentação dentro do hospedeiro. Em células propícias à replicação viral, é produzido um número abundante de novas partículas, que podem, então, se distribuir por todos os tecidos e órgãos da planta. Alguns vírus estão limitados a tecidos específicos durante o seu ciclo de vida, conforme observado para os vírus da família *Polerovirus* (HOFFMANN et al., 2001) e outras viroses (CHOEN et al., 1992), que são restritos às células do floema. No entanto, alguns vírus podem ser encontrados em diferentes tecidos vegetais (OPALKA et al., 1998).

Após a análise de tecidos de folhas e frutos de mamoeiros com meleira, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que o PMeV está presente apenas nos laticíferos da planta (KITAJIMA et al., 1993). Este resultado serviu de base para a hipótese de que o PMeV infecta, especificamente, os laticíferos do mamoeiro (KITAJIMA et al., 1993; BARBOSA et al., 1999; ZAMBOLIN et al., 2003). Deve-se considerar, entretanto, que a distribuição tecidual do PMeV descrita por Kitajima e outros (1993) equivale a uma fase específica da infecção. De acordo com Leisner e outros (1993), a ocorrência de vírus em determinados órgão e tecidos vegetais está relacionada com fatores genéticos da planta, com a fase do desenvolvimento vegetal e com o curso da infecção. Portanto, a possibilidade de ocorrência do PMeV nos demais tecidos do mamoeiro durante outras fases da infecção não pode ser descartada. Em diferentes espécies, os laticíferos não parecem propícios à colonização por microorganismos, estando os registros de agentes infecciosos limitados a protozoários flagelados (*Phytomonas sp.*) (Da CUNHA et al., 2000) e bactérias (DAVIS et al., 1996). Até o presente, além do PMeV, nenhum outro vírus foi descrito colonizando estas células.

Além da distribuição tecidual do PMeV em diferentes fases da infecção, a rota de movimentação descrita pelo vírus após sua inoculação nos tecidos do mamoeiro é pouco compreendida. Durante a distribuição no hospedeiro, muitas viroses fazem uma movimentação local (célula-célula) e outra sistêmica (longa-distância) (CARRINGTON et al., 1996). Quando a infecção se inicia em células da epiderme, o vírus segue para o mesófilo e floema (parênquima e células companheiras) utilizando os plasmodesmas de

células adjacentes (McLEAN et al., 1997). A partir das células companheiras, os vírus chegam até os vasos do floema, onde ocorre o movimento em longa-distância para os diferentes órgãos da planta, seguindo o fluxo de fotoassimilados (CARRINGTON et al., 1996). Novamente, através do movimento célula-célula, inverso ao do início da infecção, os vírus são liberados do floema, resultando em infecção sistêmica. Algumas viroses podem ainda se movimentar utilizando os vasos do xilema (OPALKA et al., 1998).

O PMeV se movimenta, possivelmente, através dos laticíferos do mamoeiro, cujas células estão distribuídas em praticamente todos os órgãos e tecidos da planta (ESAÚ, 1976). Barbosa e outros (1999a) avaliaram a ocorrência do vírus em diferentes órgãos do mamoeiros, e determinaram que ele está presente em órgãos como flores, folhas, caule e frutos verdes. Este resultado indica que o vírus se concentra nos órgão que exsudam látex em abundância, quando incisados. Entretanto, a distribuição do vírus em diferentes etapas da infecção, permanece indeterminada. Além disso, considerando verdadeira a hipótese de movimentação do PMeV através do fluxo de látex, o vírus deve ser capaz de alterar a fisiologia dos laticíferos, visando induzir tal fluxo, uma vez que sob condições normais, o látex encontra-se em equilíbrio dentro dos laticíferos (HUNTER, 1994; MOUTIM et al., 1999). Tais alterações induzidas pelo PMeV na fisiologia dos laticíferos, bem como o envolvimento dos feixes vasculares (xilema e floema) na movimentação do vírus são também desconhecidos.

1.2.7 Manejo da meleira

As estratégias de manejo da meleira compreendem medidas preventivas que visam minimizar a ocorrência do PMeV na plantação. Tais medidas também influenciam indiretamente o controle de algumas pragas. Nascimento e outros (2003) demonstraram que o vírus possivelmente reduz os níveis de um composto (benzil-isotilcianato, BITC) produzido pelas plantas, tóxico para os ovos e larvas das moscas-das-frutas, tornando os frutos verdes mais susceptíveis ao ataque dos tefritídeos.

Diferentes genótipos de mamoeiro vêm sendo avaliados em programas de melhoramento no Brasil, embora ainda não exista um cultivar comercial de mamão resistente à meleira (VENTURA et al., 2003). O aparecimento de sintomas e a presença do dsRNA foram monitorados em 11 genótipos (CMF 007, 014, 018, 020, 021, 022, 023, 031, 034, 037, 047) e nos cultivares Sunrise Solo e Tainung nº1. Os resultados demonstraram que os genótipos CMF 007, 021 e 020 e o cv. Sunrise Solo foram os mais susceptíveis, com um menor período de incubação do PMeV. Já os genótipos CMF 018, 034 e 054 e o cv. Tainung nº1 apresentaram menor percentual de plantas infectadas e maior período para a detecção do dsRNA e a manifestação de sintomas (HABIBE et al., 2002).

Com o objetivo de diminuir a disseminação da meleira, bem como evitar ou retardar sua introdução em áreas onde ela ainda não foi constatada, foram descritas algumas medidas preventivas que incluem a escolha de áreas distantes de pomares com histórico da doença, a desinfestação das ferramentas utilizadas no trato da cultura (desbrota, colheita e desbaste de frutos), a redução dos ferimentos nas plantas, a eliminação das lavouras sadias ou doentes após o ciclo de produção, e, principalmente, a realização de inspeções semanais nos pomares seguida da eliminação das plantas doentes, conhecida como *roguing* (VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA et al., 2003).

O *roguing* baseia-se no diagnóstico das plantas doentes no campo através da identificação dos sintomas da meleira (Figura 2), principalmente, a ocorrência de necrose nas pontas das folhas jovens no início da doença (Figura 2A). Este procedimento permite controlar o inóculo inicial nos pomares. Entretanto, considerando que os sintomas da doença se manifestam apenas após a floração, plantas infectadas e assintomáticas podem permanecer no campo por meses como fontes de inóculo para plantas sadias (SOUZA et al., 2002). Além disso, os sintomas da meleira podem não ser observados quando a temperatura do ar é muito alta (TATAGIBA et al., 2002) ou podem ser confundidos com as lesões causadas pela queima das folhas, provocada pelo fungo *Phoma caricae-papayae* ou por danos resultantes da infestação por insetos (VENTURA et al., 2003). Por esse motivo, mesmo em fazendas em que o *roguing* é bem conduzido, a meleira pode afetar até 20% da plantação (VENTURA et al., 2003).

Portanto, métodos de diagnóstico precoce da meleira são fundamentais para a efetividade do manejo da doença.

Métodos sorológicos são bastante utilizados em virologia para o diagnóstico, mas estão sendo substituídos por técnicas moleculares, pelo ganho em sensibilidade e precisão. Alguns métodos moleculares, baseados na detecção do dsRNA do PMeV a partir do látex das plantas, foram descritos (KITAJIMA et al., 1993; HABIBE et al., 1999; TAVARES et al., 2004) visando o diagnóstico precoce do vírus. Habibe e outros (1999) afirmam que o armazenamento do látex em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 seguido da aplicação direta em gel de agarose é a melhor estratégia de detecção do PMeV. Contudo, com a polimerização do látex, as amostras nestes géis se apresentam retidas nos poços de aplicação (ou muito perto destes), o que dificulta a análise do resultado.

Recentemente, dois novos métodos foram propostos nos quais os tratamentos de digestão do látex com proteinase K em tampão de diluição ou fervura do látex diluído em tampão citrato de amônio são seguidos de extrações utilizando solventes orgânicos (fenol e clorofórmio) (TAVARES et al., 2004). Dada a ocorrência do PMeV, em altas concentrações, no látex das plantas doentes (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003), a detecção do dsRNA viral a partir do látex representa uma estratégia efetiva para o diagnóstico. Porém, existem alguns fatores, como o custo dos reagentes e a distância entre os laboratórios de análise e as áreas de cultivo, que limitam o uso desta técnica. Além disso, os procedimentos adequados para a coleta e armazenamento das amostras de látex ainda não foram descritos, dificultando o acesso dos produtores aos benefícios do diagnóstico precoce.

Uma outra limitação ao diagnóstico do PMeV apenas no látex é a impossibilidade de se analisar mudas de mamão, que exsudam quantidades muito pequenas de látex, insuficientes ao diagnóstico. Como uma alternativa, o dsRNA pode ser extraído a partir de amostras de tecidos, utilizando o método descrito por Dodds e Joseph (1983), que compreende a extração de ácidos nucléicos totais com solventes orgânicos, seguida de ciclos de cromatografia de celulose, tratamento enzimático com nucleases e eletroforese. Tal procedimento é bastante trabalhoso, de alto custo, permite o processamento de um pequeno número de amostras e ainda apresenta baixa

reprodutibilidade dos resultados (SOUZA et al., 2002). Desta forma, até o presente, não se encontra disponível um método de diagnóstico molecular do PMeV a partir dos tecidos do mamoeiro que seja eficaz e aplicável a muitas amostras.

As limitações relacionadas ao diagnóstico do PMeV, bem como a carência de informações epidemiológicas, limitam, consideravelmente, o estabelecimento de estratégias mais efetivas de controle da meleira. Além disso, poucas informações existem acerca da interação mamoeiros *versus* PMeV, principalmente, quanto às respostas de defesa da planta. Tais informações poderiam, por exemplo, auxiliar na escolha de marcadores para o melhoramento genético de mamoeiros, visando resistência à meleira. Uma vez determinadas as repostas de defesa do mamoeiro ao PMeV, trabalhos posteriores poderão ser desenvolvidos avaliando diferentes tratamentos capazes de induzir tais repostas, tornando as plantas menos susceptíveis ao vírus.

1.3 RESPOSTAS DE DEFESA DE PLANTA

A relação vírus *versus* planta hospedeira pode ser de resistência ou de susceptibilidade. Um hospedeiro é considerado incompatível quando o vírus é incapaz de iniciar a infecção a partir do sítio de inoculação. Por outro lado, a relação de susceptibilidade inclui desde a simples replicação do vírus na planta até a indução de um quadro de sintomas, que caracteriza a doença. Em muitos casos, a exemplo da meleira, as infecções virais evoluem para doenças, comprometendo fortemente o hospedeiro. Os vírus são capazes de induzir uma série de reações em benefício do processo infeccioso, que incluem a formação de complexos de replicação (HILLS et al., 1987), interferências na regulação do ciclo celular (ASURMENDI et al., 2004), tráfico de substâncias (AUDY et al., 1994) e fotossíntese (AZEVEDO et al., 2002), bem como a supressão de estratégias de defesa da planta (WANG; MAULE, 1995). As plantas, entretanto, respondem à infecção sintetizando novos RNAs mensageiros, proteínas e compostos do metabolismo, objetivando defender-se contra o patógeno. Tais respostas

são coletivamente chamadas de respostas ao estresse ou de defesa (WOJTASZEK, 1997).

As respostas de defesa são divididas em respostas gerais ou repostas específicas. Respostas gerais incluem o reforço de paredes celulares, produção de fitoalexinas e compostos do metabolismo secundário (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995) capazes de inibir diferentes microorganismos. Já as respostas específicas atuam contra um patógeno particular, por exemplo, uma espécie ou um grupo de vírus. Todas elas se iniciam de forma coordenada, após o reconhecimento do patógeno pela planta, através da percepção de moléculas sinalizadoras produzidas pelo patógeno. As proteínas capsidiais estão entre os principais constituintes dos vírus capazes de induzir respostas de defesa (ALLAN et al., 2001). Moléculas com esta função são conhecidas como “elicitores” (PARE et al., 2005) e induzem dois tipos de respostas: 1) respostas primárias, que são rápidas, transientes, e ocorrem, principalmente, na superfície das células, baseadas na ativação de componentes pré-existentes e 2) respostas secundárias, baseadas na ativação de genes de resistência.

1.3.1 Respostas primárias

As reações primárias de plantas à moléculas elicitoras incluem: mudanças no pH extracelular e nos potenciais de membrana (FELIX et al., 1993), alterações no fluxo de íons (BACH et al., 1993) e no padrão de fosforilação de proteínas (FELIX et al., 1991) e, marcadamente, a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecida como explosão oxidativa (WOJTASZEK, 1997). As EROs são produzidas através de sucessivas reduções do oxigênio molecular (O_2). A principal delas é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que está envolvido em processos de lignificação das paredes das células, regulação do desenvolvimento vegetal e na defesa de plantas contra patógenos (Figura 3) (WOJTASZEK, 1997). Foi demonstrado por Allan e outros (2001) que células da epiderme de tabaco (*Nicotiana tabacum*) produzem elevadas concentrações de H_2O_2 quando inoculadas com o *Tobacco mosaic virus* (TMV). O H_2O_2 produzido pode ser diretamente tóxico ao patógeno ou atuar como um sinalizador em vias de resistência

celular. Por outro lado, os altos níveis de H_2O_2 podem também causar danos às células, por exemplo, afetando macromoléculas e sistemas de membrana.

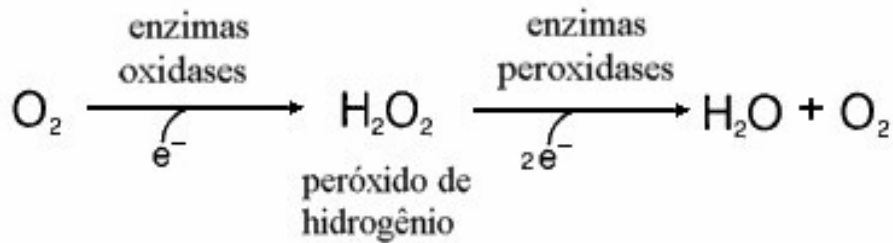


Figura 3 - Vias de síntese e degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células vegetais.

Três vias principais têm sido atribuídas à produção de peróxido em células vegetais, baseadas nas enzimas: 1) NADPH oxidase, 2) oxidases associadas à parede celular e 3) oxalato oxidase. Acredita-se que o sistema de produção de H_2O_2 pela NADPH oxidase seja similar ao encontrado em células de mamíferos. Nestas células, a molécula elicitora é reconhecida por um receptor de membrana, que inicia uma via de sinalização envolvendo proteínas de ligação a GTP (VERA-ESTRELLA et al., 1994), canais iônicos, proteínas kinases e fosfatases (BAKER et al., 1993), fosfilipases A e C (CHANDRA et al., 1996), e, possivelmente, AMP cíclico (BALAGUE et al., 2003). O radical superóxido (O^{2-}) é produzido durante esta via, e convertido em H_2O_2 pela enzima NADPH oxidase ativada.

Um modelo alternativo para a geração de H_2O_2 envolve oxidases associadas à parede celular, cuja atividade é dependente do pH (BOLWELL et al., 2002). Esta via não exclui a existência de uma cascata de sinalização, mas enfatiza a importância de componentes pré-existentes, principalmente, na matriz extracelular. Dessa forma, moléculas elicitoras são reconhecidas por receptores de membrana, que modulam a atividade de canais iônicos, permitindo a passagem de íons (Ca^{2+} , K^+ , H^+ e Cl^-) através da membrana. Este processo resulta em uma alcalinização do meio extracelular,

seguida da ativação das oxidases. No sítio ativo dessas enzimas são formados radicais superóxido, que na presença de redutores, são convertidos em H_2O_2 (BOLWELL et al., 2002).

A atividade de oxalato oxidase em plantas foi inicialmente observada a partir de flores de trigo (ZALESKI; RENHIARD, 1911). Posteriormente, tal atividade foi correlacionada com o desenvolvimento embrionário inicial de cevada (LANE et al., 1993). Os extratos de sementes germinativas de cevada, bem como o de sorgo (PUNDIR; PUNDIR, 1993), possuem proteínas chamadas “germininas”, que são capazes de oxidar o oxalato, produzindo H_2O_2 . Embora tenham sido purificadas a partir de monocotiledôneas, estas proteínas encontram homologia com seqüências do genoma de *Arabidopsis thaliana*, indicando que elas podem também existir em dicotiledôneas (DUMAS et al., 1995). Acredita-se que a principal função do H_2O_2 produzido por essas enzimas seja proteger a planta contra o ataque de patógenos (LANE, 1994), já que a expressão em cevada (DUMAS et al., 1995) e amendoim (LIVINGSTONE et al., 2005) de genes de trigo que codificam para “germininas” resulta em resistência a fungos.

1.3.2 Respostas secundárias

As respostas secundárias de plantas a patógenos estão diretamente relacionadas com a genética da planta (RODRIGUES et al., 2006). A resistência genética pode resultar da ativação de um ou poucos genes (monogênica ou vertical) ou de vários genes (poligênica ou horizontal). Neste sistema imune da planta estão envolvidos genes de resistência dominantes e genes recessivos. Os genes dominantes (*R*) de resistência a viroses codificam proteínas que apresentam um sítio de ligação a nucleotídeo e uma cauda composta por aminoácidos leucina, na extremidade carboxila da proteína (MARTIN et al., 2003). Estas proteínas interagem com proteínas codificadas por genes virais, chamados de genes de avirulência (*avr*), em um modelo conhecido como *R x avr* (RITZENTHALER, 2005). A partir deste reconhecimento, a célula inicia uma série de respostas de defesa contra o vírus invasor, que incluem, freqüentemente, uma forma de morte celular programada, conhecida como resposta de hipersensibilidade. Por outro

lado, a resistência conferida por genes recessivos está associada a um mecanismo passivo, no qual fatores do hospedeiro, necessários à replicação viral, estão ausentes ou presentes em uma forma modificada (DIAZ-PENDON et al., 2004).

Uma outra via de resistência, alternativa ao modelo $R \times avr$, foi descoberta recentemente, na qual moléculas de dsRNA são capazes de reprimir RNAs mensageiros específicos por um processo chamado silenciamento de RNA ou RNA de interferência (RNAi) (FIRE et al., 1998). Esta via pode ser encontrada em uma variedade de organismos, embora acredite-se que ela seja mais elaborada em plantas, principalmente, como um sistema natural de proteção contra viroses. O processo de silenciamento envolve a clivagem de moléculas de dsRNA precursoras em oligonucleotídeos (21-26 pb), por uma enzima, chamada Dicer, com atividade de RNase III. Estes oligonucleotídeos são chamados de RNAs de interferência curtos (*short-interfering RNAs*, siRNAs) ou micro RNAs (*micro-RNAs*, miRNAs). Ambos, siRNA ou miRNA, são capazes de guiar um complexo de degradação (RISC), responsável pela clivagem de RNAs mensageiros específicos. Adicionalmente, siRNAs são capazes de reprimir a expressão de alguns genes através da metilação da cromatina no núcleo das células. Já os miRNAs podem impedir a tradução de RNAs mensageiros em proteínas por se ligarem a estes RNAs, impossibilitando o acoplamento do ribossomo. Baseado nesta via, moléculas de dsRNA produzidas transgenicamente (PRUSS et al., 2004) ou fornecidas a partir de uma fonte exógena (TENLLADO et al., 2003) foram capazes de induzir elevados níveis de resistência de plantas a infecções virais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer metodologias de diagnóstico molecular do PMeV e compreender os mecanismos de interação entre o PMeV e o mamoeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma metodologia molecular simples para o diagnóstico precoce do PMeV à partir do látex e dos tecidos da planta.
- Avaliar métodos de inoculação artificiais do PMeV, relacionados aos ferimentos nos tecidos do mamoeiro, que ocorrem durante os tratamentos culturais.
- Avaliar, sob condições controladas, a capacidade de transmissão do PMeV para mamoeiros pela mosca branca *T. variabilis*.
- Determinar a distribuição do PMeV em diferentes órgãos do mamoeiro, em diferentes estágios da infecção.
- Avaliar a influência do PMeV sobre o metabolismo do mamoeiro, com ênfase ao funcionamento dos laticíferos da planta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

A Portaria Federal nº 134, de 17 de novembro de 1997 (BRASIL, 1997) determina a interdição de propriedades com ocorrência de meleira, seguida da eliminação das plantas infectadas, além de plantas hospedeiras. Por esta razão, os mamoeiros utilizados neste trabalho foram provenientes da Fazenda Experimental do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), localizada nos municípios de Linhares e Sooretama (Figura 1), que apresenta permissão para o cultivo de plantas com meleira.

3.2 EXTRAÇÃO DO dsRNA A PARTIR DO LÁTEX

3.2.1 Avaliação de diferentes soluções sobre a fluidez do látex

Foram avaliadas três soluções de armazenamento: 1) tampão fosfato pH 6,0 (1:1 v/v), 2) tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) e 3) látex contendo metabissulfito de sódio (2:1 p/v). Neste último tratamento, o sal foi adicionado diretamente ao látex, seguido de agitação.

3.2.2 Extração do dsRNA

Em microtubo (1,5 ml) foram adicionados 100 µl de látex nas três condições descritas (item 3.2.1) e 100 µl de fenol equilibrado com tampão pH 8,0 e clorofórmio (2:1 v/v). As amostras foram agitadas por alguns segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C. Foram feitas mais duas extrações, uma utilizando fenol e clorofórmio e outra utilizando apenas clorofórmio. À fase aquosa coletada foram adicionados 500 µl de

etanol (EtOH) absoluto gelado e 5 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2. As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16-18 hrs ou em nitrogênio líquido por 30 min e centrifugadas, posteriormente, a 12.000 rpm por 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi lavado com EtOH 70% e ressuspenso em 15 µl de água ultrapura ou tampão para as enzimas DNase ou RNase.

