

Sorologia e sobrevivência do vírus do amarelo letal do mamoeiro¹

Serology and surviving characteristics of *Papaya lethal yellowing virus*

Ana Lúcia Lopes do Nascimento², José Albersio de Araujo Lima^{3*}, Aline Kelly Queiroz do Nascimento² e Maria de Fátima Barros Gonçalves⁴

Resumo - O vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV) é responsável por uma das principais doenças do mamoeiro (*Carica papaya*) no Nordeste brasileiro. O PLYV pode ser transmitido através do solo, água, instrumento de corte e mãos contaminadas. A presente pesquisa teve como objetivo estudar as características biológicas, sorológicas e físicas de um isolado do vírus e avaliar sua sobrevivência em tecido seco infetado. O PLYV foi detectado por “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) indireto e isolado em mudas de mamoeiro, através da inoculação mecânica. A sobrevivência do PLYV em folhas e raízes secas de mamoeiro infetado foi avaliada por sorologia e inoculação em plantas saudáveis. A presença do vírus foi detectada em folhas e raízes de mamoeiro secas, indicando que o vírus pode permanecer ativo em restos de cultura por até 120 dias. A purificação do PLYV permitiu a obtenção de 309.5 mg de vírus/kg de folha e o anti-soro obtido mostrou-se altamente específico, com títulos de 1:128 em dupla difusão em Agar e 1:1.024.000 em Elisa indireto. Estudos das propriedades físicas do PLYV em mamoeiro revelaram um ponto de inativação térmica (PIT) em torno de 80 °C, um ponto máximo de diluição (PMD) de ac. 10⁻⁶ e uma longevidade *in vitro* (LIV) acima de 50 dias.

Palavras-chave - *Carica papaya*. PLYV. *Papaya lethal yellowing virus*.

Abstract - The *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) is responsible for one of the most important disease of papaya (*Carica papaya*) in the Northeast of Brazil. The PLYV can be transmitted through the soil, irrigation water, agriculture tools and contaminated hands. The present research had the objective to characterize biologically, serologically and physically a PLYV isolate and evaluates how long it survives in infected dried tissues. The PLYV was identified by indirect enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA), isolated in young papaya plants by mechanical inoculations and maintained at green house conditions for virus purification. Approximately 309.5 mg of virus was purified per kg of infected papaya leaves and a polyclonal antiserum was obtained from an immunized rabbit. The antiserum obtained was shown to be highly specific to PLYV with a titer of 1:128 in double immune-diffusion and a titer of 1:1.024.000 in indirect ELISA. The virus was detected in dried roots and leaves maintained at room temperature up to 120 days, confirming its high stability within nonliving plant tissues, which could explain its dissemination by contaminated hands, tools, water and soil. The physical properties determined for the virus revealed a thermal inactivation point of 80 °C, longevity *in vitro* over 50 days and dilution end point ac. of 10⁻⁶.

Key words - *Carica papaya*. PLYV. *Papaya lethal yellowing virus*.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 09/11/2009; aprovado em 13/07/2010

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor

²Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, CCA/UFC, Caixa Postal 6.012, Fortaleza-CE, Brasil, 60.451-970, anall17@yahoo.com.br; alynekelly@yahoo.com.br

³Bolsista de PQ 1-A do CNPq, Departamento de Fitotecnia, Bloco de Fitossanidade, Laboratório de Virologia Vegetal, CCA/UFC, Caixa Postal 6.046, Fortaleza-CE, Brasil, 60.451-970, albersio@ufc.br

⁴Departamento de Fitotecnia, Bloco de Fitossanidade, Laboratório de virologia Vegetal, CCA/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, fatinhagon@yahoo.br

Introdução

O Brasil possui condições excelentes para o cultivo de mamoeiro (*Carica papaya* L.), fato que lhe confere a posição de destaque como o maior produtor, com produção estimada no ano de 2007 de 1.812.000 t, ocupando uma área de 34.973 ha, tendo como destaque a região Nordeste, com produção média de 1.093.838 t (IBGE, 2008). Mesmo sendo propício o cultivo do mamoeiro em toda sua extensão, existem no Brasil problemas que podem tornar inviável o sucesso da exploração da cultura. Diversos são os fatores envolvidos, dentre eles se destacam os ácaros, fungos, bactérias, nematóides, fitoplasmas e vírus (LIMA et al., 2001; MARCIEL-ZAMBOLIM et al., 2003). As viroses do mamoeiro constituem, atualmente, o maior entrave à implantação de pólos produtores da cultura, devido à característica itinerante que lhe é imposta (KUNG et al., 2009; LIMA et al., 2001; RAMOS et al., 2008; SOUZA JÚNIOR et al., 2005). Dentre os principais vírus que infetam o mamoeiro, somente o vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV-P), família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*; o vírus do amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*, PLYV), possível gênero *Sobemovirus* e o vírus da meleira (*Papaya meleira virus*, PSV), sem definição taxonômica foram registrados em pomares brasileiros (CAMARÇO et al., 1998; KITAJIMA et al., 1992; KUNG et al., 2009; LIMA et al., 2001; MARCIEL-ZAMBOLIM et al., 2003; RAMOS et al., 2008; TAVARES et al., 2004).

