



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

ANA PAULA DE JESUS SANTANA

**PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE FOLHAS DO MAMOEIRO PARA
DETECÇÃO DOS VÍRUS DA MELEIRA (PMeV E PMeV2) POR DIAGNÓSTICO
MOLECULAR**

VITÓRIA-ES

2024

ANA PAULA DE JESUS SANTANA

**PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE FOLHAS DO MAMOEIRO PARA DETECÇÃO
DOS VÍRUS DA MELEIRA (PMeV E PMeV2) POR DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Prof. Dr. Jose Aires Ventura
Orientador
INCAPER/UFES - PPGBiotec

VITÓRIA-ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S231p Santana, Ana Paula de Jesus, 1990-
Preservação de amostras de folhas do mamoeiro para detecção dos vírus da Meleira (PMeV e PMeV2) por diagnóstico molecular. / Ana Paula de Jesus Santana. - 2024.
46 f.

Orientador: Jose Aires Ventura.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

I. Ventura, Jose Aires. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ativar o Wind
Acesse Configuraç

Ata da 230ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **ANA PAULA DE JESUS SANTANA**, realizada às nove horas do dia vinte e sete de março de dois mil e vinte e quatro. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio do Jitsi Meet (<https://meet.jit.si/pgbiotecniaufes>). O presidente da Banca, Prof. Dr. José Aires Ventura (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Diolina Moura Silva, examinadora interna; Ana Paula Candido Gabriel Berilli, examinadora externa. Em seguida, passou a palavra à aluna que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE FOLHAS DO MAMOEIRO PARA DETECÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DA MELEIRA (PMeV E PMeV2)”**. Terminada a apresentação, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, o presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA** e que a aluna deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final do trabalho. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 27 de março de 2024.

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profª Drª Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro interno

Profª Drª Ana Paula Candido Gabriel Berilli
Instituto Federal do Espírito Santo IFES Campus Alegre – Membro externo



Campus Universitário Maruípe – Av. Maruípe, 1468 – Maruípe, Vitória – ES | 29047-185 |
Tel. e Fax: (27) 3335-9501 | <http://www.biotecnologia.ufes.br> | pgbiotecnia@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
Jose Aires Ventura - MATRÍCULA 99992921
Membro - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Em 27/03/2024 às 13:07

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/902202?tipoArquivo=O>

Ativar o W



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
DIOLINA MOURA SILVA - SIAPE 294671
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 28/03/2024 às 16:23

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/903191?tipoArquivo=O>

Ativar o Wi
Ana Carolina



Documento assinado digitalmente
ANA PAULA CANDIDO GABRIEL BERELLI
Data: 01/04/2024 16:50:29-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

ANA PAULA DE JESUS SANTANA

**PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE FOLHAS DO MAMOEIRO PARA DETECÇÃO
DOS VÍRUS DA MELEIRA (PMeV E PMeV2) POR DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 27 de abril de 2024.

Prof. Dr. Prof. Dr. Jose Aires Ventura
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural-Incaper/
Universidade Federal do Espírito Santo-
UFES
Orientador

Prof Dra Diolina Moura Silva.
Membro interno
Universidade Federal do Espírito Santo-
Ufes

Prof Dra Ana Paula Candido Gabriel Berilli
Membro externo
Instituto Federal do Espírito Santo
IFES

VITÓRIA, ES

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo e as pessoas com quem vivi nesse espaço ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada da comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa concedida.

E, finalmente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Aires Ventura, pelo incentivo prestado e toda a sua dedicação para realização desse trabalho.

SANTANA, A. P. J. **Preservação de amostras de folhas do mamoeiro para detecção dos vírus da meleira (PMeV e PMeV2) por diagnóstico molecular 2024.** 39f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

A doença da meleira do mamoeiro é ocasionada pelo complexo viral papaya meleira virus (PMeV e PMeV2). A estratégia de controle da doença é a identificação das plantas sintomáticas que são retiradas do campo através da técnica de *roguing*. No entanto, frequentemente há a necessidade da confirmação molecular de plantas suspeitas de estarem infectadas. O trabalho foi o primeiro a utilizar a técnica de herborização para avaliar o vírus da meleira, com a herborização, podem viabilizar o transporte das amostras para diagnóstico e auxiliar em estudos de genômica viral em escala temporal. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma metodologia de coleta, preservação e armazenamento de amostras de folhas de mamão infectadas pelo complexo dos vírus da meleira para diagnóstico molecular. Foi determinada a eficiência da herborização e o armazenamento na conservação de amostras de folhas de mamoeiro para diagnóstico. As amostras foram coletadas manualmente, fazendo o corte das folhas jovens, preferencialmente com lesões apicais características dos sintomas da meleira. Um total de 48 amostras foram separadas em dois grupos armazenados de forma diferentes, sendo 24 mantidas em ultrafreezer e 24 herborizadas, que por sua vez foram subdivididas em dois subgrupos com 12 amostras de assintomáticas (UM e HM) e 12 amostras sintomáticas (UA e HA). As análises para o diagnóstico molecular dos vírus PMeV e PMeV2 foram realizadas com intervalos de zero (T0), cinco (T5), dez (T10), vinte (T20) e quarenta (T40) dias, após o armazenamento. Observou-se que em T20 e T40 todas as amostras demonstraram a presença do complexo viral PMeV em ambas as formas de conservação. Entretanto, as análises nos tempos T5 e T10 não obtiveram um padrão uniforme para identificação do vírus possivelmente relacionado à distribuição não uniforme dos vírus nas células das folhas de mamoeiro. Os resultados validaram uma metodologia alternativa para a recomendação de um novo protocolo de preservação e armazenamento de amostras com baixo custo e fácil execução, para o diagnóstico molecular da meleira do mamoeiro.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, herborização, controle viral.

SANTANA, A. P. J. **Preservation of papaya leaf samples for detection of the papaya sticky disease viruses (PMeV E PMeV-2) by molecular diagnosis** 2024.39f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

ABSTRACT

The papaya blight disease is caused by the papaya blight virus complex (PMeV and PMeV2). The strategy for controlling the disease is to identify symptomatic plants that are removed from the field using the roguing technique. However, there is often a need for molecular confirmation of plants suspected of being infected. Improving techniques for maintaining the virus in biological material, such as herborization, can help in time-scale studies of viral genomics. The aim of this study was to evaluate a methodology for collecting, preserving and storing samples of papaya leaves infected by the blight virus complex for molecular diagnosis. The efficiency of herborization and storage in preserving papaya leaf samples for diagnosis was determined. The samples were collected manually by cutting young leaves, preferably with apical lesions characteristic of the symptoms of blight. A total of 48 samples were separated into two differently stored groups, 24 kept in an ultrafreezer and 24 herbarized, which in turn were subdivided into two subgroups with 12 asymptomatic samples (UM and HM) and 12 symptomatic samples (UA and HA). Analyses for the molecular diagnosis of the PMeV and PMeV2 viruses were carried out at intervals of zero (T0), five (T5), ten (T10), twenty (T20) and forty (T40) days after storage. It was observed that at T20 and T40 all the samples showed the presence of the PMeV viral complex in both forms of preservation. However, the analyses at times T5 and T10 did not obtain a uniform pattern for identifying the virus, possibly due to the non-uniform distribution of the viruses in the cells of the papaya leaves. The results validated an alternative methodology for recommending a new low-cost and easy-to-use sample preservation and storage protocol for the molecular diagnosis of papaya blight.

Keywords: molecular diagnosis, herborization, viral control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organização genômica dos vírus da meleira do mamoeiro. PMeV isolado do Espírito Santo (PMeV – ES) e PMeV 2 16
- Figura 2. Folhas jovens de mamoeiro infectado pelo vírus da meleira, com aspecto pegajoso devido à exsudação do látex (A) e necrose no ápice das folhas devido à oxidação do látex (B)..... 18
- Figura 3. Folhas saudias (A); Folhas com início dos sintomas da meleira (B); Folhas com sintomas severos da meleira (C).....25
- Figura 4. Resumo esquemático do processo de herborização, armazenamento e análise de folhas de *Carica papaya*. a) Planta de *C. papaya*; b) Obtenção da folha; c) Disposição do material vegetal em folhas de jornal; d) Prensa realizada com barbantes e papelão; e) armazenamento das amostras em ultrafreezer; f) Análise molecular das amostras nos tempos de 5, 10, 20 e 40 dias; e g) Resultado da análise.27
- Figura 5. Eletroforese dos produtos de PCR do PMeV (650 pb) das amostras do tempo T5 (A), T10 (C), T20 (E) e T40 (G) e PMeV2 (850 pb) do tempo T5 (B), T10 (D), T20 (F) e T40 (H) em triplicata. 1 - Marcador molecular; 2 – negativo cDNA (-cDNA); 3 – negativo PCR (-PCR); 4, 5, 6 – UA; 7, 8, 9 – UM; 10, 11, 12 – HA; 13, 14, 15 – HM; 16 – positivo PCR (+PCR); 17 – negative da extração.....35
- Figura 6. Eletroforese dos produtos de PCR do PMeV (650 pb) e PMeV2 (850 pb) em triplicata das amostras com e sem nervura. SN – Amostra herbário sem nervura; CN – Amostra herbário com nervura. 1 – Marcador molecular; 2 – negativo cDNA (-cDNA); 3 – negative PCR (-PCR); 4, 5, 6 – SN10; 7, 8, 9 – CN10; 10, 11,12 – SN40; 13, 14, 15 – CN40; 16 – positivo PCR (+PCR); 17 – negative da extração.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR na detecção dos vírus PMeV e PMeV2.....	30
Tabela 2. Avaliação da presença do vírus PMeV e PMeV2 em amostras de folhas de Carica papaya herbarizadas em diferentes períodos de armazenamento.	32
Tabela 3. Intensidade da banda decorrente dos produtos de PCR durante o diagnóstico do PMeV e PMeV2 em amostras de folhas de Carica papaya herbarizadas em diferentes períodos de armazenamento.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dsRNA	RNA fita dupla (do inglês Double-stranded RNA)
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)
PMeV	Papaya meleira vírus
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do Inglês RNA dependent RNA polimerase)
ssRNA	RNA fita simples (do inglês Single-stranded RNA)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A CULTURA DO MAMÃO NO BRASIL E NO ESPÍRITO SANTO	14
1.2 VIROSES DO MAMOEIRO	14
1.3 MELEIRA DO MAMOEIRO	15
1.3.1 Etiologia	15
1.3.2 Sintomas	16
1.3.3 Transmissão	18
1.3.4 Impacto econômico	18
1.6 MONITORAMENTO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	19
1.7 HERBORIZAÇÃO DE AMOSTRAS.....	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. COLETA DE MATERIAL	25
3.2. HERBORIZAÇÃO.....	26
3.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS VÍRUS	27
3.3.1 Extração de ácidos nucleicos	28
3.3.2 Tratamento com dnase	28
3.3.3 Transcrição reversa	29
3.3.4 PCR convencional	29
3.3.5 Eletroforese dos fragmentos de PCR	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CULTURA DO MAMÃO NO BRASIL E NO ESPÍRITO SANTO

