

**ÁLVARO JULIO PEREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA VARIABILIDADE  
GENÉTICA DO *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), E TRIAGEM DE FONTES  
DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS EM GERMOPLASMA DE *Carica papaya* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

**ÁLVARO JULIO PEREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA VARIABILIDADE  
GENÉTICA DO *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), E TRIAGEM DE FONTES  
DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS EM GERMOPLASMA DE *Carica papaya* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2011.

---

Pesq. Eduardo Chumbinho de Andrade

---

Prof. Danielle Ribeiro de Barros

---

Pesq. Poliane Alfenas-Zerbini

---

Prof. Claudine Márcia de Carvalho  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior  
(Orientador)

“A vida é feita por momentos.

Use cada momento para fazer algo. Faça, erre, acerte, arrisque, caia, levante, falhe, lute, mas... não jogue fora, se acomodando, a extraordinária oportunidade de ter vivido. Um homem que ousa desperdiçar uma hora ainda não descobriu o valor da vida.”

(Charles Darwin)

Às pessoas mais importantes da minha vida que sempre acreditaram em mim, que me permitiram sonhar e contribuíram para a realização destes sonhos...meus pais Luiz e Rosa, meus irmãos e irmãs

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente nos momentos difíceis e felizes, tu fostes a minha esperança, o meu socorro e amparo, em ti está toda a minha confiança, sou muito grato a Ti;

Aos meus pais Luis e Rosa e toda minha querida família, pelo apoio e incentivo desde os primeiros passos da minha caminhada escolar, sem vocês eu não chegaria até aqui;

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela liberação para realização do curso;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGM), ao Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) pela oportunidade de realização deste curso;

Por ser um trabalho de longa duração, esta tese não se concretizaria de forma isolada, sem o auxílio direto e indireto de um grande número de pessoas queridas.

Ao Prof. Francisco Murilo Zerbini por ter me aceito como seu orientando, por sua brilhante orientação, pelas críticas, sugestões. Procurarei carregar comigo seus ensinamentos pelo restante de minha vida;

Aos professores co-orientadores Acelino Couto Alfenas, sempre prestativo e com seu refinado senso de humor e Claudine Márcia Carvalho pelas críticas e sugestões;

Ao pesquisador Eduardo Chumbinho de Andrade pela sua disposição, apoio, sugestões e cessão de vários materiais usados neste trabalho;

À pesquisadora Poliane Alfenas Zerbini, por seu rigor científico e sua inestimável ajuda durante a realização do segundo capítulo da tese;

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, os quais tive a oportunidade de ser aluno, pela altíssima qualidade de ensino oferecida;

Ao colega de laboratório Renan Cascardo, pelo auxílio na parte experimental da tese, serei eternamente grato a você por tudo;

À pós-graduanda Glória Patrícia, à Joyce, ao Marcos Basso, pela valorosa ajuda, vocês foram muito especiais, cedendo seu tempo no auxílio em várias etapas deste trabalho;

E naturalmente a todos os colegas do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Fábio, Alisson, Carol, Fernanda, Larissa, Roberto, Dani, Danizinha, Amanda, Ana Angélica, Sávio, Antonio Wilson, César, Riane, Márcio, Sarah, aos cubanos Jorge, Mercedes e outros que, por falta de memória, não lembrei-me de citar, mas que me ajudaram em todos os momentos de dificuldades e com quem pude compartilhar as alegrias de nossa convivência;

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, e outros laboratórios do BIOAGRO e Fitopatologia pela cessão de equipamentos. Ao Paulo e a todos os funcionários do BIOAGRO e da Fitopatologia, sou grato a todos.

## **BIOGRAFIA**

Álvaro Julio Pereira, filho de Luiz Gonzaga Pereira e Rosa Ferro Pereira, nasceu em 12 de julho de 1963 em Bela Vista do Paraíso no Paraná.

Em 1988 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá (UEM), vindo a graduar-se em 15 de fevereiro de 1992.

No período de 02 de junho de 1992 a 30 de abril de 1993 participou de estágio na área de Fitopatologia no Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, em Londrina no Paraná.

De 1993 a 1998 atuou como professor de ciências e biologia na rede pública estadual do município de Maringá no Paraná.

Em março de 1998 ingressou no curso de pós-graduação em Agronomia, área de Melhoramento Genético Vegetal, nível de mestrado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), defendendo dissertação em 28 de julho de 2000.

Em março de 2003 iniciou carreira como professor Assistente no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Ceará (UECE), campus da Faculdade de Educação de Itapipoca (FACEDI) em Itapipoca-Ceará.

Em março de 2007, iniciou o curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética Molecular e Microorganismos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa em Minas Gerais. Em 28 de julho de 2011 concluiu o doutorado com defesa de tese.

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura.....	4
1. Mamoeiro: Características gerais.....	4
2. Principais viroses do mamoeiro no Brasil .....	6
2.1. Mancha anelar do mamoeiro .....	6
2.2. Meleira do mamoeiro .....	6
2.3. Amarelo letal do mamoeiro.....	7
Literatura citada .....	11
Capítulo 1. Genetic variability of <i>Papaya lethal yellowing virus</i> (PLYV) isolates from Ceará and Rio Grande do Norte states, Brazil.....	17
Abstract.....	19
Resumo .....	20
Introduction.....	21
Material and Methods .....	22
Results and Discussion .....	24
Literature Cited.....	27
Figure legends.....	33
Capítulo 2. Analysis of the full-length genome sequence of <i>Papaya lethal yellowing virus</i> , determined by deep sequencing, confirms its classification in the genus <i>Sobemovirus</i> .....	37
Abstract.....	39
Literature Cited.....	43
Figure legends.....	45
Capítulo 3. Avaliação da resistência genética ao <i>Papaya lethal yellowing virus</i> (PLYV) em genótipos de mamoeiro ( <i>Carica papaya</i> L.).....	55
Resumo .....	57
Abstract.....	58
Introdução .....	59
Material e Métodos .....	61
Resultados e Discussão.....	63

Literatura Citada .....	68
Conclusões Gerais.....	72

## RESUMO

PEREIRA, Álvaro Julio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.  
**Caracterização molecular e análise da variabilidade genética do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), e triagem de fontes de resistência ao vírus em germoplasma de *Carica papaya* L.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.  
Co-orientadores: Claudine Márcia Carvalho e Acelino Couto Alfenas.

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma fruta de grande importância econômica em todo o nordeste brasileiro, região responsável por 60% da produção nacional. Mamoeiros nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte são afetados pelo amarelo letal, causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). A fim de estimar a variabilidade genética de isolados de PLYV, amostras foliares de mamoeiro foram coletadas em regiões produtoras dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Fragmentos de 16 isolados virais com aproximadamente 900 pb, correspondente à região central do genoma viral, foram amplificados via RT-PCR, clonados e sequenciados. A análise das sequências indicou >97% de identidade entre os isolados, entre 94-100% com o isolado de PLYV previamente sequenciado, e uma identidade menor, mas significativa, com vírus pertencentes ao gênero *Sobemovirus*. Estes resultados indicam um baixo grau de variabilidade genética entre isolados de PLYV. O genoma viral foi sequenciado em sua totalidade utilizando a plataforma Roche 454 GS-FLX Titanium. A análise da sequência indica a presença de uma primeira ORF com o potencial de codificar uma proteína sem identidade significativa com nenhuma outra proteína, duas ORFs parcialmente sobrepostas com o potencial de codificar uma RNA-dependente RNA polimerase e uma quarta ORF com o potencial de codificar a proteína capsidial. A RdRp e a CP

apresentam identidade de sequência significativa com as proteínas correspondentes de outros sobemovírus. Apesar da ausência de identidade da ORF1, a organização do genoma praticamente idêntica à dos sobemovírus, inclusive com uma possível mudança de fase entre as duas ORFs que codificam a RdRp, e a identidade das demais ORFs confirmam a classificação do PLYV como uma espécie do gênero *Sobemovirus*. Com o objetivo de avaliar a possível existência de genótipos de mamoeiro com resistência/tolerância ao PLYV, foi realizado um estudo utilizando-se 60 acessos provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As plantas foram inoculadas via extrato vegetal tamponado em um delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas 90 dias após a inoculação por meio de ELISA indireto, empregando-se um anti-soro policlonal. Os resultados indicaram que os acessos CMF11, 15, 20, 21, 22, 26, 30, 33, 36, 38, 44, 47, 52, 54, 60, 72, 76, 82, 88, 92, 94, 102, 108, 114, 116, 120, 121, 123, 129, 130, 132, 150, 155, 166, 172, 175, 176, 183, 186, 200, 204, 206, 220, 223, 230, 233, 234 e 235 são prováveis fontes de resistência ao vírus. Caso esses resultados sejam confirmados, estes acessos poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético visando a incorporação de resistência ao amarelo letal em cultivares comerciais de mamoeiro.

## ABSTRACT

PEREIRA, Álvaro Julio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011. **Molecular characterization and genetic variability of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), and screening for sources of natural resistance in *Carica papaya* L. germplasm.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co- Advisers: Claudine Márcia Carvalho and Acelino Couto Alfenas.

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit crop of great economical importance throughout the Brazilian northeast, which is responsible for 60% of the national output. Papayas in the states of Ceará and Rio Grande do Norte are affected by lethal yellowing disease, caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). To assess the genetic variability of PLYV isolates, foliar samples were collected in fields from Ceará and Rio Grande do Norte states. Fragments from 16 viral isolates with approximately 900 bp were RT-PCR-amplified, cloned and sequenced. Sequence analyses indicated >97% identity among the isolates, 94-100% identity with a previously sequenced PLYV isolate, and a lower but significant identity with viruses in the genus *Sobemovirus*. These results indicate a low degree of genetic variability among PLYV isolates. The viral genome was sequenced in its entirety using the Roche 454 GS-FLX Titanium platform. Sequence analysis indicates the presence of a first ORF with the potential to encode a protein without any significant similarity with known proteins, two partially overlapping ORFs that potentially encode an RNA-dependent RNA polymerase, and a fourth ORF which potentially encodes the coat protein. The RdRp and CP have significant sequence identity with sobemoviruses. In spite of the lack of sequence similarity of ORF1, the nearly identical genomic organization with sobemoviruses,

including a putative frame shift site between the two ORFs which encode the RdRp, as well as the identity of the RdRp and CP ORFs, confirm the classification of PLYV as a species in the genus *Sobemovirus*. With the objective of evaluating the existence of genetic resistance to PLYV in papaya germplasm, a study was conducted with 60 accessions from the BAG (Active Germplasm Bank) of Embrapa Mandioca e Fruticultura. The plants were mechanically inoculated in a completely randomized design. Inoculated plants were tested for viral infection 90 days after inoculation by indirect ELISA using a polyclonal antiserum against PLYV. The results indicate that accesses CMF11, 15, 20, 21, 22, 26, 30, 33, 36, 38, 44, 47, 52, 54, 60, 72, 76, 82, 88, 92, 94, 102, 108, 114, 116, 120, 121, 123, 129, 130, 132, 150, 155, 166, 172, 175, 176, 183, 186, 200, 204, 206, 220, 223, 230, 233, 234 and 235 are possible sources of resistance to the virus. In case these results are confirmed, these accesses can be used in breeding programs aiming at incorporating resistance to lethal yellowing in commercial papaya cultivars.

## INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea de origem tropical americana, mais precisamente da América Central entre o México e a Costa Rica, e da bacia Amazônica Superior, onde a sua diversidade genética é máxima. Atualmente o mamoeiro é cultivado nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Serrano e Cataneo, 2010). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão (após a Índia), com produção estimada de 1,89 milhões de toneladas em 2008, situando-se também entre os principais países exportadores, principalmente para o mercado europeu (FAO; [www.fao.org](http://www.fao.org)). O mamoeiro é cultivado em quase todo território brasileiro, com destaque para os estados da Bahia e Espírito Santo, responsáveis por cerca de 87% da produção nacional (Cruz, 2008). O estado do Ceará atingiu uma produção correspondente a 5,71% da região nordeste e 3,36% do Brasil em 2007 (Quintino, 2007). A produção cearense apresentou um crescimento de 57% entre 1999 e 2006, passando de 40.271 para 63.276 toneladas nesse período. Os principais produtores cearenses estão localizados na região de Ibiapaba, responsável por 40% da produção do estado, e na região Metropolitana de Fortaleza, responsável por 28% da produção. As regiões do Baixo Acaraú, Baixo Jaguaribe e Sertão Central respondem pelo restante da produção (Quintino, 2007).

Simultaneamente à grande expansão da cultura no país e no estado do Ceará, vários problemas fitopatológicos vêm sendo constatados, os quais depreciam a qualidade do fruto, reduzem a produtividade e longevidade da cultura. Entre as doenças causadas por vírus de maior expressão econômica, e que causam sérios prejuízos para o

cultivo do mamoeiro no Brasil incluem-se a mancha anelar, causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV; gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) (Rezende e Fancelli, 1997), a meleira, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV; sem gênero e família definidos) (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003), e o amarelo letal, causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV; possível gênero *Sobemovirus*) (Loreto *et al.*, 1983; Nascimento *et al.*, 2010).

No Brasil, tanto a mancha-anelar como a meleira são controladas por meio de "roguing", uma prática que consiste na remoção (corte) de plantas com sintomas (Lima *et al.*, 2001b). Nos estados do Espírito Santo e Bahia, principais produtores de mamão no Brasil, o "roguing" é uma prática agrônômica essencial ao cultivo do mamoeiro e regidas por lei estadual. Inspeções diárias são realizadas toda a fase da cultura, removendo-se qualquer planta que apresente sintomas semelhantes aos causados pelo PRSV e PMeV (Ventura *et al.*, 2001). A eficiência do "roguing", principalmente no controle da mancha anelar, tem sido atribuída à prevalência nessas regiões de estirpes menos severas do PRSV (Giampan e Rezende, 2004). Nos Estados Unidos (estado do Havaí), a mancha anelar vem sendo controlada desde 1998 com o plantio de mamoeiros geneticamente modificados expressando um fragmento do gene da proteína capsidial do vírus (Gonsalves, 2006).

O amarelo letal do mamoeiro foi descrito no início da década de 1980 no estado de Pernambuco (Loreto *et al.*, 1983), e em seguida na Bahia, Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba (Vega *et al.*, 1988; Kitajima *et al.*, 1989; Lima e Santos, 1991; Camarço *et al.*, 1996). A doença, que é de ocorrência restrita ao Brasil, encontra-se disseminada pelos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, e atingiu altos índices de incidência na década de 90, no sentido leste-oeste em municípios do estado do Ceará e municípios vizinhos no estado do Rio Grande do Norte (Teixeira, 1997; Lima *et al.*,

2001a). Os sintomas são observados inicialmente nas folhas do terço superior da copa, que progressivamente amarelecem, murcham e morrem, levando a planta à morte (Loreto *et al.*, 1983). Exames eletro-microscópicos de folhas de plantas com sintomas mostraram que o vírus possui partículas isométricas de 25-30 nm de diâmetro (Kitajima *et al.*, 1992b).

Apesar da importância do PLYV para o mamoeiro, pouco se conhece do seu genoma e da variabilidade genética entre os diferentes isolados, uma informação importante para os programas de melhoramento genético. Até o presente, não foi realizado o sequenciamento total do genoma viral, e existem poucas informações sobre possíveis fontes de resistência em germoplasma de *Carica papaya* L.. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos: (i) analisar a variabilidade genética de isolados do PLYV obtidos no estado do Ceará e Rio Grande do Norte; (ii) realizar o sequenciamento completo do genoma do PLYV; (iii) realizar a triagem inicial de germoplasma de *Carica papaya* L. para a identificação de possíveis fontes de resistência ao PLYV.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Mamoeiro: Características Gerais

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea nativa da América tropical. A classificação taxonômica do mamoeiro foi objeto de várias mudanças ao longo do tempo. O gênero *Carica* já foi classificado como pertencente às famílias Passifloraceae, Cucurbitaceae, Bixaceae e Papayaceae (Silva *et al.*, 2007). Na classificação atual, o mamoeiro é pertencente à classe Dicotiledônea, subclasse Archiclamydeae, ordem Violales, família Caricaceae. A família possui seis gêneros e 35 espécies (Van Droogenbroeck *et al.*, 2002). Os gêneros *Carica* (uma espécie), *Horovitzia* (uma espécie), *Jacaratia* (sete espécies), *Jarilla* (três espécies) e *Vasconcellea* (21 espécies) são originários do continente americano, enquanto o gênero *Cylicomorpha* (duas espécies) é originário do continente africano (Van Droogenbroeck *et al.*, 2004).

Todas as espécies da família Caricaceae são plantas arbustivas ou arborescentes, providas de látex branco (Joly, 1979). O gênero *Carica* é composto por uma única espécie diplóide, com  $2n=2x=18$ , ou seja, número básico de cromossomos haplóides  $n=9$  (Storey, 1941, citado por Dantas *et al.*, 2002).

O mamoeiro apresenta três tipos de flores que dão origem às plantas do sexo masculino, feminino e hermafrodita. As plantas hermafroditas produzem frutos alongados com variações de piriforme a cilíndrico ou oval, preferidos pelos mercados interno e externo (Oliveira *et al.*, 1994,(Costa, 2005).

Apesar do baixo número de espécies da família *Caricaceae*, existe uma grande variabilidade intra e interespecífica mantida nos bancos de germoplasma (Dantas e Lima, 2001; Marín *et al.*, 2002). As características agronômicas ou industriais de interesse nos acessos conservados nos bancos de germoplasma possibilitam o uso direto do germoplasma nos sistemas de produção ou nos programas de melhoramento genético (Oliveira, 2007). Apesar dessa variabilidade, o número de cultivares plantadas é limitado, e a cultura no Brasil se sustenta em estreita base genética (Pereira *et al.*, 2003; Serrano e Cataneo, 2010).