3.2.3 Avaliação das condições de armazenamento do látex

Amostras de látex (1,4 ml) foram submetidas à duas condições distintas de diluição: 1) látex em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) e 2) látex em água ultrapura (1:1 v/v). As amostras diluídas, juntamente com uma amostra de látex não diluído foram armazenadas nas temperaturas de: 1) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (freezer), 2) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (geladeira) e 3) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente). Em intervalos de 5 dias, foram retiradas alíquotas das amostras armazenadas, por um período total de 25 dias, tempo suficiente para o transporte das amostras a partir das áreas produtoras até os laboratórios. As alíquotas foram, então, submetidas a extração do dsRNA (item 3.2.2).

3.3 EXTRAÇÃO DO dsRNA A PARTIR DOS TECIDOS VEGETAIS

Os procedimentos de extração do dsRNA a partir dos tecidos do mamoeiro basearam-se na metodologia descrita por Dodds e Joseph (1983) e por Valverde (1990) (Figura 4), com modificações.

3.3.1 Método cromatográfico

Em nitrogênio líquido, foram triturados 3,0 g de tecidos de frutos de mamão. O macerado foi depositado em tubo de 15 ml, contendo 4,0 ml de tampão STE (NaCl 0,1 M; Tris 0,05 M; EDTA 1 mM) pH 6,8, 0,5 ml de SDS 10% e 4,5 ml de fenol saturado

com STE:clorofórmio (2:1 v/v). A amostra foi agitada por 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. À fase aquosa coletada, contendo os ácidos nucleicos totais, foi adicionado EtOH absoluto, para uma concentração final de 16% (v/v). A amostra foi, então, submetida a uma coluna cromatográfica de celulose, após a drenagem dos 15 ml de STE/EtOH 16% (v/v) utilizados para o empacotamento da fase fixa (1,5 g de celulose) da coluna, em seringa de vidro. Em seguida, a matriz de celulose foi lavada com 40 ml de STE/EtOH 16% (v/v), liberando o DNA e RNA do mamoeiro, que foram descartados. As moléculas de dsRNA foram liberadas após a lavagem da matriz com 5 ml de STE. Este volume foi coletado e corresponde à amostra final.

À amostra final foi adicionado EtOH absoluto para uma concentração final de 16% (v/v), repetido-se o passo de cromatografia, em uma segunda coluna. Os ácidos nucleicos presentes na amostra final, coletada a partir da segunda coluna, foram precipitados após a adição de 2 v de EtOH absoluto gelado e 250 μl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 hrs. A amostra foi centrifugada a 4.000 rpm por 3 hrs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o precipitado resultante foi lavado com EtOH 70% e ressuspenso em 15 μl de tampão para DNase.

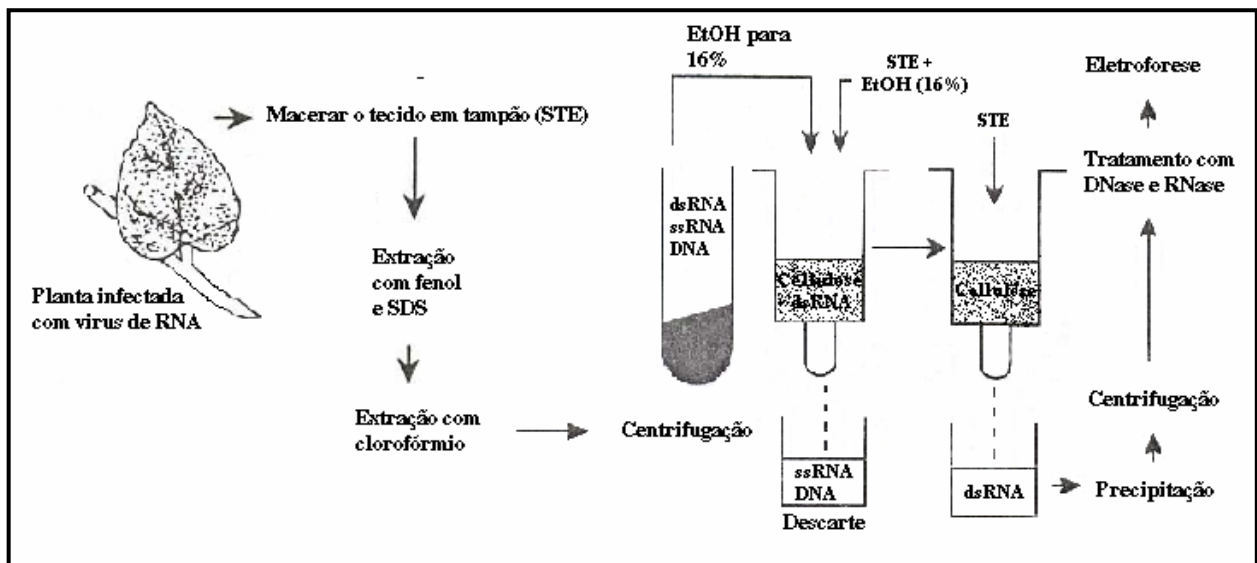


Figura 4 – Representação esquemática do procedimento de extração de dsRNA pelo método cromatográfico, a partir de tecidos vegetais (DODDS; JOSEPH, 1983; VALVERDE, 1990).

3.3.2 Método proposto neste trabalho

O procedimento de extração encontra-se esquematizado na Figura 5. Em nitrogênio líquido, foi triturado 0,5 g de tecidos da planta. O macerado foi depositado em microtubo de 1,5 ml, contendo 450 μ l de STE (item 3.3.1), 50 μ l SDS 10% e 500 μ l fenol saturado com STE/clorofórmio (2:1 v/v). Não foi possível triturar completamente as amostras provenientes da raiz e do caule, o que dificulta a extração dos ácidos nucleicos destes tecidos. Dessa forma, as amostras foram submetidas a um choque térmico, em que eram submetidas a um tratamento a 65 °C por 4 min, seguido de um rápido resfriamento em nitrogênio líquido, por alguns segundos, até que formassem cristais de fenol. Todas as amostras foram agitadas por 30 min a -20 °C e centrifugadas, posteriormente, a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C. Foram feitas mais duas extrações, uma utilizando fenol e clorofórmio e outra, utilizando apenas clorofórmio. Os ácidos nucleicos totais presentes na fase aquosa coletada foram precipitados, à baixas temperatura, após a adição de 100 μ l de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1,0 ml de EtOH absoluto, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 1 h a 4 °C. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em 15 μ l de tampão para DNase ou RNase ou em água ultra-pura.

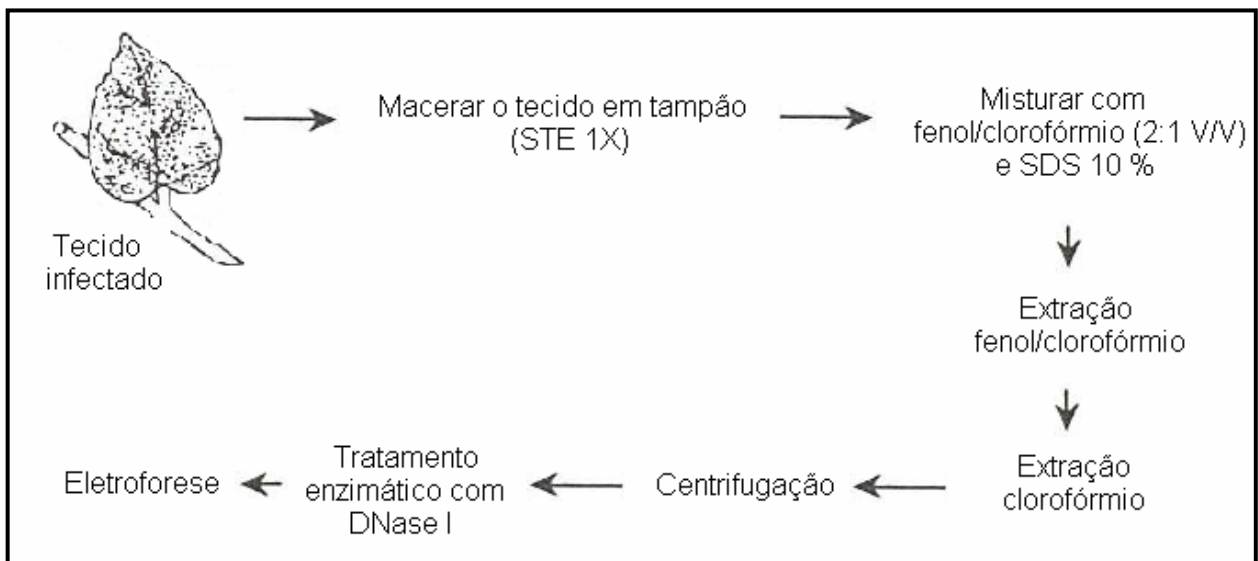


Figura 5 – Representação esquemática do procedimento proposto neste trabalho para a extração de dsRNA do PMeV a partir de tecidos do mamoeiro.

3.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

As amostras foram tratadas com DNase I visando a total degradação do material genético da planta. O tratamento com DNase I (Amersham Corp., USA) a $1,25 \cdot 10^{-3}$ U/ μ l foi feito em tampão para a DNase (Tris 40 mM pH 7,5; CaCl₂ 10 mM), durante 15 min a 37 °C. A seguir, procedeu-se um digestão com RNase A. Esta enzima possui alta especificidade para ssRNA (BOLAND, 1992), preservando o dsRNA do vírus. A digestão com RNase pancreática A (USB Corp., USA) a 2,5 U/ μ l foi feita em acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, por 15 min a 25 °C (SOUZA, 2002).

3.5 ANÁLISE POR ELETROFORESE HORIZONTAL

Após as etapas de extração e tratamento enzimático, os ácidos nucléicos provenientes do látex e tecidos do mamoeiro foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, diluído em tampão TAE (Tris 0,03 M; ácido acético glacial 0,01 M; EDTA 1 mM) pH 8,0, durante 45 min, com voltagem variando entre 80 e 100 V. Em cada poço do gel foram aplicados 10 μ l da amostra e 5,0 μ l de tampão de amostra (1 ml tampão MOPS (MOPS 0,03 M; NaOH 0,01 M; acetato de sódio 0,07 M; EDTA 1 mM), 1 ml de glicerol e azul de bromofenol 0,2 μ M). Foi utilizado um marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, USA). O gel foi corado com brometo de etídio (Sigma, USA) a 10 ng ml⁻¹, visualizado em transiluminador à 320 nm e fotografado, utilizando-se uma câmera fotográfica digital (Nikon Coolpix 885, S. Korea).

3.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DO PMeV

Foram avaliados 5 métodos de inoculação mecânica do PMeV, 4 desenvolvidos em casa de vegetação com tela anti-afídica e 1 em condições de campo. Em todos os tratamentos utilizou-se látex coletado a partir de plantas doentes, como fonte de inóculo para o PMeV. Em casa de vegetação, mudas do cv. Sunrise Solo, de 3 meses de idade,

plantadas em vasos de 8 kg, foram submetidas aos tratamentos: 1) cortes no limbo e 2) no pecíolo das folhas, utilizando uma lâmina de barbear, e 3) abrasão manual utilizando areia lavada. O látex exsudado sobre os ferimentos foi removido, seguido de aplicação abundante de látex infectado. Cerca de 100 µl de látex infectado foi também (método 4) injetado no ápice do caule, a diferentes profundidades (até aproximadamente 1 cm). Cinco plantas foram utilizadas em cada tratamento, enquanto outras cinco permaneceram não inoculadas, representando o controle negativo. A avaliação de ocorrência do dsRNA do PMeV foi feita a partir do látex (item 3.2.2) coletado a partir das plantas, a cada 15 dias, durante 90 dias.

Em um outro método, 5 plantas de 18 meses de idade, cultivadas em condições de campo, foram submetidas ao tratamento (método 5) de abrasão no caule, abaixo da coluna de frutos, com o auxílio de uma escada, similar às utilizadas durante a colheita dos frutos, seguido de aplicação de látex infectado. A partir das plantas inoculadas e de plantas não inoculadas (controle), foram retiradas alíquotas de látex, acima e abaixo do sítio de inoculação, 15 dias após a inoculação do látex. A análise do látex das plantas, coletado antes da inoculação, confirmou que elas estavam previamente sadias.

3.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSMISSÃO DO PMeV PELA MOSCA-BRANCA *T. variabilis*

Mamoeiros (cv. Sunrise Solo) de 13 meses de idade foram cultivados em casa de vegetação com tela anti-afídica. Um total de 32 plantas foi dividido em dois grupos: 1) 24 plantas inoculadas pela injeção de látex infectado (método de inoculação 4, item 3.6) e 2) 8 plantas não inoculadas (controle negativo) (Figura 6A). Um mês após a inoculação, as plantas foram infestadas com uma população de moscas-brancas *T. variabilis*, coletadas a partir de uma plantação de mamão sem ocorrência de meleira (Figura 6B). Trinta dias após a adição das moscas na casa de vegetação, três plantas sadias de cada um dos cultivares cv. Golden, cv. Sunrise Solo e cv. Taiwan foram adicionadas no mesmo local (Figura 6C). Vinte dias após a exposição dos cultivares, todas as plantas envolvidas tiveram alíquotas de látex coletadas, para a detecção do

dsRNA do PMeV (item 3.2.2). Moscas-brancas adultas, bem como as ninfas, presentes nas folhas de plantas inicialmente saudáveis ou de plantas inoculadas, foram coletadas e também submetidas à extração do dsRNA (item 3.3.2).

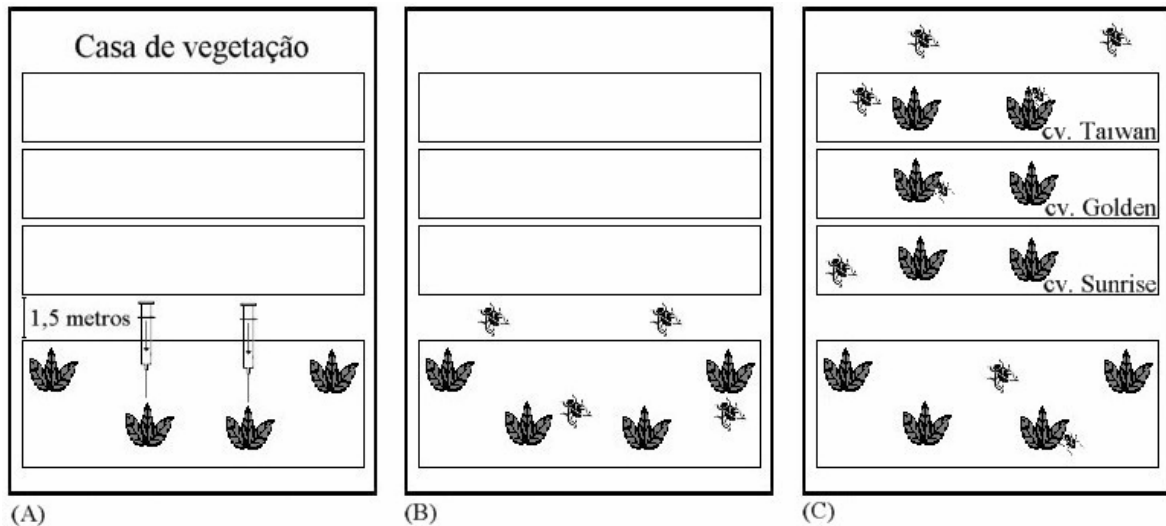


Figura 6: Representação esquemática do experimento de transmissão do PMeV pela mosca-branca *T. variabilis*. (A) Plantas inoculadas e plantas não inoculadas. (B) Infestação com *T. variabilis* aos 30 dias pós-inoculação. (C) Exposição de plantas saudáveis (cv. Taiwan, cv. Golden e cv. Sunrise) às moscas-brancas, aos 30 dias pós-infestação. Os adultos e ninfas e as plantas foram amostradas e analisadas quanto à presença do dsRNA, 20 dias após a adição das plantas saudáveis.

3.8 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO: ANÁLISE DO LÁTEX

Em experimento de campo, as plantas foram acompanhadas e mapeadas mensalmente quanto à ocorrência da meleira. Algumas plantas foram inoculadas através da injeção de látex infectado (método de inoculação 4, item 3.6), enquanto outras se tornaram doentes, naturalmente. Amostras de látex foram, então, coletadas a partir de mamoeiros com diferentes períodos pós-inoculação, e mamoeiros com diferentes períodos após a manifestação dos primeiros sintomas de meleira. Uma alíquota de 100

µl de látex foi coletada e armazenada em micro tubo contendo 100 µl de tampão citrato pH 5,0, após seccionar os tecidos de plantas com 30 e 45 dias pós-inoculação e plantas com 45 dias, 3, 6 e 12 meses após a manifestação dos sintomas da doença. O látex foi amostrado a partir dos órgãos: folhas novas, folhas completamente expandidas, folhas velhas, flores, frutos novos, frutos do meio da coluna de frutificação, frutos velhos, caule abaixo da coluna de frutos (30-40 cm), caule a 15-20 cm acima do solo e raízes. As amostras foram, então, submetidas à extração do dsRNA do PMeV (item 3.2.2).

3.9 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV NA PLANTA: ANÁLISE DOS TECIDOS

Foram coletados, a partir de mamoeiros com 12 meses de idade, manifestando os sintomas da meleira, tecidos do ápice do caule (camadas interna e externa), tecidos do caule abaixo da coluna de frutos (caule subdividido em 5 camadas, em corte transversal¹), flores, frutos (casca e mesocarpo) e folhas (pecíolo, limbo e nervuras primárias e secundárias). Estes tecidos foram submetidos à extração do dsRNA (item 3.3.2).

As sementes dos frutos foram também avaliadas, após serem divididas em carúncula, sarcotesta, envoltório seminal, hipocótilo, cotilédones e endosperma (Figura 7). A carúncula é responsável por conectar a semente ao endocarpo, enquanto que a sarcotesta é um tecido membranoso, rico em mucilagem, que reveste o envoltório seminal. O envoltório seminal, por sua vez, é uma camada rígida, composta, principalmente, por polissacarídeos. Considerando o elevado teor de açúcares nas sementes, optou-se pelo método de extração utilizando CTAB, no qual 0,5 g do tecido foi triturado em nitrogênio líquido, sendo o pó adicionado a 1 ml de tampão de extração (CTAB 1%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM pH 6,8; PVP 1%), à 65 °C (DOYLE; DOYLE, 1990). Às amostras foi adicionado b-mercaptoetanol 0,1% no momento do uso. Os polissacarídeos presentes na sarcostata e na carúncula da semente foram removidos utilizando-se NaCl 4,4 M no tampão de extração, conforme sugerido por Tel-Zur e outros (1999), para tecidos ricos em polissacarídeos. As

¹ A composição tecidual dessas camadas foi estimada por microscopia óptica (item 3.14.1).

amostras foram aquecidas à 65 °C por 30 min e centrifugadas, posteriormente, a 14,000 rpm por 5 min à 4 °C. Em seguida, foram feitas 3 extrações utilizando clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Os ácidos nucléicos totais presentes na fase aquosa, coletada após a extração, foram submetidos à precipitação com 100 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1 ml de EtOH absoluto gelado à -20 °C. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em 15 µl de tampão para DNase e submetido ao tratamento enzimático (item 3.4) e eletroforese (item 3.5).

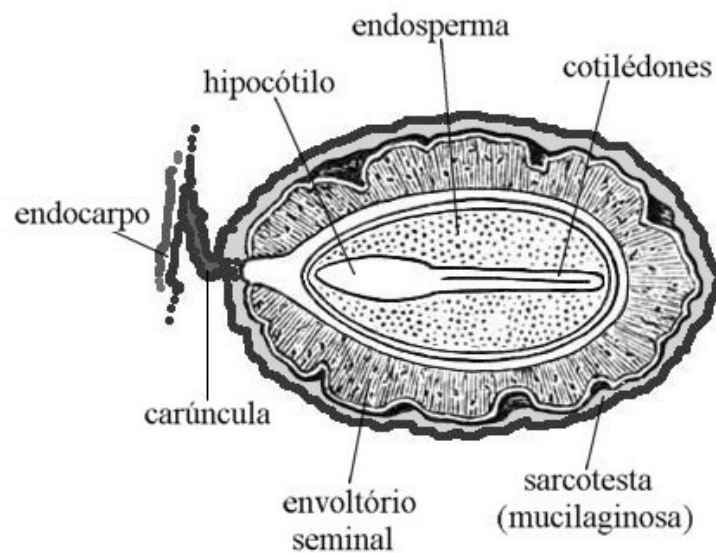


Figura 7 – Representação esquemática das partes da semente do mamoeiro em corte longitudinal.

3.10 ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO LÁTEX

O látex do mamoeiro foi submetido aos testes de coloração temporária (KRAUS; ARDUIN, 1997) descritos abaixo, seguido de observação ao microscópio óptico (Axioplan ZEISS).

3.10.1 Alcalóides

Foram determinados utilizando-se o reagente de Dragendorff (8 g de nitrato de bismuto foi diluído em 20 ml de ácido clorídrico seguido da adição de 22,7 ml de iodeto de potássio; a solução foi diluída com água destilada para um volume final de 100 ml). Uma alíquota de látex (100 μ l) foi submetida a 100 μ l do reagente de Dragendorff durante aproximadamente 1 min. A ocorrência de alcalóides foi identificada como uma coloração verde escura.

3.10.2 Açúcares redutores

Foi feito o teste de Fehling adicionando-se à 100 μ l de látex 100 μ l da solução de sulfato cúprico pentaidratado 0,8 M e hidróxido de sódio 2,5 M (1:1 v/v). A lâmina foi aquecida até a fervura, sendo os açúcares redutores identificados, posteriormente, como um precipitado vermelho-brilhante.

3.10.3 Amido

Adicionou-se à 100 μ l de látex, 100 μ l do reagente lugol (Iodeto de potássio 0,09 M; Iodo 0,01 M), sendo o amido identificado como uma cor marrom escuro, 5 min após a adição do corante.

3.10.4 Proteínas

O látex (100 μ l) foi corado utilizando-se 100 μ l do corante azul de coomassie brilhante (azul de coomassie brilhante 0,025%; metanol 40%; ácido acético 7%) durante aproximadamente 10 min. A ocorrência de proteínas no látex foi identificada como uma coloração azul.