O agronegócio representa cerca de 25,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (Cepea, 2022), sendo assim, um setor importante para a economia brasileira. Dentre os ramos do agronegócio, a fruticultura representa uma produção de 41 milhões de toneladas, em 2,6 milhões de hectares de plantios, sendo que 81% da produção se enquadra como agricultura familiar (CNA, 2022). Além disso, a fruticultura participa da cesta de exportações com mais de 40 frutas e vendas de US\$ 1,07 bilhão em 2021, sendo que manga, melão, uva, limão, maçã, melancia e mamão correspondem a mais de 80% do faturamento do setor no mercado internacional (CNA, 2022).

A cultura do mamão tem participação significativa na fruticultura nacional e possui grande relevância econômica e social, principalmente na geração de emprego e renda (Galo *et al.*, 2014). O Brasil é o terceiro maior produtor de mamão no mundo, com produção superior a 1 milhão de toneladas, gerando um valor bruto de 433.505.000 dólares (Fao, 2020). O estado do Espírito Santo é um dos principais produtores e exportadores deste fruto. O estado é responsável por praticamente metade da produção de mamão nacional, tendo produzido 439.550 toneladas em 2021 (Galeano *et al.*, 2022).

Entretanto, as plantações de mamoeiro são comprometidas por diversas doenças que reduzem a produção ou até mesmo inviabilizam a cultura comercialmente. Dentre essas doenças, destacam-se as viroses, que causam redução na produção de frutos e podem chegar a matar as plantas (Ventura *et al.*, 2014).

1.2 VIROSES DO MAMOEIRO

No Brasil, as principais doenças que acometem o mamoeiro em campo são as viroses (Ventura *et al.*, 2014). As doenças viróticas causam reduções na produtividade, podendo tornar improdutivos os pomares. Atualmente, existem mais de dez vírus diferentes relatados na cultura do mamão no mundo (Sá Antunes *et al.*, 2020), entretanto, as que ganham maiores destaques são o mosaico ou mancha

anelar (*Papaya ringspot virus-P*), a meleira causada pelo complexo de vírus papaya meleira vírus (PMeV e PMeV2) e o amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*) (Ventura; Costa; Tatagiba, 2014). Dentre estas viroses, destaca-se a meleira do mamoeiro, que é um importante problema fitossanitário do mamoeiro no Brasil, (Abreu *et al.*, 2015a; Ventura; Costa; Tatagiba, 2014), o qual causa severas perdas na produção e gera dispêndio de tempo e recursos financeiros para os produtores rurais. No Espírito Santo, a meleira é apontada como o segundo maior problema fitossanitário do mamoeiro, ficando atrás apenas do mosaico do mamoeiro (Galeano *et al.*, 2022).

1.3 MELEIRA DO MAMOEIRO

1.3.1 Etiologia

A meleira do mamoeiro é causada pelo complexo dos vírus papaya meleira vírus (PMeV e PMeV2). No início, acreditava-se que os sintomas estavam associados a um distúrbio na absorção de nutrientes como o cálcio e o boro, ou associado ao estresse hídrico (Nakagawa; Takayama; Suzukawa, 1987) ou ainda causado por bactérias do gênero *Bartonella* (Akiba, 1989).

No entanto, Rodrigues *et al.* (1989) confirmaram a transmissão da doença pelo látex de plantas doentes, atribuindo uma etiologia biótica para a doença. Posteriormente, Kitajima *et al.* (1993) constaram por microscopia eletrônica de transmissão a presença de partículas isométricas de aproximadamente 42 nm de diâmetro e em análise molecular em gel de agarose, do látex de plantas doentes, a presença de uma banda com aproximadamente 10.000 pares de bases (pb). Também, com cortes ultrafinos dos tecidos, observaram que as partículas isométricas estavam restritas às células dos vasos laticíferos. Posteriormente, com o uso da microscopia eletrônica e análises moleculares foi constatado que as partículas virais estavam fortemente ligadas aos polímeros presentes no látex (Rodrigues *et al.*, 2005). Entretanto, a etiologia viral da doença foi confirmada após a purificação das partículas isométricas e a inoculação das partículas virais em mamoeiros sadios, que apresentaram os sintomas da doença (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003).

A sequência completa de PMeV foi realizada em uma análise *in silico* do genoma composto por uma única molécula de RNA fita dupla (dsRNA), contendo os

domínios conservados característicos de RdRps de membros da família *Fusagraviridae* (Maurastoni *et al.*, 2023). Posteriormente foi demonstrado que a doença é consequência de uma dupla infecção com PMeV, revelando um segundo vírus papaya meleira virus 2 (PMeV2), relacionado com membros do gênero *Umbravirus* e que possui um genoma de RNA fita simples (ssRNA) de aproximadamente 4,5 kb (Antunes *et al.*, 2016). A organização do genoma viral pode ser observado na Figura 1.

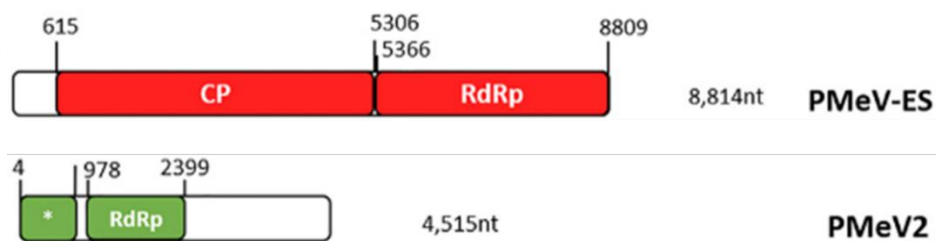


Figura 1. Organização genômica dos vírus da meleira do mamoeiro. PMeV isolado do Espírito Santo (PMeV – ES) e PMeV 2. (Fonte: Adaptado de Antunes *et al.*, 2020).

Papaya meleira virus possui dois quadros de leitura aberta (ORFs, do inglês open reading frames) (PMeV – ES, Figura 1). A ORF1 codifica as proteínas estruturais e que compõem o capsídeo do vírus, enquanto que a ORF2 traduz para uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Antunes *et al.*, 2016). Antunes *et al.* (2016) classificaram PMeV como um toti-like virus, enquanto que Maurastoni *et al.* (2023) como fusagra-like virus. A semelhança do genoma viral com os da família *Fusagraviridae* está relacionado a regiões conservadas da RdRp, para tal existe uma relação filogenética com os vírus da família *Totiviridae*, os quais pertencem a mesma ordem dos *Ghabrivirales* (Maurastoni *et al.*, 2023). O PMeV é um vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) de 8,7 kbp (*Fusagraviridae*) que interage em uma co-infecção com PMeV2, um RNA de fita simples de 4,5 kbps (ssRNA) (vírus tipo umbra-like) (Antunes *et al.*, 2016; Maurastoni *et al.*, 2023). PMeV2 possui um sítio de decodificação proteica de RdRp, porém sem uma região de produção de proteínas estruturais para formação de um capsídeo. Desse modo, necessitando de um vírus auxiliar para encapsidação do seu material genético (Maurastoni *et al.*, 2023).

Além do Brasil, a doença já foi relatada em países como México, Equador e Austrália. No Brasil a doença pode ser encontrada nos principais estados produtores

de mamão na região Sudeste (Espírito Santo e Minas Gerais) e Nordeste (Bahia, Pernambuco e Ceará) (Antunes *et al.* 2020). O isolado equatoriano foi nomeado de papaya virus Q (PpVQ), sendo um vírus similar aos do gênero Umbravirus. O Equador detectou o vírus auxiliar, classificando como um toti-like virus que foi nomeado de papaya stick fruit-associated virus (PSFaV), sendo diferente do PMeV brasileiro (Quito-Avila *et al.*, 2023). O México identificou PMeV-Mx (papaya meleira virus – isolado mexicano) como um vírus similar ao PMeV2 (Perez-Brito *et al.*, 2012). Por fim, Campbell (2018) relatou a presença de plantas de mamoeiro infectadas com o vírus da meleira. Entretanto, México e Austrália ainda não relataram qual o vírus auxiliar responsável por transcapsidar os materiais genéticos virais.