A virose ocasionada pelo PLYV tem se constituído num sério problema para os produtores não apenas pela crescente dispersão do vírus, mas, sobretudo pela severidade dos seus sintomas nas plantas infetadas (CAMARÇO et al., 1998; LIMA et al., 2001). O vírus possui partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diâmetro, com genoma do tipo ssRNA de ca. $1,6 \times 10^6$ Da, sendo o capsídeo formado por uma única proteína de ca. 35 kDa (CAMARÇO et al., 1998; KITAJIMA et al., 1992; LIMA et al., 2001). Análise de seqüências de nucleotídeos de fragmento do gene RdRp/CP indicaram forte relacionamento do PLYV com vírus do gênero *Sobemovirus*, e baixa variabilidade molecular entre isolados de PLYV (BESERRA et al., 2009).

Testes de transmissão do PLYV, empregando a espécie de afídeo *Mizus persicae* Sulz, de forma circulativa persistente e não circulativa não persistente e ensaios com besouros das espécies *Diabrotica bivitulla* Kirke e *D. speciosa* Kirke, revelaram resultados negativos, indicando que estes vetores não estão envolvidos na disseminação do vírus no campo (KITAJIMA et al., 1992; LIMA et al., 2001). No entanto, o vírus foi eficientemente transmitido de plantas doentes de mamoeiro para plantas saudáveis, pelo método de transmissão mecânica e por mãos contaminadas,

mesmo após serem lavadas em água corrente, demonstrando grande estabilidade da partícula viral (CAMARÇO et al., 1998; SARAIVA et al., 2006). Estudos realizados para avaliar as formas de sobrevivência e de transmissão do PLYV, demonstraram a presença do vírus infectivo em solo, água de rega e superfície de sementes de frutos infetados sem, no entanto ser transmitido por semente (CAMARÇO et al., 1998).

Os sintomas do Amarelo Letal iniciam-se, geralmente, com o amarelecimento de folhas parcialmente desenvolvidas do terço superior da copa. Com a evolução da moléstia, as folhas apresentam-se ligeiramente retorcidas, com aspecto clorótico e progressivamente amarelecem, murcham e morrem, enquanto nos frutos, ocorre o aparecimento de manchas circulares inicialmente esverdeadas e depois, com o amadurecimento, tornam-se amareladas (LIMA et al., 2001).

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar aspectos biológicos e sorológicos de um isolado de PLYV, determinar as suas propriedades físicas e sua sobrevivência em tecido seco infetado e avaliar a incidência do PLYV em amostras de folhas e de frutos de mamoeiro oriundos de campos de cultivo das principais regiões produtoras do Ceará.

Material e métodos

Avaliação da incidência do vírus em amostras recebidas para análise

No período de Janeiro de 2007 a Janeiro de 2009, 1.078 amostras de folhas e frutos de plantas de mamoeiro com suspeita de infecção viral, procedentes de áreas submetidas a fiscalizações sanitárias por técnicos da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADAGRI), nos municípios de Acaraú, Caririré, Curupati, Limoeiro do Norte, Mauriti, Marco, Mombaça, Nova Jaguaribara, Quixeré e Varjota, conduzidas ao Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, foram analisadas quanto a presença de sintomas e por teste de “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) indireto contra anti-soro para específico PLYV.

Isolamento e purificação do vírus

Um isolado de PLYV sorologicamente identificado infetando plantas de mamoeiro no município de Marco - CE foi mantido em casa de vegetação por inoculações periódicas em mudas saudáveis com extratos de plantas infetadas pelo vírus. O isolado de PLYV de Marco foi propagado em 100 mudas saudáveis de mamoeiro através de inoculação mecânica e purificado utilizando o método descrito por Lima et al. (1994)

com algumas modificações. Folhas de mamoeiro infetadas com PLYV coletadas 30 dias após a inoculação foram maceradas em liquidificador comum, na presença de tampão (Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,5 e 0,5% Sulfito de Sódio) e o extrato obtido foi filtrado em gaze dupla. O filtrado foi clarificado com 8% de *n*-butanol, sob agitação lenta e constante por cerca de 5 h e centrifugado por 10.000 g/10 min. Ao sobrenadante adicionou-se 8% de polietilenoglicol-6000 (PEG) e 4% de Cloreto de Sódio, os quais foram homogeneizados em agitação lenta e constante por 1 h. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10.000 g/10 min e o pellet foi ressuspenso em tampão Fosfato 0,02 M pH 8,2. Após uma clarificação de 10.000 g/10 min, o processo de precipitação viral com PEG foi repetido quatro vezes e o produto final foi ultracentrifugado a 120.000 g, em temperatura de 3 °C, por 2 h. O pellet contendo o vírus foi ressuspenso em 3,0 mL de tampão Tris 0,02 M pH 8,2.