Em geral, os mamoeiros cultivados são classificados conforme as características do fruto, sendo divididos em dois grandes grupos: Solo (ex.: 'Sunrise Solo' e 'Improved Sunrise Solo') e Formosa ('Tainung n° 1'). As linhagens pertencentes ao grupo Solo são as mais cultivadas no mundo (Ming *et al.*, 2008). A cultivar Golden, uma mutação do 'Improved Sunrise Solo 72/12', encontra-se bastante difundida nas regiões Norte do Espírito Santo e sul da Bahia, com produtividade média em torno de 90 t/ha/ano (Costa e Pacova, 2003). Um programa de melhoramento genético desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e a empresa Caliman Agrícola culminou em 2002 com o registro de nove híbridos de mamoeiro junto ao Ministério da Agricultura e no lançamento do primeiro híbrido nacional do grupo 'Formosa' ('UENF/Caliman 01'), em 2003 (Pereira *et al.*, 2003).

## **2. Principais viroses do mamoeiro no Brasil**

### **2.1. Mancha anelar do mamoeiro**

A doença denominada mancha anelar é considerada a de maior importância econômica na cultura do mamoeiro (Rezende e Fancelli, 1997). Já foi registrada na maior parte das regiões tropicais e subtropicais onde o mamoeiro é cultivado (Quiot-Douine *et al.*, 1990; Bateson *et al.*, 1994). No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo (Costa *et al.*, 1969) e em seguida no Ceará (Lima e Gomes, 1975). A incidência elevada observada em municípios da região litorânea do Ceará na década de 1980 foi atribuída ao plantio de mamoeiros em quintais residenciais, em áreas próximas aos plantios comerciais (Lima e Bezerra, 1988). A doença manifesta-se na forma de mosaico, distorção foliar, anéis oleosos nos frutos e manchas oleosas no caule. As mudas infectadas apresentam clareamento de nervuras e as folhas mais jovens se encurvam para baixo. Com o decorrer de algumas semanas, as folhas tornam-se distorcidas, com lóbulos reduzidos em tamanho (Purcifull *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 1997). O PRSV possui partículas alongadas e flexuosas medindo 780x12 nm, com genoma composto por uma fita de RNA senso positivo com 10.326 nucleotídeos (nt) (Yeh *et al.*, 1992). O PRSV induz a formação de inclusões tipo cata-vento no citoplasma das células infectadas, formadas pela proteína viral CI (Purcifull *et al.*, 1984).

## **2.2. Meleira do mamoeiro**

A meleira do mamoeiro, uma doença restrita ao Brasil, foi relatada na década de 1980 no sul da Bahia (Nakagawa *et al.*, 1987) e norte do Espírito Santo (Rodrigues *et al.*, 1989a). A doença disseminou-se rapidamente em poucos anos, atingindo os estados de Pernambuco e Ceará (Rodrigues *et al.*, 1989b; Barbosa *et al.*, 1998a; Barbosa *et al.*, 1998b). Atualmente a meleira encontra-se presente nos estados do Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (Rodrigues *et*

*al.*, 2005). A doença se caracteriza pela exsudação espontânea de látex nos frutos, que se oxida resultando em um aspecto "borrado" e "melado". A etiologia foi inicialmente controversa, mas elucidada por Kitajima *et al.* (1993), que observaram partículas isométricas de 50 nm de diâmetro no látex de mamoeiros sintomáticos. A comprovação dos postulados de Koch foi realizada por meio da purificação do vírus e transmissão via injeção da preparação purificada no ponteiro de mamoeiros sadios (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). O PMeV é um vírus de partícula isométrica com aproximadamente 50 nm de diâmetro, e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) com aproximadamente 12.000 pb (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Setenta e cinco por cento do genoma viral encontra-se sequenciado (Araujo *et al.*, 2005). A análise da sequência indicou relacionamento com o *Penicillium chrysogenum virus* (PcV), pertencente ao gênero *Chrysovirus*. Entretanto, o posicionamento taxonômico do vírus ainda não foi totalmente definido.

### **2.3. Amarelo letal do mamoeiro**

O amarelo letal do mamoeiro, causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), é uma das principais doenças do mamoeiro no nordeste brasileiro (Saraiva *et al.*, 2006). O PLYV foi descrito pela primeira vez no início da década de 1980 no estado de Pernambuco (Loreto *et al.*, 1983). Em seguida a doença foi identificada na Bahia (Vega *et al.*, 1988), no Rio Grande do Norte (Kitajima *et al.*, 1989; Kitajima *et al.*, 1992a; Kitajima *et al.*, 1992b), no Ceará (Lima e Santos, 1991) e no estado da Paraíba (Camarço *et al.*, 1996).

A infecção inicial pelo PLYV se manifesta com o amarelecimento das folhas mais novas (terço superior) da copa, que estão parcialmente desenvolvidas. Posteriormente essas folhas tornam-se cloróticas, com progressão para sintomas mais

severos como encurvamento, murchamento e senescência foliar, eventualmente induzindo a morte da planta (Saraiva *et al.*, 2006). Os frutos imaturos apresentam inicialmente manchas esverdeadas, que posteriormente se tornam amareladas na casca quando os frutos amadurecem (Lima *et al.*, 2001b). Todos esses sintomas já foram observados em mamoeiros naturalmente infectados em diferentes regiões produtoras dos estados do Ceará (Lima *et al.*, 2001b), Paraíba (Camarço *et al.*, 1998), Pernambuco (Loreto *et al.*, 1983) e Rio Grande do Norte (Teixeira, 1997).

Levantamentos realizados em diferentes localidades dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia confirmaram o diagnóstico sintomatológico para o PLYV nos frutos (Ramos *et al.*, 2008). Entretanto, o vírus se encontrou restrito a determinados pólos de produção. Corroborando estes resultados, estudos do grau de incidência do amarelo letal em amostras de mamoeiro de três municípios cearenses mostraram que o vírus estava concentrado em pomares onde anteriormente já havia registro de sua presença (Nascimento *et al.*, 2009).

Exames eletro-microscópicos de preparações "leaf dip" de folhas e frutos de plantas com sintomas revelaram a presença de grande número de partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro. O genoma é composto de RNA de fita simples e com um capsídeo formado por uma única proteína de aproximadamente 35 kDa (Kitajima *et al.*, 1992b). Estas características sugeriram que o vírus poderia constituir uma espécie da família *Tombusviridae*, gênero *Carmovirus* (Silva *et al.*, 1997). Entretanto, a presença de motivos conservados entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos genes que codificam a proteína capsidial (CP) e a RNA-dependente RNA polimerase (RdRp) do PLYV e de espécies do gênero *Sobemovirus* indicaram a possibilidade de o PLYV pertencer a esse gênero (Silva *et al.*, 2000). Os sobemovírus, assim como os tombusvírus, possuem o genoma composto por uma única

molécula de RNA de fita simples (ssRNA) de 4000-5000 nucleotídeos, empacotado em uma partícula isométrica com aproximadamente 30 nm de diâmetro (Tamm e Truve, 2000). Além disso, todos os genes codificados por espécies de tomosvírus estão presentes no genoma dos sobemovírus, porém organizados de forma diferente. Devido a essas semelhanças, e à ausência de informações mais precisas a respeito das propriedades biológicas e moleculares do PLYV, seu posicionamento taxonômico permanece indefinido.

Estudos realizados em casa-de-vegetação com 26 espécies de plantas de mamoeiro indicaram que o PLYV é estritamente limitado ao hospedeiro *Carica. Papaya* L. (Lima *et al.*, 1994). Entretanto, já foi demonstrado que o PLYV também infecta a espécie *Vasconcellea cauliflora* (Jacq.) quando inoculado via extrato vegetal tamponado (Amaral *et al.*, 2006).

Com o intuito de gerar informações sobre a variabilidade genética do PLYV em diferentes regiões produtoras do mamoeiro no estado do Ceará, Daltro *et al.* (2008) obtiveram sequências de um fragmento de aproximadamente 1100 pb do genoma viral correspondente à região 3' da RdRp e 5' da CP. A análise das sequências confirmou os dados obtidos anteriormente por Silva *et al.* (2000), indicando que o PLYV provavelmente pertence ao gênero *Sobemovirus*. Além disso, a região analisada se mostrou altamente conservada entre os isolados, sugerindo que esta região do genoma viral codifica regiões funcionalmente importantes das proteínas RdRp e CP. Um segundo estudo envolvendo quatro isolados do PLYV também obtidos no estado do Ceará indicou identidade de 69% entre as sequências de aminoácidos da RdRp do PLYV e os sobemovírus *Rice yellow mottle virus* (RYMV) e *Sesbania mosaic virus* (SeMV), e de 68% com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV). A identidade da CP foi de 45% com SeMV e o SBMV, e de 43% com o *Subterranean clover mottle virus*

(SCMoV). As comparações nucleotídicas entre os quatro isolados de PLYV revelaram identidades que variaram de 96 a 99%, demonstrando baixa variabilidade genética na região analisada (Beserra Jr. *et al.*, 2009).

Teixeira *et al.* (1999) avaliaram o grau de incidência do amarelo letal em plantios de municípios em diferentes regiões do Rio Grande do Norte, e sugeriram a possibilidade de uma baixa eficiência do vetor natural envolvido na sua disseminação, ou mesmo a ausência de um vetor. Testes anteriores realizados para verificar a transmissão do PLYV pelos afídeos *Aphis gossypii* e *Mizus persicae*, tanto de forma não persistente como de forma persistente circulativa, assim como pelos besouros das espécies *Diabrotica bivitulla* e *D. speciosa*, revelaram resultados negativos, indicando que estes insetos não estão envolvidos na disseminação do vírus no campo (Lima e Santos, 1991; Silva, 1996). Estudos realizados para avaliar as formas de sobrevivência e transmissão do PLYV demonstraram que o vírus pode ser transmitido via solo, água, instrumentos de corte contaminados e por inoculação mecânica em condições experimentais (Lima *et al.*, 1994; Camarço *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2001b). O vírus permanece nas camadas que cobrem a semente de frutos infectados, sem contudo infectar os embriões, mas é eficientemente transmitido por mãos contaminadas, mesmo após serem lavadas em água corrente, demonstrando grande estabilidade da partícula viral (Saraiva *et al.*, 2006). O PLYV foi detectado em amostras de tecido seco de mamoeiro por um período máximo de 120 dias (Nascimento *et al.*, 2008).

## LITERATURA CITADA

- AMARAL, P.P.; RESENDE, R.O.; SOUSA JR., M.T.S. *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) infects *Vasconcellea cauliflora*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 517, 2006.
- ARAUJO, M.M.M.; DA SILVA, F.R.; MARINHO, V.L.; SOUZA JR, M.T. Decodificando o genoma do vírus da "meleira"- Parte a. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. S183-184, 2005.
- BADILLO, V.M. *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St. Hil. (Caricaceae), con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, v. 10, p. 74-79, 2000.
- BARBOSA, C.J.; MEISSNER-FILHO, P.E.; HABIBE, T.C. A meleira do mamoeiro. *Bahia Agrícola*, v. 2, p. 56-57, 1998a.
- BARBOSA, C.J.; MEISSNER-FILHO, P.E.; HABIBE, T.C.; PATROCÍNIO, E.; TATAGIBA, J.; NASCIMENTO, A.S.; MATRANGOLO, W.J.R. Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com a meleira. *Summa Phytopatologica*, v. 24, p. 60, 1998b.
- BATESON, M.F.; HENDERSON, J.; CHALEEPROM, W.; GIBBS, A.J.; DALE, J.L. Papaya ringspot potyvirus - Isolate variability and the origin of PRSV Type P. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 3547-3553, 1994.
- BESERRA JR., J.E.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; ANDRADE, E.C.; LIMA, J.A.A. Análise molecular de isolados de *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) obtidos no Ceará. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. S277, 2009.
- CAMARÇO, R.F.E.A.; LIMA, J.A.A.; PIO-RIBEIRO, G. Transmissão e presença em solo do *Papaya lethal yellowing virus*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 453-458, 1998.
- CAMARÇO, R.F.E.A.; LIMA, J.A.A.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Ocorrência do "papaya lethal yellowing virus" no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 423, 1996.
- COSTA, A.F.S.; PACOVA, B.E.V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. (Ed.). *A cultura do mamão: Tecnologia e produção*. Vitória, ES: INCAPER, 2003. p. 59-102.
- COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. *O Agrônomo*, v. 21, p. 38-43, 1969.
- COSTA, R.S. Biologia floral do mamoeiro, 2005. Disponível em: [http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=8691](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8691). Acesso em: 02/02/2008.

- CRUZ, J.L. Certificação em produção integrada de mamão: Informações básicas, 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/mamao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/mamao/index.htm)>. Acesso em: 15/01/2008.
- DALTRO, C.B.; FIUZZA, A.; ANDRADE, E.C. Estudo da variabilidade genética entre isolados do vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV). In: III Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA. EMBRAPA, 2008.
- DANTAS, J.L.L.; DANTAS, A.C.V.L.; LIMA, J.F. Mamoeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. p. 309-349.
- DANTAS, J.L.L.; LIMA, J.F. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro: Avaliação de linhagens e híbridos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 617-621, 2001.
- GIAMPAN, J.S.; REZENDE, J.A. Efeito de diferentes variáveis na infetividade de estirpes fracas do *Papaya ringspot virus* em plantas de melancia. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 39-45, 2004.
- GONSALVES, D. Transgenic papaya: Development, release, impact and challenges. *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 317-354, 2006.
- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo, SP: Editora Nacional/USP, 1979.
- KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, F.C.; PINHEIRO, C.S.R.; SOARES, L.M.; PINHEIRO, K.; MADEIRA, M.C.; CHAGAS, M. Amarelo letal do mamoeiro Solo no estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 282-285, 1992a.
- KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, F.C.; PINHEIRO, C.S.R.; SOARES, L.M.; PINHEIRO, K.; VASCONCELOS, M.F. Ocorrência do vírus do amarelo letal do mamoeiro no estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira*, v. 14, p. 164, 1989.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; VEGA, J.; OLIVEIRA, C.R.B. Confirmada identidade do vírus isométrico encontrado em mamoeiros do Rio Grande do Norte como sendo o do amarelo letal do mamoeiro Solo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, p. 336-338, 1992b.
- KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, C.; SILVEIRA, J.; ALVES, F.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("stick disease") of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 8, p. 118-122, 1993.
- LIMA, J.A.A.; BEZERRA, D.R. Levantamento da incidência do vírus da mancha anelar do mamoeiro em municípios cearenses. *Fitopatologia Brasileira*, v. 13, p. 115, 1988.
- LIMA, J.A.A.; FLORINDO, M.I.; SOUSA, A. An isolate of papaya ringspot virus obtained from naturally infected *Luffa operculata*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 213, 1997.
- LIMA, J.A.A.; GOMES, M.N.S. Identificação de "papaya ringspot virus" no Ceará. *Fitossanidade*, v. 1, p. 56-59, 1975.

- LIMA, J.A.A.; LIMA, A.R.T.; MARQUES, M.A.L. Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro solo obtido no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 437-441, 1994.
- LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G. Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 16, p. 27, 1991.
- LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; LEAL, C.R.S. Presença de três vírus distintos em pomares irrigados do mamoeiro da Chapada do Apodi, Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 522, 2001a.
- LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA JR., M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 689-702, 2001b.
- LORETO, T.J.G.; VITAL, A.F.; REZENDE, J.A.M. Ocorrência de amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico*, v. 49, p. 275-279, 1983.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; KUNIEDA-ALONSO, S.; MATSUOKA, K.; DE CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Purification and some properties of Papaya melevira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, v. 52, p. 389-394, 2003.
- MARIN, S.L.D. Introdução, avaliação e seleção do mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12 no Estado do Espírito Santo. *Boletim Técnico*. Vitória, ES: EMCAPA, 1989.
- MARÍN, S.L.D.; PEREIRA, M.G.; FERREGUETTI, G.A.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; CATTANEO, L.F. Capacidade combinatória em mamoeiro (*Carica papaya* L.) dos grupos 'Solo' e 'Formosa' sob cruzamentos dialélicos parciais. In: Resumos, Congresso Brasileiro de Melhoramento Genético Vegetal, Belém, PA. Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.
- MEDINA, J.C. Cultura. In: MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; SIGRIST, J.M.M.; DE MARTIN, Z.J.; NISIDA, A.L.A.C.; BALDINI, V.L.S.; LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. (Ed.). *Mamão: Cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos*. Campinas, SP: ITAL, 1989. p. 178.
- MING, R.; HOU, S.B.; FENG, Y.; YU, Q.Y.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H.; SENIN, P.; WANG, W.; LY, B.V.; LEWIS, K.L.T.; SALZBERG, S.L.; FENG, L.; JONES, M.R.; SKELTON, R.L.; MURRAY, J.E.; CHEN, C.X.; QIAN, W.B.; SHEN, J.G.; DU, P.; EUSTICE, M.; TONG, E.; TANG, H.B.; LYONS, E.; PAULL, R.E.; MICHAEL, T.P.; WALL, K.; RICE, D.W.; ALBERT, H.; WANG, M.L.; ZHU, Y.J.; SCHATZ, M.; NAGARAJAN, N.; ACOB, R.A.; GUAN, P.Z.; BLAS, A.; WAI, C.M.; ACKERMAN, C.M.; REN, Y.; LIU, C.; WANG, J.M.; WANG, J.P.; NA, J.K.; SHAKIROV, E.V.; HAAS, B.; THIMMAPURAM, J.; NELSON, D.; WANG, X.Y.; BOWERS, J.E.; GSCHWEND, A.R.; DELCHER, A.L.; SINGH, R.; SUZUKI, J.Y.; TRIPATHI, S.; NEUPANE, K.; WEI, H.R.; IRIKURA, B.; PAIDI, M.; JIANG, N.; ZHANG, W.L.; PRESTING, G.; WINDSOR, A.; NAVAJAS-PEREZ, R.; TORRES, M.J.; FELTUS, F.A.; PORTER, B.; LI, Y.J.; BURROUGHS, A.M.; LUO, M.C.; LIU, L.; CHRISTOPHER, D.A.; MOUNT, S.M.; MOORE, P.H.; SUGIMURA, T.; JIANG, J.M.; SCHULER, M.A.; FRIEDMAN, V.; MITCHELL-OLDS, T.; SHIPPEN, D.E.; DEPAMPHILIS, C.W.; PALMER, J.D.; FREELING, M.; PATERSON, A.H.; GONSALVES, D.; WANG, L.; ALAM, M. The draft genome of the

- transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, v. 452, p. 991-997, 2008.
- NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo da ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Campinas, SP. 1987. p.555-559.
- NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.L.L.; BESERRA JR., J.E.; PURCIFULL, D.E. Biological, physical, and molecular properties of a *Papaya lethal yellowing virus* isolate. *Plant Disease*, v. 94, p. 1206-1212, 2010.
- NASCIMENTO, A.K.Q.; NASCIMENTO, A.L.L.; MARQUES, M.A.L.; GONÇALVES, M.F.B.; LIMA, J.A.A. Graus de incidência de vírus em amostra de mamoeiro recebidas para análise. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. S280, 2009.
- NASCIMENTO, A.L.L.; NASCIMENTO, A.K.Q.; CEZAR, M.A.; GONÇALVES, M.F.B.; LIMA, J.A.A. Sobrevivência do Papaya lethal yellowing virus em tecido de mamoeiro por 120 dias. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, p. S299, 2008.
- OLIVEIRA, A.A.R. Indução de resistência para o controle de doenças do mamoeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=415>>. Acesso em: 29/01/2008.
- OLIVEIRA, A.M.G.; FARIAS, A.R.N.; FILHO, H.P.S.; OLIVEIRA, J.R.P.; DANTAS, J.L.L.; SANTOS, L.B.; OLIVEIRA, M.A.; SOUZA JR, M.T.; SILVA, M.J.; ALMEIDA, O.A.; NICKEL, O.; MEDINA, V.M.; CORDEIRO, Z.J.M. Propagação e plantio de mamão para exportação: Aspectos técnicos da produção. FRUPEX, 9. ed. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994.
- PEREIRA, M.G.; MARIN, S.L.D.; VIANA, A.P.; FERREGUETTI, G.A.; MARTELLETO, L.A.P.; CATTANELO, L.F.; PEREIRA, T.N.S. Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.): Desenvolvimento e recombinações de híbridos. In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, BA. 2003.
- PURCIFULL, D.J.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. Watermelon mosaic potyvirus 1. *Descriptions of Plant Viruses no. 292*. Kew, England: CMI/AAB, 1984. p. 5p.
- QUINTINO, H.M.S. *Benefícios sociais da política de incentivos à cultura do mamão no Estado do Ceará*. Dissertação M.S. (Mestrado em Economia Rural). Dep. de Economia Rural, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 81 p., 2007.
- QUIOT-DOUINE, L.; LECOQ, H.; QUIOT, J.D. Serological and biological variability of virus isolates related to strains of papaya ringspot virus. *Phytopathology*, v. 80, p. 256-263, 1990.
- RAMOS, N.J.; NASCIMENTO, A.K.Q.; GONÇALVES, M.F.B.; LIMA, J.A.A. Presença dos vírus da mancha anelar e do amarelo letal em frutos de mamoeiro comercializados. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, p. 449-452, 2008.
- REZENDE, J.A.M.; FANCELLI, M.I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). *Manual de Fitopatologia - Doenças de Plantas Cultivadas*. Piracicaba, SP: Ed. Agron. Ceres, 1997. p. 486-496.
- RODRIGUES, C.H.; ALVES, F.L.; MARIN, S.L.D.; MAFFIA, L.A.; VENTURA, J.A.; GUTIERREZ, A.S.D. Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: Enfoque

- fitopatológico. Selecta de trabalhos sobre a meleira do mamoeiro. Linhares, ES: EMCAPA, 1989a.
- RODRIGUES, C.H.; VENTURA, J.A.; MAFFIA, L.A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 14, p. 118, 1989b.
- RODRIGUES, S.P.; GALVÃO, O.P.; ANDRADE, J.S.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Método molecular simplificado para o diagnóstico da meleira do mamoeiro em látex e tecidos de plantas infectadas. *Summa Phytopatologica*, v. 31, p. 273-275, 2005.
- SARAIVA, A.C.M.; DE PAIVA, W.O.; RABELO FILHO, F.A.C.; LIMA, J.A.A. Transmissão por mãos contaminadas e ausência de transmissão embrionária do vírus do amarelo letal do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 79-83, 2006.
- SERRANO, L.A.L.; CATANEO, L.F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, p. 657-959, 2010.
- SILVA, A.M.R. "*Papaya lethal yellowing virus*": *Caracterização biológica e molecular* Dissertação M.S. (Mestrado em Fitopatologia). Dep. de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília. 1996.
- SILVA, A.M.R.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. Nucleotide and amino acid analysis of the polymerase and the coat protein genes of the papaya lethal yellowing virus. *Virus Reviews and Research*, v. 11, p. 196, 2000.
- SILVA, A.M.R.; KITAJIMA, E.W.; SOUSA, M.V.; RESENDE, R.O. *Papaya lethal yellowing virus*: a possible member of the *Tombusvirus* genus. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 529-534, 1997.
- SILVA, J.A.T.; RASHID, Z.; NHUT, D.T.; SIVAKUMAR, D.; GERA, A.; SOUZA JR., M.T.; TENNANT, P.F. Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, v. 1, p. 47-73, 2007.
- TAMM, T.; TRUVE, E. Sobemoviruses. *Journal of Virology*, v. 74, p. 6231-6241, 2000.
- TEIXEIRA, M.G.C. *Levantamento de incidência de vírus do mamoeiro (Carica papaya L.) em municípios do Rio Grande do Norte*. Dissertação M.S. (Mestrado em Agronomia). Dep. de Agronomia, Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, RN. 1997.
- TEIXEIRA, M.G.C.; LIMA, J.A.A.; SOUZA, A.E.B.A.; FERNANDES, E.R. Baixos graus de incidência do vírus do amarelo letal do mamoeiro em municípios do Rio Grande do Norte. *Caatinga*, v. 12, p. 29-33, 1999.
- VAN DROOGENBROECK, B.; BREYBE, P.; GOETCHEBEUR, P.; ROMEIJN-PEETERS, E.; KYNDT, T.; GHEYSEN, G. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, p. 289-297, 2002.
- VAN DROOGENBROECK, B.; KYNDT, T.; MAERTENS, I.; ROMEIJN-PEETERS, E.; SCHELDEMAN, X.; ROMERO-MOTOCHI, J.; VAN DAME, P.; GOETCHEBEUR, P.; GHEYSEN, G. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (*Caricaceae*) using PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 108, p. 1473-1486, 2004.

- VEGA, J.; BEZERRA, J.L.; REZENDE, M.L.V. Detecção do vírus do amarelo letal do mamoeiro solo no estado da Bahia através de microscopia eletrônica. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 147, 1988.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o "roguing". *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 536, 2001.
- YEH, S.D.; JAN, F.J.; CHIANG, C.H.; DOONG, T.J.; CHEN, M.C.; CHUNG, P.H.; BAU, H.J. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2531-2541, 1992.

## **CAPÍTULO 1**

### **GENETIC VARIABILITY OF *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) ISOLATES FROM CEARÁ AND RIO GRANDE DO NORTE STATES, BRAZIL**

Pereira, A.J., Cascardo, R.S., Daltro, C.B., Beserra-Junior, J.E.A., Lima, J.A.A., Andrade, E.C., Zerbini, F.M. Genetic variability of *Papaya lethal yellowing virus*

isolates collected in Ceará and Rio Grande do Norte states, Brazil. Tropical Plant Pathology, *submitted*.

**Genetic variability of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) isolates from Ceará and Rio Grande do Norte states, Brazil**

Álvaro Julio Pereira<sup>1\*</sup>, Renan de Souza Cascardo<sup>1</sup>, Cleidiane Borges Daltro<sup>2</sup>, José Evando A. Bezerra-Junior<sup>3#</sup>, José Albérico de Araújo Lima<sup>3</sup>, Eduardo Chumbinho de Andrade<sup>4</sup>, Francisco Murilo Zerbini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 44380-000

<sup>3</sup>Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 60451-970

<sup>4</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 44380-000

\*Present address: Dep. Biologia, FACEDI, Universidade Estadual do Ceará, Itapipoca-CE, 62500-000

#Present address: Dep. de Agronomia, Universidade Estadual do Piauí, Picos, PI, 64600-000

Author for correspondence: Francisco Murilo Zerbini; E-mail: zerbini@ufv.br

## **ABSTRACT**

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit crop of great economical importance throughout the Brazilian northeast, which is responsible for 60% of the national output. Papayas in the states of Ceará and Rio Grande do Norte are affected by lethal yellowing disease, caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). Previous work indicated that PLYV is a putative sobemovirus. However, the complete viral genome has not yet been sequenced, and very few studies have been carried out on the genetic variability of PLYV isolates. To assess the genetic variability of PLYV isolates, foliar samples were collected during October 2008 and 2009 in fields from Ceará and Rio Grande do Norte states, and total RNA was extracted using the Brazol reagent. A pair of specific primers based on the sequence of a previously characterized PLYV isolate was used for the RT-PCR-based amplification of an approximately 900 bp fragment corresponding to the central region of the viral genome. Fragments from 16 viral isolates were cloned and sequenced. Nucleotide sequence analyses indicated >97% identity among the isolates, 94-100% identity with the previously sequenced PLYV isolate, and a lower but significant identity with the sobemoviruses *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), *Turnip rosette virus* (TRoV) and *Lucerne transient streak virus* (LTSV). These results suggest a low degree of genetic variability among PLYV isolates, and are in agreement with the provisional placement of PLYV in the genus *Sobemovirus*. Definitive taxonomic conclusions, however, await the determination of the full-length genomic sequence.

**Keywords:** Genetic diversity, PLYV, *Carica papaya* L.

## RESUMO

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma fruta de grande importância econômica em todo o nordeste brasileiro, região responsável por 60% da produção nacional. Mamoeiros nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte são afetados pelo amarelo letal, causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). Trabalhos anteriores indicaram que o PLYV é um possível membro do gênero *Sobemovirus*. Entretanto, o genoma viral completo ainda não foi sequenciado, e poucos estudos foram realizados sobre a variabilidade genética de isolados do PLYV. Com o objetivo de se estimar a variabilidade genética de isolados de PLYV, amostras foliares de mamoeiro infectadas foram coletadas em outubro de 2008 e de 2009 em regiões produtoras dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Brazol. Um par de oligonucleotídeos específicos baseados na sequência de um isolado de PLYV previamente caracterizado foi utilizado para a amplificação via RT-PCR de um fragmento com aproximadamente 900 pb, correspondente à região central do genoma viral. Fragmentos de 16 isolados virais foram clonados e sequenciados. A análise das sequências de nucleotídeos indicou >97% de identidade entre os isolados, entre 94-100% com o isolado de PLYV previamente sequenciado, e uma identidade menor, mas significativa, com os sobemovírus *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), *Turnip rosette virus* (TRoV) e *Lucerne transient streak virus* (LTSV). Estes resultados sugerem um baixo grau de variabilidade genética entre isolados de PLYV, e estão de acordo com a classificação provisória do PLYV como membro do gênero *Sobemovirus*. No entanto, para a classificação taxonômica definitiva deve-se aguardar a determinação da sequência genômica completa do vírus.

**Palavras-chave:** diversidade genética, PLYV, *Carica papaya* L.

## INTRODUCTION

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit crop of great economic importance in tropical and subtropical countries of the world. Papaya cultivation is widely distributed throughout the tropical regions of the world, extending to 32° latitude north and south, with the possible introduction in Brazil in 1587 (Serrano & Cataneo, 2010). According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO; [www.fao.org](http://www.fao.org)), the world production of papaya represents 10% of all tropical fruits, yielding around 8 million tonnes, of which 39% are produced in Latin America and the Caribbean ([faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)). The world's leading producers are India, Brazil, Nigeria, Indonesia and Mexico. In 2008, Brazil produced 1.89 million tons on 36,500 hectares with a production value estimated at US\$ 1 billion. The major papaya producer states are Bahia (902,000 tons), Espírito Santo (630,000 tons), Rio Grande do Norte (106,000 tonnes) and Ceará (100,000 tons).

In most states of northeastern Brazil, papayas are affected by lethal yellowing disease, caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). Lethal yellowing was first described in the early 1980's in the state of Pernambuco (Loreto et al., 1983). The disease was later detected in the states of Bahia (Vega et al., 1988), Rio Grande do Norte (Kitajima et al., 1992a; Kitajima et al., 1989; Kitajima et al., 1992b), Ceará (Lima & Santos, 1991) and Paraíba (Camarço et al., 1996). Initial infection with the virus manifests as yellowing of the younger leaves, which later progresses to more severe symptoms of curled leaves, wilting and senescence. Green blemishes are commonly found on immature fruit and they turn yellow as the fruit reaches maturity (Lima et al., 2001). PLYV is transmitted mechanically and can be found in the soil (Camarço et al., 1998). The virus has never been reported anywhere else other than northeastern Brazil. PLYV has isometric particles with *ca.* 30 nm in diameter, and a single-stranded positive

sense RNA genome of 4.8 kb. The single coat protein (CP) probable has a molecular mass of 36 kDa. Analysis of the incompletes genes encoding the putative RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and coat protein (CP) indicated that PLYV shares sequence similarity to viruses in the genus *Sobemovirus* (Nascimento et al., 2010). However, the complete viral genome has not yet been sequenced and therefore the taxonomical classification of PLYV is provisional. Besides, very few studies have been carried out on the genetic diversity of PLYV isolates. To generate information on the diversity of PLYV, we performed the cloning, sequencing and genetic analysis of 900 pb fragment of PLYV isolates from infected papaya plants in the states of Ceará and Rio Grande do Norte.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sampling of papaya fields and preliminary viral detection**

A total of 27 *Carica papaya* L. foliar samples showing symptoms of lethal yellowing disease were collected in production regions around the cities of Acaraú (2°53'09" S, 40°07'12" W), Paraipaba (3°26'20" S, 39°08'52" W) and Quixeré (5°04'26" S, 37°59'20" W) in the state of Ceará, during October 2008, and the city of Baraúna (5°04'48" S, 37°37'00" W) in the state of Rio Grande do Norte, during October 2009 (Figure 1). The presence of PLYV in the samples was assessed by indirect ELISA (Converse & Martin, 1990) using a polyclonal antiserum produced at the Federal University of Ceará.

## **RNA extraction**

Total RNA was extracted from infected leaf tissues by grinding in liquid nitrogen and extraction with the Brazol reagent (LGC Biotecnologia), according to the manufacturer's instructions. The final RNA pellet was resuspended in 20  $\mu$ l of nuclease-free water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **RT-PCR, cloning and sequencing**

Viral cDNA was transcribed from 5  $\mu$ l of total RNA (aprox. 5  $\mu$ g) using the PLYV-specific reverse primer 5'-GTG TAT GGC ATA CAG TTA TC-3' (Amaral et al., 2006). Initially, the RNA, the primer (20 pmol) and nuclease-free water (to complete the volume to 12  $\mu$ l) were incubated for 5 min at  $65^{\circ}\text{C}$ , and quickly transferred to ice. The reaction was then completed with 4  $\mu$ l of 5 $\times$  reaction buffer, 1  $\mu$ l of 10 mM dNTP mix, 2  $\mu$ l of 0.1 M dithiothreitol (DTT) and 1  $\mu$ l (200 units) of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h followed by  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min. PCR was performed in a total volume of 50  $\mu$ l, using 2.5  $\mu$ l of the cDNA, 5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 3  $\mu$ l of 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu$ l of dNTPs (2.5 mM each), 20 pmol of each primer [the same reverse primer used in the reverse transcription reaction plus a forward primer based on the sequence of the Marco2 isolate (GU066876), 5' TGA AGC GGA TAT TTC TGG 3' (Amaral et al., 2006)] and 1 unit of Taq DNA polymerase. The thermocycler (PTC-100, MJ Research Inc.) was programmed for 35 cycles of denaturing at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 minute, primer annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 minute, with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels and were purified from the gels using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The amplified fragments were

cloned using the pGEM-T Easy kit (Promega), as recommended by the manufacturer. Cloning was confirmed by digestion of plasmid DNA with *EcoR* I and analysis by agarose gel electrophoresis.

The sequences obtained from the PLYV isolates were aligned and compared with those from 11 sobemoviruses available in GenBank (Table 1). Multiple sequence alignments were obtained with Clustal W (Thompson et al., 1994). Pairwise sequence comparisons were performed with DNAMAN v. 4 (Lynnon Biosoft). Phylogenetic trees were constructed with MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007), using the neighbour-joining algorithm with 2000 bootstrap replications.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Cloning of PLYV genomic fragments**

Out of 27 papaya samples collected in Rio Grande do Norte state, 21 were positive for the presence of PLYV based on results of indirect ELISA using a PLYV-specific polyclonal antiserum (*data not shown*). An approximately 900 bp fragment was successfully amplified via RT-PCR from total RNA extracted from these 21 samples. Fragments representing 16 viral isolates (Table 2) were cloned and completely sequenced.

### **Sequence comparisons**

A preliminary analysis of the nucleotide sequences using BLASTn (Altschul et al., 1990) indicated the PLYV Marco2 isolate (GenBank access number GU066876) as the closest related virus, with >94% sequence identity with all isolates (Table 3). This confirmed the identity of all isolates as PLYV. Further analysis using the ORF finder

tool ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf)) indicated that the 900 bp fragment included two partial open reading frames (ORFs) in the same sense, one corresponding to a putative viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and the other corresponding to a viral coat protein (CP).