Um fator intrigante sobre o vírus da meleira do mamoeiro é que são encontrados em altas concentrações em nos laticíferos, mas também podem ser identificados em outros tecidos (Mérchan-Gaitán *et al.*, 2024). Em plantas produtoras de látex, os laticíferos se estendem por todo seu tecido vegetal e podem ser diferenciados em articulados e não articulados (Hagel *et al.*, 2008). As plantas de *Carica papaya* possuem células laticíferas não articuladas, garantindo que permaneçam unidas entre si (Mérchan-Gaitán *et al.*, 2024; Hagel *et al.*, 2008), e talvez seja um fator predominante para uma maior concentração viral.

1.3.2 Sintomas

A doença é caracterizada por uma exsudação espontânea de látex nos frutos e pontas das folhas jovens, em que o látex se oxida com a exposição atmosférica, dando uma aparência pegajosa do fruto devido ao seu escorrimento e formando pequenas lesões necróticas nas bordas das folhas jovens encontradas no ápice das plantas (Figura 2) (Tavares *et al.*, 2004; Ventura; Costa; Tatagiba, 2014; Maurastoni *et al.*, 2023).

As plantas com a presença do vírus da meleira produzem frutos impróprios para consumo. A exsudação fluída e espontânea do látex em frutas de *Carica papaya* afetam o seu controle de qualidade reduzindo o teor de açúcares (°BRIX), decorrente da maior aquosidade no tecido vegetal, aparição de manchas sazonais, necrose nas regiões em que o látex entra em contato e em caso mais graves da doença a presença de látex no interior do fruto (Maurastoni *et al.*, 2023).

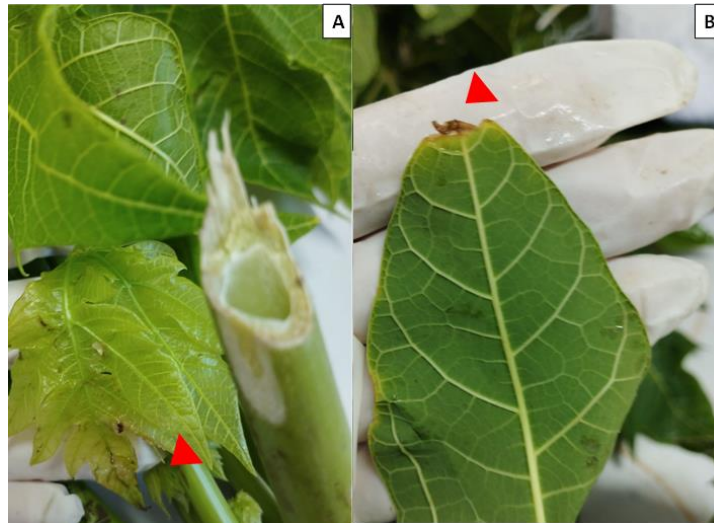


Figura 2. Folhas jovens de mamoeiro infectado pelo vírus da meleira, com aspecto pegajoso devido à exsudação do látex (A) e necrose no ápice das folhas devido à oxidação do látex (B).

Inicialmente, os sintomas da meleira foram atribuídos a uma deficiência de cálcio ou boro (Nakagawa; Takayama; Suzukawa, 1987), mas, posteriormente com estudos de monitoramento da dispersão da doença em pomares comerciais, se confirmou o envolvimento de um patógeno associado à doença (Rodrigues; Ventura; Mafia, 1989) e confirmada a associação com um vírus (Kitajima *et al.*, 1993).

1.3.3 Transmissão

O vírus da meleira do mamoeiro encontra-se em alta concentração no látex da planta (Kitajima *et al.*, 1993). Em pesquisas de epidemiologia da doença no campo notou-se uma distribuição agregada das plantas infectadas pelo PMeV ao longo das linhas de plantio, o que sugere que a transmissão do vírus ocorra durante os tratos culturais, através de ferimentos nas plantas com a inoculação de látex infectado (Ventura *et al.*, 2003). Além de estudos sobre transmissão, também sugeriram que pode ocorrer por insetos vetores, como a cigarrinha (García-Cámara *et al.*, 2019).

1.3.4 Epidemiologia da doença

O vírus da meleira do mamoeiro causa severas perdas nos cultivos de mamão no Brasil. No estado do Espírito Santo, a meleira do mamoeiro foi notificada

oficialmente pela primeira vez em 1989, após a confirmação do agente causal desta doença (Rodrigues; Ventura; Mafia, 1989; Rodrigues; Ventura; Marin, 1989).

Os meses de janeiro e fevereiro costumam ser de maior ocorrência da meleira no Espírito, podendo causar prejuízos com mais de 50% de perda (Galeano *et al.*, 2022). Entretanto, os danos podem ser maiores caso não seja realizada a erradicação das plantas doentes, que geralmente servem de fonte de inóculo nos pomares (Ventura *et al.*, 2003). Ainda não foram identificados genótipos de mamão resistentes ao vírus da meleira (Abreu *et al.*, 2015a). Além disso, não há métodos de controle curativo para o vírus, sendo recomendada a eliminação de plantas infectadas (*roguing*), uma vez que uma única planta doente é capaz de ser fonte de inóculo para toda a lavoura (Santos Filho; Oliveira; Haddad, 2016).

Algumas medidas podem ser adotadas para reduzir a disseminação da doença, tais como: realizar inspeções semanais nos pomares e eliminar plantas doentes; não coletar sementes de plantas doentes; desinfetar todo o material utilizado no desbaste e colheita dos frutos; eliminar todos os pomares ao final do ciclo econômico de produção, para eliminar as fontes de inóculo (Ventura; Costa; Tatagiba, 2014). Diante da agressividade da doença, associada a falta de métodos curativos para ela, é indispensável o monitoramento constante para garantir o diagnóstico eficaz e precoce do vírus.

1.6 MONITORAMENTO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

Para garantir um controle eficiente e evitar perdas econômicas por problemas fitossanitários, é importante o diagnóstico correto do agente causal, em tempo hábil para ocorrer intervenções. Específico para a meleira, o diagnóstico precoce e correto é importante para a redução das fontes de inóculo, pois ainda não existem variedades resistente à doença. Atualmente, há métodos moleculares para a identificação dos vírus, com base na extração de ácidos nucleicos do látex de mamão infectado e na visualização do dsRNA em gel de agarose a 1% (p/v). Apesar de serem métodos rápidos e com custo baixo, requer uma grande quantidade de látex (entre 350 e 500 μ L) (Tavares *et al.*, 2004), e uma alta concentração do vírus, inviabilizando a detecção nos estágios iniciais da infecção ou quando apenas uma pequena quantidade do material vegetal está disponível (Abreu *et al.*, 2015a).

A metodologia usual para a identificação do vírus da meleira do mamoeiro é através da técnica RT-PCR em tecidos do mamoeiro (Abreu *et al.*, 2012). Para tanto, o material vegetal coletado deve ser imediatamente armazenado em N₂ e congelado em ultrafreezer até o processamento das amostras (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). Essa necessidade do armazenamento imediato em nitrogênio líquido (N₂) dificulta o monitoramento da doença e o transporte de amostras de uma região para outra, bem como o envio para os laboratórios, uma vez que é preciso levar recipientes com N₂ para o campo e manter as amostras congeladas. Entretanto, a severidade da doença faz necessário o monitoramento constante dos cultivos de mamoeiro, aumentando a importância do desenvolvimento de técnicas alternativas para armazenamento do material vegetal. Uma alternativa seria a utilização da técnica de herborização, muito utilizada para armazenar material vegetal. Nesta técnica, partes de plantas (ou até mesmo a planta inteira) são coletadas, prensadas para dessecação e preservadas (Lang *et al.*, 2019).

Além do RT-PCR, existem outras técnicas de detecção viral do complexo PMeV, como multiplex RT-PCR (mPCR) e qPCR (Abreu *et al.*, 2011; Maurastoni *et al.*, 2020). O mPCR é capaz de detectar a presença dos dois vírus em um único ensaio de diagnóstico amplificando regiões correspondentes aos vírus PMeV e PMeV2 e sob a prescrição de um limite de detecção, sendo uma ferramenta útil no controle da doença em campo (Maurastoni *et al.*, 2020). Enquanto que, qPCR pode realizar a quantificação do acúmulo viral em plantas que demonstrem sintomas virais ou que estejam assintomáticas (Antunes *et al.*, 2016).

Podemos observar que a detecção viral do PMeV e PMeV2 pode ser aplicada com o diagnóstico molecular. Isto se tornou possível através da utilização de técnicas de sequenciamento para identificação de regiões conservadas e montagem do genoma do vírus (Antunes *et al.*, 2016). Segundo Martson *et al.* (2013) a construção de oligonucleotídeos específicos podem auxiliar na construção de bibliotecas genômicas e que podem ser utilizados posteriormente como *primers* no diagnóstico viral por PCR.

1.7 HERBORIZAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DIGNÓSTICO

O processo de herborização consiste na coleta e preservação de material vegetal para seca-los de forma que conserve seus órgãos em estudos com fins botânicos (Machado, sd). A preservação de amostras a curto ou longo prazo segue regras estabelecidas pelos laboratórios de análises, as condições de acondicionamento se tornam cruciais para as amostras que serviram para análise de vírus que infectam plantas. As amostras de plantas infectadas podem ser preservadas em diferentes condições de armazenamento levando em consideração a temperatura (geladeiras, freezers, ultra-freezers e freezers criogênicos). O material quando adequadamente herborizado possui informações sobre a espécie, local e data de coleta, o responsável pela coleta, e são depositados em herbários (coleção de material vegetal) para fornecer espécimes comprovantes em suportes de nomenclatura válida (Hartung *et al.*, 2015).