A concentração e a pureza da preparação viral foram avaliadas através da análise do espectro de absorção ultravioleta na faixa de comprimento de onda de 240 a 320 nm, no espectrofotômetro Variant DMS 70. Em razão de o PLYV pertencer a um grupo taxionômico ainda não definido, sua concentração foi estimada usando-se o coeficiente de extinção de 5,8 determinado para o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), vírus tipo do gênero *Sobemovirus* (TADAITI, O. Jr., 2007). A infectividade do vírus purificado foi avaliada através da sua inoculação mecânica em mudas sadias de mamoeiro.

Avaliação do peso molecular da proteína capsidial do PLYV por eletroforese

A determinação do peso molecular da proteína capsidial do PLYV purificado foi feita por análise eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). O gel de concentração contendo 4% de poliacrilamida [1,84 mL de água destilada; 0,315 mL de Tris-HCl 1M pH 6,8; 0,025 mL de solução SDS 10%; 0,325 mL de acrilamida-BIS 30%; 0,0125 de APS (Persulfato de amônia) 10% e 0,0025 mL de tetrametiletilenodiamina (TEMED)] e o gel de separação contendo 17,5 % poliacrilamida (0,72 de água destilada; 1,25 de Tris- HCl 1,5 M pH 8,8; 0,05 mL de solução SDS 10% ; 2,915 mL de acrilamida-BIS 30%; 0,043 de APS 10% e 0,05 mL de TEMED).

Foram aplicados 10 µL das diluições 1:2 e 1:10 por cavidade do gel e a eletroforese se desenvolveu à temperatura ambiente no tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 25mM e SDS 5%), sob uma voltagem constante de 115 V durante aproximadamente 1 h: 30 min. Após a corrida o gel passou por um período de coloração em solução “ comassie blue” R 250 0,25 % juntamente com álcool metílico 45% e ácido acético glacial 10% durante aproximadamente 1 h sob agitação lenta, à tornar-se

possível a visualização das bandas protéicas. O excesso do corante foi removido com uma solução de metanol (30%) e ácido acético glacial (7%).

O peso molecular da proteína foi avaliado de acordo com os marcadores padrões das seguintes proteínas: albumina sérica bovina PM= 66 KDa; ovalbumina PM= 45 KDa; pepsina PM= 34,2 KDa; tripsinogênico PM= 24 KDa; β - Lactoglobulina PM= 18,4 KDa e lysosyme PM= 14,3 KDa. Estimou-se o peso molecular da proteína capsidial do vírus através da curva obtida pelo peso molecular (kDa) x mobilidade eletroforética.

Sorologia

Produção de anti-soro policlonal: Uma alíquota de 500 µL da preparação purificada do PLYV na concentração 10,25 mg/mL foi emulsificada com igual volume de adjuvante incompleto de Freund e injetada na pata traseira de um coelho da raça Nova Zelândia. Outras duas injeções foram efetuadas, em intervalos de sete dias, usando a mesma quantidade da preparação viral. Antes da imunização efetuou-se uma coleta de sangue do coelho para a produção de soro normal. Decorridos 15 dias da terceira injeção, procedeu-se a primeira sangria para observação da titulação do anti-soro. A partir daí, sangrias foram realizadas semanalmente, com a coleta de sangue sendo efetuada através de cortes nas veias marginais da orelha do coelho, retirando-se aproximadamente 20 mL de sangue por sangria. O sangue coletado foi aquecido em banho-maria a 37 °C por 1 h e centrifugado a 3.000 g por 10 min e em seguida submetido a uma centrifugação de 10.000 g por 10 min. O soro obtido foi armazenado a - 20 °C.

Técnica de ELISA indireto (“Enzyme linked immunosorbent assay”): Para a realização dos testes sorológicos com o anti-soro produzido, utilizou-se a técnica de ELISA indireto e de acordo com os critério adotados no Laboratório de Virologia Vegetal da UFC foram consideradas positivas as reações que correspondiam ao dobro dos valores médios das absorbâncias registradas para os extratos de plantas sadias, usadas como testemunhas. O título do anti-soro foi avaliado por meio de ELISA indireto, utilizando as seguintes diluições do anti-soro: 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000; 1:64.000; 1:128.000; 1:256.000; 1:512.000 e 1:1.024.000, a partir do anti-soro puro. Avaliou-se ainda a reatividade e a especificidade do anti-soro através de diluições do extrato de folhas infetadas (1:10; 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000 e 1:64.000; 1:128.000; 1:256.000; 1:512.000 e 1:1.024.000) e duas diluições do extrato sadio (1:10 e 1:1.000) contra o anti-soro nas diluições 1:4.000; 1:8.000 e 1:16.000.