Pairwise comparisons indicated that the 900 bp fragments amplified from the 16 viral isolates shared >97% nucleotide sequence identity amongst themselves, and 94-100% identity with the PLYV Marco2 isolate from Ceará state (Table 3). This is indicative of a low degree of genetic variability, specially considering that some of the locations where the samples were collected are approximately 370 km apart (Figure 1), and that samples were collected within a one-year interval (Table 2).

Amino acid sequence comparisons with known sobemoviruses indicated that the putative RdRp of PLYV is much more similar to the corresponding protein of sobemoviruses than the CP. In addition, motifs in nucleotide and deduced amino acid sequences of sobemovirus proteins are also present in the PLYV sequences, reinforcing the relationship between PLYV and other members of the genus *Sobemovirus*.

The deduced amino acid sequences of the RdRp showed greatest identity with the sobemoviruses *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV; 84%), *Turnip rosette virus* (TRoV) and *Lucerne transient streak virus* (LTSV) (83% in both cases), and *Ryegrass mottle virus* (RGMoV; 81%) (Table 4). Identity values for the deduced amino acid sequence of the CP were much lower: up to 35% with *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV) and 33% with *Southern bean mosaic virus* (SBMV) (Table 4). However, a closer examination of Table 4 indicates that the CP of sobemoviruses is much more variable than the RdRp. Except for the CPs of SBMV, SCPMV and *Sesbania mosaic virus* (SeMV), which share 65-77% identity, those of other

sobemoviruses share only 8-40% identity. Identity values for the RdRps vary from 36 to 82%.

As it had been previously suggested that PLYV could be a member of the genus *Tombusvirus*, we also performed sequence comparisons with tombusviruses. The greatest identity values observed were 13% for the RdRp and 17% for the CP of *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (*data not shown*). The values for the RdRp are much lower than those observed with sobemoviruses. While the identity values observed for the CP are within the range observed among sobemoviruses, it must be noted that the CPs of sobemoviruses and tombusviruses are known to be distantly related (Hull & Fargette, 2005), and their identity values are within this range.

### **Phylogenetic analysis**

Results of phylogenetic analysis corroborate those of sequence comparisons. Both the CP-based and the RdRp-based phylogenetic trees indicate that all 16 isolates obtained from Ceará and Rio Grande do Norte states are closely related to each other, as well as to the Marco2 isolate (from Ceará). However, in the CP-based tree the PLYV isolates are most closely related to SCPMV, SeMV and TRoV, while in the RdRp-based tree the most closely related viruses are SBMV, SCMoV and LTSV (Figure 2).

Together, the results of sequence comparisons and phylogenetic analyses of the RdRp and CP of PLYV indicate that PLYV is much more closely related to sobemoviruses than to tombusviruses, and are consistent with the classification of PLYV as a species in the genus *Sobemovirus*. However, the sequenced fragment represents only approximately 25% of the viral genome. Therefore, a definitive taxonomic placement will require the complete genomic sequence, since it is not

unreasonable to assume that the remaining part of the genome could be divergent from known sobemoviruses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded by CNPq (grant 474137/2007-4) to ECA.

## LITERATURE CITED

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amaral PP, Resende RO, Sousa JR. MTS (2006) *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) infects *Vasconcellea cauliflora*. *Fitopatologia Brasileira* 31:517.
- Camarço RFEA, Lima JAA, Pio-Ribeiro G (1998) Transmissão e presença em solo do *Papaya lethal yellowing virus*. *Fitopatologia Brasileira* 23:453-458.
- Camarço RFEA, Lima JAA, Pio-Ribeiro G, Andrade GP (1996) Ocorrência do "papaya lethal yellowing virus" no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. *Fitopatologia Brasileira* 29:423.
- Converse RH, Martin RR (1990) ELISA methods for plant viruses, p. 179-196, *In* Hampton R, et al., eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS Press, St. Paul, USA.
- Hull R, Fargette D (2005) Genus *Sobemovirus*, p. 885-890, *In* Fauquet CM, et al., eds. *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Kitajima EW, Rezende JAM, Vega J, Oliveira CRB (1992a) Confirmada identidade do vírus isométrico encontrado em mamoeiros do Rio Grande do Norte como sendo o do amarelo letal do mamoeiro Solo. *Fitopatologia Brasileira* 17:336-338.
- Kitajima EW, Oliveira FC, Pinheiro CSR, Soares LM, Pinheiro K, Vasconcelos MF (1989) Ocorrência do vírus do amarelo letal do mamoeiro no estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 14:164.
- Kitajima EW, Oliveira FC, Pinheiro CSR, Soares LM, Pinheiro K, Madeira MC, Chagas M (1992b) Amarelo letal do mamoeiro Solo no estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 17:282-285.
- Lima JAA, Santos CDG (1991) Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. *Fitopatologia Brasileira* 16:27.
- Lima RCA, Lima JAA, Souza JR. MT, Pio-Ribeiro G, Andrade GP (2001) Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 26:689-702.

- Loreto TJG, Vital AF, Rezende JAM (1983) Ocorrência de amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico* 49:275-279.
- Nascimento AKQ, Lima JAA, Nascimento ALL, Beserra Jr. JE, Purcifull DE (2010) Biological, physical, and molecular properties of a *Papaya lethal yellowing virus* isolate. *Plant Disease* 94:1206-1212.
- Serrano LAL, Cataneo LF (2010) O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32:657-959.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Vega J, Bezerra JL, Rezende MLV (1988) Detecção do vírus do amarelo letal do mamoeiro solo no estado da Bahia através de microscopia eletrônica. *Fitopatologia Brasileira* 21:147.

**Table 1.** Viruses used for sequence alignments, comparisons and construction of phylogenetics trees. All viruses belong to the genus *Sobemovirus*, except where indicated.

<b>Virus</b>	<b>Acronym</b>	<b>CP sequence accession no.</b>	<b>RdRp sequence accession no.</b>
<i>Papaya lethal yellowing virus - Marco2<sup>a</sup></i>	PLYV	GU066876.1	YP_002308437
<i>Southern bean mosaic virus</i>	SBMV	NP_660273	NP_660271
<i>Sesbania mosaic virus</i>	SeMV	AAG01371	AAG01370
<i>Southern cowpea mosaic virus</i>	SCPMV	NP_042303	NP_736599
<i>Cocksfoot mottle virus</i>	CfMV	NP_941377	NP_941957
<i>Lucerne transient streak virus</i>	LTSV	AAA79989	AAA79988
<i>Rice yellow mottle virus</i>	RYMV	NP_041740	CBA11880
<i>Subterranean clover mottle virus</i>	SCMoV	NP_715629	NP_736581
<i>Turnip rosette virus</i>	TRoV	NP_778218	AAO24320
<i>Ryegrass mottle virus</i>	RGMoV	NP_620506	NP_620504
<i>Rubus chlorotic mottle virus</i>	RuCMV	YP_002158815	YP_002158813
<i>Imperata yellow mottle virus</i>	IYMV	YP_002308437	YP_002308436
<i>Potato leaf roll virus<sup>b</sup></i>	PLRV	not used	BAA19463

<sup>a</sup> Possible sobemovirus, partial sequence.

<sup>b</sup> Gen. *Polerovirus*, Fam. *Luteoviridae*; used as an outgroup.

**Table 2.** Isolates of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) obtained and analyzed in this study.

<b>Isolate</b>	<b>Place of collection</b>	<b>Date of collection</b>	<b>GenBank access number</b>
1	Paraipaba	Oct. 2008	
3	Paraipaba	Oct. 2008	
7	Quixeré (Itatinga District)	Oct. 2008	
8	Quixeré (Itatinga District)	Oct. 2008	
9	Quixeré (Boa Esperança District)	Oct. 2008	
11	Quixeré (Boa Esperança District)	Oct. 2008	
14	Quixeré (Oiticica dos Mirandas District)	Oct. 2008	
18	Acaraú (Irrigated Perimeter, lot C136/3C2)	Oct. 2008	
19	Acaraú (Irrigated Perimeter, lot C136/3C2)	Oct. 2008	
20	Acaraú (Irrigated Perimeter, lot C136/3C2)	Oct. 2008	
21	Quixeré (Itatinga District)	Oct. 2008	
23	Baraúna (Velame Farm)	Oct. 2009	
24	Baraúna (Velame Farm)	Oct. 2009	
25	Baraúna (Velame Farm)	Oct. 2009	
26	Baraúna (Velame Farm)	Oct. 2009	
141	Quixeré (Oiticica dos Mirandas District)	Oct. 2008	

**Table 3.** Percent nucleotide sequence identities among PLYV isolates from Ceará and Rio Grande do Norte state. Values above the diagonal corresponding to the coat protein (CP) coding region. Values below the diagonal correspond to the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) coding region. Marco2 is a previously sequenced isolate from Ceará state (GenBank access number GU066876).

	Marco2	1	3	7	8	9	11	14	18	19	20	21	23	24	25	26	141
Marco2	---	96	96	95	96	95	95	94	96	96	100	96	97	98	97	98	96
1	94	---	99	98	99	99	99	99	99	99	97	99	98	98	97	98	99
3	94	100	---	99	99	99	99	99	99	99	97	99	98	98	98	98	99
7	94	98	98	---	99	99	99	99	99	99	97	99	98	98	96	97	99
8	94	100	100	98	---	99	99	99	99	99	97	100	98	98	97	98	99
9	93	98	98	97	98	---	99	99	99	99	97	99	98	98	96	97	99
11	100	98	98	97	98	97	---	99	99	99	97	99	98	98	96	97	99
14	93	97	97	96	97	98	96	---	99	99	97	99	97	97	95	96	99
18	93	100	100	98	100	98	98	97	---	99	97	99	98	98	97	98	99
19	93	100	100	98	100	98	98	97	100	----	97	99	98	97	97	98	99
20	97	96	96	95	96	95	95	94	96	96	---	97	97	97	96	97	97
21	94	100	100	98	100	98	98	97	100	100	96	---	98	98	97	98	99
23	98	98	98	97	98	97	97	96	98	98	97	98	---	100	98	99	98
24	98	98	98	97	98	97	97	96	98	98	97	98	100	---	98	99	98
25	94	97	97	96	97	96	96	95	97	97	96	97	98	98	---	98	98
26	100	98	98	97	98	97	97	96	98	98	97	98	100	100	98	---	97
141	93	98	98	97	98	100	97	98	98	98	95	98	97	97	96	97	---

**Table 4.** Percent amino acid sequence identities between PLYV proteins and those of known sobemoviruses. For simplicity, only isolate 8 from Ceará state is shown. Values above the diagonal refer to the coat protein (CP) and values below the diagonal refer to the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp).

	PLYV 8	SBMV	SeMV	SCPMV	CfMV	LTSV	RYMV	SCMoV	TRoV	RGMoV	RuCMV	IYMV
PLYV 8	--	33	25	35	18	20	16	13	28	20	19	17
SBMV	56	--	77	70	22	11	31	24	34	28	24	20
SeMV	57	77	--	65	22	28	21	29	28	27	31	19
SCPMV	50	57	60	--		19	23	31	37	19	24	20
CfMV	64	71	52	66	--	14	29	22	19	12	25	30
LTSV	83	46	45	36	46	--	12	25	8	11	14	15
RYMV	53	81	45	49	55	76	--	18	26	17	20	40
SCMoV	84	66	62	64	55	77	57	--	27	34	24	22
TRoV	83	65	65	63	46	66	57	54	--	12	25	17
RGMoV	81	77	77	70	44	57	71	55	64	--	26	18
RuCMV	60	47	46	63	44	39	60	57	44	41	--	33
IYMV	59	82	45	48	54	39	56	68	50	44	48	--

## Figure legends

**Figure 1.** Map showing the locations of the municipalities of Acaraú, Paraipaba and Quixeré (Ceará state), and Baraúna (Rio Grande do Norte state), where the papaya samples infected with *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) were collected.

**Figure 2.** Phylogenetic trees based on (A) CP and (B) RdRp partial amino acid sequences. PLYV isolates from Rio Grande do Norte state sequenced in this study are highlighted in red. The CP tree is unrooted, while the RdRp tree has the polerovirus *Potato leaf roll virus* (PLRV) as an outgroup. Both trees were constructed using the neighbor-joining method and bootstrapped with 2000 replications.