Na herborização, o material vegetal é preservado através da dessecação por prensagem. Para tanto, coletam-se partes da planta (ou a planta inteira, se for pequena) e as dispõe em prensas constituídas de folhas de papelão, intercalado com folhas de jornal e amarrado com barbante grosso, cordões ou cintas (Figura 4). Alternativamente, o material vegetal pode ser armazenado em sacos plásticos no campo e a prensagem ser feita no laboratório (Fidalgo; Bononi, 1989; Lang *et al.*, 2019; Rotta; Carvalho; Beltrami, 2008). Com esta técnica, vários espécimes são preservados em museus, constituindo uma fonte rica da diversidade da flora do mundo. Além disso, com os avanços tecnológicos, agora é possível sequenciar genomas históricos para fornecer uma melhor compreensão da emergência de doenças virais de plantas e da história evolutiva de patógenos. Nesse contexto, os espécimes de herbário representam uma valiosa fonte de material datado e preservado (Rieux *et al.*, 2021).

Foram encontrados cerca de 12 trabalhos sobre investigação de vírus em material herborizado. Nestes estudos, os autores investigaram a presença de vírus em plantas depositadas em herbários, a fim de estudar o histórico do vírus em determinadas regiões no mundo (Hartung *et al.*, 2015; Knierim; Tsai; Kenyon, 2013; Malmstrom *et al.*, 2007; Melzer *et al.*, 2013; Rieux *et al.*, 2021). No entanto, esses

trabalhos mostraram a possibilidade dos vírus ficarem preservados no material vegetal herborizado.

Para investigar a evolução de vírus em plantas de tabaco na Austrália, Fraile *et al.* (1997) utilizaram espécimes de *Nicotiana glauca*, armazenados entre 1899 e 1972, pertencentes a um herbário australiano. Neste estudo foi identificado o vírus do mosaico (TMV) e o vírus do mosaico verde (TMGVM) nas amostras. Malmstrom *et al.* (2007) estudando se os vírus do nanismo-amarelo-da-cevada (BYDVs e CYDVs) ancestrais e atuais compartilham alguma semelhança funcional, encontraram sequências parciais do vírus BYDV (cepas PAV e MAV) e CYDV (cepa RPV) em espécimes gramíneas de herbário, obtidas de pastagens da Califórnia em 1917.

Um trabalho com objetivo de investigar a preservação do RNA em material vegetal, obteve duas sequências do vírus do mosaico latente do pessegueiro (PLMVd) em espécimes coletadas em 1956, pertencentes a um herbário da Nova Zelândia (Guy, 2013). Bieker *et al.* (2020) analisaram o perfil metagenômico de espécimes de *Ambrosia artemisiifolia* e *Arabidopsis thaliana*, coletadas até 180 anos atrás. Neste trabalho, os autores conseguiram identificar o vírus *Rudbeckia flower distortion virus* (RuFDV) nas amostras de *A. artemisiifolia*. O vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) foi detectado em líquens *Usnea* spp., pela primeira, vez em material herborizado desde 1952 no Herbário de líquens do Museu da Silésia, na República Tcheca (Petrzik *et al.*, 2016).

Hartung *et al.* (2015) investigaram a história e a diversidade dos vírus da leprose dos citros, o *Citrus leprosis virus nuclear type* (CiLV-N) e o *Citrus leprosis virus cytoplasmic type* (CiLV-N). Para tanto, os autores utilizaram espécimes de citros com sintomas da doença, herborizadas há mais de 50 anos, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - Serviço de Pesquisa Agrícola. Neste trabalho foram obtidas sequência genômica quase completas dos dois vírus nos espécimes analisadas. A fim de analisar as espécies de vírus do gênero *Potterovirus* que infectam plantas de pimenta (*Capsicum* spp.), um trabalho identificou o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus*, PLRV) em espécimes de um herbário australiano armazenados desde 1990 (Knierim; Tsai; Kenyon, 2013).

No estado do Havaí - Estados Unidos da América, foi realizado um trabalho com espécimes de coqueiro-de-vênus (*Cordyline fruticosa*) armazenados desde 2003 no *Bishop Museum* (Museu do Bispo). O objetivo do trabalho foi avaliar a distribuição

e variações do vírus *Cordyline ringspot virus* (CoV-1, CoV-2, CoV-3 e CoV-4) em diferentes países, e os autores isolaram CoV-3 e CoV-4 das espécimes herborizadas (Melzer *et al.*, 2013). Rieux *et al.* (2021) fizeram a reconstrução da história evolutiva do vírus africano do mosaico da mandioca (ACMV), utilizando espécimes de *Manihot glaziovii* herborizados desde 1928, pertencentes ao Herbário Nacional do *Muséum National d'Histoire Naturelle* (Museu Nacional de História Natural) em Paris. Os autores conseguiram identificar o vírus nos espécimes, os quais estavam herborizadas há mais de 90 anos.

Para estudar o histórico do vírus *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV), causador da doença da mancha vermelha da videira, Rwahnih *et al.* (2015) utilizaram espécimes preservadas no *Center for Plant Diversity/Herbarium* (Centro de Diversidade Vegetal/Herbário), da Universidade da Califórnia, em Davis. Foram 56 espécimes de videira (23 de *Vitis vinifera* e 33 de híbridos americanos) coletados entre 1937 e 1950. Neste trabalho, os autores conseguiram a sequência completa do genoma do vírus, o qual compartilhou 92 a 99% de identidade com outros isolados de GRBaV atuais. No Brasil, um trabalho foi realizado para entender os processos genéticos e evolutivos do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) (Chabi-Jesus *et al.*, 2021). Os autores conseguiram genomas virais completos ou quase completos em espécimes de *Citrus* spp. armazenadas no Herbário do Instituto Biológico, em São Paulo, coletadas de 1932 a 1975 no Brasil, na Argentina e no Paraguai.

Há também um trabalho que prova a preservação de vírus em grãos de cevada. O RNA do vírus do mosaico da listra falsa da cevada (*Barley Stripe Mosaic virus* - BSMV) foi extraído de grãos de cevada arqueológicos, coletados de *Qasr Ibrim*, uma ilha/fortaleza na Alta Núbia (sul do Egito). Os grãos de cevada exibindo infecção por BSMV utilizados neste trabalho datavam 600 a 900 anos antes do início das avaliações do trabalho (Smith *et al.*, 2014).

Os resultados apresentados acima evidenciam a possibilidade de utilizar a técnica de herborização das amostras de folhas de plantas de *Carica papaya* infectadas no campo, facilitando a coleta e transporte dessas amostras para os laboratórios, para serem utilizadas no diagnóstico da doença, evitando as perdas e a necessidade do uso de N₂ ou outros processos de preservação da integridade dos vírus da meleira do mamoeiro para estudos epidemiológicos da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da herborização na preservação e armazenamento de amostras de folhas de mamoeiro para a identificação molecular do complexo viral PMeV (PMeV e PMeV2).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Herborizar folhas de plantas de mamoeiro infectadas com PMeV e PMeV2;
- Identificar a presença do complexo PMeV e PMeV2 em amostras de folhas herborizadas;
- Estabelecer um protocolo para a herborização de baixo custo e fácil execução para o diagnóstico da meleira do mamoeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Para realização da coleta das amostras, fez-se necessário a utilização de bisturi, pares de luvas individualizadas e sacos plásticos para cada planta. A utilização de equipamentos de proteção individual garante a não contaminação entre amostras e o meio ambiente de realização da coleta.

Foram coletadas manualmente folhas de mamoeiro assintomáticas e com sintomas severos de infecção pelos vírus da meleira do mamoeiro, fazendo o corte das folhas jovens, preferencialmente com lesões necróticas apicais características dos sintomas da meleira. A coleta das amostras foi realizada em plantas da cultivar THB no dia 28/06/2022, no sítio São Roque, localizado no Córrego da Onça, Linhares - ES (GPS 385128/787392/N). As amostras foram identificadas e mantidas individualmente em sacos plásticos para evitar o ressecamento e contaminações (Figura 3). Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES em recipientes hermeticamente fechados.

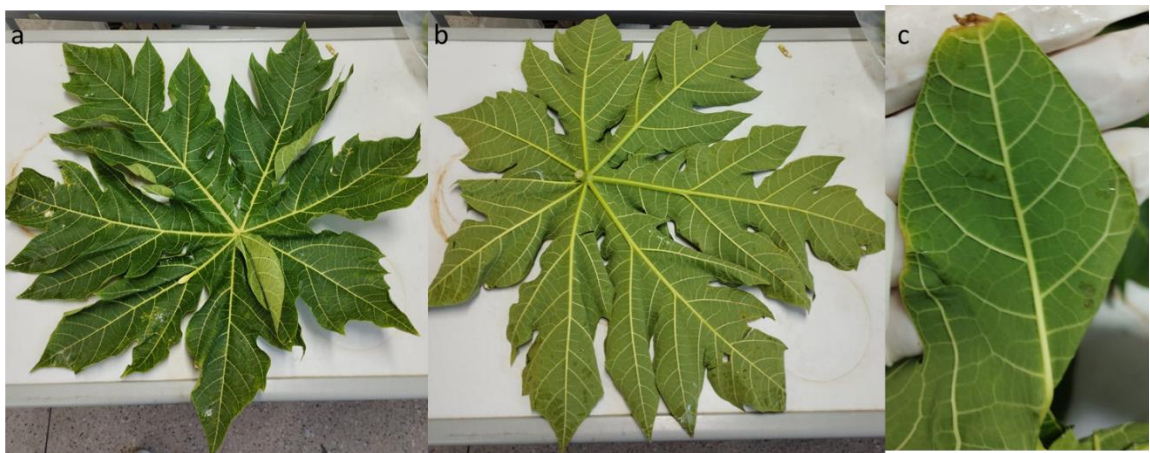


Figura 3. Folhas sadias (A); Folhas com início dos sintomas da meleira (B); Folhas com sintomas severos da meleira (C).