Técnica de dupla difusão em agar: Testes de dupla difusão em agar foram realizados com amostras de

tecidos foliares e de tecidos retirados da camada superficial dos frutos, visando avaliar a eficiência e reatividade do anti-soro em teste de menor sensibilidade. Os extratos foram obtidos a partir da maceração, em presença de água destilada, na proporção de 1: 2 (p/v). Em seguida, alíquotas de 20 a 30 μ L dos extratos foram distribuídos nos orifícios periféricos do gel de ágar (0,8 % de Agar Noble e 1,0% de azida de sódio) e testados contra o anti-soro específico para o PLYV. O título do anti-soro foi também avaliado em dupla difusão, utilizando diluições de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1.024; 1: 2.048 e extratos de plantas infetadas nas diluições de 1:5 e 1:10. Estudos adicionais foram, realizados com o anti-soro nas diluições 1:8 e 1:16 e os extratos de plantas infetadas nas diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1.024.

Estudo da sobrevivência do vírus em folhas e raízes de mamoeiro

A sobrevivência do PLYV em folhas e raízes secas de mamoeiro infetado foi avaliada por sorologia e inoculação em plantas sadias. Aproximadamente 100 g de folhas e 100 g de raízes coletadas de plantas de mamoeiro sistematicamente infetadas pelo PLYV foram acondicionadas em placas de Petri abertas mantidas à temperatura ambiente de 26 °C. A cada 10 dias de intervalo, até 120 dias, 20 alíquotas de 0,1 g de folhas secas e 20 alíquotas de 0,1 g de raízes secas foram avaliadas por ELISA indireto contra anti-soro para PLYV, utilizando a diluição 1:10 na preparação do antígeno. Da mesma forma, para avaliar a infectividade do PLYV nos tecidos secos, 20 alíquotas de folhas e 20 alíquotas de raízes, de 0,1 g cada foram inoculadas em plantas jovens de mamoeiro, utilizando duas plantas por alíquota de tecido. Os inóculos foram preparados em tampão de fosfato na diluição 1:10. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, para avaliação da presença da infecção do vírus, através do aparecimento de sintomas característicos e por ELISA indireto, utilizando anti-soro para PLYV, após 30 dias de inoculação.

Determinação da estabilidade do PLYV em seiva

As propriedades físicas do PLYV foram determinadas em plantas sadias de mamoeiro por constituir a única hospedeira natural do vírus até então registrada em trabalhos de gama de hospedeiros. O Ponto de Inativação Térmica (PIT), a Longevidade *in vitro* (LIV) e o Ponto Máximo de Diluição (PMD) foram determinados utilizando-se 10 plantas jovens de mamoeiro como planta teste para cada tratamento. O PIT foi estimado em temperaturas entre 45 °C a 90 °C com intervalos de 5 °C. A LIV foi determinada em períodos de 0; 24; 48 h; 4; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 dias. Para a determinação do PMD o

extrato bruto de seiva de folhas de mamoeiro com sintomas de vírus foi submetido às diluições de 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} e 10^{-6} com solução tampão e posterior inoculação em oito mudas de mamoeiro.

Resultados e discussão

De acordo com as análises dos sintomas e os resultados dos testes sorológicos, o PLYV foi identificado em amostras de folhas e de frutos provenientes de vários Pólos de Agricultura Irrigada do Estado do Ceará (TAB. 1), confirmando a crescente dispersão do vírus. Nas análises visuais e testes sorológicos de 628 amostras de folhas e de frutos, recebidos no Laboratório de Virologia Vegetal, verificou-se que 153 estavam infetadas pelo PLYV representando 24,36% das amostras testadas (TAB. 1). Percebeu-se ainda, que as amostras provenientes dos municípios de Limoeiro, Marco e Quixeré apresentaram os maiores índices de infecção com PLYV. Os baixos índices de amostras com PLYV, provenientes de áreas de produção do Estado do Ceará demonstraram que o vírus está restrito a determinadas regiões. Pode-se observar que as maiores taxas de incidência do PLYV ainda estão concentradas em áreas de cultivo onde já se tinha o conhecimento da doença, tendo o homem como o principal veículo de disseminação do vírus, em razão da possível ausência de um vetor natural (LIMA et al., 2001). Entretanto, estratégias de controle para esta virose têm trazido benefícios aos produtores, contribuindo para a eliminação de fontes de vírus no campo e sua disseminação.