**Figure 1**

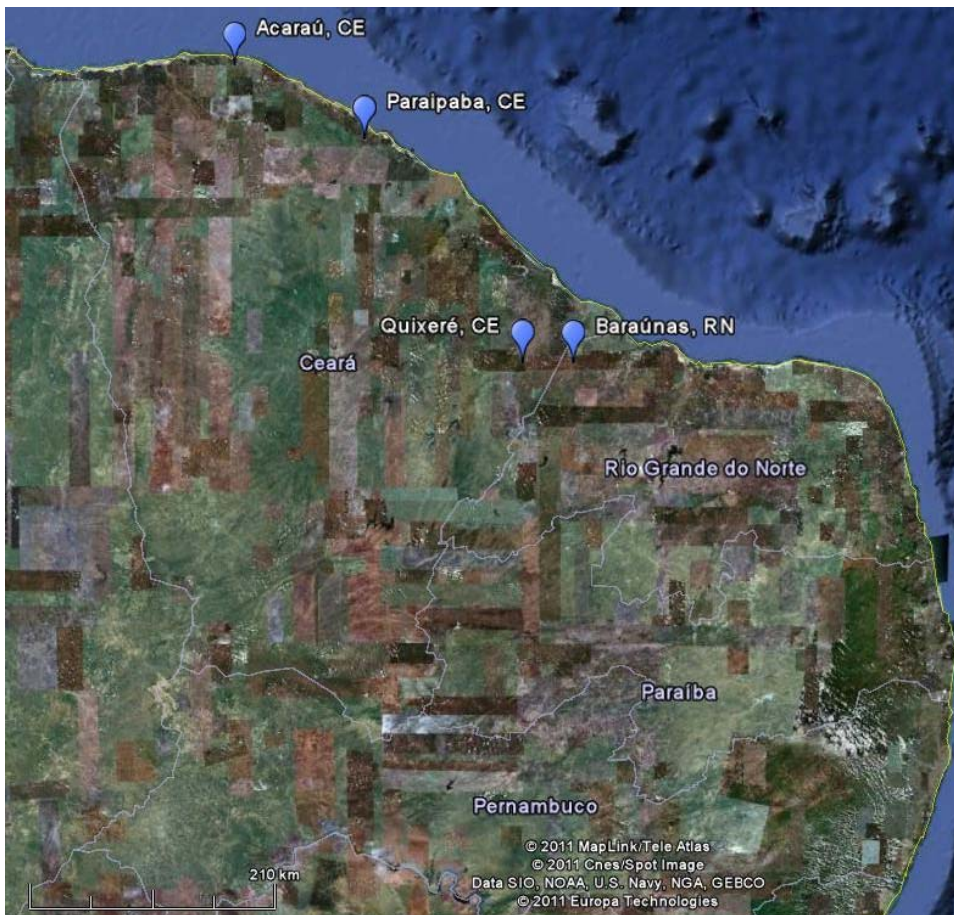


Figure 2A

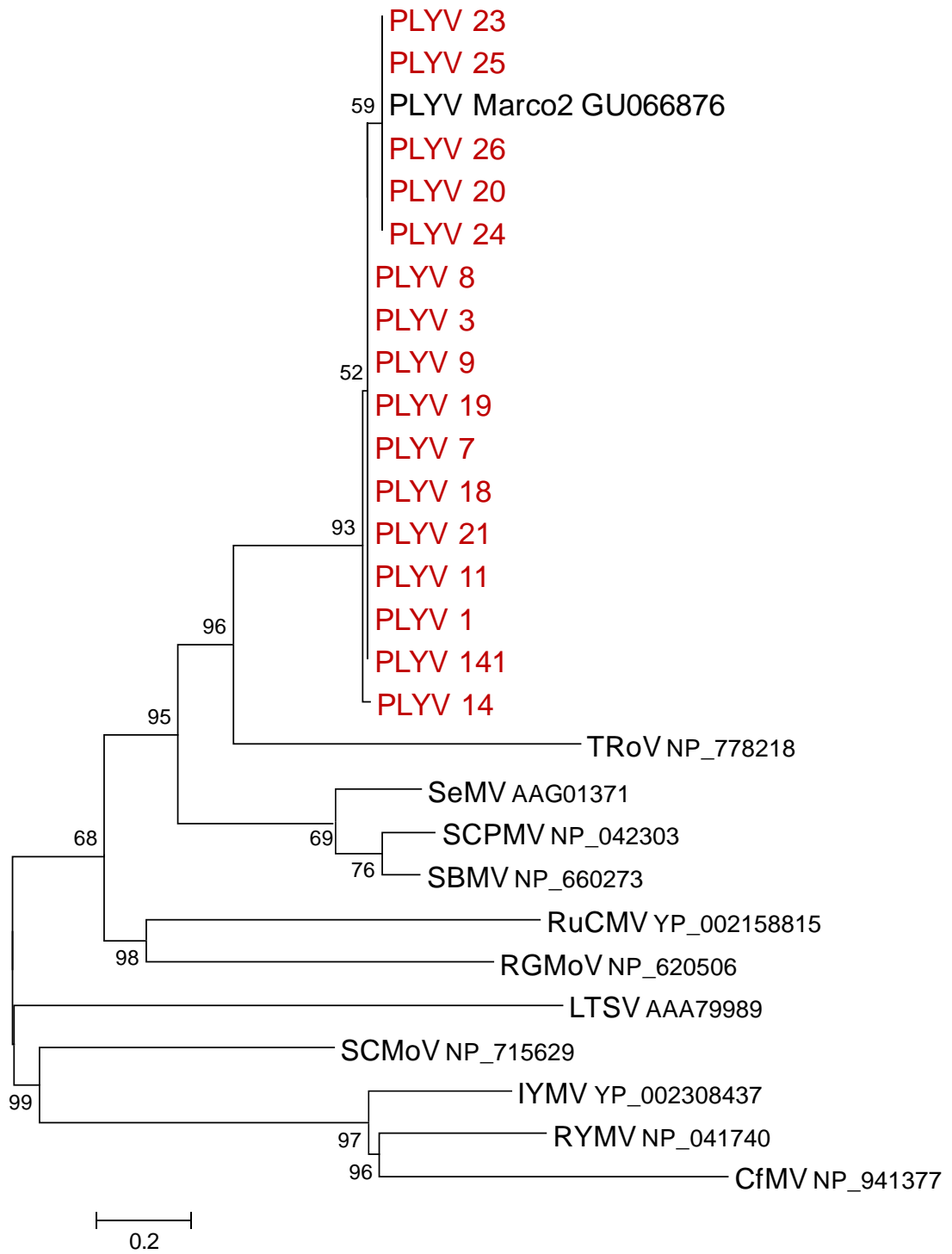
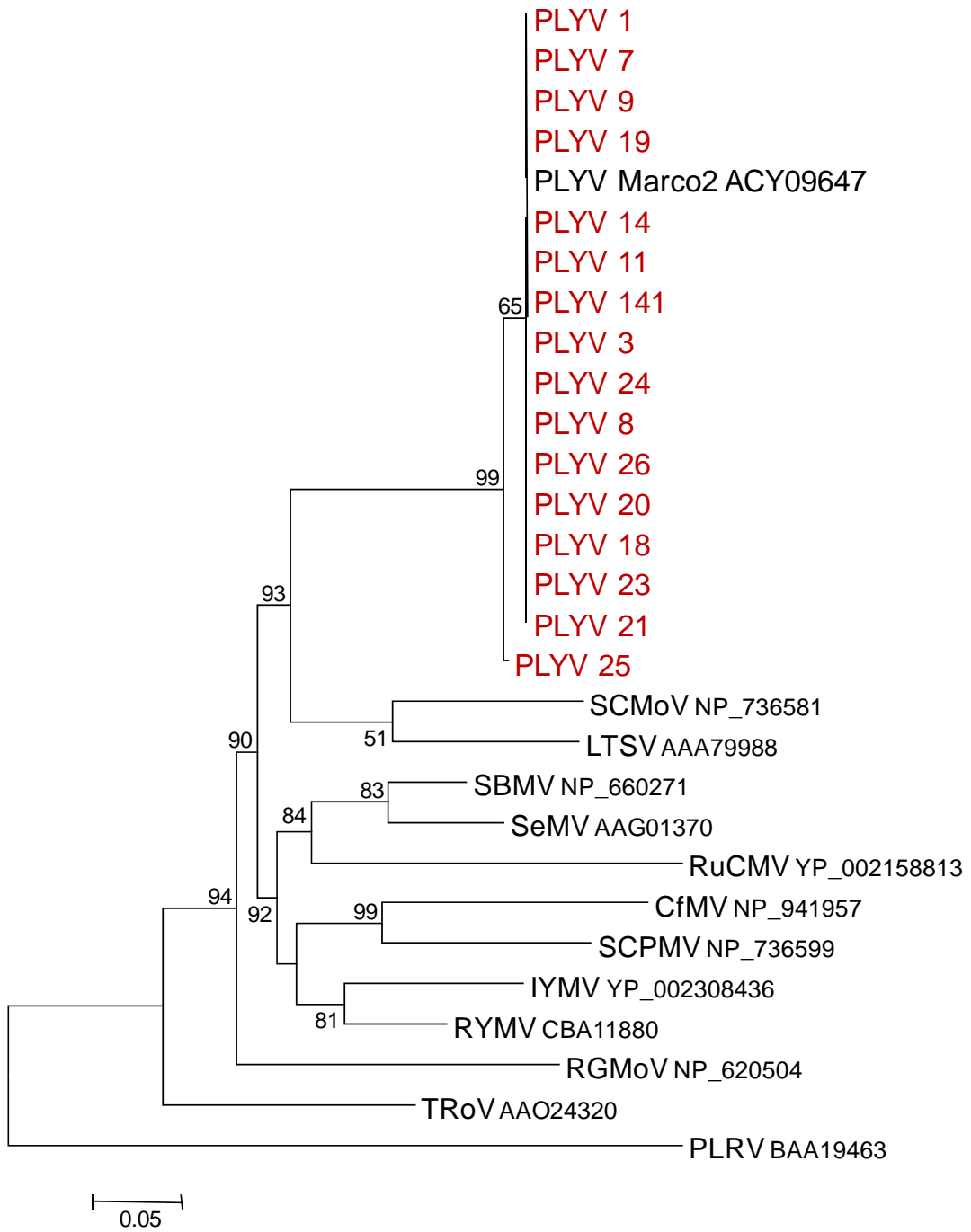


Figure 2B



## **CAPÍTULO 2**

**ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH GENOME SEQUENCE OF *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), DETERMINED BY DEEP SEQUENCING, CONFIRMS ITS CLASSIFICATION IN THE GENUS *Sobemovirus***

Pereira, A.J., Cascardo, R.S., Andrade, E.C., Alfenas-Zerbini, P, Zerbini, F.M. Analysis of the full-length genome sequence of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV),

determined by deep sequencing, confirms its classification in the genus *Sobemovirus*.  
Archives of Virology, in preparation.

**Analysis of the full-length genome sequence of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), determined by deep sequencing, confirms its classification in the genus *Sobemovirus***

Pereira, A.J.<sup>1</sup>, Cascardo, R.S.<sup>1</sup>, Andrade, E.C.<sup>2</sup>, Alfenas-Zerbini, P.<sup>3</sup>, Zerbini, F.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,  
36570-000

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 44380-000

<sup>3</sup>Dep. de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,  
36570-000

Author for correspondence: Francisco Murilo Zerbini; E-mail: zerbini@ufv.br

## ABSTRACT

*Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) causes an economically important disease in papayas in northeastern Brazil. PLYV particles are isometric and the viral genome is comprised of one ssRNA molecule. Based on these properties and on the partial sequence of one isolate, PLYV has been tentatively assigned to the genus *Sobemovirus*. However, its complete genomic sequence has not yet been determined. Here we report the sequence of the full-length genome of a PLYV isolate from Rio Grande do Norte state, Brazil, determined by deep sequencing. The PLYV genome is 4,145 nt long and contains four ORFs, with an arrangement similar to that of the CfMV subgroup of sobemoviruses. ORF1 has the potential to encode a protein with no sequence similarity to other known proteins, and very low sequence identity with the corresponding protein of other sobemoviruses. ORFs 2a and 2b potentially encode the viral RdRp, with a putative -1 frameshift allowing translation of ORF 2b. ORF 3 potentially encodes the viral coat protein. The RdRp and CP display significant sequence identity with the corresponding proteins of other sobemoviruses. Pairwise comparisons and phylogenetic analysis based on complete nucleotide sequences confirm the classification of PLYV in the genus *Sobemovirus*.

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit crop of great economic importance in tropical and subtropical countries of the world. Brazil is the world's second largest producer (after India) and the first exporter ([www.fao.org](http://www.fao.org)). The Brazilian states of Bahia and Espírito Santo are responsible for >80% of the production, followed by the states of Rio Grande do Norte and Ceará which together account for *ca.* 10% of the production [4].

The most economically important viral disease of papayas in Brazil as well as worldwide is papaya ringspot, caused by the potyvirus *Papaya ringspot virus* (PRSV). Besides ringspot, papayas in Brazil are also affected by "sticky disease", caused by *Papaya meleira virus* (PMeV) [10], and lethal yellowing disease, caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) [11].

Lethal yellowing was first described in the early 1980's in the state of Pernambuco [9]. The disease was later detected in several states of northeastern Brazil [8], but has never been reported anywhere else. Initial infection with the virus manifests as yellowing of the younger leaves, which later progresses to more severe symptoms of curled leaves, wilting and senescence [8]. PLYV is readily sap-transmitted and can be found in the soil, but a vector has never been identified [1]. Viral particles are isometric with *ca.* 30 nm in diameter, and a single-stranded positive sense RNA genome reported to be 4,800 nucleotides (nt) long [5]. Sequence of a fragment with *ca.* 1,100 nt including part of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and coat protein (CP) coding regions indicated significant identity with viruses in the genus *Sobemovirus*.

As part of a study to assess the genetic variability of PLYV, 16 isolates were obtained from samples collected in the states of Ceará in October 2008 and Rio Grande do Norte in October 2009, and maintained in papaya plants by successive sap inoculation using 0.05 potassium phosphate buffer, pH 7.2. The isolate named 26 was

selected for sequencing of the complete genome. A concentrated preparation [7] was obtained from papaya leaves collected at 28 days after inoculation. Viral RNA was extracted according to Krause-Sakate *et al.* [6], treated with DNase (Promega) and quantified. A total of 5 µg of RNA were lyophilized and shipped to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) for cDNA synthesis using random hexamers and sequencing using the 454 GS-FLX Titanium platform. The raw data generated consisted of 135,877 reads and 54,942,211 nt, with an average read length of 404 nt. A 5,525 nt contig was assembled from 30,665 reads using Geneious 5.4.5. A consensus sequence with 4,675 nt was determined and manually edited to generate a final sequence with 4,145 nt. The PLYV genome has been estimated to be 4,800-5,000 nt long [5,11], which is quite longer than the genomes of sobemoviruses (all within the 3,900-4,500 nt range). These estimates were based on gel electrophoresis in non-denaturing conditions, which can lead to inaccurate estimates due to the extensive secondary structure of the viral RNA, which affects its electrophoretic mobility. The extremely high sequence coverage even at the very 3' end of the genome (Figure 1) is further evidence that our sequence is complete, and that therefore the PLYV genome length is actually 4,145 nt.

The full length nucleotide sequence obtained has 38.2-50.3% identity with other sobemoviruses (Supplementary Figure S1). This is well within the range observed for pairwise comparisons among sobemoviruses, with the vast majority of viruses displaying 44-50% identity (if *Cocksfoot mild mottle virus*, CfMMV, is excluded, the identity range of PLYV with other sobemoviruses is 45.6-50.3%). The PLYV 5'-terminal nucleotides are ACAAA, in agreement with the sequences of other sobemoviruses. The conserved polypurine tract (AAGAAA) is also present near the 5' terminus.

The PLYV genome contains four open reading frames (ORFs), in a highly compact arrangement which is typical of sobemoviruses in the *Cocksfoot mottle virus* (CfMV)-subgroup (Figure 2) [3]. The 5'-non translated region has 50 nt. ORF1 (nts 50-559) potentially encodes a 169 amino acid (aa) protein, with low sequence identity with the corresponding proteins from sobemoviruses (6.6-27.9%; Supplementary Figure S1), and no significant similarity with other proteins. The ORF1 products of sobemoviruses are notoriously variable, and in many cases the putative proteins have no significant identity with known proteins [13]. ORFs 2a (nts 561-2,247) and 2b (nts 1,745-3,566) encode the putative viral RdRp, with a -1 frameshift required for the translation of the 2b portion (Figure 2). The PLYV 2a protein has 561 deduced aa, with 12.2-40.1% identity with the corresponding proteins from other sobemoviruses (the lowest value is 24.6% if CfMMV is excluded) (Supplementary Figure S1). The 2b portion of the fusion protein (574 aa) is more conserved, with 21.9-70.3% identity with other sobemoviruses (the lowest value being 54.7% if CfMMV and *Sowbane mosaic virus*, SoMV, are excluded) (Supplementary Figure S1). The putative 2a/2b fusion protein has 1,001 deduced aa. The serine protease (HX<sub>36</sub>DX<sub>62</sub>TXXGXSG) and VPg (WADxxEEDEPEE) domains are located in the 2a portion, and the RdRp domain (GDD) is located in the 2b portion (Figure 2), as for other sobemoviruses [3]. The viral coat protein is encoded by ORF3 (nt 3,240-4,077), with 278 deduced aa. Identities with other sobemoviruses range from 19.1 to 37.4%. The CP start codon is preceded by the conserved ACAA sequence, suggesting that ORF3 is translated from a subgenomic RNA. The 3'-non translated region has 68 nt.

Phylogenetic analysis based on the complete nt sequences placed PLYV in a monophyletic branch with *Lucerne transient streak virus* (LTSV) and *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV) (Figure 3). Analysis based on the deduced aa sequences of

each viral protein also indicated a closer relationship with these two viruses, except in the case of the CP, when PLYV was placed on a monophyletic branch with *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV) and *Sesbania mosaic virus* (SeMV) (Supplementary Figure 3a-d).

Our results confirm that PLYV is a true member of the genus *Sobemovirus*, with a genomic organization (lack of a continuous ORF2 and of a nested ORF3, and overlapping ORFs 2a and 2b with a frameshift strategy for the translation of 2b) that places it in the CfMV subgroup. Like all sobemoviruses, PLYV is readily sap transmissible. However, a vector has not yet been identified. Most sobemoviruses are transmitted by beetles, and *Velvet tobacco mottle virus* (VTMV) by a mirid [2]. *Diabrotica bivitulla* and *D. speciosa* have been ruled out as possible vectors for PLYV [5, 12]. Nevertheless, the search for a vector should continue, considering the potential for disease management based on vector control.

## LITERATURE CITED

1. Camarço RFEA, Lima JAA, Pio-Ribeiro G (1998) Transmissão e presença em solo do *Papaya lethal yellowing virus*. *Fitopatol Bras* 23: 453-458
2. Gibb KS, Randles JW (1988) Studies on the transmission of Velvet tobacco mottle virus by the mirid, *Cyrtopeltis nicotianae*. *Ann Appl Biol* 112: 427-437
3. Hull R, Fargette D (2005) Genus *Sobemovirus*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Viral Taxonomy 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp 885-890
4. IBGE (2010) Levantamento sistemático da produção agrícola. Available at [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm). Accessed 30/06/2011
5. Kitajima EW, Rezende JAM, Vega J, Oliveira CRB (1992) Confirmada identidade do vírus isométrico encontrado em mamoeiros do Rio Grande do Norte como sendo o do amarelo letal do mamoeiro Solo. *Fitopatol Bras* 17: 336-338
6. Krause-Sakate R, Mello RN, Zambolim EM, Pavan MA, Carvalho MG, Le Gall O, Zerbini FM (2001) Molecular characterization of two Brazilian isolates of

- Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. *Fitopatol Bras* 26: 153-157
7. Lane LC (1992) A general method for detecting plant viruses. In: Maramorosch K (ed) *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. Oxford & IBH Publishing, New Delhi, pp 3-17
  8. Lima RCA, Lima JAA, Souza JR. MT, Pio-Ribeiro G, Andrade GP (2001) Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatol Bras* 26: 689-702
  9. Loreto TJG, Vital AF, Rezende JAM (1983) Ocorrência de amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico* 49: 275-279
  10. Maciel-Zambolim E, Kunieda-Alonso S, Matsuoka K, de Carvalho MG, Zerbini FM (2003) Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathol* 52: 389-394
  11. Nascimento AKQ, Lima JAA, Nascimento ALL, Beserra Jr. JE, Purcifull DE (2010) Biological, physical, and molecular properties of a *Papaya lethal yellowing virus*. *Plant Dis* 94: 1206-1212
  12. Silva AMR (1996) "Papaya lethal yellowing virus": Caracterização biológica e molecular M.S. Thesis (Plant Pathology), Dep de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
  13. Tamm T, Truve E (2000) Sobemoviruses. *J Virol* 74: 6231-6241
  14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*: doi: 10.1093/molbev/msr1121

## Figure legends

**Figure 1.** Sequence coverage along the genome of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). The numbers above the diagram indicate nucleotide positions in the viral genome. Coverage based on a contig assembled from 30,665 reads using Geneious 5.4.5.

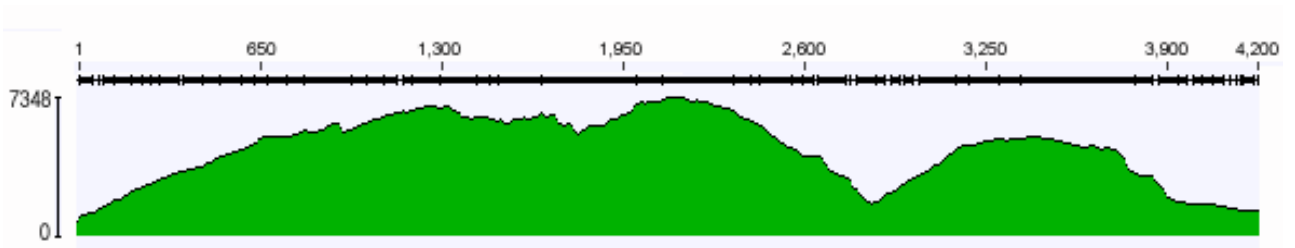
**Figure 2. (A)** Schematic representation of the *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) genome. The numbers represent the nucleotide positions of the start and stop codons for each open reading frame. The grey box indicates the putative frameshift region. **(B)** Putative frameshift region between ORFs 2a and 2b of PLYV and other sobemoviruses, comprised of the conserved "slippery" sequence UUUAAAC (*italics*) followed by a stem-loop (underlined).

**Figure 3.** Maximum likelihood tree based on the complete nucleotide sequences of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) and viruses in the *Sobemovirus* genus. *Leek white stripe virus* (LWSV; genus *Necrovirus*, family *Tombusviridae*) was used as an outgroup. The tree was generated with MEGA 5.05 [14] using the GTR+G nucleotide substitution model. Numbers at the branches indicate bootstrap confidence values.