3.10.5 Lipídeos

O látex (100 µl) foi corado utilizando-se 100 µl do reagente Sudan III (Sudan III 0,01 M em EtOH 80%). Aproximadamente 20 min após a adição do reagente, os lipídeos foram identificados como uma cor amarelo-alaranjado.

3.10.6 Compostos fenólicos

Adicionou-se à 100 µl de látex, 100 µl do reagente de cloreto férrico (carbonato de sódio 0,02 M; cloreto férrico hexaidratado 0,37 M). Após 2 min, os compostos fenólicos foram identificados como uma coloração verde escuro.

3.10.7 Cristais de oxalato de cálcio

O látex (100 µl) foi submetido, separadamente, a 100 µl de ácido clorídrico 10% ou 100 µl de ácido acético 10%. Os cristais são solúveis em ácido clorídrico e insolúveis em ácido acético.

3.11 DETECÇÃO DE H₂O₂ TECIDUAL UTILIZANDO DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINA)

A produção localizada de H₂O₂ foi observada em cortes transversais e longitudinais de tecidos frescos de pecíolos de folhas de mamoeiro do cultivar Golden. Os cortes permaneceram em placas de petri, contendo uma solução de DAB-HCl (Sigma, EUA) 2,5 mM pH 3,8, durante 12 hrs. Amostras controle foram mantidas apenas em água deionizada. Todas os cortes foram descorados em EtOH 96% fervente, por 20 min, e montados em glicerol 50%. As amostras foram analisadas e fotografadas, utilizando-se

um microscópio óptico, sendo a produção de H_2O_2 identificada como uma coloração marrom castanho.

3.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO LÁTEX

3.12.1 Teor de água

O látex (5 ml) foi pesado antes e após aquecimento a $70\text{ }^\circ\text{C}$, por 5 hrs.

3.12.2 pH

O valor de pH foi estimado a partir da fase aquosa do látex (5 ml) diluído em água ultrapura (2:1 v/v), após centrifugação a 8.000 rpm por 10 min à $25\text{ }^\circ\text{C}$.

3.12.3 Teor total de proteínas

Foi estimado utilizando-se o método de Lowry (1951). Uma alíquota de 1,0 ml de látex diluído em água ultrapura (1:1 v/v) foi adicionada a 5,0 ml de reagente de cobre (48 ml de carbonato de sódio 3% em hidróxido de sódio 0,1 M; 1,0 ml de tartarato de sódio e potássio 4%; 1,0 ml de sulfato de cobre 2,0%). Após 10 min, foi adicionado 500 μl de reagente de Reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:2 v/v). Após 10 min, as amostras tiveram a absorbância estimada em espectrofotômetro à 660 nm. A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada utilizando-se uma curva padrão (25, 50, 100, 150 μg) de albumina de soro bovino.

3.12.4 Teor total de açúcares

Foi estimado utilizando-se o método de Scott e Melvin (1954). O látex foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. Em 50 µl do sobrenadante foi adicionado 200 µl de água destilada e 2,5 ml de solução de antrona 0,2%. As amostras foram incubadas em banho-maria à 100 °C, durante 10 min. Após serem resfriadas, no escuro, durante aproximadamente 20 min, as amostras tiveram a absorvância estimada em espectrofotômetro à 620 nm. O teor total de açúcares presente em cada amostra foi determinado utilizando-se uma curva padrão (50, 100, 150 e 200 µg) de glicose.

Para a determinação do teor de sacarose de cada amostra, o látex foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. Em 50 µl do sobrenadante foi adicionado 300 µl de água destilada, 100 µl de KOH 5,4 M e 3,0 ml de uma solução de antrona 0,2%. Após 10 min, as amostras tiveram a absorvância estimada em espectrofotômetro à 620 nm. O teor sacarose presente em cada amostra foi determinado utilizando-se uma curva padrão (50, 100, 150 e 200 µg) de sacarose.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NO LÁTEX

Os elementos químicos foram quantificados por espectroscopia de absorção atômica, utilizando-se meios de extração específicos para cada elemento: Mehlich n°1, para fósforo (P), potássio (K), ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn); solução de cloreto de potássio (KCl) 1 M, para cálcio (Ca) e magnésio (Mg); água quente, para boro (B); solução de fosfato de amônio monobásico e ácido acético, para enxofre (S).

3.14 ANÁLISES MICROSCÓPICAS DO LÁTEX E TECIDOS DA PLANTA

3.14.1 Microscopia óptica

A partir da observação direta dos tecidos do caule do mamoeiro, de 12 meses de idade, em corte transversal, foram identificadas cinco diferentes camadas. Os tecidos destas camadas foram separados e analisados quanto à presença do dsRNA (item 3.9). A estimativa dos tecidos presentes nestas camadas foi feita a partir do caule de uma muda de mamoeiro com, aproximadamente, 3 meses de idade, sadia. Foram obtidos cortes a fresco, submetidos, posteriormente, à clarificação, por 3 min, utilizando-se uma solução de hipoclorito de sódio (2:1 v/v). Em seguida, os cortes foram submetidos aos seguintes tratamentos: água destilada (2x), por 5 min; EtOH 30%, por 10 min; EtOH 50%, por 10 min; solução contendo safranina 1% (p:v) e azul de anilina 1% (p:v), por 5 min; série de EtOH 70%, 80%, 90%, 100%, por 10 min cada; série de EtOH 100% e xilol (3:1), (1:1) e (1:3) (v/v), por 10 min cada; xilol puro (2x), por 10 min. As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá (Merck, BR) e armazenadas em estufa a 65 °C, por 24 hrs. Os tecidos foram observados e fotografados ao microscópio óptico.

3.14.2 Microscopia eletrônica

Amostras de látex foram coletadas a partir de mamoeiros com meleira e de mamoeiros sadios. Alíquotas de látex, previamente diluído (1:1 v/v) em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,4, foram fixadas em uma mistura contendo formaldeído 4%, glutaraldeído 2.5% e tampão cacodilato 0,05 M pH 7,4, por aproximadamente 12 hrs à 5 °C. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% e desidratadas em percentuais crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 100% e acetona ultra-seca).

O látex foi submetido à análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio ZEISS modelo DSEM962, após ponto crítico das amostras fixadas e desidratadas, com CO_2 e cobertura destas com uma camada de ouro.

Adicionalmente, 100 µl de látex fresco foi aplicada sobre uma fita de carbono, que permaneceu sobre a bancada até a secagem. As amostras foram, então, submetidas a uma avaliação qualitativa dos elementos químicos presentes, através de micro análise de raio-x, com a voltagem do microscópio eletrônico de varredura variando entre 20 e 25 KV.

Adicionalmente, foram feitas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em secções ultrafinas do látex fixado e desidratado. Para isso, as amostras sofreram inclusão em Epon, foram cortadas com o auxílio de um ultramicrotomo com faca de diamante, e, posteriormente, analisadas e fotografadas em microscópio ZEISS modelo EM900.

3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados resultantes da quantificação dos compostos bioquímicos e dos elementos químicos (itens 3.12 e 3.13) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias de cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey. As letras diferentes indicam que as médias foram estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 DIAGNÓSTICO DO PMeV

4.1.1 Extração do dsRNA a partir do látex

O látex sofre um processo de polimerização quando exsudado a partir da planta (MOUTIM et al, 1999), o que dificulta a sua manipulação em laboratório, mesmo para as amostras mais fluidas, coletadas a partir de mamoeiros com meleira. Visando manter a fluidez do látex, as amostras foram diluídas em tampão fosfato pH 6,0 ou tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) ou metabissulfito de sódio 2% (p/v). Este último tratamento é conhecido por induzir a fluidez do látex de mamão através de um mecanismo ainda não compreendido (MELO; RUGGIERO, 1988). Após os três tratamentos, todas as amostras de látex avaliadas tiveram a sua fluidez mantida em proporções suficientes para manipulações posteriores.

Uma alíquota de cada amostra de látex diluído foi aplicada diretamente no gel de agarose, objetivando avaliar a influência dos tratamentos sobre a manutenção da integridade dos ácidos nucleicos presentes no látex. Entretanto, observou-se que para algumas amostras parte dos ácidos nucleicos permaneceu retido no poço do gel e para todas as amostras não é possível observar uma banda única correspondente ao genoma viral, mas sim um arraste (Figura 8). Este arraste pode ser referente a degradação dos ácidos nucleicos ou por uma forte ligação destes com polímeros do látex. Desta forma, procedeu-se a extração dos ácidos nucleicos do látex com solventes orgânicos, seguida de eletroforese. Com este procedimento uma única banda de ácidos nucleicos foi observada a partir da amostra de látex diluída em tampão citrato (Figura 8). Por outro lado, os ácidos nucleicos extraídos a partir do látex tratado com tampão fosfato pH 6,0 ou metabissulfito de sódio 2%, apresentaram migração irregular no gel (Figura 8). Esses resultados indicam que o tampão citrato pH 5,0 permite um resgate mais eficiente dos ácidos nucleicos presentes no látex de mamoeiros com meleira.

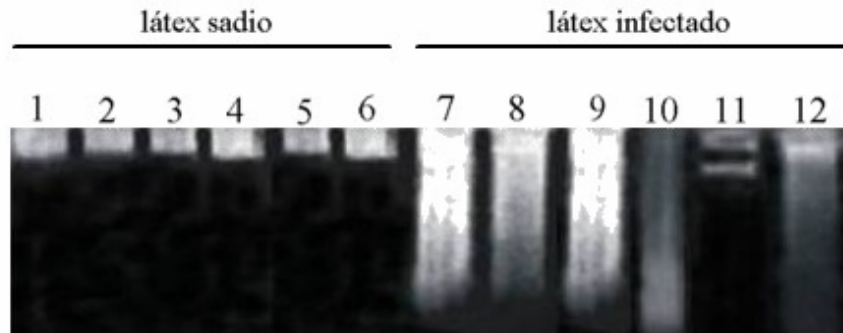


Figura 8 - Avaliação de diferentes tratamentos sobre a integridade de ácidos nucléicos presentes no látex do mamoeiro e extração destes ácidos nucléicos, utilizando-se solventes orgânicos. Amostras de látex diluído em tampão fosfato pH 6,0 foram aplicadas diretamente no gel de agarose a 1% (1 e 7) ou foram submetidas à extração com solventes orgânicos antes da aplicação (4 e 10). O mesmo procedimento foi feito para as amostras diluídas em tampão citrato pH 5,0 (2 e 8; 5 e 11) e em metabissulfito de sódio 2% (3 e 9; 6 e 12).

A natureza dos ácidos nucléicos extraídos após a diluição do látex infectado em tampão citrato pH 5,0 foi determinada através do tratamento com as enzimas DNase I e RNase A. O tratamento com a DNase é responsável pela degradação do DNA da planta, enquanto que o tratamento com a RNase degrada, especificamente, RNA fita simples (ssRNA). Desta forma, os ácidos nucléicos que resistem ao tratamento à ambas as enzimas podem ser considerados como RNA fita dupla (dsRNA). Tal resistência foi observada para os ácidos nucléicos extraídos a partir do látex das plantas com meleira. Eles formaram uma banda no gel de eletroforese com um peso molecular aproximado a 12 kbp, semelhante ao observado para o PMeV (Figura 9) (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003). O tratamento com a RNase resultou em fragmentos de tamanho irregular, entre 1 e 4 kbp (Figura 9), indicando uma resistência parcial à esta enzima. Portanto, a banda formada por ácidos nucléicos extraídos à partir do látex de plantas com meleira é composta por moléculas de dsRNA com aproximadamente 12 kbp, semelhante ao descrito para o genoma do PMeV (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003).

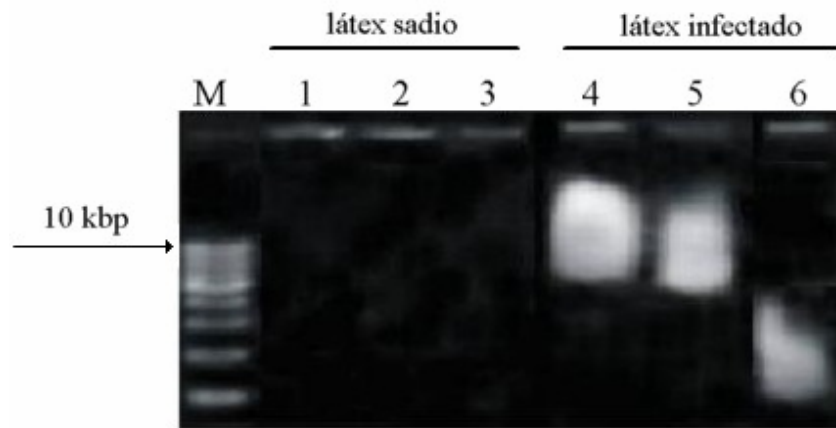


Figura 9 - Tratamento enzimático dos ácidos nucléicos extraídos a partir do látex de mamoeiro com meleira. Ácidos nucléicos não tratados (4) ou tratados com DNase (5) e com RNase (6) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Foi utilizado um marcador de peso molecular de “escada” em 1 kbp (1 kbp DNA ladder) (M).

4.1.2 Avaliação das condições de armazenamento do látex

Objetivando avaliar o efeito do tempo de armazenamento do látex sobre a integridade do dsRNA, amostras de látex diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) ou em água ultrapura (1:1 v/v) e látex puro foram armazenadas sob diferentes temperaturas (25 °C, 5 °C ou -20 °C), durante 25 dias. Em intervalos de cinco dias, o dsRNA presente em cada amostra foi extraído procedendo-se de acordo com o método de extração proposto neste trabalho, e analisado em gel de eletroforese. Para todas as amostras mantidas à 25 °C, foi observada uma degradação progressiva do dsRNA, que desapareceu quase totalmente ao final do experimento (Figura 10).

Diferentemente, todas as amostras armazenadas às temperaturas de 5 °C ou -20 °C tiveram a integridade do dsRNA preservada durante os 25 dias de avaliação. Comparando os tratamentos tampão citrato pH 5,0, água ultrapura e látex puro, observou-se que as amostras diluídas em tampão citrato pH 5,0 e armazenadas a baixas temperaturas (5 °C ou -20 °C) apresentaram um padrão de bandamento mais intenso, sendo os melhores resultados obtidos com o armazenamento à -20 °C (Figura 10). Estes resultados indicam que o dsRNA presente no látex diluído em tampão citrato

pH 5,0 (1:1 v/v) e armazenado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ é preservado durante 25 dias após a coleta, sem comprometer a sensibilidade do método de diagnóstico do PMeV.

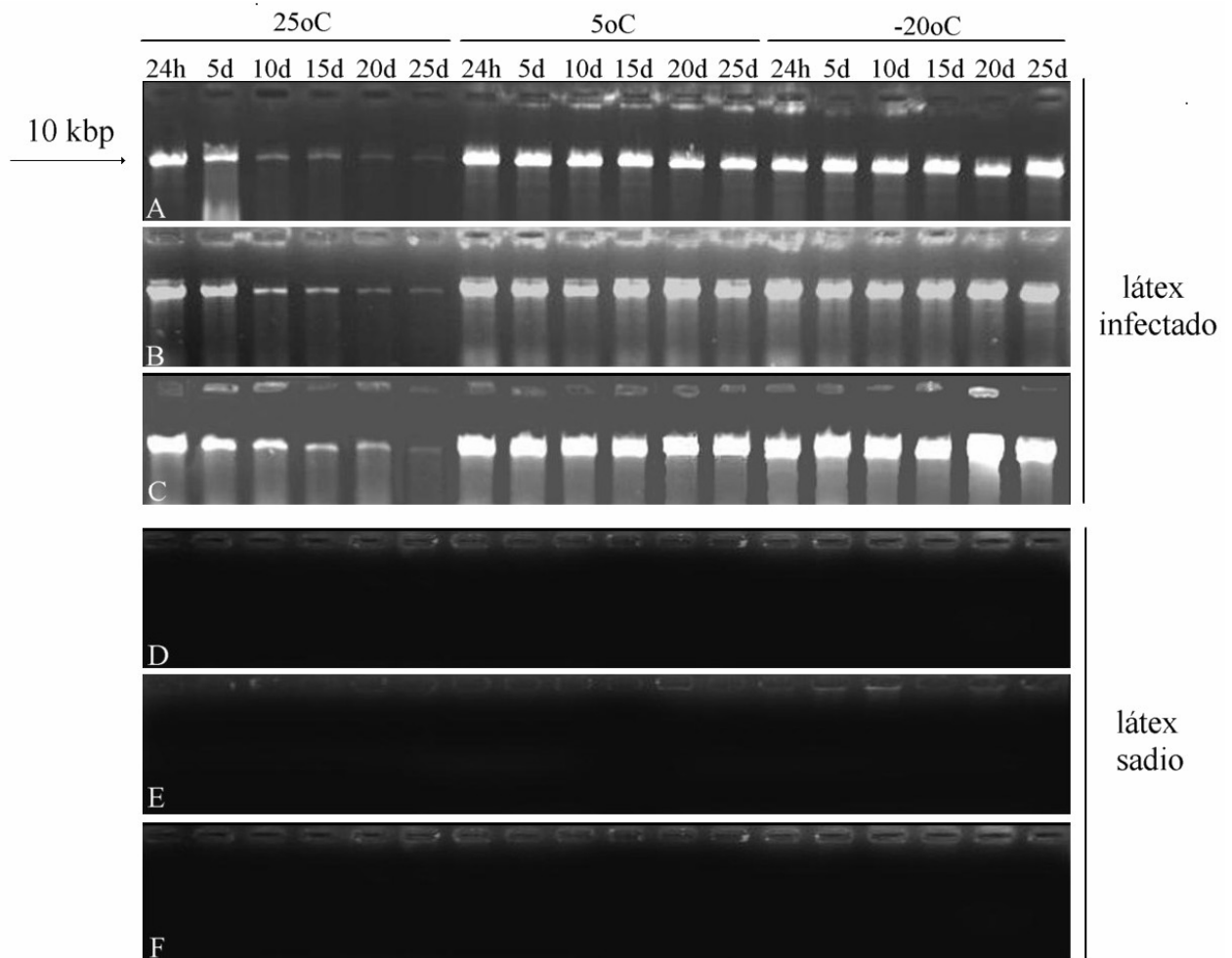


Figura 10 - Avaliação das condições de diluição e do tempo de armazenamento do látex sobre a integridade do dsRNA do PMeV. Ácidos nucleicos extraídos a partir de amostras de látex puro (A), látex diluído em água ultrapura (B) ou em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) (C), que permaneceram armazenadas sob à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 25 dias. h: horas, d: dias.

Observou-se, em várias amostras de plantas com meleira, o aparecimento de uma banda extra no gel, de aproximadamente 14 kbp (Figura 11). Em plantas com alta carga viral, ocorreu uma fusão das duas bandas no gel. Mesmo nestes casos, uma separação satisfatória entre as duas bandas foi obtida desenvolvendo-se a eletroforese a 80 V. A natureza dos ácidos nucleicos que compunham a banda de 14 kbp confirmou-se ser de DNA genômico do mamoeiro, já que ela foi completamente degradada após o tratamento com a enzima DNase I (Figura 11).

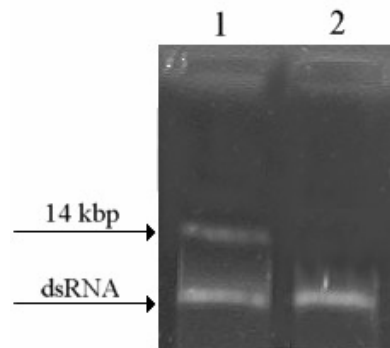


Figura 11 - Ácidos nucleicos extraídos a partir do látex de mamoeiro com meleira e tratamento destes com DNase I. Ácidos nucleicos totais sem tratamento (1) ou submetidos ao tratamento com DNase (2) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.1.3 Extração do dsRNA a partir dos tecidos vegetais

4.1.3.1 Método cromatográfico

O método cromatográfico proposto por Dodds e Joseph (1983) e por Valverde (1990) baseia-se na extração dos ácidos nucleicos totais, seguida da separação destes por cromatografia de celulose. Esta separação está relacionada com um comportamento diferencial de moléculas de dsRNA em meio alcoólico, condição esta que retém, preferencialmente, o dsRNA na matriz de celulose, em detrimento dos demais ácidos nucleicos (DNA e ssRNA). Os ácidos nucleicos indesejados podem ser eliminados

lavando-se a coluna com um tampão contendo EtOH. Após sucessivas lavagens, o dsRNA purificado pode ser, então, liberado da matriz de celulose utilizando-se o tampão sem o EtOH.

Durante os experimentos, visando determinar a eficiência da coluna cromatográfica de celulose na eliminação dos ácidos nucléicos indesejados, uma alíquota do tampão alcoólico utilizado durante o início e o final da lavagem da coluna foi submetida à precipitação dos ácidos nucléicos, seguida de eletroforese. Nas amostras equivalentes ao início da lavagem, observou-se um arraste de DNA e RNA, com diferentes pesos moleculares (Figura 12). Estes ácidos nucléicos estiveram praticamente ausentes na alíquota do tampão utilizado no final da lavagem, indicando o funcionamento correto da coluna para a eliminação do DNA e RNA do mamoeiro. Para cada amostra foram utilizados dois ciclos de cromatografia, sendo os ácidos nucléicos purificados submetidos, posteriormente, a um tratamento simultâneo com as enzimas DNase I e RNase A. Como resultado, observou-se para as amostras provenientes de frutos doentes uma banda de 12 kbp, equivalente ao dsRNA do PMeV (Figura 12). Este resultado não foi observado para as amostras provenientes de frutos sadios (Figura 12).