Um isolado do PLYV foi obtido a partir de uma amostra foliar proveniente do município de Marco, a qual foi selecionada entre as amostras infetadas, com a presença do PLYV confirmada por ELISA e que não reagiram com anti-soro para PRSV. O isolado de PLYV foi mantido em condições de casa de vegetação por transferências periódicas de plantas infetadas para mudas sadias de mamoeiro.

A preparação purificada do PLYV apresentou um espectro de absorção de luz ultravioleta com máximo em 258 nm (= 0,724) e uma razão da absorção nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e entre a absorção máxima e mínima ($A_{\text{máx}}/A_{\text{mín}}$) de 1,89 e 1,44, respectivamente, típico de vírus de formato poliédrico. A preparação purificada do vírus foi infectiva quando inoculada em plantas sadias de mamoeiro demonstrando que o processo de purificação não afetou a integridade biológica do vírus. A concentração viral foi estimada em 12,38 mg de vírus/mL, com um total de 37,14 mg de vírus na preparação viral purificada, correspondendo a 30,95 mg de vírus em 100 g de tecido vegetal infetado. O grau de pureza da preparação purificada e a elevada concentração de vírus (12,38 mg de vírus/mL) servem

Tabela 1 - Resultados da análise de amostras foliares de mamoeiro (*Carica papaya*), procedentes de regiões produtoras do estado do Ceará, com suspeita de sintomas típicos de vírus, semelhantes aos ocasionados por *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) e/ou *Papaya ringspot virus* (PRSV), através de teste de ELISA indireto contra anti-soros específicos para PLYV

Município de Procedência	Tamanho da Amostra (Número de plantas)	Número e percentagem de plantas infetadas com PLYV
Acaraú	20	20 (100%)
Cariré	26	Zero
Curupati	52	16 (30,77%)
Jaguaribara	64	Zero
Limoeiro	188	76 (40,43%)
Marco	22	22 (100%)
Mauriti	20	Zero
Mombaça	10	Zero
Quixeramobim	20	5 (25%)
Quixeré	88	32 (36,36%)
Varjota	118	Zero

para validar o método adaptado por Lima et al. (1994) para a purificação do PLYV e confirmar que o mesmo ocorre em concentrações relativamente elevadas em plantas infetadas (KITAJIMA et al., 1992; LIMA et al., 2001). Concentrações elevadas em preparações purificadas de vírus de plantas já foram, também, obtidas com o vírus mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus*, SQMV), família *Comoviridae*, gênero *Comovirus* (LIMA, 1972). Lima (1972) purificou estirpes do SQMV em concentrações entre 23,0 a 52,0 mg de vírus por 100 g de tecido de plantas. De outra parte, o ajuste do tempo de clarificação com *n*-butanol (5 h de agitação lenta) contribui para diminuir o tempo de purificação, reduzindo inclusive a possibilidade de degradação das partículas virais, pela ação do *n*-butanol.

A análise protéica em gel de eletroforese em meio a 10% de SDS permitiu estimar o peso molecular da proteína capsidial do vírus, revelando apenas uma banda com aproximadamente 34,7 kDa. O valor obtido se manteve próximo aos encontrados anteriormente para isolados do PLYV (KITAJIMA et al., 1992; SARAIVA et al., 2006).

Os resultados dos testes sorológicos, em ELISA indireto e dupla difusão em ágar, mostraram que o anti-soro obtido contra a preparação purificada do PLYV reconheceu o extrato de planta infetada com o vírus, não apresentando reação com extratos de plantas sadias, evidenciando uma clara distinção entre o extrato de planta sadia e o extrato de planta infetada, com títulos de 1:128 em dupla difusão em Agar e de 1:1.024.000 em Elisa indireto. Anti-soro específico para SQMV

com excelente reatividade em dupla difusão em Agar já foi preparado através da imunização oral de coelho no Laboratório de Virologia Vegetal da UFC (CÂMARA FILHO et al., 2005).

O anti-soro reagiu com extratos foliares de plantas infetadas pelo PLYV em ELISA indireto, até a diluição de 1:1.024.000, apresentando absorvância superior ao dobro dos valores obtidos com extratos de plantas sadias, demonstrando o elevado título do anti-soro. No entanto, as melhores reações foram obtidas com as diluições de 1:4.000, 1:8.000 e 1:16.000 do anti-soro (FIG. 1). Apesar da elevada concentração do vírus na diluição de 1:10 do extrato de planta infetado, os maiores valores de absorvância em 405 nm, 1 h após adição do substrato, foram observados quando o extrato foi diluído na proporção de 1:1.000 (FIG. 1). Contudo, as diluições acima de 1:1.000 também apresentaram valores elevados de absorvância, confirmando a alta concentração de vírus nas folhas infetadas (KITAJIMA et al., 1992; LIMA et al., 2001) e a elevada sensibilidade da técnica de ELISA para detecção do PLYV em tecido de mamoeiro infetado (FIG. 1). De acordo com os resultados aqui apresentados, 1,0 ml do anti-soro bruto diluído na proporção de 1:16.000 seria suficiente para indexar mais de 140.000 amostras de plantas quando utilizado em ELISA indireto.