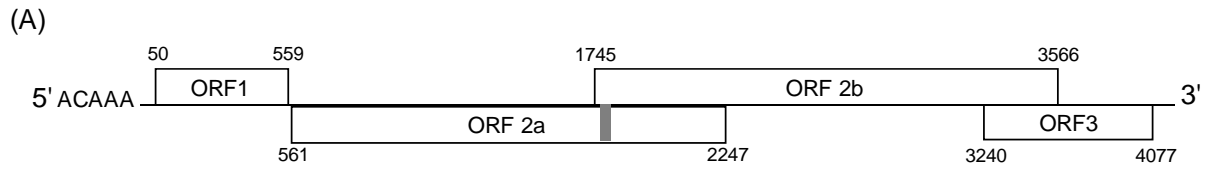
**Supplementary Figure S1.** Pairwise nucleotide **(A)** and deduced amino acid **(B-E)** sequence identities between *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) and viruses in the *Sobemovirus* genus. **(B)** p1 protein, **(C)** p2a protein, **(D)** p2b protein, **(E)** coat protein.

**Supplementary Figure S2.** Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of proteins (A) p1, (B) p2a, (C) p2b and (D) CP of *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) and viruses in the *Sobemovirus* genus. Trees were generated using the neighbor-joining method in MEGA 5.05. Numbers at the branches indicate bootstrap confidence values.

**Figure 1**



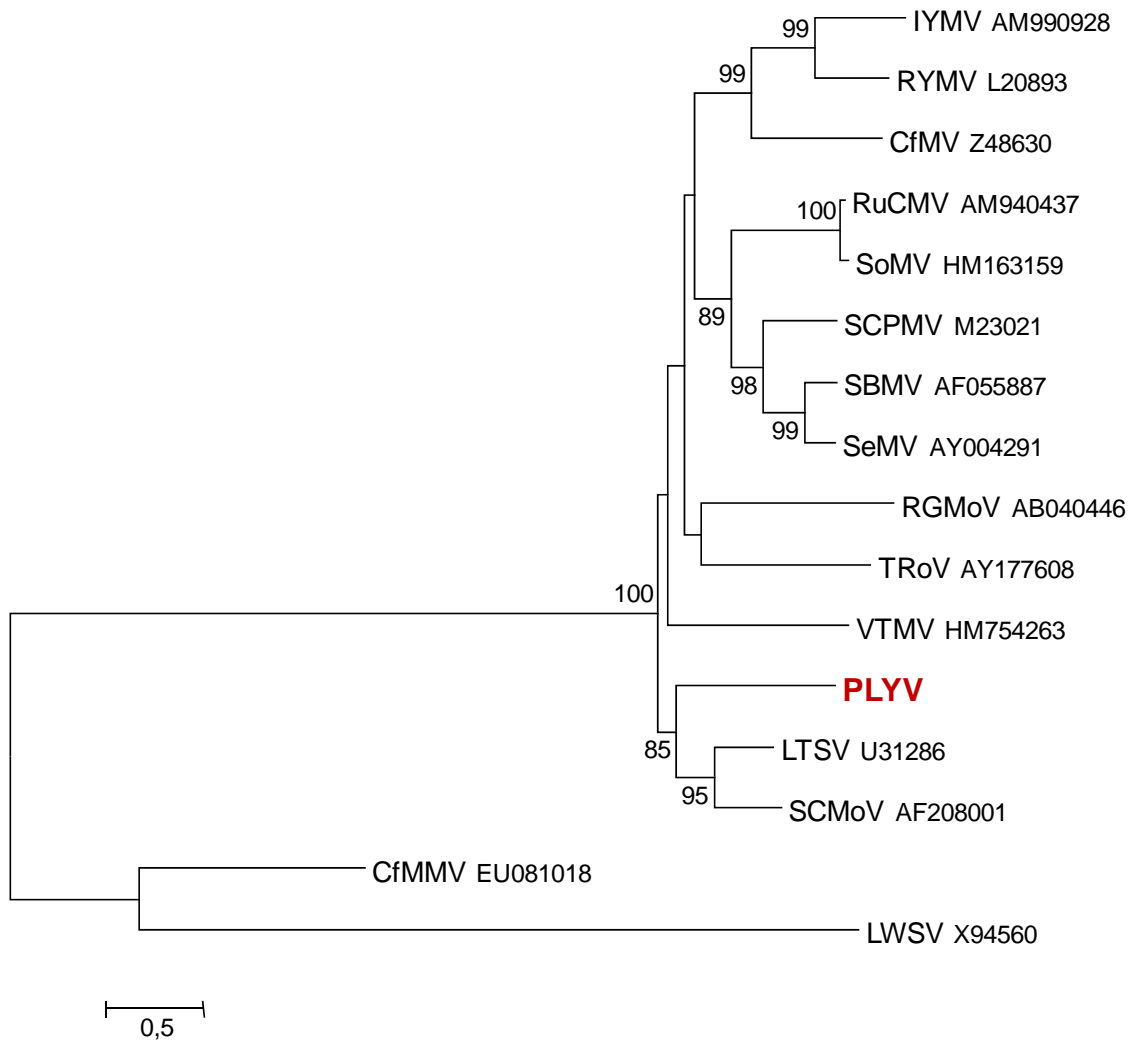
**Figure 2**



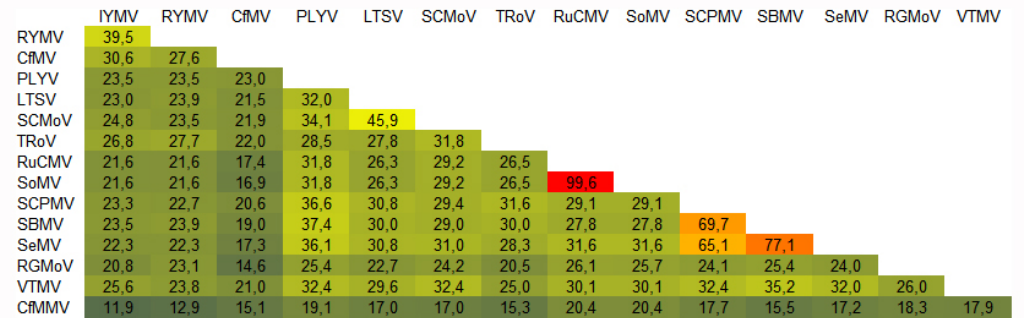
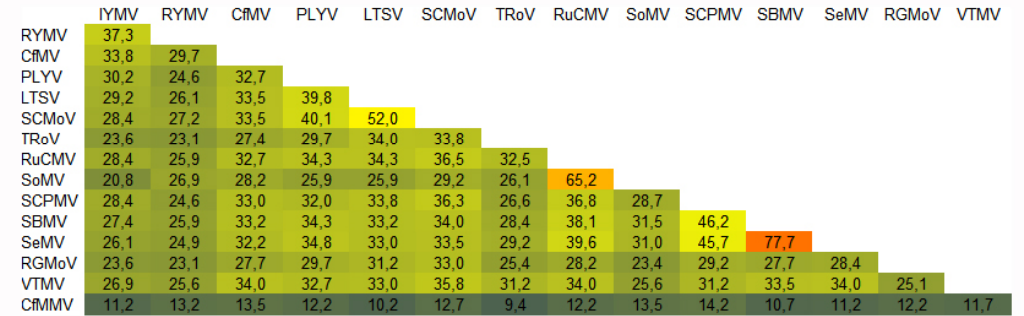
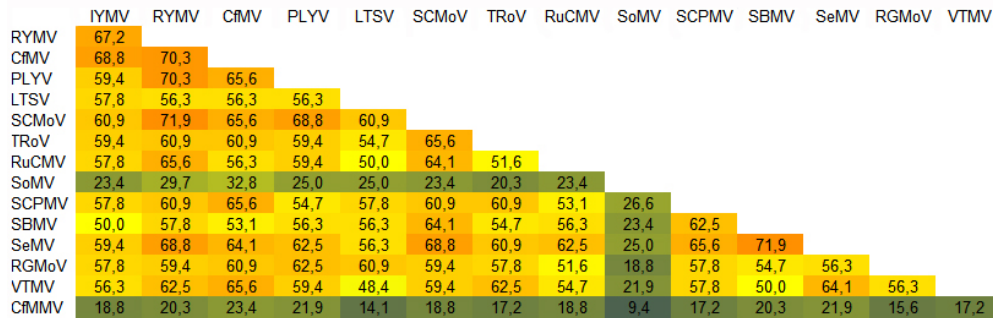
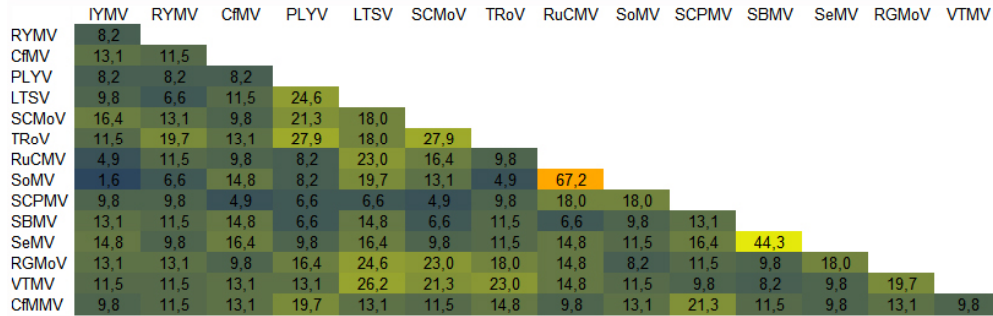
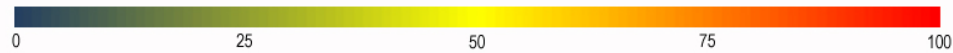
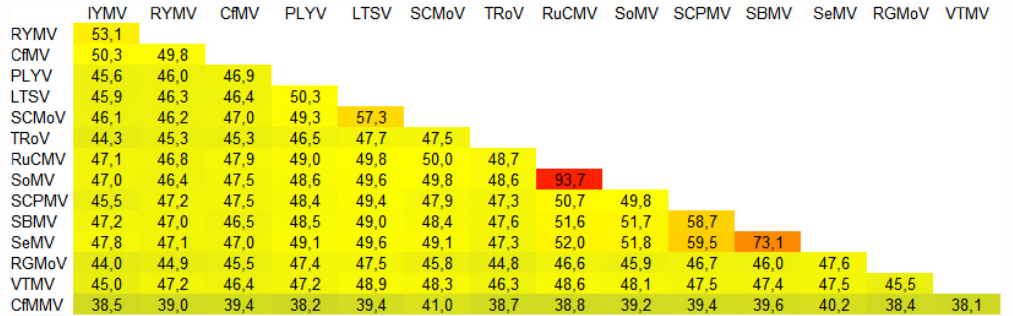
(B)

PLYV	1761	CCUUUAAACGUGGAUGGGGCGGAGUCG-----GUCAAACGAUCUCCGCCCUCA
IYMV	2059	CCUUUAAACUACCAGCGGGCGGACCUC---CUACGGGAGAGUCCGCCCUUGGAAGGCUUA
RYMV	1975	CCUUUAAACUGCCAGGGGGCGGGCUCGAGCCUUCGGGCAGUCCGCCCUUGGACGGCUUA
CfMV	1631	CCUUUAAACUACCAGCGGGCGGGCUC---CUACGGGCAGUCCGCCCUUGGCCAACUUA
SCM $\phi$ V	1843	CAUUUAAACUGCCAGCGGGUGGCCACAACUUA-----AAAGUUGUGUGCCACCUCUA
VTMV	1786	AAUUUAAACUGCCAGAGGGCGGCC-----CAAACAUUGGAGCCGCCUUC

**Figure 3**

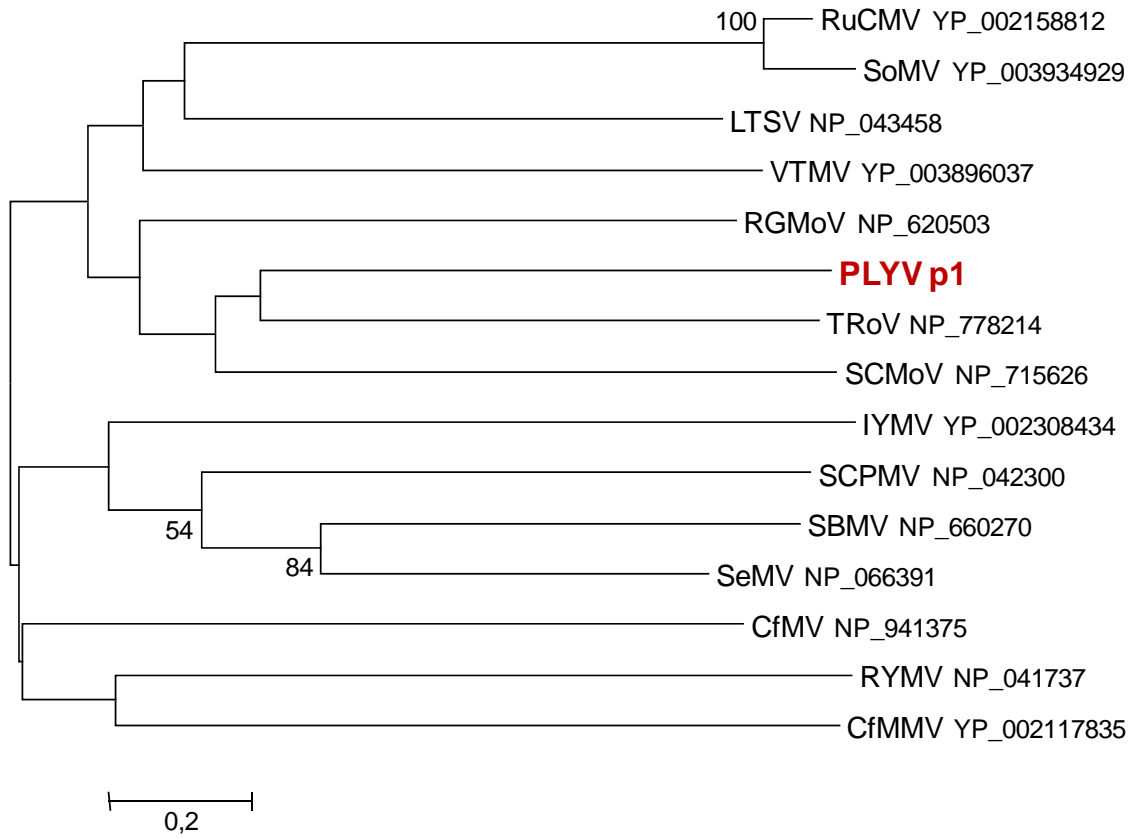


### Supplementary Figure S1



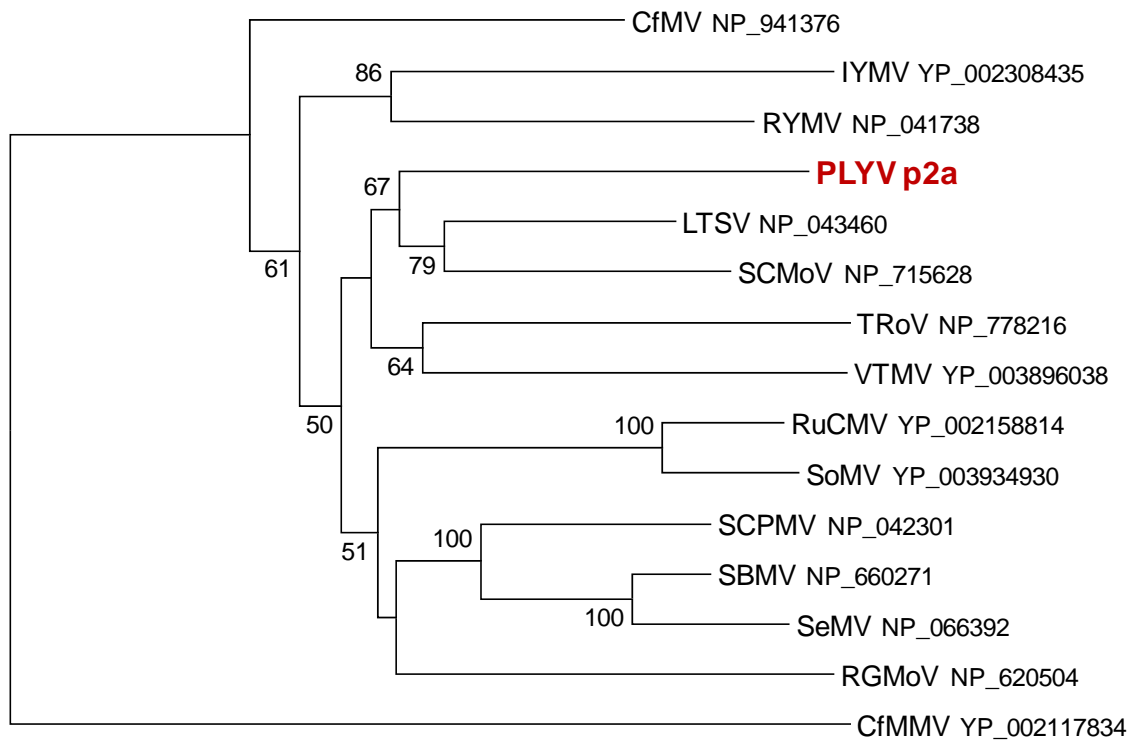
## Supplementary Figure S2

(A)



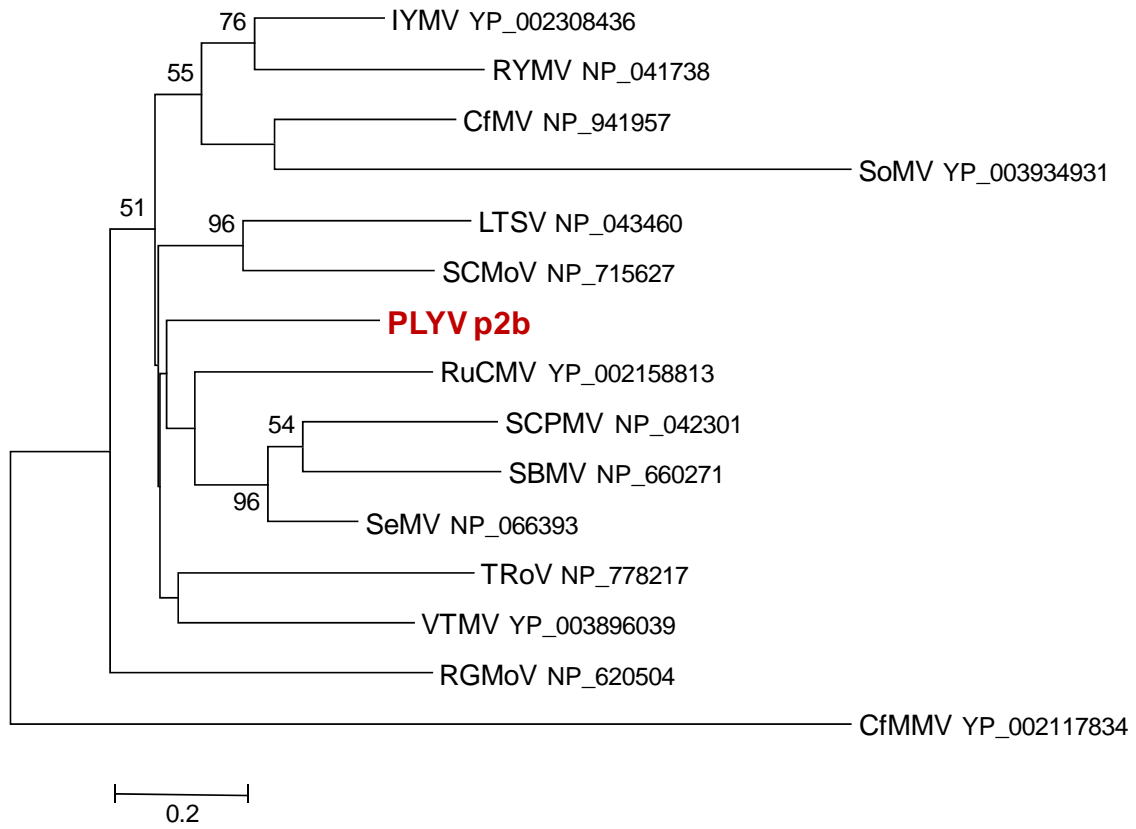
Suppl. Figure S2 (cont.)