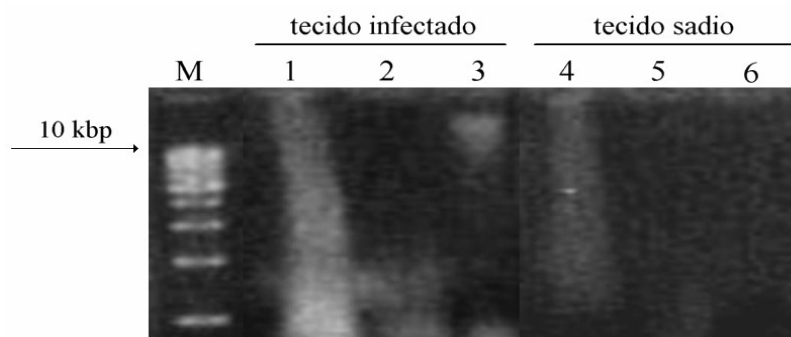


Figura 12 - Extração de dsRNA à partir dos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o método cromatográfico. Alíquotas do tampão alcoólico utilizado no início (1 e 4) e no final (2 e 5) da lavagem da coluna de cromatografia tiveram os ácidos nucléicos presentes precipitados e separados por eletroforese. O dsRNA foi liberado da coluna utilizando-se tampão sem EtOH. Após a precipitação, o ácido nucléico foi tratado simultaneamente com DNase e RNase, seguido de eletroforese (3 e 6). M: marcador de peso molecular de 1 kbp.

4.1.3.2 Método proposto neste trabalho

Com o objetivo de simplificar o método cromatográfico de extração de dsRNA, foram feitas algumas alterações no protocolo original: o volume inicial de extração foi reduzido de 9,0 ml para 1,0 ml e os dois passos de cromatografia foram excluídos. Após a extração total de ácidos nucleicos utilizando-se tecidos do fruto, as amostras foram submetidas ao tratamento simultâneo com DNase I e RNase A, seguido de eletroforese. Os ácidos nucleicos extraídos a partir de frutos doentes formaram duas bandas no gel de eletroforese, uma de 12 kbp e outra de 14 kbp (Figura 13). Após o tratamento com as enzimas, somente a banda de 12 kbp foi preservada, indicando a presença do dsRNA do PMeV (Figura 13). Os ácidos nucleicos extraídos a partir de frutos saudáveis, entretanto, formaram uma banda de 14 kbp, que foi completamente degradada após o tratamento com DNase I, demonstrando tratar-se do DNA da planta (Figura 13). Através deste método de extração, um número aproximado de 30 amostras era processado, normalmente, em um único dia de trabalho, indicando o seu potencial para o uso em larga escala.

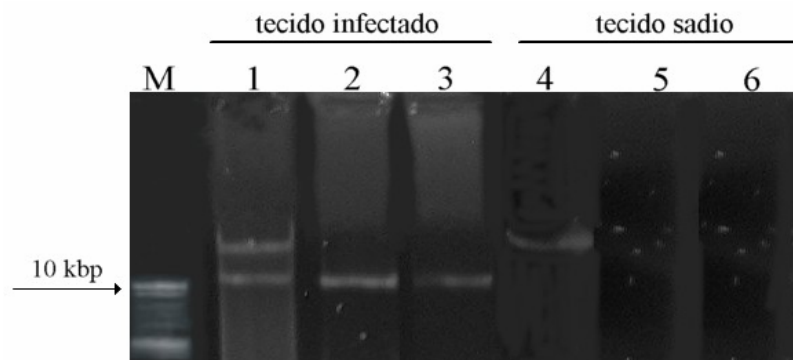


Figura 13 - Extração de dsRNA à partir dos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o método proposto neste trabalho. Tecidos do fruto do mamoeiro foram submetidos à extração de ácidos nucleicos totais, sendo estes ácidos nucleicos diluídos em água (1 e 4), tratados com DNase (2 e 5) ou com DNase e RNase (3 e 6) e separados por eletroforese em gel de agarose. M: marcador de peso molecular de 1 kbp.

4.2 TRANSMISSÃO DO PMeV

4.2.1 Avaliação de diferentes métodos de inoculação

As viroses de planta podem ser propagadas por mecanismos naturais ou artificiais de transmissão. Observações de campo demonstram que, em alguns casos, os mamoeiros infectados pelo PMeV apresentam distribuição agregada na plantação, sugerindo que a transmissão do vírus dentro do pomar ocorra, artificialmente, ao longo das linhas de plantio, através de ferimentos provocados durante o manejo da cultura (VENTURA et al., 2003). O papel dos ferimentos na transmissão do PMeV foi avaliado utilizando-se mudas de mamão mantidas em casa de vegetação ou plantas adultas, no campo.

As mudas foram submetidas à quatro métodos de inoculação diferentes. As folhas das plantas foram lesionadas através de cortes no limbo (1) e no pecíolo (2), além de abrasão no limbo com areia (3), seguidos de inoculação do látex infectado. Foi avaliada também a injeção direta de látex infectado no ápice do caule (4). Todas as mudas tiveram alíquotas de látex coletadas em intervalos de quinze dias, durante um período total de 90 dias. O látex foi, então, submetido à extração do dsRNA, seguido de eletroforese. A banda de 12 kbp equivalente ao dsRNA do PMeV não foi observada no gel para as amostras correspondentes às mudas que sofreram os ferimentos de corte ou abrasão nas folhas. Resultado semelhante foi obtido para as mudas não inoculadas, utilizadas como controle negativo (Figura 14). Por outro lado, o dsRNA foi extraído a partir das mudas que sofreram a injeção de látex infectado no ápice do caule (Figura 14). Entre as cinco plantas injetadas com o látex, uma apresentou o dsRNA quinze dias pós-inoculação, enquanto outras duas apresentaram o ácido nucléico trinta dias pós-inoculação, totalizando três plantas infectadas pelo PMeV. A intensidade da banda foi crescente ao longo dos noventa dias de experimento, para as três plantas infectadas (Figura 14).

Em condições de campo, cinco plantas adultas sofreram abrasão no caule, com o auxílio de uma escada semelhante às utilizadas durante a colheita dos frutos, seguida de inoculação de látex infectado. Quinze dias pós-inoculação, o látex das plantas foi

coletado acima e abaixo do sítio de inoculação e submetido à extração e análise do dsRNA. As plantas inoculadas permaneceram não infectadas após os quinze dias de avaliação, resultado evidenciado pela ausência do dsRNA no látex das plantas, similar ao observado para o controle negativo (Figura 14).

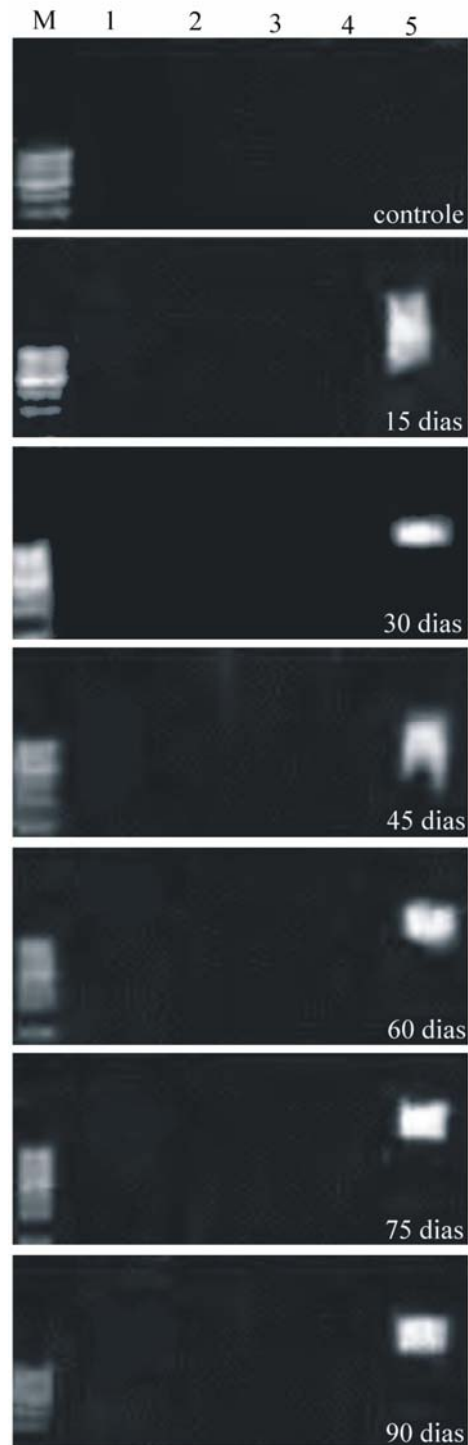


Figura 14 - Avaliação de diferentes métodos de inoculação do PMeV através de ferimentos nos tecidos das plantas. Plantas controle permaneceram não inoculadas (1). O látex de plantas com meleira foi aplicado sobre cortes no limbo (2) ou no pecíolo (3) da folha ou sobre a folha lesionada com areia (4). Outras plantas sofreram a injeção direta de látex infectado no ápice do caule (5). Amostras de látex coletadas no momento da inoculação (controle) ou 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias pós-inoculação foram submetidas à extração de ácidos nucléicos, seguido de eletroforese. M: marcador de peso molecular de 1 kb.

4.2.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSMISSÃO DO P_{MeV} PELA MOSCA-BRANCA *T. variabilis*

A transmissão natural do P_{MeV} provavelmente ocorre através de vetores, como observado para a maioria dos vírus de planta. Foi demonstrado que a mosca branca *B. tabaci* é capaz de transmitir o P_{MeV} sob condições controladas (VIDAL et al., 2003). Contudo, não pode ser descartado o envolvimento de outros insetos na transmissão deste vírus, considerando a diversidade das espécies que ocorrem na cultura do mamão (LIMA et al., 2003). Entre essas espécies, uma importância particular tem sido atribuída à mosca branca *T. variabilis*.

A capacidade de transmissão do P_{MeV} pela mosca *T. variabilis* foi avaliada utilizando-se mamoeiros do cv. Sunrise Solo, mantidos em casa de vegetação protegida contra afídeos. As plantas foram divididas em dois grupos: plantas inoculadas pela injeção de látex infectado e plantas não inoculadas (Figura 6). Um mês após a inoculação, as plantas foram infestadas com uma população de moscas brancas *T. variabilis*. Trinta dias após a adição das moscas na casa de vegetação, mamoeiros sadios de diferentes cultivares (cv. Golden, cv. Sunrise Solo e cv. Taiwan), foram expostos às moscas, durante vinte dias. As plantas envolvidas foram, então, avaliadas quanto à infecção pelo P_{MeV}, através da extração do dsRNA do vírus a partir de alíquotas de látex, seguida de eletroforese. As moscas brancas adultas e as ninfas presentes nas folhas de plantas inicialmente sadias ou de plantas inoculadas foram coletadas e também submetidas à extração do dsRNA. Entre as plantas avaliadas, a banda de dsRNA foi observada nas amostras correspondentes às plantas inoculadas com látex infectado, no início do experimento (Figura 15), confirmado o estabelecimento da infecção. Essas plantas representaram uma fonte de inóculo para o P_{MeV} ao longo do experimento. Entretanto, o dsRNA não foi extraído a partir das amostras de látex provenientes dos três cultivares de mamoeiros sadios, que foram expostos na casa de vegetação (Figura 15). O mesmo foi observado para as amostras correspondentes às plantas sadias, que permaneceram expostas às moscas, ao longo de todo o experimento (Figuras 6 e 15).

As moscas brancas adultas submetidas à extração de ácidos nucleicos demonstraram a capacidade de adquirir o P_{MeV}, uma vez que o dsRNA foi extraído a partir destes

insetos (Figura 15). De forma semelhante, as ninfas, coletadas sobre as plantas infectadas através da inoculação com o látex, também apresentaram o dsRNA (Figura 15). Diferentemente, as ninfas coletadas sobre as plantas saudias não apresentaram o ácido nucléico (Figura 15). Pelos resultados obtidos a mosca-branca *T. variabilis* não foi eficiente para transmitir o PMeV para mamoeiros saudios sob condições controladas, embora seja capaz de adquirir o vírus a partir de mamoeiros infectados.

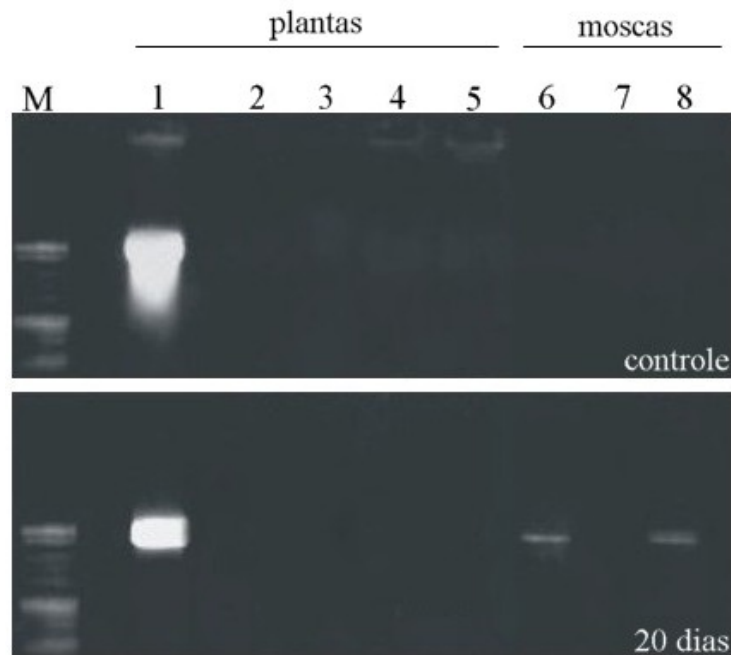


Figura 15 - Avaliação da capacidade de transmissão do PMeV para diferentes cultivares de mamoeiros pela mosca *T. variabilis*, sob condições controladas. Inicialmente, as plantas foram inoculadas com látex infectado (1) ou permaneceram não inoculadas (2). Após trinta dias, estas plantas foram infestadas com uma população de moscas *T. variabilis* e aos trinta dias pós-infestação, mamoeiros dos cultivares Taiwan (3), Golden (4) e Sunrise Solo (5) foram expostos na casa de vegetação. Todas as plantas tiveram alíquotas de látex coletadas vinte dias pós-exposição, sendo o látex coletado, submetido, posteriormente, à extração e análise do dsRNA do PMeV. Da mesma forma, as moscas adultas (6) e as ninfas coletadas sobre plantas infectadas pelo PMeV (8) e as ninfas coletadas sobre plantas não infectadas pelo vírus (7) foram analisadas quanto à presença do dsRNA.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM MAMOEIROS

4.3.1 Distribuição em diferentes fases da infecção

No campo, plantas mantidas em condições experimentais tiveram alíquotas de látex coletadas a partir de: folhas novas, folhas completamente expandidas, folhas velhas, flores, frutos novos, frutos do meio da coluna de frutificação, frutos velhos, caule abaixo da coluna de frutos (30-40 cm), caule a 15-20 cm acima do solo e raízes. Foram avaliadas plantas com 30 e 45 dias pós-inoculação de látex infectado e plantas com 45 dias, 3, 6 e 12 meses após a manifestação dos sintomas da meleira. Após extração do dsRNA presente nas amostras de látex, seguida de eletroforese, observou-se um perfil de bandas, indicando os órgãos e as fases da infecção nas quais o PMeV pôde ser detectado (Figura 16). A banda de dsRNA foi observada nas amostras provenientes de folhas jovens e flores de plantas com 30 e 45 dias pós-inoculação (Figura 16). Nas plantas com 45 dias, 3, 6 e 12 meses após a manifestação de sintomas, a banda de dsRNA foi observada em todas as amostras analisadas, exceto nas raízes (Figura 16). A coleta de látex no caule a 15-20 cm acima do solo não foi possível a partir das plantas com sintomas de meleira. Portanto, o PMeV se distribui, inicialmente, nos órgão próximos ao sítio de inoculação e ao longo de quase toda a planta, nos estágios mais avançados da infecção. Aparentemente, o vírus se concentra nos órgãos ricos em laticíferos, como caule e frutos, cujo látex apresentou bandas de dsRNA bastante intensas (Figura 16).

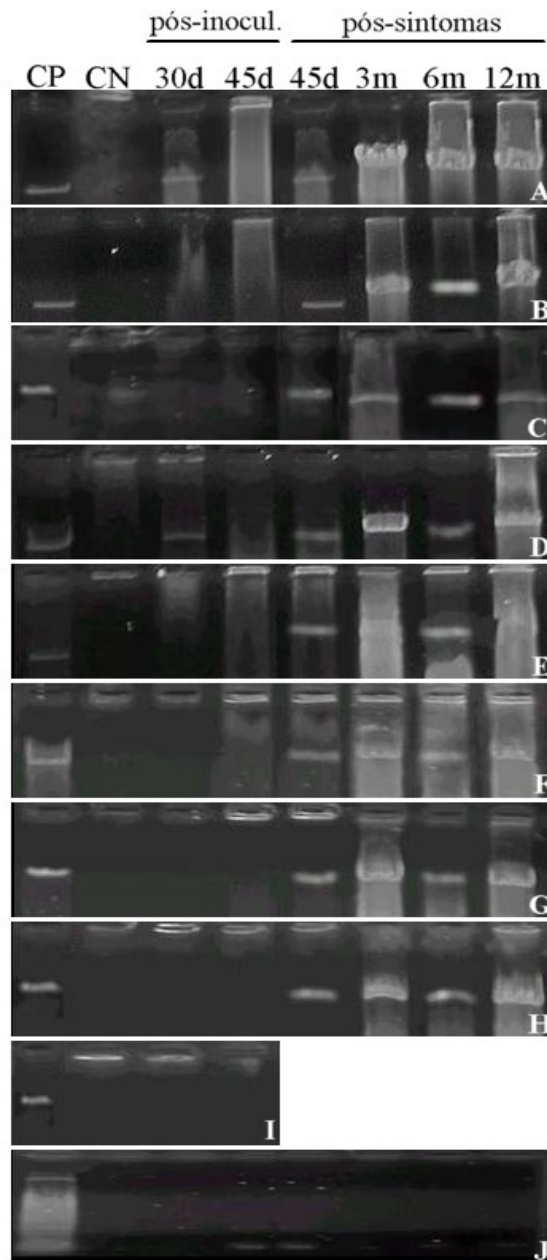


Figura 16 - Detecção do dsRNA do PMeV no látex coletado a partir de diferentes órgãos do mamoeiro, em diferentes fases da infecção. Alíquotas de látex foram coletadas a partir de folhas novas (A), folhas completamente expandidas (B), folhas velhas (C), flores (D), frutos novos (E), frutos do meio da coluna (F), frutos velhos (G), caule 30-40 cm abaixo da coluna de frutos (H), caule 15-20 cm acima do solo (I) e raiz (J) e submetidas à extração e análise do dsRNA do PMeV. O látex de plantas com meleira ou de plantas sadias foi utilizado como controle positivo (CP) ou negativo (CN), respectivamente. d: dias. m: meses.

4.3.2 Distribuição do vírus na planta: análise dos tecidos

Com o objetivo de confirmar os dados de distribuição do PMeV, obtidos após a análise do látex das plantas, os tecidos de mamoeiros com meleira foram analisados quanto a presença do dsRNA do PMeV. Tecidos do ápice do caule (camadas interna e externa), do caule abaixo da coluna de frutos (caule subdividido em 5 camadas, em corte transversal), de flores, de frutos (casca e mesocarpo) e de folhas (pecíolo, limbo e nervuras primárias e secundárias) foram submetidos à extração do dsRNA utilizando-se a metodologia proposta neste trabalho, seguida de eletroforese. A banda de 12 kbp composta pelo dsRNA foi observada em amostras correspondentes a tecidos de folhas, flores e frutos (casca e mesocarpo) (Figura 17). No caule, o vírus foi detectado em tecidos mais externos da região apical e nos tecidos mais internos da região da coluna de frutos ou abaixo desta coluna (Figura 17). Pode ser observado que as bandas de dsRNA mais intensas foram encontradas nos tecidos do caule e dos frutos (Figura 17). Estes resultados confirmam os dados de distribuição do PMeV em mamoeiros obtidos a partir da análise do látex, reforçando a idéia de que o vírus está presente em órgãos ricos em laticíferos.

Após subdividir o caule da planta em cinco camadas, na região abaixo da coluna de frutos, em corte transversal, foi observado que o dsRNA está presente nos tecidos correspondentes às camadas 2 e 3 (Figuras 18). Através de microscopia óptica, os tecidos presentes nestas camadas foram identificados como xilema, câmbio vascular e floema (Figura 18). Esaú (1976) descreve que os laticíferos de *C. papaya* estão distribuídos, principalmente, entre os tecidos do xilema e do floema, confirmando, portanto, a correlação positiva entre a ocorrência do PMeV e a presença dos laticíferos do mamoeiro.

Com o objetivo de avaliar a presença do PMeV nas sementes do mamoeiro, estas foram subdivididas em carúncula, sarcotesta e envoltório seminal. Considerando o elevado teor de polissacarídeos nas sementes, os ácidos nucléicos foram extraídos utilizando-se tampão de extração contendo o detergente CTAB, que facilita a eliminação de açúcares, seguido de tratamento com DNase e eletroforese. Os ácidos nucléicos totais formaram uma banda de peso molecular aproximado entre 14 kbp e 12 kbp no gel

(Figura 19). Contudo, após o tratamento enzimático, somente os ácidos nucleicos extraídos a partir de tecidos do pedúnculo demonstraram resistência à DNase (Figura 19). O peso molecular observado e a resistência à degradação pela DNase indicam tratar-se de moléculas de dsRNA. Portanto, entre as três regiões da semente avaliadas, o PMeV foi detectado apenas na carúncula.