Os resultados dos testes indicando a reatividade do anti-soro com extrato de mamoeiro infetado até a diluição de 1:1.024.000 (FIG. 1) comprovam a eficiência da técnica de ELISA indireto para a detecção do PLYV em plantios comerciais de mamoeiro de forma prática e eficiente. Semelhantemente aos vírus do gênero *Sobemovirus*, o

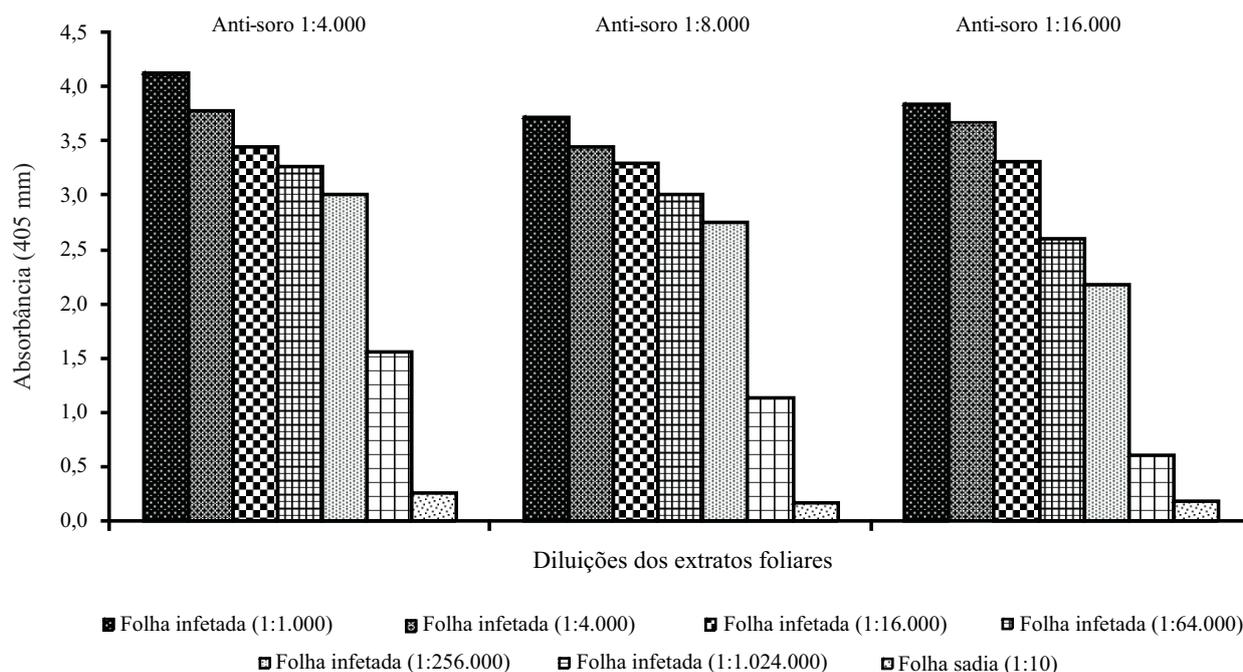


Figura 1 - Absorbâncias em 405 nm em testes de ELISA indireto, com extratos de folhas de mamoeiro (*Carica papaya*) infetado com o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) e de planta sadia, usando anti-soro policlonal para PLYV, 1 h após a adição do substrato, com diferentes diluições do anti-soro (1:4.000, 1:8.000 e 1:16.000) e do extrato de folhas (1:1.000; 1:4.000; 1:16.000; 1:64.000; 1:256.000 e 1:1.024.000)

PLYV ocorre em concentrações relativamente elevadas em plantas infetadas (KITAJIMA et al., 1992; LIMA et al., 2001), possuindo boas propriedades imunogênicas e antigênicas, facilitando a produção de anti-soros com títulos elevados (TAMM; TRUVE, 2000). Os vírus do gênero *Sobemovirus* são detectados predominantemente no mesófilo e nos tecidos vasculares, mas têm sido relatados também, por exemplo, na epiderme e em células-guardas (TAMM; TRUVE, 2000).