(B)



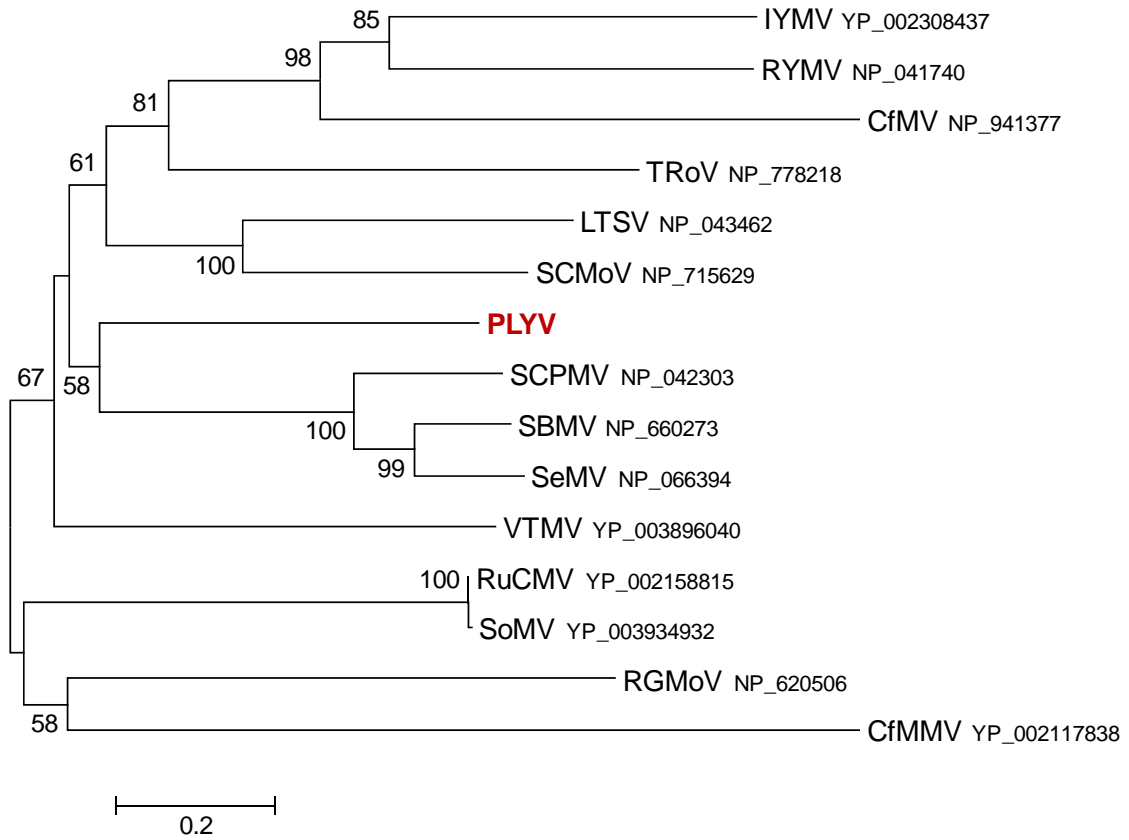
Suppl. Figure S2 (cont.)

(C)



Suppl. Figure S2 (cont.)

(D)



## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA GENÉTICA AO *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) EM GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)**

Pereira, A.J., Cascardo, R.S., Basso, M.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M. Avaliação da resistência genética ao *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) em genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.).

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA GENÉTICA AO *Papaya lethal yellowing virus*  
(PLYV) EM GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)**

Álvaro Julio Pereira<sup>1</sup>, Renan de Souza Cascardo<sup>1</sup>, Marcos Fernando Basso<sup>1</sup>, Eduardo  
Chumbinho de Andrade<sup>2</sup>, Francisco Murilo Zerbini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,  
36570-000

<sup>2</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 44380-000

Autor para correspondência: Francisco Murilo Zerbini; E-mail: zerbini@ufv.br

## Resumo

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) é originária da América tropical, a partir de onde se disseminou para várias partes do mundo. O Brasil, além de ser um dos maiores produtores mundiais, apresenta o cultivo do mamoeiro na quase totalidade do seu território. Dentre as doenças virais que atacam a cultura, o amarelo letal do mamoeiro, causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), é comum nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, constituindo-se em uma das doenças de importância econômica pelos prejuízos causados à cultura. Com o objetivo de avaliar a possível existência de genótipos de mamoeiro com resistência/tolerância ao PLYV, foi realizado um estudo em condições de casa-de-vegetação na Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se 60 acessos provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. As plantas foram inoculadas via extrato vegetal tamponado com um isolado de PLYV obtido de uma planta de mamoeiro infectada coletada em Mossoró, RN. Nove plantas de cada acesso foram inoculadas, em um delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas 90 dias após a inoculação por meio de ELISA indireto, empregando-se um anti-soro policlonal. Os resultados indicaram que os acessos CMF11, 15, 20, 21, 22, 26, 30, 33, 36, 38, 44, 47, 52, 54, 60, 72, 76, 82, 88, 92, 94, 102, 108, 114, 116, 120, 121, 123, 129, 130, 132, 150, 155, 166, 172, 175, 176, 183, 186, 200, 204, 206, 220, 223, 230, 233, 234 e 235 contêm fontes de resistência ao vírus, e portanto podem ser utilizados em programas de melhoramento genético visando a incorporação de resistência ao amarelo letal em cultivares comerciais de mamoeiro.

**Palavras-chave:** *Papaya lethal yellowing virus*, mamão, banco de germoplasma, resistência genética.

## **Abstract**

The papaya (*Carica papaya* L.) is native to tropical America, from where it spread worldwide. Brazil, besides being the world's largest papaya producer, cultivates it in almost all of its territory. Among the viral diseases that affect this crop, lethal yellowing caused by *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) is common in the states of Ceará and Rio Grande do Norte, where it constitutes an economically important disease due to the heavy yield losses that it imposes. With the objective of evaluating the existence of genetic resistance to PLYV in papaya germplasm, a study was conducted at Universidade Federal de Viçosa, under greenhouse conditions, testing 60 accessions from the BAG (Active Germplasm Bank) of Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. The plants were mechanically inoculated with a PLYV isolate obtained from a field-infected papaya plant collected at Mossoró, RN. Nine plants of each genotype were inoculated in a completely randomized design. Inoculated plants were tested for viral infection 90 days after inoculation by indirect ELISA using a polyclonal antiserum against PLYV. The results indicate that accesses CMF11, 15, 20, 21, 22, 26, 30, 33, 36, 38, 44, 47, 52, 54, 60, 72, 76, 82, 88, 92, 94, 102, 108, 114, 116, 120, 121, 123, 129, 130, 132, 150, 155, 166, 172, 175, 176, 183, 186, 200, 204, 206, 220, 223, 230, 233, 234 and 235 contain sources of resistance to the virus, and therefore can be used in breeding programs aiming at incorporating resistance to lethal yellowing in commercial papaya cultivars.

**Keywords:** *Papaya lethal yellowing virus*, papaya, germplasm bank, genetic resistance.

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma planta herbácea pertencente à família Caricaceae (Ming *et al.*, 2007). Sua origem se deu na América Tropical, na faixa que vai do noroeste da América do Sul ao sul do México, onde sua diversidade genética é máxima (Dantas *et al.*, 2002). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, com uma produção estimada de 1.890.286 toneladas de frutos em 2008 (IBGE, 2010). Em área colhida, o estado da Bahia ocupa a liderança com 914.679 toneladas, seguido pelo estado do Espírito Santo com 752.503 toneladas (Agrianual, 2009).

Antes da introdução do mamoeiro tipo Solo, praticamente não existiam variedades comerciais para plantio, e as sementes utilizadas apresentavam um elevado grau de segregação devido à existência exclusiva de cultivares dióicas ou comuns. Atualmente, praticamente toda a área de produção comercial é implantada com apenas três cultivares, integrantes de dois grupos: o grupo Solo, representado pelas cultivares Sunrise Solo e Improved Sunrise Solo 72/12, atualmente denominado Golden, e o grupo Formosa, representado pela cultivar Tainung no. 1. Isso implica em uma base genética extremamente estreita, com consequente vulnerabilidade da cultura (Santos, 2009).

Regiões produtoras de mamoeiros nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte têm sido afetadas, de forma frequente, pelo amarelo letal causado pelo *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) (Nascimento *et al.*, 2010a). A infecção viral se manifesta inicialmente com o amarelecimento das folhas superiores das plantas e posteriormente progride para sintomas mais severos como curvamento foliar, queima e senescência. Em frutos imaturos inicialmente observam-se manchas esverdeadas que se tornam amareladas após o amadurecimento (Lima *et al.*, 2001a; Lima *et al.*, 2001b). O PLYV pode ser transmitido mecanicamente, e é encontrado em solos contaminados (Camarço

*et al.*, 1998). Até o presente não foi identificado um agente vetor do vírus (Silva, 1996; Nascimento *et al.*, 2010b).

O melhoramento genético vegetal pode contribuir de maneira efetiva para uma maior produtividade da cultura do mamoeiro. Para que este objetivo seja alcançado, a aplicação de métodos de melhoramento e seleção de variedades com rendimentos superiores deve ser realizada, bem como cruzamentos para a obtenção de linhagens ou híbridos com resistência a doenças e pragas, principalmente as doenças de origem viral (Dantas e Lima, 2001). As doenças virais não podem ser controladas após sua introdução na cultura, e em muitos casos o plantio de cultivares resistentes é a única forma racional de controle. Esse é o caso do amarelo letal do mamoeiro, cuja única forma de controle atualmente existente é a erradicação de plantas com sintomas.

O germoplasma de mamoeiro apresenta uma variação fenotípica considerável para várias características agronomicamente importantes como altura da planta, forma e cor do fruto, sabor e conteúdo de açúcares do fruto, duração do período juvenil, carpeloidia do estame e aborto do carpelo. Além disso, cultivares comerciais de mamoeiro podem originar linhagens ginodióicas, exemplificadas pela linhagem Solo, desenvolvida no Havaí (EUA), que possui frutos pequenos e com alto conteúdo de açúcares (Kim *et al.*, 2002).

O objetivo deste estudo foi identificar acessos de mamoeiro do Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa Mandioca e Fruticultura com resistência ou tolerância ao amarelo letal, a fim de subsidiar programas de melhoramento genético do mamoeiro na seleção de parentais com resistência ao vírus.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Foram utilizados 60 acessos de mamoeiro provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Mamoeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Bahia) (Tabela 1). As sementes foram enviadas para a Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG) pelo correio, em conformidade com um Acordo de Transferência de Material assinado pelos dirigentes de ambas as instituições.

### **Desenho experimental**

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG). Dez sementes de cada acesso foram plantadas individualmente em vasos de 5 litros contendo solo, areia e esterco na proporção 3:1:1. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada acesso constituiu em um tratamento, e cada vaso com uma planta individual consistiu em uma repetição.

### **Isolado viral e método de inoculação**

As plantas foram inoculadas quando possuíam quatro folhas definitivas. Como fonte de inóculo utilizou-se o isolado 23 de PLYV, provenientes de uma planta de mamoeiro infectada coletada em um plantio comercial em Mossoró, estado do Rio Grande do Norte (Pereira *et al.*, 2010). A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 acrescido de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a 0,1%, na proporção 1:2 (p/v) de folhas e solução tampão. O extrato obtido foi friccionado com

gaze na superfície adaxial das folhas previamente polvilhadas com carborundum (600 *mesh*).

### **Avaliação da infecção viral**

Aos 90 (noventa) dias após a inoculação foram coletadas folhas novas (não inoculadas) de cada planta, e a infecção viral foi verificada por meio de ELISA indireto, com uso de anti-soro policlonal contra o PLYV gentilmente cedido pelo Prof. J. Albérico A. Lima (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE). Inicialmente os poços da placa de ELISA foram cobertos com 100 µl do extrato de folhas, preparados em tampão carbonato de sódio pH 9,6 na proporção 1:10 (peso de folhas/volume de tampão). Após incubação a 37° C por 1 h as placas foram lavadas três vezes (2 min por lavagem) com PBS-T (NaCl 0,136 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, Tween 20 0,05%) pH 7,4, e em seguida adicionaram-se 100 µl do anti-soro policlonal diluído na proporção 1:1000 em PBS-T contendo 2% de polivinilpirrolidona e 0,2% de ovalbumina. As placas foram incubadas novamente a 37° C por 1 h, e em seguida lavadas três vezes (2 min) com PBS-T. Foram então adicionados 100 µl de conjugado (IgG de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina) diluído na proporção 1:2000 em PBS-T contendo 2% polivinilpirrolidona, 0,2% de ovalbumina e azida de sódio 3 mM. Após 3 h de incubação a 37° C e posterior lavagem (3 vezes por 2 minutos com PBS-T) foram adicionados 100 µl do substrato *p*-nitrofenil fosfato (0,5 mg dissolvido em dietanolamina 12%, azida de sódio 0,25%, pH 9,8). As leituras de absorbância foram realizadas em um aparelho Labsystem Multiskan MS no comprimento de onda de 405 nm. Amostras cujos valores de absorbância foram superiores a duas vezes os valores obtidos para os controles negativos (planta sadia) foram consideradas positivas para a presença do vírus (Sutula *et al.*, 1986).

## **Classificação dos acessos em relação a resistência ao amarelo letal**

Os acessos foram classificados de acordo com o critério proposto por Aguilera *et al.* (2011): acessos nos quais a infecção viral foi comprovada pelo ELISA indireto em menos de 25% das plantas inoculadas foram considerados "resistentes" (R); acessos nos quais a infecção viral foi comprovada em 25-50% das plantas inoculadas foram considerados "moderadamente resistentes" (MR); acessos nos quais a infecção viral foi comprovada em mais de 50% das plantas inoculadas foram considerados "suscetíveis" (S).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em estudos objetivando a identificação de plantas resistentes a viroses, uma simples avaliação visual pode levar a erros grosseiros, uma vez que alguns genótipos podem mostrar somente sintomas fracos, difíceis de serem reconhecidos. Além disso, os sintomas de viroses em plantas podem ser difíceis de distinguir daqueles induzidos por desordens fisiológicas de natureza abiótica, como deficiências nutricionais ou fitotoxidez. Por fim, plantas infectadas podem ser tolerantes, permitindo a multiplicação viral sem apresentar sintomas. Portanto, para distinguir plantas infectadas de plantas não infectadas, assim como plantas tolerantes de plantas efetivamente resistentes (nas quais a replicação viral não ocorre) é necessário a utilização de um método de diagnose sorológico, como o ELISA indireto, ou molecular (Hull, 2002).

Neste trabalho, utilizando-se o ELISA indireto, confirmou-se a infecção por PLYV e estimou-se a frequência de plantas infectadas para cada acesso. Os acessos de mamoeiro testados comportaram-se da seguinte forma quanto à resistência ao PLYV: 48 acessos foram considerados "resistentes" (CMF11, 15, 20, 21, 22, 26, 30, 33, 36, 38, 44, 47, 52, 54, 60, 72, 76, 82, 88, 92, 94, 102, 108, 114, 116, 120, 121, 123, 129, 130, 132,

150, 155, 166, 172, 175, 176, 183, 186, 200, 204, 206, 220, 223, 230, 233, 234 e 235); sete acessos foram considerados "moderadamente resistentes" (CMF 24, 27, 65, 115, 154, 164, e 187); cinco acessos foram considerados "suscetíveis" (CMF 28, 31, 142, 145 e 165) (Tabela 1).