Foram coletadas 48 amostras totais para compor dois grupos, armazenados de forma diferentes, sendo 24 mantidas em ultrafreezer (- 80°C) (Glacier - 86 °C,

Ultralow Temperature Freezer), e 24 herbarizadas, que por sua vez foram subdivididas em dois subgrupos com 12 amostras de assintomáticas (UA – amostra assintomática no ultra freezer e HA – assintomática herborizada) e 12 amostras sintomáticas (UM – amostra sintomática no ultrafreezer e HM – amostra sintomática herborizada). As análises para o diagnóstico molecular dos vírus PMeV e PMeV2 foram realizadas com intervalos de zero (T0), cinco (T5), dez (T10), vinte (T20) e quarenta (T40) dias, após o armazenamento, com três repetições.

3.2 HERBORIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO

O processo de herborização foi realizado no laboratório, em até 24 horas após a coleta no campo, dispondo o material vegetal sob folhas de jornal. Em seguida, o material foi colocado aberto em folha jornal, sobrepostos na prensa de papelão, prensado com barbante (Figura 4) e deixado em local arejado para secagem (25 ± 2 °C) por um período de 40 dias (Peixoto; Maia, 2013). O protocolo estabelecido se encontra em ANEXO neste documento.

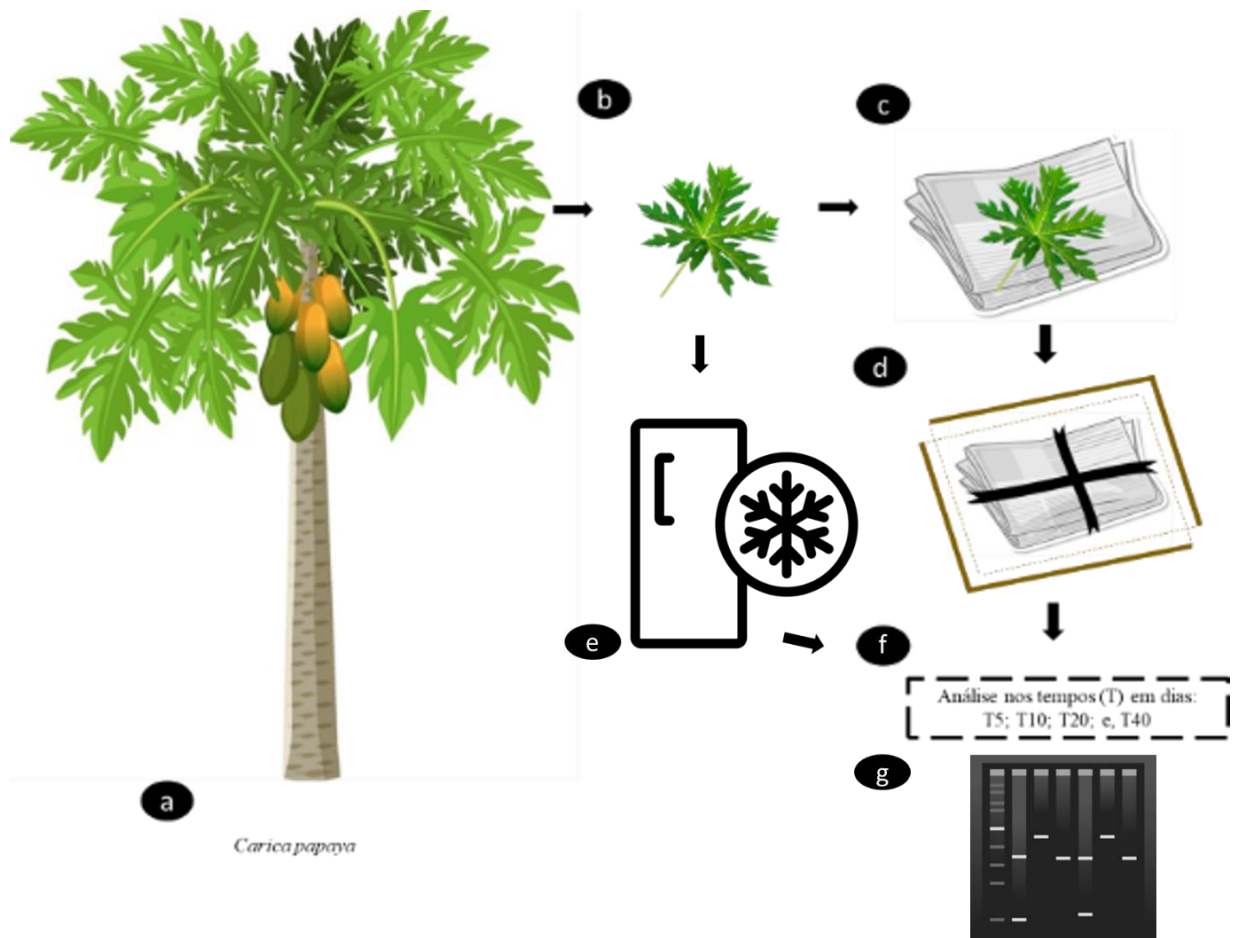


Figura 4. Resumo esquemático do processo de herborização, armazenamento e análise de folhas de *Carica papaya*. a) Planta de *C. papaya*; b) Obtenção da folha; c) Disposição do material vegetal em folhas de jornal; d) Prensa realizada com barbantes e papelão; e) armazenamento das amostras em ultrafreezer; f) Análise molecular das amostras nos tempos de 5, 10, 20 e 40 dias; e g) Resultado da análise.

3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS VÍRUS

Para o diagnóstico molecular dos vírus foram utilizadas seis amostras armazenadas no ultrafreezer (três assintomáticas e três sintomáticas) e seis amostras herborizadas (igualmente três assintomáticas e três sintomáticas). Para cada extração foi utilizado um controle positivo, que consistiu em uma amostra de látex de mamoeiro sintomático para meleira, e um controle negativo, que consistiu em água ultrapura.

3.3.1 Extração de ácidos nucleicos

As amostras passaram pelo processo de extração, segundo as diretrizes de Antunes *et al.*, (2016) e protocolo estabelecido pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio. Para obtenção do RNA total foi utilizado Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e 100 mg de folha de cada amostra em eppendorf de 2 mL. Após a pesagem, foi adicionado em cada tubo com a amostra de folha 300 µL de trizol, em seguida as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido e as folhas foram maceradas com o auxílio de um pistilo. Após a maceração, foram adicionados 700 µL de triazol.

Em seguida as amostras foram agitadas no vortex durante 10 segundos e mantidas por 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio nas amostras e novamente agitadas no vortex por 1 min. Finalizada esta etapa, as amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e então centrifugadas por 10 s, 12.000 g à 4 °C por 15 minutos (centrifuge 5418R. – eppendorf). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo eppendorf (2 mL), e adicionou-se 400 µL de isopropanol. Estes tubos foram agitados manualmente por inversão durante 2 minutos e mantidos em temperatura ambiente por 8 minutos. Após a inversão, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.

O sobrenadante das amostras foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75% a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 7.500 g durante 5 min a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* na câmara de fluxo laminar. Utilizou-se 20 µL de água ultrapura para ressuspensão. O RNA isolado foi quantificado (ng/ µL) utilizando nanodrop e posteriormente estocado em ultra freezer a -80 °C.

3.3.2 Tratamento com DNase

Foi utilizado um µg de RNA extraído na etapa anterior e homogeneizado com DNase (RNase – Free DNase Promega) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Adicionou-se 1 µL de tampão para DNase e 1 µL da enzima, completando o volume para 8 µL com água ultrapura. Posteriormente, a reação foi incubada por 30

minutos a 37 °C e adicionado 1 µL de EDTA 20 mM. Em seguida, a reação foi novamente incubada por 10 minutos a 75 °C (Antunes *et al.*, 2016).

3.3.3 Transcrição reversa

Após o tratamento do RNA com DNase, 0,5 µg do primer hexâmero randômico foi adicionado e incubados por 3 minutos a 96°C. Após, foi adicionado 4 µL do tampão de enzima M-MLV, 1,25 µL de dNTP 25 mM, e 1 µl da enzima M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl) (Promega), completando um volume final de 25 µl. Ao final, a amostra foi incubada a 37 °C por 60 min para a síntese do cDNA e 70 °C por 10 min para a desativação da enzima (Antunes *et al.*, 2016).