A presença do PLYV foi detectada em folhas e raízes secas de mamoeiros infetados mantidas em temperatura ambiente durante todo o período em que os tecidos foram avaliados. No entanto, a detecção do vírus por ELISA e sua infectividade avaliada por inoculação de plantas saudias foram decaindo ao longo do tempo. Após 20 dias o vírus foi detectado por ELISA em 100% das amostras das folhas e das raízes testadas, sendo que o índice de 100% manteve-se até os 40 dias para as folhas e foi reduzido para 80% nas raízes (FIG. 2). Nas folhas, a detecção do vírus por ELISA manteve-se elevada (90%) até os 80 dias, enquanto que nas raízes caiu para 60% no mesmo período. No final do período de 120 dias a detecção por ELISA nas folhas ainda se manteve acima de 70% e nas raízes a detecção

foi possível em apenas 20% das amostras (FIG. 2). A avaliação biológica do vírus nos tecidos secos, através de inoculações de mudas de mamoeiros, também confirmou sua capacidade de sobrevivência durante todo o período de análise. Após um período de 20 dias, o vírus infetou 60% das plantas inoculadas com folhas secas e 50% com raiz seca. Após 60 dias de estocagem, o PLYV infetou 40% das mudas inoculadas com raízes e folhas secas, ocasionando sintomas típicos e sendo detectados por ELISA. Após 100 dias, o vírus infetou 30% das plantas inoculadas com folhas secas e 25% das plantas inoculadas com raízes secas. Após 120 dias, o vírus infetou 15% das plantas inoculadas com folhas secas e 10% das plantas inoculadas com raízes secas, sendo as infecções confirmadas por ELISA indireto, nas plantas inoculadas. Estes resultados indicam que o PLYV pode permanecer ativo no solo e restos de culturas, constituindo fonte de vírus em pomares produtivos. Portanto, é necessário que as medidas de controle de caráter preventivo, sejam criteriosas, efetuando-se a eliminação de pomares velhos e abandonados com históricos de viroses e procedendo a prática do "roguing" (LIMA et al., 2001), com o cuidado de não deixar folhas e raízes, mesmo secas, na área cultivada.

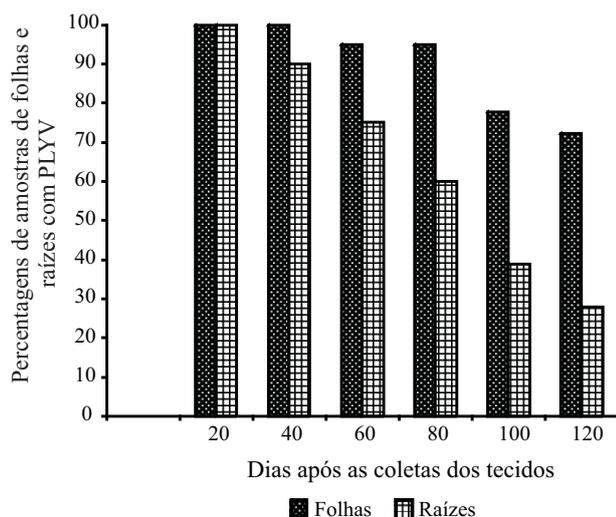


Figura 2 - Detecção por ELISA indireto da presença do *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) em tecidos secos de folhas e de raízes de plantas de mamoeiro (*Carica papaya*) infetadas, mantidas em temperatura ambiente por 120 dias

Além das características sorológicas, biológicas e moleculares, são desejáveis dados sobre as propriedades físicas para auxiliar na definição correta da posição taxionômica dos vírus, inclusive do próprio PLYV. As propriedades físicas determinadas para o PLYV confirmaram que se trata de um vírus de elevada estabilidade, uma vez que poucas espécies de vírus apresentam PIT entre 75-90 °C, sendo que um grande número de vírus de plantas, o PIT encontra-se entre 50° e 60 °C (CAMARGO, 2006). Os resultados da LIV mostraram que o tempo máximo em que o extrato foliar permaneceu infectivo foi de 50 dias e o PMD evidenciou que o PLYV foi capaz de infetar plantas mesmo em baixas concentrações, revelando sua alta concentração nos tecidos das plantas. O extrato viral até a diluição máxima de 10^{-4} foi capaz de infetar as plantas inoculadas, podendo-se considerar que o PMD do PLYV está entre 10^{-4} a 10^{-5} . A variação no PMD dos vírus de plantas é muito grande, podendo ser de 10^{-1} para alguns vírus e até 10^{-7} para outros (CAMARGO, 2006). As propriedades em seiva encontradas, normalmente, diferem entre os vírus, como para o caso do PRSV com o PIT entre 45 e 50 °C, LIV de 18 h e o PMD de 1:10.000 (KUNKALIKAR *et al.*, 2006). As propriedades físicas das espécies de vírus pertencentes ao gênero *Sobemovirus*, tais como o SBMV, apresentam PIT entre 90 e 95 °C, LIV entre 20-165 dias e o PMD entre 10^{-4} e 10^{-6} (ICTVdB, 2006), revelando uma proximidade taxionômica entre o PLYV e o SBMV. Todos os resultados obtidos com LIV, PIT e PMD foram confirmados por ELISA indireto.