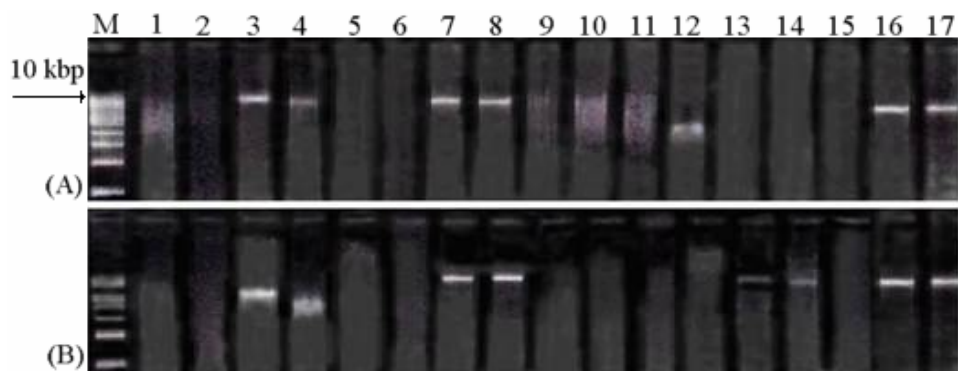


Figura 17 - Detecção do dsRNA do PMeV em diferentes tecidos de mamoeiros com meleira. Foi feita uma extração total de ácidos nucleicos (A), a partir de tecidos da raiz (1), tecidos internos do caule na coluna de frutos (2), tecidos externos do caule na coluna de frutos (3), tecidos internos do ápice do caule (4), tecidos externos do ápice do caule (5), tecidos internos do caule abaixo da coluna de frutos, subdivididos nas camadas C1 (6), C2 (7), C3 (8), C4 (9) e C5 (10), em corte transversal, nervuras primárias (11), nervuras secundárias (12), limbo foliar (13), flor (14), pecíolo (15), casca dos frutos (16) e mesocarpo dos frutos (17), seguida do tratamento destes com DNase I (B). Os ácidos nucleicos não tratados ou tratados com a enzima foram separados por eletroforese, utilizando-se um marcador de peso molecular de 1 kbp (M).

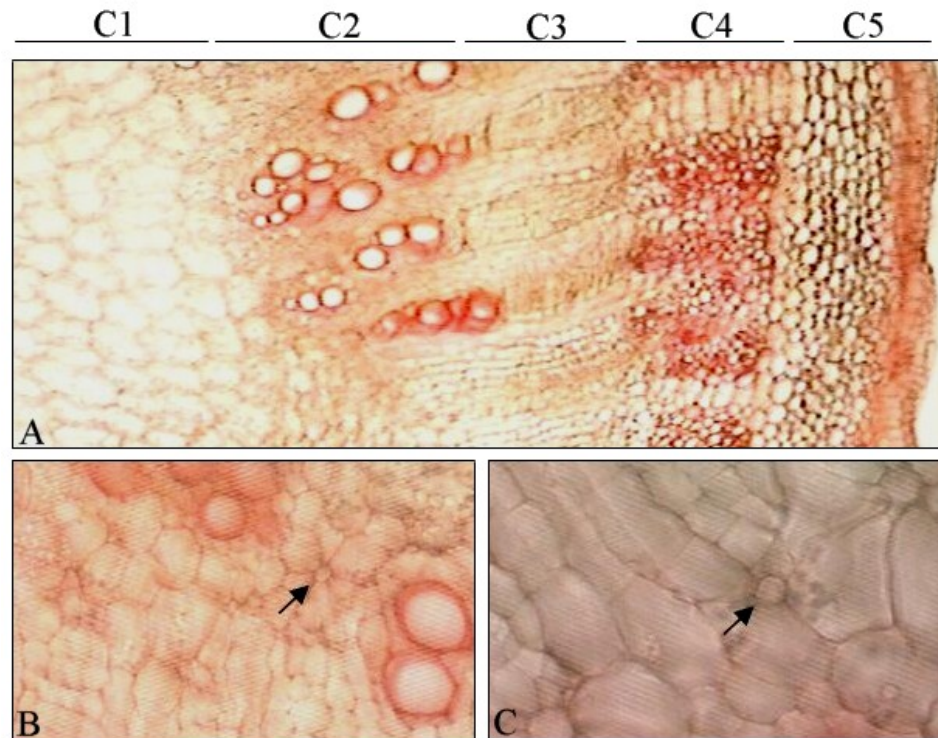


Figura 18 - Identificação dos tecidos do caule do mamoeiro. Secção transversal do caule do mamoeiro (A), indicando o parênquima medular (C1), os tecidos do xilema (C2), tecidos do câmbio vascular e floema (C3), as fibras dos feixes vasculares (C4) e o parênquima cortical e epiderme (C5). Os laticíferos do mamoeiro podem ser observados (seta) ocorrendo entre células do xilema (B) e do cambio vascular e floema (C).

A extração de ácidos nucléicos a partir da carúncula e sarcotesta da semente foi possível através do aumento na concentração de NaCl de 1,4 M para 4,4 M no tampão de extração, aumentando a eficiência de retirada dos açúcares (TEL-ZUR et al., 1999). As partes internas da semente (hipocótilo, cotilédones e endosperma) foram também avaliadas utilizando-se NaCl 4,4 M, mas a grande maioria dos polissacarídeos permanecia junto com os ácidos nucléicos no final da extração, inviabilizando as etapas posteriores de tratamento enzimático e de eletroforese. Para estas partes foi, então, avaliada a adição de NaCl 5,4 M e 6,4 M ao tampão de extração. Entretanto, na etapa de precipitação, grande parte do NaCl utilizado precipitava junto com os ácidos nucléicos extraídos. No gel de eletroforese, observou-se uma quantidade muito pequena de ácidos nucléicos totais, com um padrão de migração irregular. Por estes

motivos, não foi possível a identificação da ocorrência do dsRNA no hipocótilo, cotilédones e endosperma da semente do mamoeiro.

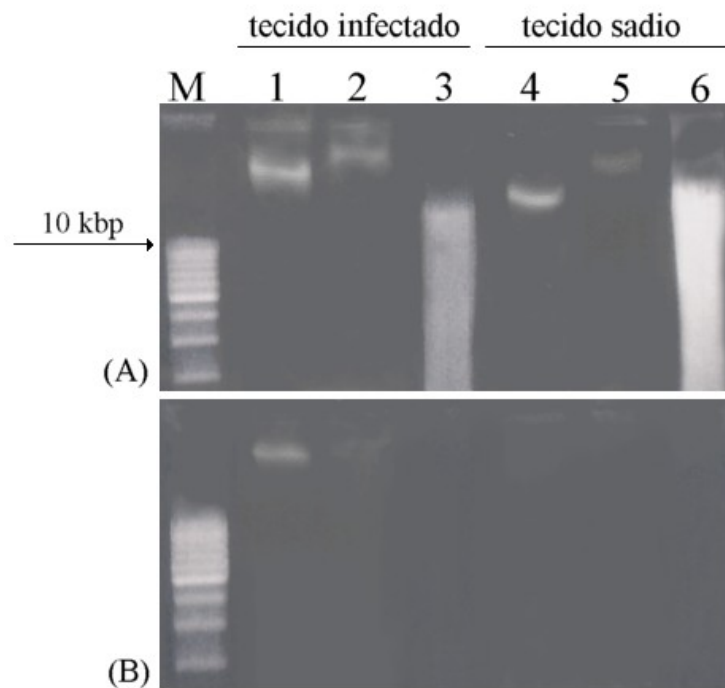


Figura 19 - Detecção do dsRNA do PMeV em sementes do mamoeiro. Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir de tecidos da semente, subdividida em carúncula (1 e 4), sarcotesta (2 e 5) e envoltório seminal (3 e 6). Estes ácidos nucléicos foram separados por eletroforese, sem tratamento (A) ou após digestão com DNase I (B), utilizando-se um marcador de peso molecular de 1kbp (M).

4.4 INTERAÇÃO PMeV *VERSUS* MAMOEIROS

Os vírus são capazes de induzir uma série de reações na planta hospedeira, auxiliando o processo infeccioso. As plantas, por sua vez, respondem à infecção na tentativa de defender-se contra o agente invasor. As respostas do mamoeiro ao estresse representado pela infecção do PMeV foram avaliadas através da análise qualitativa e quantitativa de compostos bioquímicos e de elementos químicos e também a partir de dados de microscopia. Durante as análises, utilizando-se látex ou tecidos da planta, foi dada ênfase a influência exercida pelo vírus sobre os laticíferos, uma vez que a distribuição destas células na planta está diretamente relacionada com o a distribuição do PMeV. Além disso, o vírus parece alterar a fisiologia do laticífero, uma vez que o principal sintoma da meleira compreende uma exsudação espontânea de látex fluido a partir de frutos e folhas.

4.4.1 Testes histoquímicos

Foram utilizados dois tipos de testes histoquímicos: um baseado na coloração temporária de compostos bioquímicos e outro baseado na atividade de enzimas presentes no próprio tecido. O primeiro deles objetivou avaliar a presença dos compostos gerais do látex, enquanto que o segundo tipo de teste foi aplicado a tecidos do pecíolo das plantas, objetivando determinar a distribuição das células produtoras de H_2O_2 . Toda a avaliação foi desenvolvida em amostras coletadas a partir de plantas saudas e de plantas com meleira.

4.4.1.1 Histoquímica do látex

Alíquotas de látex foram avaliadas quanto à presença de açúcares redutores, proteínas, lipídeos, amido, compostos fenólicos, alcalóides e cristais de oxalato de cálcio. Após os

testes, foram identificados compostos fenólicos, proteínas, lipídeos, amido e açúcares redutores, a partir de ambas as amostras, sadias ou com meleira (Figuras 20 e 21). Comparando látex sadio com látex coletado a partir de plantas doentes, observou-se que os açúcares redutores coraram mais intensamente nas amostras de látex sadio, distribuindo-se na superfície dos polímeros de látex (Figura 21). Já nas amostras infectadas pelo PMeV, além de menor intensidade de coloração, os açúcares redutores apresentaram um aspecto mais disperso (Figura 21). Além disso, nas amostras sadias foram observadas vesículas definidas, com aspecto oleoso, enquanto que nas amostras infectadas algumas vesículas também foram observadas, mas com formato irregular.

Após submeter amostras de látex à coloração indicadora da presença de alcalóides, observou-se que estes compostos estavam presentes apenas no látex infectado pelo PMeV (Figura 21), indicando que os alcalóides foram produzidos em resposta ao vírus. Uma outra resposta foi observada após submeter o látex ao reagente Sudan III, responsável pela indicação da ocorrência de lipídeos. Este reagente induziu a formação de cristais com formato semelhante a ráfides (Figura 21). Polímeros de látex foram observados no centro dos cristais (Figura 21) como se eles auxiliassem o processo de cristalização.

A composição dos cristais foi determinada após submetê-los, separadamente, a um teste de solubilidade diferencial em ácido clorídrico ou em ácido acético. Eles foram solúveis em ácido clorídrico e insolúveis em ácido acético (Figura 21), indicando tratar-se de oxalato de cálcio. Os cristais foram observados em maior quantidade a partir das amostras infectadas pelo PMeV (Figura 21). Deve ser destacado que os cristais foram observados apenas durante a coloração para lipídeos, não sendo observados no látex durante todos os demais testes histoquímicos, bem como durante a observação do látex sem nenhum tratamento.

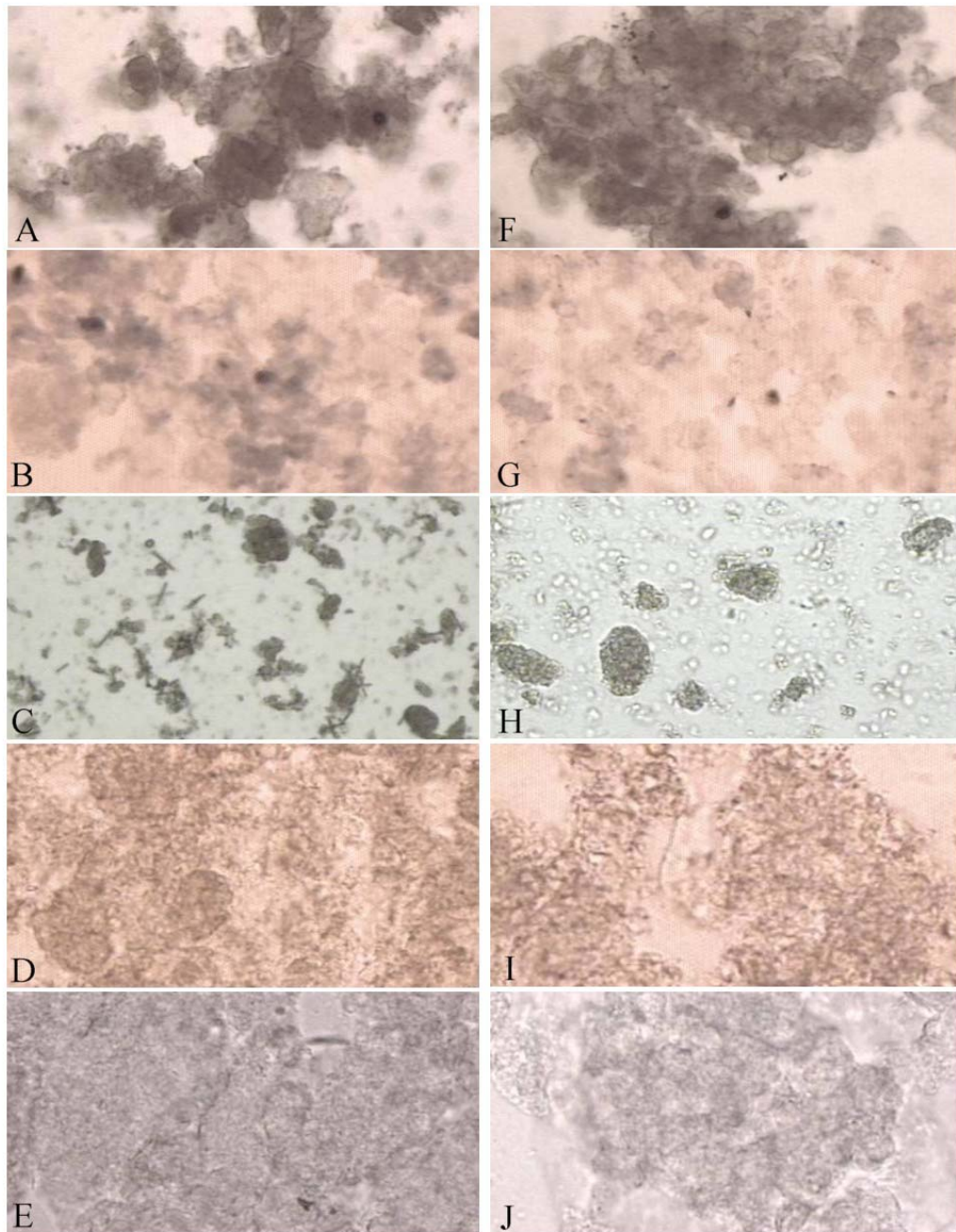


Figura 20 - Histoquímica do látex do mamoeiro. Látex coletado a partir de plantas com meleira (A-E) ou coletado de plantas saudáveis (F-J) foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos (A e F), proteínas (B e G) e lipídeos (C e H), amido (D e I), utilizando-se látex sem tratamento, como controle (E e J).

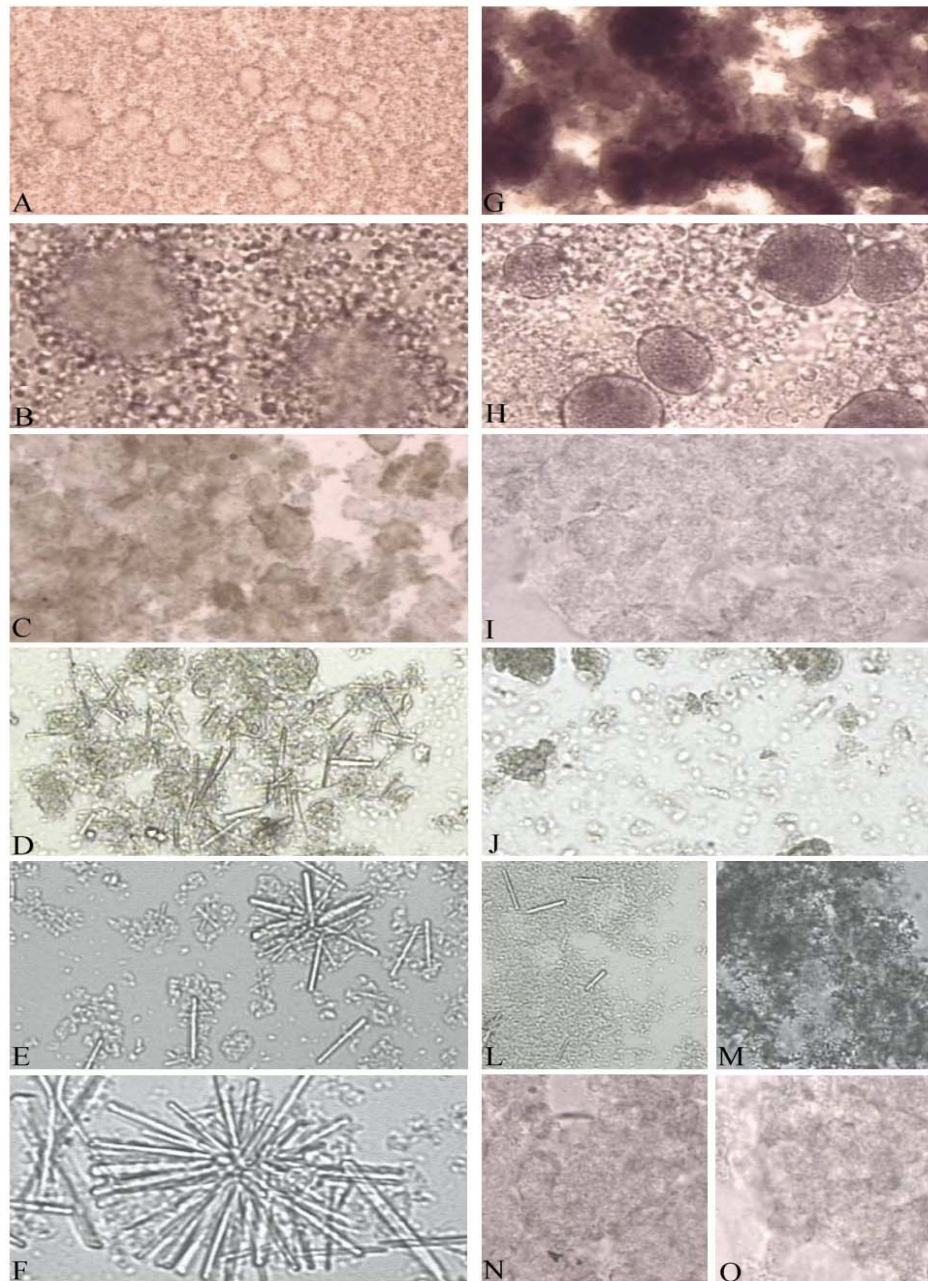


Figura 21 - Histoquímica do látex do mamoeiro. Látex coletado a partir de plantas com mealeira (A-F e L e N) ou coletado de plantas saudáveis (G-J e M e O) foram avaliados quanto à presença de açúcares redutores (A e G, em aumento de 20x; B e H, em aumento de 40x), alcalóides (C e I) e cristais (D-F e J). Os cristais foram insolúveis em ácido acético (L) e solúveis em ácido clorídrico (M), demonstrando tratar-se de oxalato de cálcio. O látex sem tratamento foi utilizado como controle (N e O).

4.4.1.2 Detecção de H₂O₂ tecidual

A partir dos testes histoquímicos constatou-se que o látex do mamoeiro, principalmente aquele coletado a partir de plantas com meleira, possui oxalato de cálcio na sua composição. A ocorrência deste composto pode estar relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio, uma vez que ele tem sido descrito como um substrato para enzimas com atividade de oxalato oxidase, que atuam convertendo o oxalato em H₂O₂ e oxigênio (O₂) (LANE et al., 1993). Com o objetivo de correlacionar a distribuição dos laticíferos, que são as células responsáveis pela produção e armazenamento do látex, com os centros de produção de H₂O₂ nos tecidos do mamoeiro, foi utilizado um método de marcação de H₂O₂ que se baseia na atividade de peroxidases presentes no próprio tecido. Estas enzimas são responsáveis pela redução do H₂O₂ em água (H₂O) e O₂ (Figura 3). Durante a coloração, os tecidos da planta são depositados em uma solução ácida, contendo o reagente DAB (3,3'-diaminobenzidina), que atua como um substrato para as peroxidases durante a degradação do H₂O₂, resultando em um composto marrom, nos locais onde o H₂O₂ estava presente (Figura 22).

Os tecidos do pecíolo de mamoeiros do cultivar Golden foram seccionados em corte transversal e longitudinal e submetidos à coloração com DAB. Posteriormente, os cortes foram montados em glicerol e analisados ao microscópio óptico. Uma coloração marrom clara foi observada ao longo de todos os tecidos do pecíolo, tanto para as amostras sadias quanto para as infectadas pelo PMeV (Figura 23). Uma cor marrom intensa esteve associada às células do xilema (Figura 23 A e G).

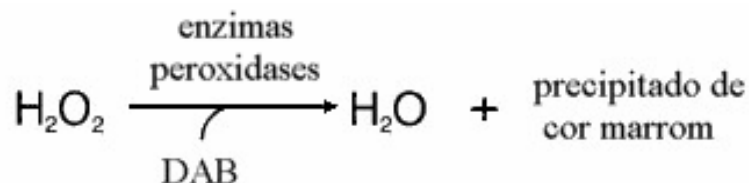


Figura 22 - Reação do processo de marcação do H₂O₂ produzido pelos tecidos vegetais, utilizando o reagente DAB (3,3'-diaminobenzidina) como substrato.

Os laticíferos foram identificados facilmente, ocorrendo entre o xilema e o floema como células articuladas, formando sistemas de ductos conectados através de anastomoses (Figura 23 D, I e O). Esta descrição anatômica para os laticíferos de *C. papaya* está de acordo com aquela feita por Esaú (1976).