3.3.4 PCR convencional

Para o PCR convencional foram utilizados os cDNAs da transcrição reversa para posterior avaliação dos seus produtos. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos, de acordo com Antunes *et al.* (2016) apresentados na Tabela 1 para o PMeV e PMeV2. Em dois microtubos tipo eppendorf, foi preparado uma solução mix para cada vírus correspondente ao seu nucleotídeo iniciador, contendo 4 µL de tampão 10X para a enzima, 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 0,2 µL de dNTPs 25 mM; 1,25 µl do oligonucleotídeo iniciador (125 ng/µl), 1 µL de cDNA, 0,1 µl de enzima (5 U/µl) e água ultrapura livre de RNase completando-se 10 µL na solução final. A solução mix correspondente a cada um dos vírus (PMeV e PMeV2) foi submetida a uma temperatura preliminar de 94° C por 3 minutos e posteriormente 32 ciclos de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos (Araújo *et al.*, 2007; Antunes *et al.*, 2016), no termociclador (Mastercycler gradiente, 5331YN356755).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR na detecção dos vírus PMeV e PMeV2

Nome do iniciador	Sequência do primer ¹	T _m
Primer PMeV	F: 5' CTCTGTGGGAAGCAACGATTA 3' R: 5' GTAGGAAACTCGGTCTGCCATAG 3'	59,4 °C 62,1 °C
Primer PMeV2	F: 5' CGCCAAGTGGGATAAGTTTAGA 3' R: 5' CGATTTGAGCACAAAGGGTTAATG 3'	60 °C

¹Antunes *et al.* (2016)

3.3.5 Análise dos produtos de PCR por Eletroforese em Gel de Agarose

Após a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), em solução tampão TAE (Tris-base 0,1 M; ácido acético glacial 1 M e EDTA 0,5 M, pH 8,0) e corado com 10 µL de brometo de etídio (10 ng/mL), durante 90 minutos em uma voltagem de 80 mV. Para verificar o peso molecular, foi feito por comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen Carlsbad, USA). Foram aplicadas 10 µL de cada amostra por poço e 2 µL do tampão Blue/Orange (Promega). As imagens dos géis foram digitalizadas e fotografadas no sistema ultravioleta digital de captura de imagens L-PIX (Loccus Biotecnologia® Molecular Imaging) para obtenção dos dados. O diagnóstico molecular foi considerado positivo quando houve a amplificação em pares de base (pb) na região correspondente ao fragmento viral quando comparado junto ao marcador molecular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras herborizadas e armazenadas em ultrafreezer foram submetidas à análise molecular para determinar a presença dos vírus PMeV e PMeV2. Os vírus foram detectados nas amostras de folhas infectadas, nos dois processos de armazenamento e em todos os seus tempos. Nas amostras assintomáticas armazenadas no ultrafreezer (UA), duas repetições apresentaram amplificação para o vírus PMeV, mas não amplificaram para o PMeV2, tanto no tempo T5, quanto no T10 (Tabelas 2 e 3, Figura 5). Já nos tempos T20 e T40, todas as repetições UA amplificaram para PMeV (Tabelas 2 e 3, Figura 5). No diagnóstico de PMeV2, as amostras em UA também amplificaram, no tempo T20 (Tabela 2, Figura 5), e duas repetições com bandas de intensidade moderada e uma com intensidade leve, no tempo T40 (Tabelas 2 e 3, Figura 5). A variação da detecção dos vírus entre as repetições de uma mesma amostra possivelmente está associada à distribuição dos vírus nos tecidos da folha.

Os resultados mostraram que ocorreu uma variação dentro das repetições de uma mesma amostra. Esta variação da detecção dos vírus entre as repetições de uma mesma amostra possivelmente está associada à distribuição dos vírus nos tecidos da folha, ou aos períodos de incubação do vírus nas plantas no campo, bem como no processo da seleção das folhas no laboratório para extração do RNA dos vírus. É comum em algumas culturas a padronização da folha a ser coletada para amostragem de pragas e doenças (Vieira Júnior; Fernandes, 2009; Souza *et al.*, 1998). Na cultura café, por exemplo, a recomendação é coletar o terceiro e o quarto par de folhas, no terço inferior da planta, para amostragem representativa de ferrugem (Vieira Júnior; Fernandes, 2009; Ventura *et al.*, 2019). Com os resultados do presente trabalho fica evidente a necessidade de padronização na coleta das folhas e sua posição na planta e a coleta dos tecidos do limbo para as extrações do RNA dos vírus. Possivelmente, a presença do vírus nos tecidos variou com a idade de folha e também na distribuição dentro das células na mesma, justificando a diferença da amplificação dos vírus PMeV e PMeV2 em algumas das repetições da mesma amostra. Trabalhos futuros poderão ser realizados para estipular a padronização da coleta de amostras para diagnóstico, validando a hipótese da necessidade de padronização ou pela inativação natural do vírus.

Tabela 2. Avaliação da presença do vírus PMeV e PMeV2 em amostras de folhas de Carica papaya herbarizadas em diferentes períodos de armazenamento.

Amostras	Período de Armazenamento							
	T5		T10		T20		T40	
	PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2
UA	2/3	0/3	2/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
UM	3/3	1/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
HA	1/3	0/3	1/3	1/3	2/3	1/3	3/3	3/3
HM	2/3	1/3	2/3	0/3	3/3	1/3	3/3	3/3
C+	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
C-	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
S/N			0/3	0/3			2/3	0/3
C/N			0/3	0/3			1/3	0/3
C+			1/1	1/1			1/1	1/1
C-			0/1	0/1			0/1	0/1

Sequência de 3 amostras relacionadas ao teste positivo para PMeV e PMeV2. UA= Amostra assintomática no ultrafreezer; UM= Amostra sintomática no ultrafreezer; HA= Amostra assintomática herborizada; HM= Amostra sintomática herborizada; Cont+= Controle positivo; Cont-= Controle negativo; S/N= Amostra herbário sem nervura; C/M= Amostra herbário com nervura; Cont+= Controle positivo; Cont-= Controle negativo. T10= Tempo 10; T40= Tempo 40

Tabela 3. Intensidade da banda decorrente dos produtos de PCR durante o diagnóstico do PMeV e PMeV2 em amostras de folhas de *Carica papaya* herbarizadas em diferentes períodos de armazenamento.

Amostras	Repetição	Período de Armazenamento							
		T5		T10		T20		T40	
		PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2	PMeV	PMeV2
UA	1	++	-	++	-	++	+	++	+
	2	++	-	++	-	++	++	++	++
	3	-	-	-	-	++	+	++	++
UM	1	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++
	2	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
HA	1	-	-	-	-	-	-	++	+
	2	+	-	-	-	+	-	++	+
	3	-	-	-	+	++	+	+	+
HM	1	+	-	-	-	++	-	++	+
	2	+	+++	+++	-	++	-	++	++
	3	-	-	-	-	++	+	++	++
	C+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	C-	-	-	-	-	-	-	-	-
S/N	1			-	-			+	-
	2			-	-			-	-
	3			-	-			+	-
C/N	1			-	-			++	-
	2			-	-			-	-
	3			-	-			-	-
	C+			+++	++			+++	++

C-

-

-

-

-

UA= Amostra assintomática no ultrafreezer; UM= Amostra sintomática no ultrafreezer; HA= Amostra assintomática herborizada; HM= Amostra sintomática herborizada; Cont+= Controle positivo; Cont-= Controle negativo; S/N= Amostra herbário sem nervura; C/M= Amostra herbário com nervura; Cont+= Controle positivo; Cont-= Controle negativo. T10= Tempo 10; T40= Tempo 40; + banda leve; ++ banda intermediária; +++ banda forte.