Por não apresentar hospedeira de lesão local, o PLYV foi avaliado quanto a sua capacidade infectiva em mudas de mamoeiro que apresentam sintomas sistêmicos, constituindo o único hospedeiro disponível (LIMA *et al.*, 2001), embora o vírus possa infectar experimentalmente outra espécie do gênero *Carica* (AMARAL *et al.*, 2006). Os resultados discrepantes entre o LIV do PLYV e sua sobrevivência em tecidos secos podem ser esclarecidos em função dos meios aos quais as partículas virais foram submetidas. Enquanto em tecidos secos as partículas virais foram mantidas na forma de ultra-micro cristais protéicos, na seiva, referidas partículas ficaram sujeitas a ação enzimática e microbiana, o que possivelmente, contribui para um LIV menor que o encontrado em folhas secas.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Os baixos índices de amostras foliares de mamoeiro infetadas com o PLYV, demonstraram que o vírus ainda está restrito a determinadas regiões produtoras de mamão do Estado;
2. A elevada sensibilidade da técnica de ELISA indireto para diagnose do PLYV em tecido de mamoeiro, permite que 1,0 ml do anti-soro na diluição de 1:16.000 seja suficiente para testar mais 140.000 plantas;
3. O fato do PLYV permanecer ativo em tecidos mortos de plantas de mamoeiro infetadas, por até 120 dias em condições ambientais, demonstra a importância dos restos de cultura como fonte de vírus, para aumentar sua distribuição nos campos de produção.

Referências

- AMARAL, P. P. R.; RESENDE, R. O.; SOUZA JUNIOR, M. T. Papaya Lethal Yellowing Virus (PLYV) Infects Vasconcellea cauliflora. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 05, p. 517, 2006.
- BESERRA JUNIOR, J. E. A. *et al.* Análise molecular de isolados de Papaya lethal yellowing virus (PLYV) obtidos no Ceará. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. S277, 2009. Suplemento.
- CÂMARA FILHO, F. A. *et al.* Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora, mediante imunização oral de coelhos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 3, p. 344-247, 2005.
- CAMARÇO, R. F. E. A.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. Transmissão e presença em solo do "Papaya lethal yellowing vírus". **Fitopatologia Brasileira**, v. 04, p. 453-458, 1998.
- CAMARGO, M. **Virologia vegetal**. Jaboticabal, SP: Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias. UNESP/FUNEB, 2006. 35 p.

- INSTITUDOBRASILEIRODEGEOGRAFIAEESTATISTICA (IBGE). Produção agrícola municipal. 2008. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 nov. 2008.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TOXONOMY OF VIRUSES (ICTVdB). Southern bean mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*. New York: Büchen-Osmond, C., 2006.
- KITAJIMA, E. W. *et al.* Amarelo letal do mamoeiro solo no estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira*, v.17, p. 282-285, 1992.
- KUNG, Y. *et al.* Generation of transgenic papaya with double resistance to *Papaya ringspot* and *Papaya leaf-dostortion mosaic virus*. *Phytopathology*, v. 99, n. 11, p. 1312-1320, 2009.
- KUNKALIKAR, S.; BYADGI, A. S.; KULKARNI, V. Studies on papaya ring spot virus. *Annals of Agri Bio Research*, v. 11, p. 37-41, 2006.
- LIMA, J. A. A. **Interactions between strains of squash mosaic vírus in pumpkin and cantaloupe plants**. 1972. 36 f. Dissertation (Mestrado em Fitopatologia)- University of Arizona. 1972.
- 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, 1994.
- LIMA, R. C. A. *et al.* Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 689-702, 2001.
- MARCIEL-ZAMBOLIM, E. *et al.* Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, v. 52, n. 03, p. 389-394, 2003.
- RAMOS, N. F. *et al.* A Presença dos vírus da mancha anelar e do amarelo letal em frutos de mamoeiro comercializados. *Tropical plant pathololy*, v. 33, n. 06, p. 449-452, 2008.
- SARAIVA, A. C. M. *et al.* Transmissão por mãos contaminadas e ausência de transmissão embrionária do vírus do amarelo letal do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 79-83, 2006.
- 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: Review and Research*, v. 11, p. 196, 2000.
- SOUZA JUNIOR, M. T.; NÍCKEL, O.; GONSALVES, D. Development of transgenic papayas expressing the coat protein gene from a Brazilian isolate of Papaya ringspot virus (PRSV). *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 360-368, 2005.
- TADAITI, O. Jr. Sequenciamento do genoma do *Southern bean mosaic virus*, isolado São Paulo, expressão da porção C-terminal da polimerase e produção de anti-soro policlonal. 2007. 71 f. – Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
- TAMM, T.; TRUVE, E. Sobemoviruses. *Journal of Virology*, v. 74, n. 14, p. 6231–6241, 2000.
- TAVARES, E. D. *et al.* Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 563-566, 2004.