Tanto os laticíferos das amostras sadias quanto os das amostras infectadas foram corados de marrom escuro (Figuras 23 A-B e G-H), indicando que estas células são locais de produção de H_2O_2 . Contudo, os laticíferos de pecíolos com meleira apresentaram uma coloração marrom mais intensa que aquela observada para os laticíferos sadios (Figura 23 C e J), indicando que a produção de H_2O_2 pelos laticíferos não é uma resposta específica à infecção pelo PMeV, mas se acentua nas plantas infectadas pelo vírus. Por outro lado, somente as células companheiras do floema de plantas com meleira produziram o H_2O_2 (Figuras 23 A e G), demonstrando tratar-se de uma resposta específica à infecção. As células companheiras foram identificadas como células pequenas, associadas aos elementos de vaso do floema (Figura 23 L-O).

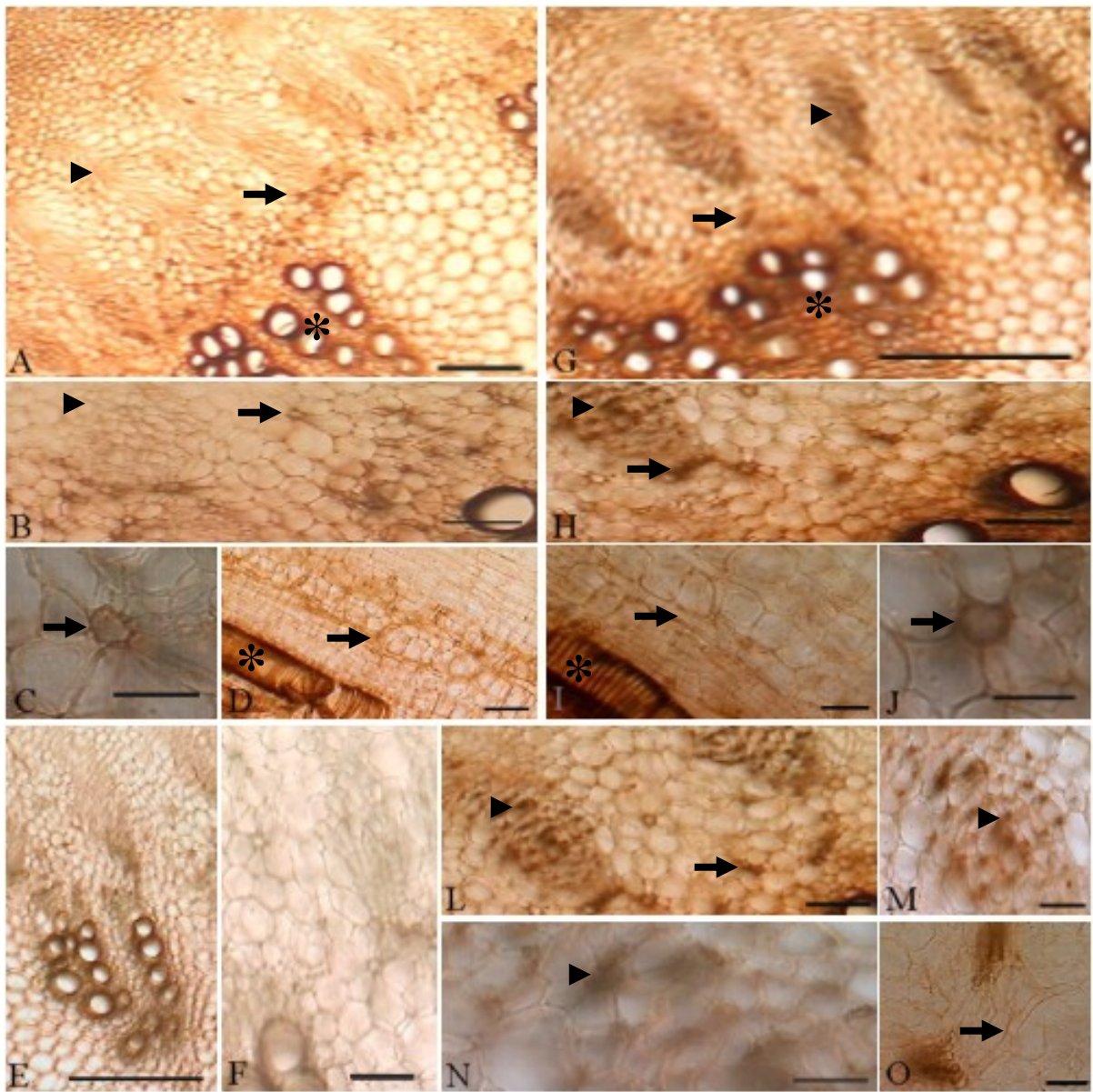


Figura 23 - Detecção dos sítios de produção de H_2O_2 nos tecidos do mamoeiro, utilizando-se o reagente DAB. Tecidos do pecíolo de plantas sadias (A-D) e tecidos de pecíolo de plantas com meleira (G-O) foram submetidos à coloração com o reagente DAB. Tecidos de pecíolos sadios (E) e com meleira (F) não submetidos ao mesmo reagente foram utilizados como controle. Asterisco: xilema; Seta: laticíferos; triângulo: células companheiras do floema. Barras: 0,5 mm (O, F), 0,1 mm (A, B, D, E, G, I, J, L, N), 10 mm (C, H, M).

4.4.2 Dosagens de compostos bioquímicos do látex

O látex exsudado a partir de plantas com meleira é caracterizado por uma maior fluidez, quando comparado com o látex leitoso das plantas sadias (VENTURA et al., 2001). Alguns compostos bioquímicos gerais foram quantificados objetivando compreender os efeitos do PMeV sobre os laticíferos, que levam à maior fluidez do látex. Os dados obtidos encontram-se relacionados na Tabela 1.

Inicialmente, foi determinado o teor de água do látex após aquecê-lo à 70 °C durante cinco horas. Observou-se que o látex coletado a partir de plantas infectadas pelo vírus apresenta um maior teor de água (87,33%), quando comparado com o látex sadio (81,03%). Isso indica que a maior fluidez do látex infectado está associada a um teor mais elevado de água. Esta diferença não parece ser acompanhada por alterações no pH do látex, já que os valores de pH obtidos para a fase líquida do látex infectado (pH 6,13) ou sadio (pH 5,68) não apresentaram diferenças significativas.

Foi também quantificado o teor de açúcares totais, de sacarose e de proteínas totais presentes no látex. Os valores obtidos indicam que estes três compostos estão presentes em menor concentração no látex infectado pelo PMeV. O teor de proteínas foi de 133,33 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o látex infectado, comparado com 175,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o látex sadio. Já os teores de açúcares totais e de sacarose foram 188,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 30,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o látex infectado, comparado com 446,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 60,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o látex sadio, respectivamente.

Tabela 1 - Dosagens de compostos bioquímicos e de elementos químicos presentes no látex do mamoeiro, sadio ou infectado pelo PMeV.

	Látex sadio	Látex infectado
Dosagens de compostos bioquímicos		
Conteúdo de água (%)	81,03 b*	87,33 a
pH	5,68 a	6,13 a
$\mu\text{g ml}^{-1}$		
Açúcares totais	446,0 a	188,0 b
Sacarose	60,0 a	30,0 b
Proteínas totais	175,0 a	133,33 b
Dosagens de elementos químicos		
% em massa seca		
Fósforo	0,30 b	0,33 a
Potássio	0,59 b	0,77 a
Cálcio	0,71 a	0,35 a
Magnésio	0,81 a	0,78 a
Enxofre	1,63 a	1,71 a
ppm		
Ferro	20,00 a	20,00 a
Zinco	7,00 a	6,00 a
Boro	42,66 a	28,03 a

*Teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.4.3 Quantificação de elementos químicos presentes no látex

A partir das dosagens bioquímicas gerais, observou-se que a fluidez elevada do látex infectado pelo PMeV era acompanhada por um maior teor água. Considerando o papel de alguns elementos químicos no processo de captação de água pelas células, foram quantificados os elementos fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco e boro presentes no látex, utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção atômica. Os resultados obtidos encontram-se relacionados na Tabela 1.

Entre os elementos analisados, somente os valores obtidos para os níveis de fósforo e potássio apresentaram diferenças significativas, comparando amostras de látex sadio com amostras de látex infectado pelo PMeV. O elemento potássio representou 0,77% da massa seca do látex infectado, comparado com 0,59% do látex sadio. Já o elemento fósforo representou 0,33% da massa seca do látex infectado, comparado com 0,30% do látex sadio.

4.4.4 Análises do látex por microscopia eletrônica

A influência do PMeV sobre a morfologia dos polímeros do látex foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise do látex revelou a presença de polímeros com formato irregular, ocorrendo em menor quantidade nas amostras infectadas pelo vírus (Figura 24). Nestas amostras, os polímeros eram menores e apresentavam uma superfície mais irregular, quando comparado com os polímeros do látex sadio, que apresentaram um aspecto compacto (Figura 24). Apesar disto, uma micro-análise de raio-x revelou que ambos os polímeros, de látex sadio ou infectado, eram compostos pelos mesmos elementos químicos: magnésio, fósforo, potássio, cálcio e enxofre (Figura 25). Em ambas as amostras (sadias ou infectadas), o pico de detecção de enxofre foi superior ao observado para os demais elementos (Figura 25).

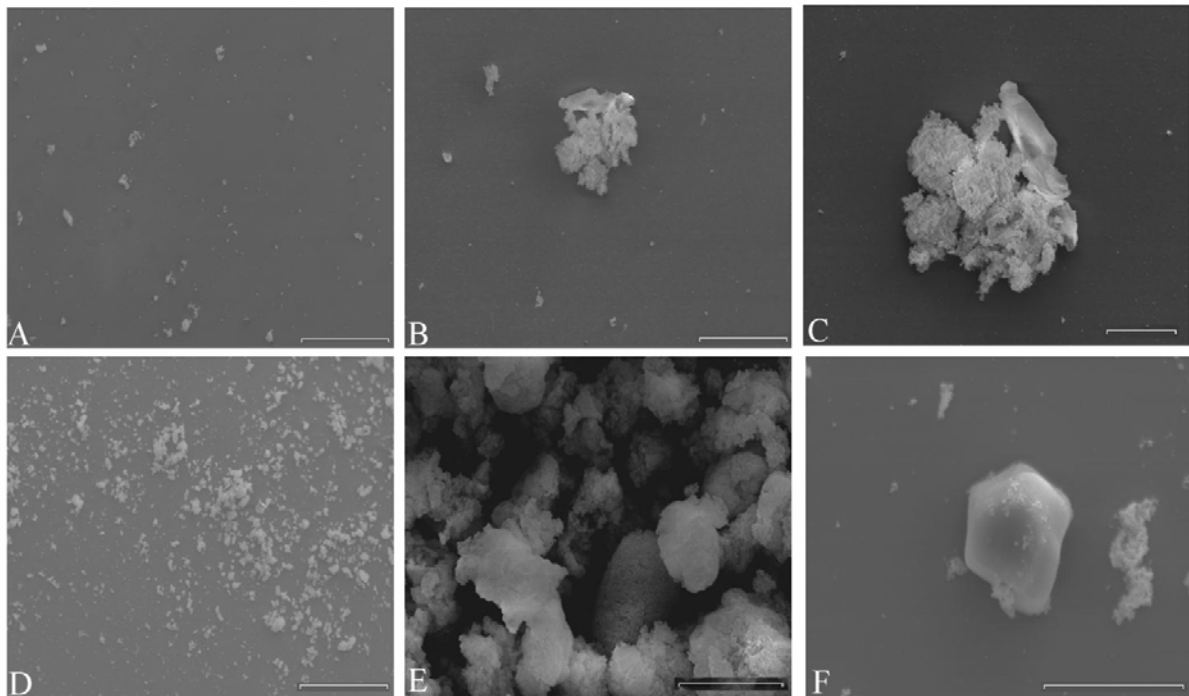


Figura 24 - Análise do látex do mamoeiro por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A estrutura superficial dos polímeros de látex de plantas com meleira foi avaliada por MEV (A-C) utilizando-se látex de plantas saudáveis como controle (D-F). Barras: 500 μm (A e D), 100 μm (E), 50 μm (B) e 20 μm (C e F).

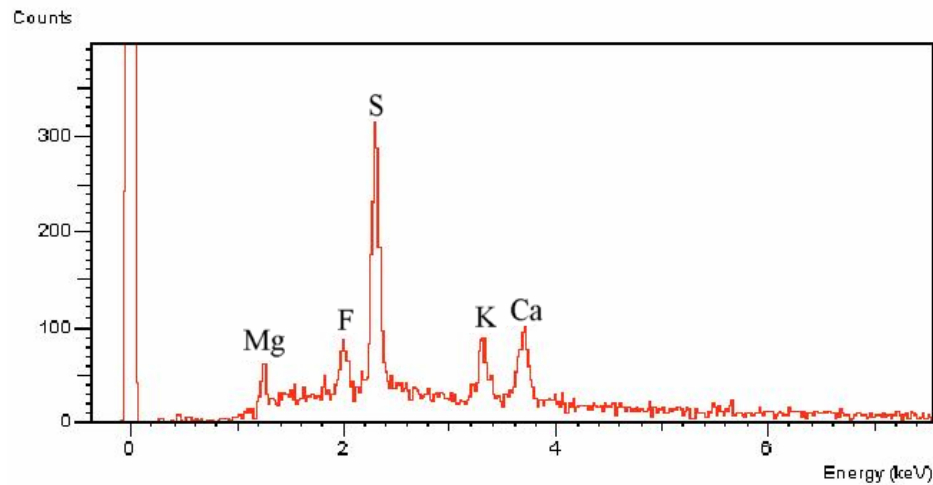


Figura 25 - Composição elemental dos polímeros presentes no látex do mamoeiro. Os polímeros do látex infectado pelo PMeV ou do látex sadio foram submetidos à micro-análise de raio-x, observado-se o mesmo perfil de elementos químicos, para ambos.

As características observadas para os polímeros do látex infectado foram confirmadas através de análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estes polímeros apresentam um centro compacto e uma periferia com aspecto esponjoso, comparado com o aspecto homogêneo dos polímeros sadios (Figura 26). Curiosamente, as partículas do PMeV foram observadas aderidas na superfície dos polímeros, como se estivessem imersas na parte esponjosa destes (Figura 26). Portanto, o vírus causa alterações morfológicas nos polímeros do látex, ligando-se na superfície destes polímeros.

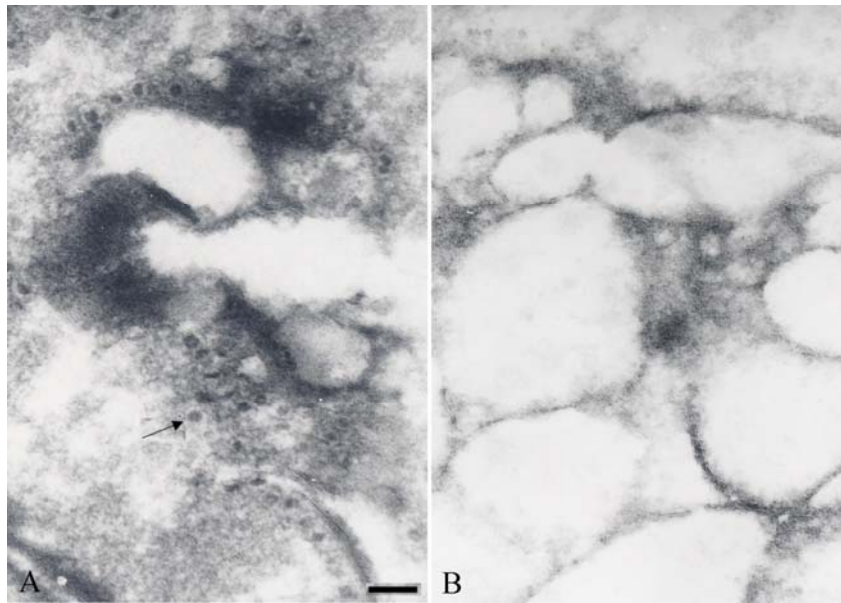


Figura 26 - Análise do látex do mamoeiro por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Secções ultrafinas do látex coletado a partir de plantas com meleira (A) e do látex coletado à partir de plantas sadias (B). A seta indica as partículas do PMeV aderidas na superfície dos polímeros do látex. Barra: 200 nm.

5 DISCUSSÃO

5.1 DIAGNÓSTICO DO PMeV

5.1.1 Diagnóstico a partir do látex

Neste trabalho, foi apresentado um método para o diagnóstico molecular do PMeV utilizando-se látex do mamoeiro. Inicialmente, o látex foi submetido aos tratamentos de diluição em tampão fosfato pH 6,0 ou citrato pH 5,0, ou a adição de metabissulfito de sódio 2%, seguidos de aplicação direta em gel de eletroforese. Este procedimento, que é semelhante àquele proposto por Habibe e outros (1999), forneceu um arraste de ácidos nucleicos, observado somente nas amostras infectadas pelo PMeV. A ocorrência de arraste indica que os ácidos nucleicos encontram-se ligados nos polímeros do látex. Algumas vezes, estes polímeros apresentavam um tamanho maior que os poros do gel, retendo os ácidos nucleicos ainda no poço de aplicação.

Considerando que o látex do mamoeiro é composto principalmente por proteínas (MOUTIM et al., 1999), a utilização de solventes orgânicos (fenol e clorofórmio) permitiu a extração dos ácidos nucleicos presentes neste exsudado. Diferente do observado para o látex diluído em tampão fosfato pH 6,0 ou látex contendo metabissulfito de sódio 2%, o látex diluído em tampão citrato pH 5,0 forneceu uma banda definida, composta de dsRNA. Este resultado pode estar relacionado com o pH ácido do tampão. Nesta condição, os grupos fosfato das moléculas de RNA encontram-se protonados, eliminando repulsões eletrostáticas internas, o que as torna mais estáveis e de fácil resgate (FARRELL JÚNIOR, 1998).

O dsRNA extraído a partir do látex diluído em tampão citrato pH 5,0 foi resistente ao tratamento com a enzima DNase I e parcialmente resistente à enzima RNase A (Figura 9), confirmando a ocorrência de moléculas de dsRNA nas amostras. A RNase utilizada degrada, especificamente, moléculas de ssRNA. Contudo, a enzima é capaz atacar pequenos segmentos de fita-simples (bases desemparelhadas), que podem ocorrer ao longo de moléculas de dsRNA. Considerando a extensão da molécula de dsRNA do

PMeV (12 kbp), seguimentos de fita-simples podem ter ocorrido, por exemplo, durante os procedimentos de extração e tratamento enzimático. A clivagem destes seguimentos pela RNase teria resultado em pequenos fragmentos de dsRNA, o que explica o padrão de migração eletroforética observado na Figura 9.

Além do dsRNA do PMeV, o DNA da planta foi também extraído, a partir do látex infectado, formando uma banda de aproximadamente 14 kbp no gel de eletroforese (Figura 11). Este resultado é semelhante ao observado por Tavares e outros (2004). Entretanto, a banda de DNA foi observada somente em alguns experimentos, indicando que a ocorrência de DNA no látex do mamoeiro não é um caráter permanente. Isto pode estar relacionado com as próprias características dos laticíferos (DATTA; IQBAL, 1994). As células maduras de laticíferos do tipo articulado, como aqueles que ocorrem em *C. papaya*, perdem praticamente todos os seus constituintes internos na maturidade, sendo preenchidas por látex, enquanto que as células mais jovens são compostas por vesículas de látex e por algumas organelas e núcleo. A articulação entre as células em diferentes estágios de maturação permite o fluxo de látex ao longo dos canais. Este fluxo, por sua vez, é capaz de carrear o núcleo das células jovens, razão pela qual o DNA da planta pode estar presente no látex. Por este motivo, dependendo do estágio do desenvolvimento vegetal em que o látex for coletado existe a possibilidade de ocorrência de DNA no exsudado.

Durante o diagnóstico do PMeV, a extração de ácidos nucléicos presentes no látex, que, após a eletroforese, formem uma única banda no gel, pode resultar em falsos positivos para o vírus, considerando a proximidade entre o peso molecular do dsRNA do vírus (12 kbp) e o do DNA da planta (14 kbp). Portanto, para um diagnóstico mais seguro, a confirmação do peso molecular da banda atribuída ao vírus deve ser feita aplicando-se no gel um marcador de peso molecular de 1 kbp e uma amostra do dsRNA do PMeV previamente extraída (controle positivo). Devem ser considerados positivos para a infecção com o PMeV os mamoeiros cujos os ácidos nucléicos extraídos à partir do látex formarem uma banda de peso molecular idêntico ao controle positivo (12 kbp), ou mamoeiros cujos ácidos nucléicos formarem duas bandas no gel, entre 12 e 14 kbp. A ocorrência destas duas bandas não demanda o tratamento com DNase I.

Em geral, moléculas de dsRNA mostram-se menos passíveis de sofrerem aberturas no duplex (desnaturação) quando comparadas com outros tipos de ácidos nucléicos. Além de facilitar o ataque por algumas nucleases, estas aberturas tornam a molécula mais susceptível à outros processos de degradação. O dsRNA do PMeV se desnatura, especificamente, sob exposição curta a 96 °C (ZAMBOLIM et al., 2003). Entretanto, o dsRNA foi progressivamente degradado, ao longo de 25 dias, quando as amostras de látex puro ou látex diluído em água ultrapura ou em tampão citrato pH 5,0 permaneceram à 25 °C (Figura 10). Portanto, a manutenção do látex à temperatura ambiente resulta em degradação do dsRNA do PMeV, provavelmente associada ao ambiente bioquímico do látex, sendo capaz de comprometer a sensibilidade de métodos de detecção futuros.