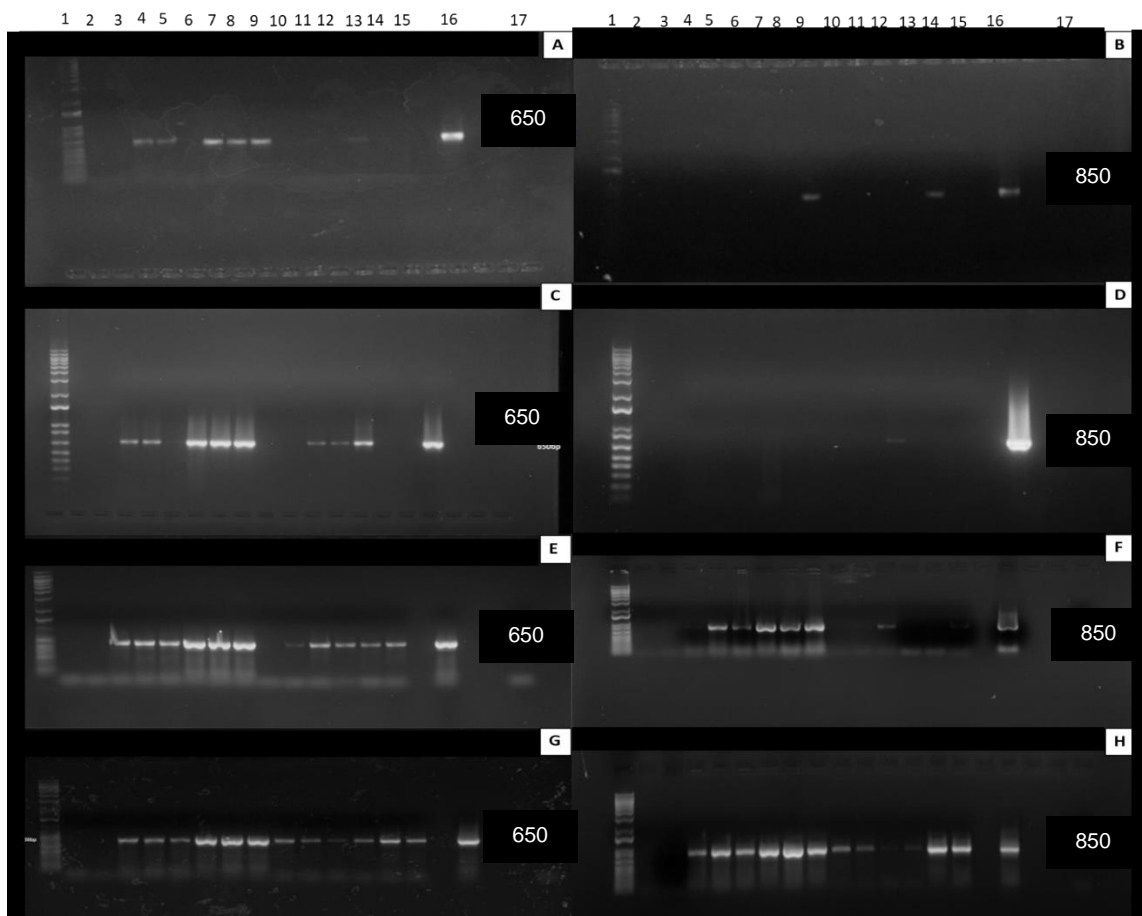


Figura 5. Eletroforese dos produtos de PCR do PMeV (650 pb) das amostras do tempo T5 (A), T10 (C), T20 (E) e T40 (G) e PMeV2 (850 pb) do tempo T5 (B), T10 (D), T20 (F) e T40 (H) em triplicata. 1 - Marcador molecular; 2 – negativo cDNA (-cDNA); 3 – negativo PCR (-PCR); 4, 5, 6 – UA; 7, 8, 9 – UM; 10, 11, 12 – HA; 13, 14, 15 – HM; 16 – positivo PCR (+PCR); 17 – negative da extração.

As amostras (armazenadas em ultrafreezer e sintomáticas para meleira (UM), amplificaram as três repetições, com banda forte para PMeV nos tempos T5 e T10 (Tabela 2, Figura 5), mas somente a repetição três do T5 amplificou para PMeV2 (Tabela 2, Figura 5). As demais não amplificaram PMeV2, tanto em T5, quanto em T10 (Tabela 2, Figura 5). Contudo, todas as repetições amplificaram os vírus PMeV e PMeV2 nos tempos T20 e T40 (Tabela 2, Figura 5).

Além do mais, o fato dos maiores tempos de armazenamentos (T20 e T40) mostrarem a presença dos vírus de forma mais acentuada nas três repetições, corroboram com a explicação levantada no parágrafo acima. Possivelmente, a falta de padronização da idade e posição das folhas nas plantas, na coleta de campo, bem como a variação dos tecidos do limbo foliar

(com ou sem nervuras, onde existe maior quantidade de vasos laticíferos), podem ter contribuído para essa variação na detecção. Diante disso, trabalhos futuros que busquem a padronização da coleta podem eliminar essas variações e trazer maior robustez aos resultados encontrados neste trabalho.

Para as amostras herborizadas, de plantas consideradas assintomático para meleira (HA), somente uma repetição amplificou P_{MeV} no tempo T5 (Tabela 2, Figura 5). As demais não amplificaram nenhum dos dois vírus no tempo T5 (Tabela 2, Figura 5). No tempo T10, uma repetição amplificou, os vírus P_{MeV} e P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5). As demais repetições de T10 não amplificaram os vírus (Tabela 2, Figura 5). Já no tempo T20, duas repetições amplificaram P_{MeV}, e uma amplificou P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5).

No maior tempo de herborização (T40), as três repetições amplificaram o P_{MeV} e P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5). Semelhante ao ocorrido com o grupo assintomático armazenado em ultrafreezer, houve uma variação entre as repetições, mas a tendência dos resultados mostra eficiência do tempo de herborização para preservar o vírus.

O grupo sintomático para meleira armazenado por herborização (HM), no tempo T5 duas amostras amplificaram P_{MeV} e uma amplificou P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5). No tempo T10, duas amostras amplificaram P_{MeV} e nenhuma amplificou P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5). Para o tempo T20, todas as repetições amplificaram P_{MeV}, mas somente uma amplificou P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5). No tempo 40, todas as repetições amplificaram P_{MeV} e P_{MeV2} (Tabela 2, Figura 5).

Mesmo diante da variação dos resultados entre as repetições, os resultados mostram que o método de herborização pode vir a ser uma alternativa para preservar o vírus e posteriores avaliações. Trabalhos feitos com amostras herborizadas de outros patossistemas, detectaram a presença de vírus (Hartung *et al.*, 2015; Knierim; Tsai; Kenyon, 2013; Malmstrom *et al.*, 2007; Melzer *et al.*, 2013; Rieux *et al.*, 2021), vindo de encontro com os resultados encontrados no presente trabalho e corroborando para a eficácia do método na preservação do vírus nos tecidos do hospedeiro para identificação posterior. É válido destacar que em todas as repetições de todos os tratamentos o P_{MeV2} só foi detectado onde existia a presença do P_{MeV}. Em nenhuma das amostras houve

amplificação do PMeV2 sem ter ocorrido a amplificação do PMeV, confirmando a interação dos vírus e a dependência de PMeV2 ao PMeV, conforme já observado por Antunes *et al.* (2020).

Com os resultados encontrados na análise molecular, levantou-se a hipótese dos vírus ficarem também nas nervuras da planta. Para testá-la, foram feitas análises moleculares das amostras herborizadas sintomáticas nos tempos T10 e T40, com e sem nervura, para ver o comportamento no início e no final dos tempos de herborização.

No tempo T10, nenhuma amostra amplificou os vírus, tanto com nervura, quanto sem nervura (Tabela 2, Figuras 6). Já no tempo 40, houve amplificação nas amostras com e sem nervura para PMeV (Tabela 2, Figura 6), enquanto PMeV2 não amplificou (Tabela 2, Figura 6). Diante disso, pode-se entender que os vírus estão presentes também nas nervuras das plantas, visto que os laticíferos são encontrados de forma articulada entre os tecidos vegetais das plantas de *Carica papaya* (Mérchan-Gaitán *et al.*, 2024).

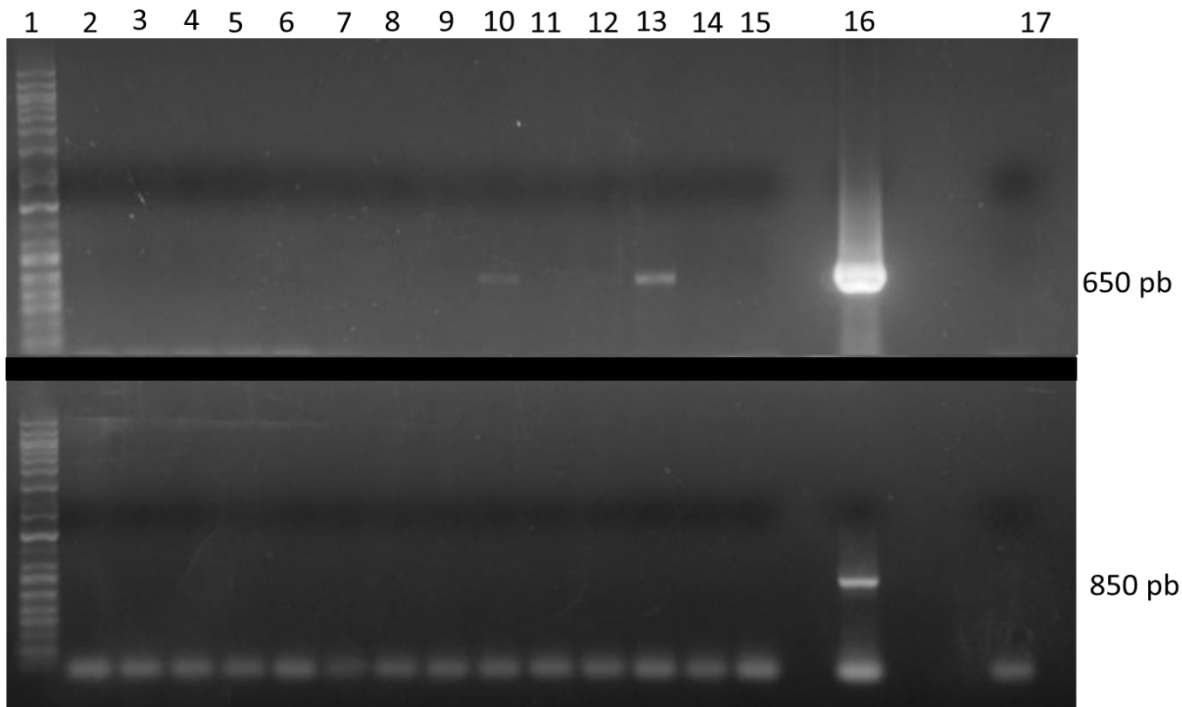


Figura 6. Eletroforese dos produtos de PCR do PMeV (650 pb) e PMeV2 (850 pb) em triplicata das amostras com e sem nervura. SN – Amostra herbário sem nervura; CN – Amostra herbário com nervura. 1 – Marcador molecular; 2 – negativo cDNA (-cDNA); 3 – negative PCR (-PCR); 4, 5, 6 – SN10; 7, 8, 9 – CN10; 10, 11, 12 – SN40; 13, 14, 15 – CN40; 16 – positivo PCR (+PCR); 17 – negative da extração.

Diante dos resultados expostos, torna-se possível provar que a técnica de herbarização pode ser aplicada para estudos futuros do material viral. Fraile *et al.* (1997) encontrou em amostras armazenadas em um período de 73 anos a presença de TMV e TMGVM. Além do mais, a herbarização também pode ser aplicada para avaliar o grau de evolução do vírus. BYDVs e CYDVs foram encontrados em folhas de cevada para avaliação ancestral, podendo ser identificado semelhança funcional entre cepas virais PAV, MAV e RPV que foram identificadas em gramíneas (Malmstrom *et al.*, 1917).