Esses resultados sugerem que os acessos de mamão do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura apresentam alta variabilidade genética em termos de resistência ao amarelo letal, o que pode ser útil em trabalhos de pré-melhoramento e fontes de variabilidade para resistência ao PLYV. Todos os acessos que mostraram-se resistentes (80% do total de acessos testados) são possíveis fontes de resistência do mamoeiro ao PLYV.

Conforme afirmam Gómez *et al.* (2009), os melhoristas de plantas e fitopatologistas tem realizado rastreamentos em bancos de germoplasma com o objetivo de buscar fontes de resistência a patógenos e caracterização dos fenótipos em várias plantas de interesse econômico. A diversidade genética vegetal encontrada nesses bancos provê o material para o melhoramento de plantas. As fontes de resistência e variação genética para resistência viral em uma cultivar podem ser suficientes para o desenvolvimento de linhagens resistentes a vírus em culturas de polinização cruzada, como o mamoeiro.

Dois aspectos relacionados à resposta dos acessos ao amarelo letal chamam a atenção: (i) os dois acessos classificados como suscetíveis apresentaram algumas plantas nas quais a infecção não se estabeleceu, e vice-versa, ou seja, na maioria dos acessos classificados como resistentes (31 em 48) observaram-se plantas com sintomas, nas quais a infecção foi confirmada por ELISA; (ii) a proporção de acessos classificados como resistentes pode ser considerada elevada em comparação com o que tem sido relatado para outros patossistemas, inclusive alguns incluindo o mamoeiro.

A explicação mais simples para a observação de plantas de acessos suscetíveis nas quais a infecção viral não se estabeleceu é o escape na inoculação via extrato vegetal tamponado. Entretanto, considerando-se a facilidade com a qual o PLYV é transmitido dessa forma (Nascimento *et al.*, 2010b), essa possibilidade é considerada remota. Uma segunda explicação seria a incapacidade do anti-soro utilizado de detectar com precisão o isolado viral. Essa possibilidade também é considerada remota uma vez que o estudo de diversidade genética do vírus (Pereira *et al.*, 2010) indicou que esta é baixa. Por fim, é possível que o resultado reflita a variabilidade genética existente entre plantas de cada acesso, somado a uma herança oligo/poligênica da resistência. Assim, os possíveis genes de resistência podem estar segregando entre essas plantas, de forma que algumas se comportam como resistentes. De qualquer forma, em uma eventual repetição do experimento, seria recomendável que a inoculação seja realizada duas (ou mesmo três) vezes, para que seja possível descartar a ocorrência de escapes.

A segregação de possíveis genes de resistência também é a explicação mais provável para a ocorrência de plantas infectadas nos acessos classificados como resistentes. Em apoio a essa hipótese, observa-se que Marin *et al.* (2002) relataram que a cultivar Golden é constituída de um tipo genético não-fixado e, portanto, sujeito a altas taxas de segregação.

O fato de 80% dos acessos testados terem sido classificados como resistentes é, em uma primeira análise, surpreendente, considerando-se que a maioria dos relatos de busca de fontes de resistência a viroses em acessos de bancos de germoplasma identifica um pequeno número de acessos resistentes (ou mesmo nenhum). Por exemplo, no caso específico do mamoeiro, até o presente ainda não foi possível identificar fontes de resistência ao potyvírus *Papaya ringspot virus* (PRSV, agente causal da mancha anelar do mamoeiro) em germoplasma de *Carica papaya* L. (Magdalita *et al.*, 1997; Dillon *et*

*al.*, 2005; O'Brien e Drew, 2009). Da mesma forma, até hoje não foram encontradas fontes eficientes de resistência ao begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV, agente causal do mosaico dourado do feijoeiro) em germoplasma de *Phaseolus* (Morales e Singh, 1991; Pessoni *et al.*, 1997). Em tomateiro, fontes de resistência ao potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, agente causal da risca do tomateiro) foram encontradas apenas em espécies selvagens de *Solanum* (Juhász *et al.*, 2006; Juhász *et al.*, 2008). Por outro lado, não existe nenhuma informação anterior sobre a existência de fontes de resistência ao amarelo letal em germoplasma de mamoeiro, e portanto qualquer conclusão a respeito da proporção de acessos classificados como resistentes ou suscetíveis é precipitada. As cultivares plantadas no Brasil foram melhoradas em outros países, e uma vez que o amarelo letal ocorre exclusivamente no Brasil, o processo de melhoramento não levou essa virose em consideração (ou seja, não ocorreu seleção para resistência ao amarelo letal). Isso explicaria a suscetibilidade dessas cultivares ao vírus. Considerando-se a estreita base genética dos mamoeiros cultivados, com apenas duas cultivares plantadas em todo o país, e a ocorrência restrita do amarelo letal em alguns estados da região Nordeste, é perfeitamente plausível que fontes de resistência estejam presentes em outros genótipos. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de que o experimento de inoculação dos acessos seja repetido, a fim de que se confirme o resultado.

As fontes de resistência e variação genética para resistência viral em uma cultivar podem ser suficientes para o desenvolvimento de linhagens resistentes a vírus em culturas de polinização cruzada, enquanto em plantas com autopolinização, as culturas tendem a ser geneticamente mais uniformes. O mamoeiro possui uma biologia floral complexa, com plantas masculinas (que produzem apenas flores masculinas), femininas (que produzem apenas flores femininas) e hermafroditas (que produzem

flores hermafroditas e masculinas). Apenas as flores hermafroditas são capazes de se autofecundar. Em consequência, a variabilidade intra- e interespecífica é elevada, o que pode ser verificado com a caracterização de acessos mantidos em bancos de germoplasma (Oliveira, 2007). Paradoxalmente, apesar dessa grande variabilidade genética, o número de cultivares comerciais efetivamente plantadas é limitado, e a base genética da cultura é extremamente estreita. Os resultados deste trabalho sugerem que a incorporação de resistência ao amarelo letal não deve ser difícil. Entretanto, é fundamental que seja caracterizada a herança da resistência nesses acessos.

Não obstante, é possível que os resultados obtidos neste trabalho sejam devidos, além da segregação genética diferencial dentre os genótipos, também pelas condições ambientais e pelo método utilizado para a inoculação. Diferenças qualitativas e quantitativas na resistência podem ocorrer com base nas condições ambientais, incluindo a temperatura, o fotoperíodo e a luminosidade. Para isso, é fundamental que o ensaio seja repetido em outras regiões e em outras épocas do ano. Além disso, um método de inoculação no qual a dose de inóculo seja muito baixa em comparação com a infecção natural pode levar a uma superestimação da resistência, e vice-versa (Marco *et al.*, 2003; Kido *et al.*, 2008). Infelizmente, no caso do amarelo letal do mamoeiro, a inoculação mecânica é basicamente o único método viável nesse tipo de estudo, uma vez que essa virose não possui um vetor conhecido.

Em conclusão, a grande maioria (80%) dos acessos de mamoeiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura testados foi resistente ao amarelo letal causado pelo PLYV em ensaio conduzido em casa-de-vegetação. Embora altamente encorajador, esse resultado deve ser confirmado por meio da repetição do experimento, de preferência mais de uma vez e em diferentes locais. Caso esse resultado seja de fato confirmado, esses acessos deverão ser objeto de estudos futuros visando

caracterizar a herança da resistência, com o objetivo final de incorporar o(s) gene(s) de resistência em cultivares comerciais de mamoeiro.

## LITERATURA CITADA

- AGUILERA, J.G.; ALVES-JUNIOR, M.; SILVA, D.J.H.; ZERBINI, F.M. Characterization of the resistance of tomato accessions from the BGH-UFV to the geminivírus *Tomato yellow spot virus*. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 1, p. 11-22, 2011.
- AGRIANUAL. *Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo, SP: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2009.
- CAMARÇO, R.F.E.A.; LIMA, J.A.A.; PIO-RIBEIRO, G. Transmissão e presença em solo do *Papaya lethal yellowing virus*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 453-458, 1998.
- DANTAS, J.L.L.; DANTAS, A.C.V.L.; LIMA, J.F. Mamoeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa - MG: Editora UFV, 2002. p. 309-349.
- DANTAS, J.L.L.; LIMA, J.F. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro: Avaliação de linhagens e híbridos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 617-621, 2001.
- DILLON, S.; RAMAGE, C.; DREW, R.; ASHMORE, S. Genetic mapping of a PRSV-P resistance gene in "highland papaya" based on inheritance of RAF markers. *Euphytica*, v. 145, p. 11-23, 2005.
- GÓMEZ, P.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.M.; MOURY, B.; ARANDA, M.A. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology*, v. 125, p. 1-22, 2009.
- HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. 4a ed. ed. Londres, Inglaterra: Academic Press, 2002.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola, 2010. Disponível em: [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm). Acesso em: 30/06/2011.
- JUHASZ, A.C.P.; DA SILVA, D.J.H.; ZERBINI, F.M.; CARNEIRO, P.C.S.; SOARES, B.O.; CRUZ, C.D. Resistance genetic basis of a wild tomato access to pepper yellow mosaic virus. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 43, p. 713-720, 2008.
- JUHASZ, A.C.P.; DA SILVA, D.J.H.; ZERBINI, F.M.; SOARES, B.O.; AGUILERA, G.A. Screening of *Lycopersicon* sp accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola*, v. 63, p. 510-512, 2006.
- KIDO, K.; TANAKA, C.; MOCHIZUKI, T.; KUBOTA, K.; OHKI, T.; OHNISHI, J.; KNIGHT, L.M.; TSUDA, S. High temperatures activate local viral multiplication

- and cell-to-cell movement of *Melon necrotic spot virus* but restrict expression of systemic symptoms. *Phytopathology*, v. 98, p. 181-186, 2008.
- KIM, M.S.; MOORE, P.H.; ZEE, F.; FITCH, M.M.M.; STEIGER, D.L.; MANSCHARDT, R.M.; PAUL, R.E.; DREW, R.A.; SEKIOKA, T.; MING, R. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, v. 45, p. 503-512, 2002.
- LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; LEAL, C.R.S. Presença de três vírus distintos em pomares irrigados do mamoeiro da Chapada do Apodi, Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, 2001a.
- LIMA, R.C.A.; LIMA, J.A.A.; SOUZA JR., M.T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 689-702, 2001b.
- MAGDALITA, P.M.; PERSLEY, D.M.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W. Screening *Carica papaya* X *C. cauliflora* hybrids for resistance to papaya ringspot virus type P. *Plant Pathology*, v. 46, p. 837-841, 2003.
- MARCO, C.F.; AGUILAR, J.M.; ABAD, J.; GOMEZ-GUILLAMON, M.L.; ARANDA, M.A. Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology*, v. 93, p. 844-852, 2003.
- MARÍN, S.L.D.; PEREIRA, M.G.; FERREGUETTI, G.A.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; CATTANEO, L.F. Capacidade combinatória em mamoeiro (*Carica papaya* L.) dos grupos "Solo" e "Formosa" sob cruzamentos dialélicos parciais. In: Resumos, Congresso Brasileiro de Melhoramento Genético Vegetal, Belém, PA. Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.
- MING, R.; YU, Q.; MOORE, P.H. Sex determination in papaya. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 18, p. 401-408, 2007.
- MORALES, F.J.; SINGH, S.P. Genetics of resistance to bean golden mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, v. 52, p. 113-117, 1991.
- MOWAT, W.P.; DAWSON, S.S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods*, v. 15, p. 233-247, 1987.
- NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.L.L.; BESERRA JR., J.E.; PURCIFULL, D.E. Biological, physical, and molecular properties of a *Papaya lethal yellowing virus*. *Plant Disease*, v. 94, p. 1206-1212, 2010a.
- NASCIMENTO, A.L.L.; LIMA, J.A.A.; A.K.Q., N.; GONÇALVES, M.F.B. Sorologia e sobrevivência do vírus do amarelo letal do mamoeiro. *Ciência Agrônômica*, v. 41, p. 448-455, 2010b.
- O'BRIEN, C.M.; DREW, R.A. Potential for using *Vasconcellea parviflora* as a bridging species in intergeneric hybridisation between *V. pubescens* and *Carica papaya*. *Australian Journal of Botany*, v. 57, p. 592-601, 2009.
- OLIVEIRA, A.A.R. Indução de resistência para o controle de doenças do mamoeiro, 2007. Disponível em: [www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=415](http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=415). Acesso em: 29/01/2008.

- PEREIRA, A.J.; CASCARDO, R.S.; DALTRO, C.B.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Partial genome sequencing of Papaya lethal yellowing virus (PLYV) isolates from Rio Grande do Norte, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 15, p. 121, 2010.
- PESSONI, L.A.; ZIMMERMANN, M.J.O.; FARIA, J.C. Genetic control of characters associated with bean golden mosaic geminivirus resistance in *Phaseolus vulgaris* L. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, p. 51-58, 1997.
- SANTOS, V.J. *Avaliação de resistência de genótipos de mamoeiro a Asperisporium caricae*. Dissertação M.S. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. 57 p., 2009.
- SILVA, A.M.R. *"Papaya lethal yellowing virus": Caracterização biológica e molecular*. Dissertação M.S. (Fitopatologia). Dep. de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1996.
- SUTULA, C.L.; GILLETT, J.M.; MORRISSEY, S.M.; RAMSDELL, D.C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease*, v. 70, p. 722-726, 1986.

**Tabela 1.** Resultado da inoculação de acessos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com um isolado do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV). Os acessos foram classificados como "resistentes" (R) quando <25% das plantas inoculadas foram positivas de acordo com o ELISA, "moderadamente resistentes" (MR) quando 25-50% das plantas inoculadas foram positivas, e "suscetíveis" (S) quando >50% das plantas inoculadas foram positivas.

No. acessos	Posit/inoc (%)	Classif.	No. acessos	Posit/inoc (%)	Classif.
CMF 011	1/9 (11)	R	CMF 116	2/9 (22)	R
CMF 015	1/9 (11)	R	CMF 120	0/9 (0)	R
CMF 020	1/9 (11)	R	CMF 121	2/9 (22)	R
CMF 021	2/9 (22)	R	CMF 123	2/9 (22)	R
CMF 022	1/9 (11)	R	CMF 129	0/9 (0)	R
CMF 024	3/9 (33)	MR	CMF 130	1/9 (11)	R
CMF 026	1/9 (11)	R	CMF 132	0/9 (0)	R
CMF 027	3/9 (33)	MR	CMF 142	5/9 (56)	S
CMF 028	6/9 (67)	S	CMF 145	5/9 (56)	S
CMF 030	2/9 (22)	R	CMF 150	0/9 (0)	R
CMF 031	5/9 (56)	S	CMF 154	3/9 (33)	MR
CMF 033	0/9 (0)	R	CMF 155	2/9 (22)	R
CMF 036	1/9 (11)	R	CMF 164	4/9 (45)	MR
CMF 038	2/9 (22)	R	CMF 165	5/9 (55)	S
CMF 044	2/9 (22)	R	CMF 166	2/9 (22)	R
CMF 047	0/9 (0)	R	CMF 172	0/9 (0)	R
CMF 052	2/9 (22)	R	CMF 175	1/9 (11)	R
CMF 054	0/9 (0)	R	CMF 176	1/9 (11)	R
CMF 060	0/9 (0)	R	CMF 183	1/9 (11)	R
CMF 065	3/9 (33)	MR	CMF 186	0/9 (0)	R
CMF 072	1/9 (11)	R	CMF 187	4/9 (44)	MR
CMF 076	0/9 (0)	R	CMF 200	2/9 (22)	R
CMF 082	1/9 (11)	R	CMF 204	0/9 (0)	R
CMF 088	0/9 (0)	R	CMF 206	1/9 (11)	R
CMF 092	0/9 (0)	R	CMF 220	1/9 (11)	R
CMF 094	1/9 (11)	R	CMF 223	0/9 (0)	R
CMF 102	1/9 (11)	R	CMF 230	0/9 (0)	R
CMF 108	2/9 (22)	R	CMF 233	1/9 (11)	R
CMF 114	0/9 (0)	R	CMF 234	1/9 (11)	R
CMF 115	3/9 (33)	MR	CMF 235	2/9 (22)	R

## CONCLUSÕES GERAIS

As análises efetuadas sobre a variabilidade genética dos isolados do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) provenientes de plantas coletadas em duas regiões produtoras da região nordeste do Brasil, indicaram um baixo grau de variabilidade genética dentre os isolados estudados e uma identidade um pouco mais baixa, mas significativa com espécies do gênero *Sobemovirus*.

O genoma viral sequenciado em sua totalidade com uso da plataforma Roche 454-GS-FLX Titanium indicou a existência de 4 ORFs. Uma com potencial de codificar uma proteína sem similaridade significativa com nenhuma outra proteína, a segunda e a terceira com sobreposição e potencial para codificar uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e uma quarta com potencial de codificar a proteína capsidial (CP). A RdRp e a CP apresentaram similaridade sequência significativa com proteínas correspondentes de espécies do gênero *Sobemovirus*. Devido a estas características da organização genômica quando comparadas com os sobemovírus, confirma-se a classificação do PLYV como uma espécie pertencente ao gênero *Sobemovirus*.

Na avaliação da existência de genótipos de mamoeiro com resistência/tolerância ao PLYV em 60 acessos procedentes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, os resultados revelaram que dos 60 acessos estudados, 48 eram resistentes, 7 moderadamente resistentes e 5 suscetíveis. Apesar da alta porcentagem de genótipos resistentes, outros estudos envolvendo diferentes regiões e épocas devem ser realizados para melhor corroborar o uso dos genótipos estudados em programas de melhoramento genético do mamoeiro com resistência ao PLYV.