A integridade do dsRNA presente no látex infectado, por outro lado, foi preservada quando o látex (diluído em tampão citrato pH 5,0 ou água ultrapura ou látex puro) permaneceu armazenado sob 5 °C ou -20 °C, durante 25 dias. Novamente, as amostras diluídas em tampão citrato pH 5,0 permitiram um resgate mais eficiente do dsRNA, resultando em um padrão de bandeamento bastante intenso no gel, principalmente para as amostras mantidas a -20 °C (Figura 10). Este resultado deve-se à conhecida preservação de moléculas de RNA sob temperaturas mais baixas (FARRELL JÚNIOR, 1998) e indica que a diluição em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v), seguida de armazenamento à -20 °C, é a condição mais adequada de tratamento do látex, antes do procedimento de diagnóstico do PMeV. Este tratamento simples pode ser feito pelo próprio produtor, após coletar o látex das plantas que se deseja analisar. As amostras podem, então, permanecer à -20 °C (em freezer) até serem transportadas, em caixa térmica à 5 °C (caixa de isopor com gelo), ao laboratório de análise, mantendo a sensibilidade máxima do diagnóstico.

5.1.2 Diagnóstico nos tecidos

A metodologia de extração e análise de moléculas de dsRNA descrita por Dodds e Joseph (1987) e por Valverde (1990), que envolve uma extração total de ácidos nucléicos, seguida da separação destes por cromatografia de celulose, já foi utilizada para a extração do dsRNA do PMeV à partir do látex e dos tecidos do mamoeiro (BARBOSA et al., 1999). De forma semelhante, utilizando-se a mesma metodologia, o dsRNA do PMeV foi extraído à partir de tecidos de mamoeiros com meleira, permitindo a distinção entre plantas saudáveis e plantas doentes (Figura 12). Contudo, como apontado por Souza e outros (2002), observou-se ao longo dos experimentos, que o método cromatográfico é bastante trabalhoso, permite o processamento de um pequeno número de amostras (8 amostras em média) e possui muitas etapas, o que submete as amostras à possíveis agentes de degradação, não apenas do dsRNA, mas também dos demais ácidos nucléicos extraídos. Tal degradação é evidenciada pelo arraste formado pelos fragmentos de ácidos nucléicos separados no gel (Figura 12). Este fato compromete seriamente a sensibilidade do método para fins de diagnóstico do PMeV, principalmente para as plantas em fase inicial de infecção, nas quais a carga de vírus pode ser ainda baixa, o que resultaria em diagnósticos incorretos. Portanto, as dificuldades de processamento das amostras e a baixa sensibilidade do método cromatográfico o tornam inadequado para o diagnóstico do PMeV à partir dos tecidos do mamoeiro.

Alternativamente, foram feitos ajustes no método cromatográfico, reduzindo-se os volumes de reagentes utilizados durante a extração e excluindo-se os passos de cromatografia. Tais ajustes facilitaram o processamento das amostras, reduziram o tempo de experimento e também os custos com reagentes, elevando, em média, de 8 para 25 o número de amostras analisadas em um único dia de experimento. Através deste método, observou-se um perfil de bandas de dsRNA definidas (Figura 13), indicando que a integridade deste ácido nucléico foi preservada durante a extração. Comparado com o método cromatográfico original, a metodologia modificada mostrou-se, portanto, mais sensível para a extração e a identificação do dsRNA do PMeV.

Considerando que a ocorrência do PMeV está limitada ao látex das plantas com meleira (KITAJIMA et al., 1993), o diagnóstico feito através da extração do dsRNA do vírus a partir do látex apresenta maior sensibilidade que o diagnóstico feito partindo-se dos tecidos da planta. Apesar disto, a metodologia modificada a partir de Dodds e Joseph (1987) e Valverde (1990) descrita neste trabalho, representa uma ferramenta indisponível até o presente, podendo ser utilizada para o diagnóstico do PMeV em mudas de mamoeiro, que exsudam látex em pequenas quantidades, insuficientes para a extração do dsRNA do vírus. Embora não existam relatos da transmissão do PMeV através de sementes, a análise da ocorrência do vírus em mudas representa uma estratégia capaz de prevenir a utilização de plantas infectadas, logo no início da plantação, reduzindo as perdas econômicas advindas do cultivo de plantas já comprometidas. Além disso, o diagnóstico do PMeV feito a partir de tecidos do mamoeiro pode ser utilizado como um método alternativo, para validar resultados obtidos através do diagnóstico do vírus utilizando-se o látex das plantas.

5.2 TRANSMISSÃO DO PMeV

5.2.1 Avaliação de diferentes métodos de inoculação

Observações de campo demonstram que, em alguns casos, os mamoeiros infectados pelo PMeV apresentam distribuição agregada na plantação, sugerindo que a transmissão do vírus dentro do pomar ocorra, artificialmente, ao longo das linhas de plantio, através de ferimentos provocados durante o manejo da cultura (VENTURA et al., 2003). Após simular a ocorrência de ferimentos semelhantes (cortes no limbo e no pecíolo foliares, lesão das folhas com areia, abrasão no caule, provocada por escada) e aplicar o látex extraído a partir de plantas doentes sobre os ferimentos, observou-se que as plantas inoculadas não foram infectadas pelo PMeV. Esses resultados sugerem que o vírus não é propagado na plantação através de ferimentos nos tecidos das plantas, durante o manejo da cultura do mamoeiro. Uma característica marcante do

mamoeiro é a ocorrência imediata de exsudação de látex na superfície dos ferimentos e a subsequente polimerização do exsudado. Em geral, a função deste processo é a obstrução da superfície lesionada, impedindo o contato entre o interior do tecido e o ambiente (HUNTER, 1994). Esta mesma função foi descrita especificamente para a polimerização do látex de *C. papaya* por Moutim e outros (1999), que correlacionaram o processo com a coagulação sangüínea que ocorre sobre ferimentos em tecidos de mamíferos. Desta forma, a obstrução conferida pelos polímeros de látex aos ferimentos nas mudas de mamão podem ter impedido a entrada do PMeV nas células da planta. Este mesmo mecanismo de defesa provavelmente protege as plantas também no campo contra uma possível inoculação do vírus através de ferramentas contaminadas.

A injeção de látex infectado no caule das mudas, entretanto, resultou no estabelecimento da infecção pelo PMeV, sendo o dsRNA do vírus observado quinze dias pós-inoculação (Figura 14). O procedimento de injeção, embora também provoque a exsudação de látex, pode ter liberado partículas do PMeV no interior de células vegetais viáveis. Em geral, este é um pré-requisito para o estabelecimento de infecções virais em plantas (CARRINGTON et al., 1996). A eficiência da injeção do látex infectado como um método de inoculação do PMeV foi confirmada após observar que o dsRNA extraído a partir do látex das plantas forma uma banda no gel de eletroforese, em intensidade crescente, ao longo dos noventa dias de experimento (Figura 14), indicando um aumento na carga viral.

Semelhante à injeção, outros procedimentos simples são capazes de causar lesões moderadas em tecidos vegetais, podendo ser eficientes na inoculação de alguns vírus. Redinbaugh e outros (2001) demonstraram, por exemplo, que vírus que infectam milho (*Zea mays* L.) podem ser inoculados utilizando-se uma ferramenta de joalheiro, capaz de gerar ondas responsáveis pela abertura parcial na parede e na membrana celular. Ao contrário disto, grande parte das estratégias de inoculação utilizadas em virologia vegetal demandam tecnologia e conhecimento técnico avançados. Estas estratégias incluem a produção de plasmídeos contendo o genoma do vírus (REDINBAUGH, 2003), a introdução de partículas ou do genoma viral nas células da planta através de técnicas biolísticas (HOFFMANN et al., 2001) ou mesmo a utilização de vetores biológicos específicos. Comparado com estas estratégias, o procedimento de injeção de látex

infectado se apresenta como um método simples, de baixo custo e eficiente para a inoculação do PMeV em mamoeiros, características que facilitam trabalhos futuros sobre a meleira.

5.2.2 Avaliação da capacidade de transmissão pela mosca *T. variabilis*

Entre as diferentes espécies de insetos que ocorrem na cultura do mamoeiro inclui-se a mosca branca *T. variabilis*, registrada oficialmente no Espírito Santo por Culik e outros (2004). Em casa de vegetação, esta espécie esteve em contato com mamoeiros infectados pelo PMeV e com mamoeiros saudáveis. Os insetos adultos coletados na superfície das plantas infectadas apresentaram o dsRNA do PMeV (Figura 12). As ninfas, que permaneciam restritas à plantas específicas, apresentaram resultados diferentes. As que foram coletadas na superfície de plantas infectadas também apresentaram o dsRNA, oposto ao observado para aquelas coletadas a partir de plantas saudáveis (Figura 12). Isso indica que a espécie *T. variabilis* é capaz de adquirir o PMeV a partir de plantas infectadas pelo vírus. Estes resultados estão de acordo com as características do gênero *Trialeurodes*, no qual a espécie é incluída, que agrupa vetores eficientes de viroses de planta (VALVERDE et al., 2004).

Apesar de adquirirem o PMeV, *T. variabilis* foi incapaz de transmitir o vírus para mamoeiros saudáveis, dos cultivares cv. Golden, cv. Sunrise e cv. Taiwan (Figura 15). Este resultado pode estar relacionado com a proteção contra herbivoria, conferida pelos laticíferos da planta (HUNTER, 1994). Em algumas espécies esta proteção está relacionada com a ocorrência de compostos fenólicos, alcalóides e enzimas proteolíticas no látex (KONNO et al., 2004). A presença de enzimas proteolíticas é um aspecto marcante para o látex de *C. papaya*, que é composto por uma mistura de cisteína endopeptidases, por exemplo, papaína, quimiopapaina A e B, papaya endopeptidase III, entre outras (BRAVO, 1994), que podem ser ativadas, por exemplo, durante a exsudação do látex (MOUTIM et al., 1999). Exsudações localizadas de látex ocorrem durante a picada de prova de alguns insetos, quando o aparelho bucal perfura os laticíferos da planta buscando os feixes vasculares. Observou-se que as cisteína

endopeptidases, particularmente a papaína, proteína característica do látex do mamoeiro, são responsáveis pela toxicidade à larvas de diferentes insetos, reduzindo consideravelmente o crescimento destas larvas (KONNO et al., 2004). No mesmo trabalho os autores destacam o papel das enzimas como proteínas de defesa geral do látex, talvez degradando compostos ou estruturas na superfície do aparelho bucal dos insetos, promovendo danos superficiais severos. Todo este sistema de defesa do mamoeiro pode ter sido determinante para a incapacidade da mosca *T. variabilis* em transmitir o PMeV. As partículas do vírus adquiridas pelo inseto podem ter sofrido degradações enzimáticas consideráveis, resultando na sua inativação total ou parcial. De fato, este ataque superficial representa uma primeira estratégia de defesa utilizada por algumas plantas contra a entrada de vírus, já que, durante a transmissão, muitos deles estão expostos na superfície do aparelho bucal do vetor (GRILLI; HOLT, 2000).

5.3 DISTRIBUIÇÃO DO PMeV EM MAMOEIROS

Nas plantas aos 30 e 45 dias pós-inoculação com látex infectado pelo PMeV, o dsRNA do vírus foi detectado nas amostras provenientes de folhas jovens e flores, enquanto que nas plantas sintomáticas aos 45 dias, 3, 6 e 12 meses de após a manifestação de sintomas, o ácido nucléico foi detectado em todas as amostras analisadas (folhas novas, folhas completamente expandidas, folhas velhas, flores, frutos novos, frutos do meio da coluna de frutificação, frutos velhos, caule a 30-40 cm abaixo da coluna de frutos, caule a 15-20 cm acima do solo e raízes), exceto nas raízes (Figura 16). Portanto, o vírus se concentra inicialmente nos órgãos próximos ao sítio de inoculação, propagando-se, em seguida, para órgãos mais distantes, como observado para muitos outros vírus (CARRINGTON et al., 1996). A análise da presença do PMeV no caule de plantas sintomáticas à 15-20 cm acima do solo não foi possível dado a ausência de exsudação de látex nesta região. Este bloqueio na exsudação de látex pode ser observado em plantas em estágio avançado de meleira, contrastando-se com a exsudação espontânea do exsudado, descrita como o principal sintoma da doença.

Barbosa e outros (1999) avaliando a ocorrência do PMeV em mamoeiros, em uma fase específica da infecção, demonstraram que o vírus ocorre nas flores, caule, folhas novas e maduras, hastes foliares e frutos verdes. Entretanto, estes resultados não podem ser comparados com aqueles apresentados na Figura 16, uma vez que os autores analisaram os tecidos da planta utilizando-se a metodologia cromatográfica de detecção do dsRNA. Além disto, o estágio da infecção das plantas utilizadas nos experimentos deste mesmo trabalho não foi determinado.

Os dados de distribuição do PMeV obtidos analisando-se o látex de mamoeiros infectados (Figura 16) foram confirmados através das análises dos tecidos da planta (Figura 17), observando-se que o PMeV ocorre em maior concentração nas partes aéreas do mamoeiro, evidenciado pela intensidade das bandas do dsRNA extraído a partir de flores, frutos e folhas (Figuras 16 e 17). Nos frutos, o PMeV foi detectado em tecidos da casca, mesocarpo e carúncula das sementes. A ocorrência do vírus no pedúnculo indica ele apresenta um contato próximo com as sementes. Entretanto, experimentos adicionais precisam ser desenvolvidos visando determinar a relação entre o PMeV e as sementes do mamoeiro, já que estas se apresentam como veículos potenciais para a transmissão do vírus.

A detecção do dsRNA do PMeV a partir dos tecidos de plantas sintomáticas demonstrou a ocorrência do vírus principalmente nos órgãos ricos em laticíferos (frutos, flores, folhas e partes verdes do caule). Este dado foi evidenciado após detectar a ocorrência do vírus em duas diferentes camadas do caule, em corte transversal, e determinando-se os tecidos que ocorrem em cada camada. Verificou-se que o PMeV está presente em grande concentração nas camadas compostas principalmente por tecidos do xilema, cambio vascular e floema (Figura 18), tecidos onde os laticíferos de *C. papaya* ocorrem em maior quantidade (ESAÚ, 1976). Este resultado enfatiza a estreita associação entre o PMeV e os laticíferos do mamoeiro, já apontada por outros autores (KITAJIMA et al., 1993).

5.4 INTERAÇÃO PMeV VERSUS MAMOEIROS

5.4.1 Influências sobre a bioquímica do látex

Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com o látex de *C. papaya* abordando aspectos bioquímicos da ocorrência (BRAVO et al., 1994) e ativação (MOUTIM et al., 1999) de enzimas proteolíticas. Contudo, a ocorrência de outros compostos gerais é pouco compreendida. Em outras espécies vegetais, a composição química do látex inclui, por exemplo, óleos, carboidratos, ácidos orgânicos, alcalóides, poliisoprenos, hidrocarbonetos, carotenóides, proteínas, fosfolipídios, ácidos inorgânicos e esteróis (DATTA; IQBAL, 1994). Após os testes histoquímicos, observou-se que o látex de *C. papaya* também apresenta lipídeos, proteínas, compostos fenólicos, carboidratos (açúcares redutores e amido) e alcalóides na sua composição (Figura 20 e 21). Estes resultados indicam que, embora a presença de enzimas proteolíticas seja a principal característica do látex de mamoeiros, o exsudado possui uma composição complexa, semelhante à observada para outras espécies.

A ocorrência de alcalóides no látex é um caráter já descrito para algumas espécies vegetais (DATTA; IQBAL, 1994). Os laticíferos podem participar tanto na síntese quanto no armazenamento destes compostos, como observado para plantas de ópio (*Papaver somniferum* L.) (WEID et al., 2004). Em *C. papaya*, foi observado que os alcalóides estão presentes somente no látex de plantas com meleira (Figura 21), indicando que os mamoeiros produzem alcalóides em resposta à infecção pelo PMeV. De fato, a síntese de alcalóides representa uma resposta de defesa geral de plantas contra estresses. Além de alcalóides, compostos fenólicos, também relacionados com processos de defesa vegetal, estão presentes no látex de *C. papaya* (figura 20). Entretanto, a presença de fenóis parece ser um caráter constitutivo, já que estes compostos foram observados tanto em amostras de látex infectado pelo PMeV, quanto em amostras de látex sadio (Figura 20).

Uma outra resposta de defesa observada nos mamoeiros foi a síntese de H_2O_2 . Após a determinação dos sítios de produção desta espécie reativa de oxigênio nos tecidos da planta, observou-se que ele pode ser produzido tanto nos laticíferos de plantas sadias,

quanto nos de plantas com meleira (Figura 23). Entretanto, a síntese de H_2O_2 mostrou-se mais intensa nos laticíferos de plantas com meleira, indicando que esta é também uma resposta dos laticíferos contra o PMeV. A ocorrência simultânea de oxalato de cálcio e síntese de H_2O_2 nos laticíferos sugere que o oxalato seja um substrato para a síntese de H_2O_2 . Contudo, experimentos adicionais precisam ser desenvolvidos visando determinar a(s) via(s) de síntese de H_2O_2 nos laticíferos do mamoeiro.

Além dos laticíferos, a síntese de H_2O_2 foi observada nas células companheiras do floema (Figura 23). Este resultado, por outro lado, foi observado somente em amostras de plantas com meleira, indicando que a síntese de H_2O_2 pelas células companheiras foi uma resposta específica ao vírus. Em plantas, a síntese de H_2O_2 é amplamente observada durante infecções fúngicas (DEUNFF et al., 2004) e já foi demonstrada durante infecções virais (ALLAN et al., 2001). Acredita-se que o papel principal do H_2O_2 produzido por elas durante infecções virais seja a ativação de vias de resistência celular. Tais vias podem ser ativadas em diferentes células próximas aos sítios de produção de H_2O_2 , ou até mesmo nos laticíferos e nas células companheiras. Estas células apresentam um grande potencial de resposta à estímulos para a síntese de compostos de defesa. Kush e outros (1990) demonstraram que os laticíferos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) respondem à ferimentos aumentando consideravelmente a expressão de genes relacionados a estresse. Estes genes formam o segundo grupo de genes mais expressos nos laticíferos (KO et al., 2003), podendo codificar para diversas proteínas relacionadas à defesa vegetal: quitinase, β -1,3-glucanase, hevaminas, heneínas, glucosidase, β -galactosidase, β -acetil-glucosaminidase, polifenol oxidase e inibidores e iso-inibidores de proteases (KIM et al., 2003; SRITANYARAT et al., 2006). A análise proteômica da seiva coletada a partir do floema de curcubitáceas demonstrou que a maioria das proteínas presentes estão envolvidas em estresse ou reações de defesa, incluindo β -glucosidase, proteínas de resistência à seca, glioxalase, entre outras (WALZ et al., 2004).

5.4.2 Influência sobre o potencial osmótico dos laticíferos e fluidez do látex

Os dados de distribuição do PMeV em mamoeiros com meleira apresentados neste trabalho indicaram que o vírus apresenta uma estreita associação com os laticíferos da planta (Figuras 13-15). Adicionalmente, a capacidade do vírus em tornar o látex das plantas mais fluido e translúcido sugere uma forte influência deste na fisiologia dos laticíferos. A dosagem de elementos químicos presentes no látex indicou que os laticíferos infectados apresentam um teor mais elevado dos elementos K e P (Tabela 1). Em células vegetais, estes elementos incluem-se entre os principais osmólitos, responsáveis pelo controle da captação ou perda de água pelas células. O acúmulo de K e P nos laticíferos infectados pelo PMeV pode atuar reduzindo o potencial osmótico destas células, resultando na captação de água a partir das células vizinhas. Esta suposição foi fortalecida após verificar-se que látex de plantas com meleira apresenta um maior teor de água quando comparado com látex de plantas sadias (Tabela 1). Portanto, o PMeV é capaz de alterar o balanço de elementos químicos nos laticíferos, resultando na maior captação de água por estas células. Aparentemente, este processo não é acompanhado pela síntese de compostos bioquímicos gerais (açúcar total, sacarose e proteínas totais), resultando em um estado mais diluído destes compostos no látex infectado (Tabela 1). Efeito semelhante foi observado para os polímeros presentes no látex, que, após a análise por microscopia eletrônica de varredura, mostraram-se em quantidade muito reduzida quando comparado com os polímeros observados no látex sadio (Figura 24).

Além das influências do PMeV sobre o balanço osmótico dos laticíferos, o vírus parece influenciar também o estado de fluidez do látex. A determinação da morfologia superficial dos polímeros do látex indicou que o vírus é capaz de torná-los muito mais irregulares (Figura 24). Estas características podem ser determinantes para o grau de polimerização do látex do mamoeiro. Gidrol e outros (1994), estudando o processo de polimerização do látex de seringueira, propuseram um modelo de polimerização que envolve dois elementos chave: glicoproteínas dispostas na superfície dos polímeros e proteínas do tipo heveínas. De acordo com este modelo, as proteínas heveínas se ligam aos açúcares das glicoproteínas dispostas na superfície de polímeros adjacentes,

promovendo a conexão destes polímeros. Os polímeros interligados, então, determinam a maior viscosidade do látex. As influências exercidas pelo PMeV na morfologia superficial dos polímeros de látex podem atuar dificultando este processo de conexão entre polímeros adjacentes. Os dados obtidos após a análise histoquímica sugerem que açúcares presentes na superfície dos polímeros podem ser também importantes para a polimerização do látex do mamoeiro. De acordo com esta idéia, observou-se que o látex infectado pelo PMeV apresenta um teor bastante reduzido de açúcares redutores, acompanhado de uma distribuição dispersa destes açúcares (Figura 21A e B). No látex sadio, por outro lado, os açúcares redutores foram corados fortemente, estando associados à superfície dos polímeros (Figura 21B). Portanto, uma menor quantidade de açúcares redutores, acompanhada de uma disposição superficial incorreta poderia explicar o estado mais fluido, característico do látex de mamoeiros com meleira.

As alterações identificadas no látex do mamoeiro como consequência da infecção pelo PMeV podem ser induzidas pelo vírus em benefício do processo infeccioso. A pressão de turgência crescente, que resulta da maior captação de água pelos laticíferos, poderia assumir níveis não suportados pela membrana plasmática destas células, o que explicaria a exsudação espontânea de látex observada em mamoeiros com meleira. A ocorrência de exsudação é fundamental para o fluxo de látex no interior dos laticíferos. Ao contrário, sob condições fisiológicas normais, que não resultam em exsudação espontânea, o látex permanece estável no interior dos laticíferos. As modificações induzidas pelo PMeV determinam o fluxo de látex ao longo dos laticíferos, com o consequente transporte do vírus pela planta. Tal transporte torna-se ainda mais eficiente através da ligação do PMeV na superfície dos polímeros de látex, conforme observado após a análise por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 26). De fato, as características anatômicas dos laticíferos são perfeitamente adequadas à esta função de distribuição do PMeV, já que eles formam um complexo de células, que interliga todos os órgãos do mamoeiro (ESAÚ, 1976).

6 CONCLUSÕES

- ✓ A diluição do látex do mamoeiro em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) seguida da extração de ácidos nucleicos utilizando-se fenol e clorofórmio representa uma estratégia viável e eficiente para a detecção molecular do PMeV em mamoeiros. A integridade do dsRNA presente é preservada durante 25 dias, quando o látex diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) é armazenado à -20 °C.
- ✓ O método cromatográfico de extração de dsRNA à partir dos tecidos do mamoeiro mostrou-se inadequado para fins de diagnóstico do PMeV. Por outro lado, a metodologia apresentada neste trabalho para a extração do dsRNA do vírus a partir dos tecidos do mamoeiro mostrou-se mais atrativa para o diagnóstico do PMeV nos tecidos da planta.
- ✓ A infecção do PMeV em mudas de mamoeiro não é estabelecida quando o látex coletado a partir de plantas com meleira é aplicado sobre cortes feitos na superfície de pecíolo e limbo das folhas, bem como sobre limbo lesionado com abrasivo, sugerindo que o vírus não é transmitido durante o trato cultural. Por outro lado, a infecção é estabelecida quando o látex coletado a partir de plantas com meleira é injetado no ápice do caule.
- ✓ A mosca-branca *T. variabilis* é capaz de adquirir o PMeV a partir de mamoeiros infectado, embora seja incapaz de transmitir este mesmo vírus para mamoeiros sadio dos cultivares Taiwan, Golden e Sunrise Solo.
- ✓ Em mamoeiros infectados pelo PMeV e mamoeiros com meleira o vírus concentra-se na parte aérea da planta, concentrando-se nos órgãos ricos em laticíferos.
- ✓ O vírus altera a composição bioquímica do látex incluindo uma redução na concentração de proteínas totais, açúcares totais e sacarose. Esta redução no teor de açúcares é acompanhada por uma alteração na disposição dos açúcares redutores na superfície dos polímeros de látex. O vírus induz também a síntese de alcalóides e um acúmulo de cristais de oxalato de cálcio.

- ✓ O acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nos laticíferos infectados pelo PMeV é acompanhado pela síntese de H_2O_2 nestas células, como uma resposta de defesa do mamoeiro. Embora esta característica tenha sido observada tanto em tecidos infectados quanto em tecidos saudáveis, ela foi mais pronunciada nos tecidos infectados pelo PMeV. Por outro lado, H_2O_2 foi produzido especificamente nas células companheiras do floema de tecidos infectados, sugerindo alguma influência direta ou indireta do vírus nestas células.
- ✓ O PMeV induz um acúmulo dos elementos químicos K e P no laticífero resultando na redução do potencial destas células como a consequente captação de água à partir das células vizinhas. De fato, o látex infectado apresenta um maior teor de água quando comparado como látex saudável.
- ✓ O PMeV altera a morfologia superficial dos polímeros do látex, efeito este que, associado às alterações na quantidade e disposição dos açúcares redutores na superfície dos polímeros presentes no exsudado, pode reduzir consideravelmente o grau de polimerização do látex de mamoeiros infectados pelo vírus. Além destas alterações, o vírus encontra-se ligado fortemente na superfície dos polímeros modificados. Portanto, o PMeV altera a fisiologia dos laticíferos induzindo a entrada de água nestas células e facilitando o fluxo de látex ao longo dos canais. Este processo pode, então, ser utilizado pelo vírus para se movimentar dentro da planta colonizando tecidos não infectados.

7 REFERÊNCIAS

- 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. **Fitopatol. Bras.**, n. 14, p. 110-111, 1989.
- ALLAN, A.C.; LAPIDOT, M.; CULVER, J.M.; FLUHR, R. An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 97-128, 2001.
- ANDRADE, J.S.; VENTURA, J.A.; RODRIGUES, S.P.; COUTO, A.O.F.; LIMA, R.C.A.; TATAGIBA, J.S.; COSTA, H.; FERNANDES, P.M.B.; MARTINS, D. DoS S. Evidência da não-transmissão do vírus da meleira do mamoeiro por mosca-branca *Trialeurodes variabilis* (Quaintence, 1990). In: Martins D. dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p. 605-608, 2003.
- ASURMENDI, S.; BERGI, R.H.; KOO, J.C.; BEACHY, R.N. Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 1415-1420, 2004.
- AUDY, P.; PALUKAITIS, P.; SLACK, S.A.; ZAITLIN, M. Replicase-mediated resistance to Potato virus Y in transgenic plants. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 7, p. 18-22, 1994.
- AZEVEDO, C.; SADANANDOM, A.; KITAGAWA, K.; FREIALDENHOVEN, A.; SHIRASU, K.; SCHULZE-LEFERT, P. The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. **Science**, v. 295, p. 2073-2076, 2002.
- BACH, M.; SCHNITZLER, J.P.; SEITZ, H.U. Elicitor-induced changes in Ca²⁺ influx, K⁺ efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *daucus carota* 1. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 407-412, 1993.

- BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W.; MOCK, N.M. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. **Plant Physiol.**, v. 102, p. 1341-1344, 1993.
- BALAGUE, C.; LIN, B.; ALCON, C.; FLOTTE, G.; MALMSTROM, S.; KOHLER, C.; NEUHAUS, G.; PELLETIER, G.; GAYMARD, F.; ROBY, D. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. **Plant Cell**, v. 15, p. 365-379, 2003.
- BARBOSA, C.J.; HABIBE, T.C.; NASCIMENTO, A.S. Detecção de formas replicativas de vírus semelhantes às de meleira em gramíneas de pomares afetados. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 1999, Botucatu. **Programas e Resumos**, Botucatu: SPF, 1999a.
- BARBOSA, C.J.; MEISSNER FILHO, P.E.; HABIBE, T.C.; VILARINHOS, A.D.; MATRANGOLO, W.L. Distribuição de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiros afetados pela meleira. **Ver. Bras. Frutic.**, v. 21, p. 356-358, 1999b.
- BOLAND, G.J. Hipovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 10-17, 1992.
- BOLWELL, G.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **J. Exp. Bot.**, v. 53, p. 1367-1376, 2002.
- BRASIL. Portaria nº 134, de 17 de novembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 nov. 1997, v. 73.
- BRAVO, L.M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C.E. A biochemical comparison between látex from *Carica candamarcensis* and *C.papaya*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2831-2842, 1994.
- CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K.; SCHAAD, M.C. Cell-to-cell and long-distance transport of plant viruses. **Plant Cell**, v. 8, p. 1669-1681, 1996.
- CHANDRA, S.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 3979-3986, 1996.

- CHOEN, J.; FRANCK, A.; VETTEN, H.J.; LESEMANN, D.E.; LOEBENSTEIN, G. Purification and properties of closterovirus-like particles associated with a whitefly-transmitted Gemini-like virus. **Ann. Appl. Biol.**, v. 121, p. 257-268, 1992.
- CORREA, F.J.F.; FRANCO, B.J.D.C.; WATANABE, H.S.; SAKAY, M.Y.; YAMASHITA, E.M. Estudo preliminar sobre a exsudação de látex do mamoeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA CULTURA DO MAMOEIRO, 2., 1988, Jaboticabal. **Anais Jaboticabal: UNESP**, 1988. p. 409-428.
- CULIK, M.P.; MARTINS, D. dos S. First record of *Trialeurodes variabilis* (Quaintance)(Hemiptera: Aleyrodidae) on *Carica papaya* L. in the State of Espírito Santo, Brazil. **Neotrop. Entomol.**, v. 33, p. 659-660, 2004.
- Da CUNHA, M.; GOMES, V.M.; XAVIER-FILHO, J.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; MIGUENS, F.C. The laticifer system of *Chamaesyce thymifolia*: a closed host environment for plant Trypanosomatids. **Biocell**, v. 24, p. 123-132, 2000.
- DATTA, S.K.; IQBAL, M. The laticiferous system in vascular plants. In: IQBAL, M. (Org.). **Growth patterns in vascular plants**. Portland, Oregon: Timber press, cap.6, p.137-161, 1994.
- DAVIS, M.J.; KRAMER, J.B.; FERWERDA, F.H.; BRUNNER, B.R. Association of a bacterium and not a phytoplasm with papaya bunchy top disease. **Pythopathology**, v. 86, p. 102-109, 1996.
- DEUNFF, E.L.; DAVOLNE, C.; DANTEC, C.L.; BILLARD, J.; HUAULT, C. Oxidative Bursa and expression of *germin/oxo* genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. **The Plant Journal** 38, 421-431, 2004.
- DIAZ-PENDON, J.A.; TRUNIGER, V.; NIETO, C.; GRACIA-MAS, J.; BENDAHMANE, A.; ARANDA, M.A. Advances in understanding recessive resistance to viruses. **Mol. Plant Pathol.**, v. 5, p. 223-233, 2004.
- DODDS, J.A.; BAR-JOSEPH, M. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. **Phytopathology**, v. 73, p. 419-423, 1983.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

- DUMAS, B.; FREYSSINET, G.; PALLETT, K.E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1091-1096, 1995.
- ESAÚ, K. **Anatomía Vegetal**. 3 ed. Barcelona: Ediciones Omega, S. A., 1976
- FAO. **Tropical fruits commodity notes**: Highlights includes 2002 production dates for mangoes, pineapple, avocado e papaya and a review of preliminary 2002 trade date. Disponível em: http://www.fao.org/es/esc/en/20953/21038/highlight_26407en.html. Acesso em: 30 nov. de 2005.
- FARREL JÚNIOR, R.E. **RNA methodologies**: a laboratory guide for isolation and characterization. 2ª edição. San Diego: Academic Press. 1998.
- FAUQUET, C. Taxonomy and classification-general. In: WEBSTER, R.G., GRANOFF, A. (Eds.). **Encyclopedia of virology**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 1398-1340.
- FELIX, G.; GROSSKOPF, D.G.; REGENASS, M.; BOLLER, T. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 8831-8834, 1991.
- FELIX, G.; REGENASS, M.; BOLLER, T. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. **Plant J.**, v. 4, p. 307-316, 1993.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- GASPAR, L.P.; JOHNSON, J.E.; SILVA, J.L.; Da POIAN, A.T. Partially folded states of the capsid protein of Cowpea severe mosaic virus in the disassembly pathway. **J. Mol. Biol.**, v. 273, p. 456-466, 1997.
- GIDROL, X.; CHRESTIN, H.; TAN, H.; KUSH, A. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 9278-9283, 1994.

- GRAY, S.M.; BANERJEE, N. Mechanisms of arthropods transmission of plant and animal viruses. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 128-148, 1999.
- GRILLI, M.P.; HOLT, J. Vector feeding period variability in epidemiological models of persistent plant viruses. **Ecological Modelling**, v. 126, p. 49–57, 2000.
- HABIBE, T.C.; BARBOSA, C.J.; NASCIMENTO, A.S. Metodologia simplificada para detecção de formas replicativas de vírus em mamoeiros afetados pela meleira. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., Jaboticabal, 1999. **Programas e Resumos** Jaboticabal: UNESP, 1999.
- HABIBE, T.C.; DANTAS, J.L.L.; VIDAL, C.A.; SILVA, Q. de A. Reação de genótipos de mamoeiros à inoculação com meleira. **Fitopatol. Bras.**, v. 27, p. 206, 2002.
- HILLS, G.H.; PLASKITT, K.A.; YOUNG, N.D.; DUNIGAN, D.D.; WATTS, J.W.; WILSON, T.M.A.; ZAITLIN, M. Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. **Virology**, v. 161, p. 488-496, 1987.
- HOFFMANN, K.; VERBEEK, M.; ROMANO, A.; DULLEMANS, A.M.; van den HEUVEL, J.F.J.M.; van der WILK, F. Mechanical transmission of poleroviruses. **J. Virol. Methods.**, v. 91, p. 197-201, 2001.
- HUNTER, W.B.; ULLMAN, D.E. Anatomy and ultrastructure of the piercing-sucking mouthparts and paraglossal sensilla of Frankliniella-Occidentales Pergande Thysanoptera Thripidae. **Int. J. Insect. Morphol.**, v. 21, p. 17-35, 1992.
- HUNTER, J.R. Reconsidering the function of latex. **Trees**, v. 9, p. 1-5, 1994.
- KIM, J.S.; KIM, Y.O.; RYU, H.J.; KWAK, Y.S.; LEE, J.Y.; KANG, H. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. **Plant Cell Physiol.**, v. 44, p. 412–414, 2003.
- KITAJIMA, E.W.; RODRÍGUEZ, C.H.; SILVEIRA, J.A.; ALVES, F.L.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric particles, restricted to laticifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatol. Bras.**, v. 18, p. 118-122, 1993.

- KO, J.H.; CHOW, K.S.; HAN, K.H. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (rubber tree). **Plant Mol. Biol.**, v. 53, p. 479–492, 2003.
- KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I.E. Defense of plants to pathogens. **Adv. Bot. Res.**, v. 21, p. 1-34, 1995.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, v. 37, p. 370-378, 2004.
- KUSH, A.; GOYVAERTS, E.; CHYE, M.L.; CHUA, N.H. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 87, p. 1787–1790, 1990.
- McLEAN, B.; HEMPEL, F.D.; ZAMBRYSKI, P.C. Plant intercellular communication via plasmodesmata. **Plant Cell**, v. 9, p. 1043-1054, 1997.
- LANE, B.G. Oxalate, germin, and extracellular matrix of higher plants. **FASEB J.**, v. 5, p. 12239-12242, 1994.
- LANE, B.G.; DUNWELL, J.M.; RAY, J.A.; SCHMITT, M.R.; CUMING, A.C. Germin, a marker protein of early plant growth, is an oxalate oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12239-12242, 1993.
- LEISNER, S.M.; TURGEON, R.; HOWELL, S.H. Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 5, p. 191-202, 1993.
- LIMA, R.C.; LIMA, A.A.; SOUZA JR., M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatol. Bras.**, v. 26, p. 689-702, 2001.
- LIMA, R.C.A.; COUTO, A.O.F.; ANDRADE, J.S.; MARTINS, D. Dos S.; VENTURA, J.A.; TATAGIBA, J.S.; COSTA, H. Flutuação populacional de insetos vetores de doenças do mamoeiro e sua relação com a ocorrência de doenças viróticas. In: Martins, D. dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 539-541, 2003.

- LIVINGSTONE, D.M.; HAPTON, J.L.; PHIPPS, P.M.; GRABAU, E.A. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. **Plant Physiol.**, v. 137, p. 1354-62, 2005.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARTIN, G.B.; BOGDANOVE, A.J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 23-61, 2003.
- MARTINS, D. Dos S. Situação atual da produção integrada de mamão no Brasil. In: Martins, D. Dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p.97-130, 2003.
- MELO, J. W.; RUGGIERO, C. A Papaína. In: RUGGIERO, C. (Org.). **Mamão**. Jaboticabal, BR: FCAV/UNESP. p. 47-88, 1988.
- MELTON, D.A.; KRIEG, P.A.; REBAGLIATI, M.R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M.R. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. **Nucleic Acid Research**, v. 12, p. 7035-7056, 1984.
- MOUTIM, V.; SILVA, L.G.; LOPES, M.T.P.; WILSON FERNANDES, G.; SALAS, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Science**, v. 142, p. 115-121, 1999.
- MINK, G.I. Pollen-and seed-transmitted viruses and viroids. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 31, p. 375-402, 1993.
- NAKAGAWA, J.; TAKAYAWA, Y.; SUZUKAWA, Y. Exsudação de látex do mamoeiro: estudo da ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: IX Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais**. Campinas,SP:SBF/UNICAMP, 555-559, 1987.
- NASCIMENTO, A.S.; FRIGHETTO, R.S.; MALAVASI, A.; HABIBE, T.C. Avaliação dos teores de benzil-isotiocianato (BITC) em mamoeiros infectados pela meleira em condições de campo e telado. In: MARTINS, D. Dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p. 597-600, 2003.

- OPALKA, N.; BRUGIDOU, C.; BONNEAU, C.; NICOLE, M.; BEACHY, R.N.; YEARGER, M.; FAUQUET, C. Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3323-3328, 1998.
- PARE, P.W.; FARAG, M.A.; KRISHINAMACHARI, V.; ZHANG, H.; RYU, Z.M.; KLOEPPER, J.W. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynth. Res.**, v. 85, p. 149-159, 2005.
- PRATES, R.S. Aspectos operacionais do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos: sete anos de sucesso. In: MARTINS, D. Dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória, ES: INCAPER. p. 57-78, 2005.
- PRUSS, G.J.; LAWRENCE, C.B.; BASS, T.; LI, Q.Q.; BOWMAN, L.H.; VANCE, V. The potyviral suppressor of RNA silencing confers resistance to multiple pathogens. **Virology**, v. 320, p. 107-120. 2004.
- PUNDIR, S.; PUNDIR, G.S. Purification and properties of an oxalate oxidase from leaves of grain sorghum hybrid SCH-5. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1161, p. 1-5, 1993.
- REDINBAUGH, M.G. Transmission of Maize streak virus by vascular puncture inoculation with unit-length genomic DNA. **J. Virol. Methods**, v. 109, p. 95-98, 2003.
- REDINBAUGH, M.G.; LOUIE, R.; NGWIRA, P.; EDEMA, R.; GORDON, D.T.; BISARO, D.M. Transmission of viral RNA and DNA to maize kernels by vascular puncture inoculation. **J. Virol. Methods**, v. 98, p. 135-143, 2001.
- REINISCH, K.M. The dsRNA *Viridae* and their catalytic capsids. **Nature**, v. 9, p. 714-716, 2002.
- RODRIGUES, S.P.; LINDSEY, G.; FERNANDES, P.M.B. Biotechnological Approaches to the Control of Plant Viruses. In: THANGADURAI, D. (Org.). **Plant Stress and Biotechnology**. Tamil Nadu, cap. 6, 2006.
- RODRIGUES, C.H.; VENTURA, J.A.; MARIN, S.L.D. Ocorrência e sintomas da meleira do mamoeiro (*Carica papaya*) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatol. Bras.**, v. 14, p. 118, 1989a.

- RODRIGUES, C.H.; VENTURA, J.A.; MAFFIA, L.A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Estado do Espírito Santo. **Fitopatol. Bras.**, v. 14, p. 118, 1989b.
- RITZENTHALER, C. Resistance to plant viruses: old issues, news answers? *Current Opin. Plant Biotechnology*, v. 16, p. 118-122, 2005.
- RUGGIERO, C.; DURIGAN, J.F.; GÓES, A.; NATALE, W.; BENASSI, A.C. Panorama da produção do mamão no Brasil e no mundo: Situação atual e tendências. In: MARTINS D. Dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p. 13-34, 2003.
- SOUZA JÚNIOR, M.T.; TAVARES, E.T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VENTURA, J.A. Studies aiming molecular characterization, early diagnosis, and control of papaya stick disease. **Virus Reviews & Research**, v. 7, 2002.
- SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W.F.; RYAN, C.A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 2006, article in press.
- TATAGIBA, J.S.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; COSTA, A.F. Evolução temporal dos sintomas da meleira do mamoeiro associada à condições climáticas. **Fitopatol. Bras.**, v. 27, p. 214, 2002.
- TAVARES, E.T.; TATAGIBA, J.S.; VENTURA, J.A.; SOUZA, JR. M.T. Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. **Fitopatol. Bras.**, v. 29, p. 563-566, 2004.
- TEL-ZUR, N.; ABBO, S.; MYSLABODSKI, D.; MIZRAHI, Y. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Celenicereus* (*Cactaceae*). **Plant Molecular Reporter**, v. 17, p. 249-254, 1999.
- TENLLADO, F.; MARTÍNEZ-GRACIA, B.; VARGAS, M.; DÍAZ-RUÍZ, J.R.. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnol.**, v. 3, p. 1-11, 2003.

- UCHIDER, T.; EGAMI, F. The specificity of ribonuclease T2. **Journal of Biochemistry**, v. 61, p. 44-49, 1967.
- VALVERDE, R.A. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, v. 74, p. 255-258, 1990.
- VALVERDE, R.A.; SIM, J.; LOTRAKUL, P. Whitefly transmission of sweet potato viruses. **Virus Res.**, v. 100, p. 123-128, 2004.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S.; ANDRADE, J.S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomatologia e controle. In: MARTINS D. Dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p. 267-276, 2003.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o "roguing". **Fitopatol. Bras.**, v. 26, p. 536, 2001.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças de fruteiras tropicais: abacaxi, banana e mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado de doenças e pragas: fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV. 2000.
- VERA-ESTRELLA, R.; HIGGINS, V.J.; BLUMWALD, E. Plant defense response to fungal pathogens II. G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 97-102, 1994.
- WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1795-804, 2004.
- WANG, D.; MAULE, A.J. A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea seed-born mosaic virus. **Plant Cell**, v. 6, p. 777-787, 1994.
- WEID, M.; ZIEGLER, J.; KUTCHAN, T.M. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, p. 13957-13962, 2004.
- WINTER, E.; YAMAMATO, F.; ALMOGNESA, C.; PERUCHO, M.A. A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes: amplification and over

expression of the mutant c-k-ras allele in human tumor cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7575-7579, 1985.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early response to pathogen infection. **Biochem. J.**, v. 322, p. 681-692, 1997.

ZALESKI, W.; REINHAD, A. Uber die fermentative oxydation der oxalsaure. **Biochem. Z.**, v. 33, p. 449-455, 1911.

ZAMBOLIM, E.M.; ALONSO, S.K.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Purification and partial characterization of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. **Plant Pathol.**, v. 52, p. 389-394, 2003.