Guy (2013) e Bieker *et al.* (2020) observaram a presença de PLMVd de espécimes de pessegueiro coletadas em 1956 e RuFDV em *A. artemisiifolia*, respectivamente. Petrzik *et al.* (2016) também identificou CaMV em amostras herbarizadas desde 1952. Também foi possível identificar e realizar a reconstrução evolutivas do vírus ACMV que infecta a planta da mandioca. Assim, a técnica de herbarização pode contribuir a entender a evolução genética de diversos vírus, inclusive da meleira do mamoeiro (PMeV e PMeV2). O vírus da meleira pode ser encontrado no Brasil, Equador, México e Austrália (Antunes *et al.*, 2016). A aplicação da técnica empregada no trabalho pode contribuir em trabalhos de genética do vírus da meleira no Brasil e em nível internacional, auxiliando a compreender a sua epidemiologia e formas de controle da doença nos campos de *C. papaya*.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos foram inéditos ao confirmar que foi possível fazer a detecção dos vírus associados à meleira (PMeV e PMeV 2), em amostras de folhas herbarizadas e armazenadas por um período de até 40 dias após a coleta no campo. Estes resultados viabilizam a recomendação da herbarização como um novo procedimento para a preservação e armazenamento das amostras de folhas para diagnóstico molecular da meleira do mamoeiro, em substituição ao armazenamento imediato das amostras em N líquido e transporte rápido para o laboratório, sendo uma alternativa de baixo custo e fácil execução, no transporte de amostras para os laboratórios de fitopatologia. Torna-se evidente também, a necessidade de padronização na coleta das folhas e sua posição na planta e a coleta dos tecidos do limbo para as extrações do RNA dos vírus.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. M. V. et al. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 180, 11-17, 2011.

ABREU, P. M. V.; PICCIN, J. G., RODRIGUES, S. P.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 180, n. 1–2, p. 11–17, 2012. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.12.003.

ABREU, P. M. V.; ANTUNES, T. F. S.; MAGAÑA-ÁLVAREZ, A.; PÉREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P.M.B. A current overview of the *Papaya meleira virus*, an unusual plant virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853–1870, 2015a. DOI: 10.3390/v7041853

ABREU, E. F., DALTRO, C. B., NOGUEIRA, E. O., ANDRADE, E. C., ARAGAO, F. J. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of virology**, v. 160, n. 12, p. 3143-3147, 2015b. DOI: 10.1007/s00705-015-2605-x

AKIBA, F. Bactérias pleomórficas, Gram negativas, e de crescimento lento em meio de cultura, isoladas do sistema vascular de diversas espécies de plantas apresentando sintomas de declínio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 110-111, 1989.

ANTUNES, T. F. S.; AMARAL, R. J. V.; VENTURA, J. A.; GODINHO, M. T.; AMARAL, J. G.; SOUZA, F. O.; ZERBINI, P. A.; ZERBINI, F. M.; FERNANDE, P. M. B. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **Plos one**, v. 11, p. 1-14, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0155240

ANTUNES, T. F. S. et al. Batle of Three: The Curius Case of Papaya Sticky Disease. **Plant Disease**, 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2622-FE>.

ARAÚJO, M. TAVARES, E. T.; SILVA, F. R.; MARINHO, V.L. JÚNIOR, M.T. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 146, n. 1, p. 305-310, 2007. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.07.022

BIEKER, V. C.; BARREIRO, F. S.; RASMUSSEN, J. A.; BRUNIER, M.; WALES, N.; MARTIN, M. D. Metagenomic analysis of historical herbarium specimens reveals a postmortem microbial community. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 5, p. 1206–1219, 2020. DOI: 10.1111/1755-0998.13174

CAMPBELL, P. **New test to offer early detection of papaya sticky disease**. p. 1 in: *Papaya Press*, Issue 1.2018 <https://web.archive.org/web/20190305080217/https://australianpapaya.com.au/website/wp-content/uploads/2018/05/PAPAYAPRESS-MAY.pdf>

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **PIB do Agronegócio Brasil**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 3 dez. 2022.

CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; POSTCLAM-BARRO, M.; FONTENELE, R.S.; HARAKAVA, R.; BASSANEZI, R. B.; MOREIRA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; VARSANI, A.; FREITAS-ASTÚA, J. Molecular Epidemiology of Citrus Leprosis Virus C: A New Viral Lineage and Phylodynamic of the Main Viral Subpopulations in the Americas. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.641252

CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Fruticultura Brasileira: Diversidade e sustentabilidade para alimentar o Brasil e o Mundo**. Disponível em: <<https://cnabrasil.org.br/noticias/fruticultura-brasileira-diversidade-e-sustentabilidade-para-alimentar-o-brasil-e-o-mundo#:~:text=A fruticultura brasileira%2C seja cultivando,um alimento saudável e saboroso.>>>. Acesso em: 30 dez. 2022.

FAO. **Crop Production**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989.

FRAILE, A.; ESCRUI, F.; ARANDA, M. A.; MALPICA, J. M.; GIBBS, A. J.; GARCÍA-ARENAL, F. A Century of Tobamovirus Evolution in an Australian Population of *Nicotiana glauca*. **American Society for Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 8316–8320, 1997. DOI: 10.1128/JVI.71.11.8316-8320.1997.

GALEANO, E. A. V.; MARTINS, D. S.; BARROS, F. L. de S.; VENTURA, J. A.; QUEIROZ, R. B. **Cadeia produtiva do mamão no Espírito Santo**. Vitória-ES: Incaper, 2022. 172p. (Fruticultura Capixaba, 1). DOI: 10.54682/livro.9788589274340

GALO, J. Q. B.; SOUZA, M. L.; KUSDRA, J. F.; MATTIUZ C. Postharvest storage of papaya ‘sunrise solo’ with the use of chitosan. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 305–312, 2014. DOI:10.1590/0100-2945-194/13

GARCÍA-CÁMARA, I.; TAPIA-TUSSELL, R.; MAGAÑA-ÁLVAREZ, A.; VELÁZQUEZ, A. C.; MARTÍN-MEX, R.; MORENO-VALENZUELA, O.; PÉREZ-BRITO, D. *Empoasca papayae* (Hemiptera: Cicadellidae)-Mediated Transmission of Papaya Meleira Virus-Mexican Variant in Mexico. **Plant Disease**, v. 103, n.8, p. 2015-2023, 2019. DOI:10.1094/PDIS-06-18-1101-RE

GUY, P. L. Ancient RNA? RT-PCR of 50-year-old RNA identifies peach latent mosaic viroid. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, p. 691–694, 2013. DOI: 10.1007/s00705-012-1527-0

HAGEL, J.; YEUNG, E.; FACCHINI, P. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends Plant Sci.**, 13, 631–639, 2008.

HARTUNG, J. S. ROY, A.; FU, S.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. History and diversity of *Citrus Leprosis* virus recorded in herbarium specimens. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1277–1284, 2015. DOI: 10.1094/PHYTO-03-15-0064-R.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/11985?tipo=grafico&indicador=1992>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

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

KNIERIM, D.; TSAI, W. S.; KENYON, L. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described pepper vein yellows virus (genus *Polerovirus*) in six additional countries. **Archives of Virology**, v. 158, n. 6, p. 1337–1341, 2013.

LANG, P. L. M. Willems FM; Scheepens, J.F.; BURBANO HA; BOSSDORF O. Using herbaria to study global environmental change. **New Phytologist**, v. 221, n. 1, p. 110–122, 2019.

MACIEL-ZAMBOLIM.; KUNIEDA A. S.; MATSUOKA K.; DE CARVALHO M. G.; ZERBINI F. M.; Purification and some properties of *Papaya Meleira Virus*, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389-394, 2003.

MALMSTROM, C. M.; SHU, R.; LINTON, E. W.; NEWTON, L. A.; COOK, M. A. Barley yellow dwarf viruses (BYDVs) preserved in herbarium specimens illuminate historical disease ecology of invasive and native grasses. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1153–1166, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2007.01307.x

MARSTON, D. A. et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

MERCHÁN-GAITÁN, J.B.; MENDES, J.H.L.; NUNES, L.E.C.; BUSS, D.S.; RODRIGUES, S.P.; FERNANDES, P.M.B. The Role of Plant Latex in Virus Biology. **Viruses**, 16, 47, 2024. <https://doi.org/10.3390/v16010047>

MACHADO, S. L. O. **Técnicas de herborização**, 7p., sd. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/herb/T%E9cnicas%20de%20Herboriza%E7%E3o.pdf> Acesso em: 06 de março de 2024

MAURASTONI, M., et al. A multiplex RT-PCR method to detect papaya meleira virus complex in adult pre-flowering plants. **Brief Report**, 165, 1211-1214, 2020.

MAURASTONI, M.; SÁ ANTUNES, T. F.; ABREU, E. F. M.; RIBEIRO, S. G.; MEHTA, A.; SANCHES, M. M.; FONTES, W.; KITAJIMA, E. W.; CRUZ, F. T.; SANTOS, A. M. C.; VENTURA, J. A.; GOMES, A. C. M. M.; ZERBINI, F. M.; SOSA-ACOSTA, P.; NOGUEIRA, F. C. S.; RODRIGUES, S. P.; ARAGÃO, F. J. L.; WHITFIELD, A. E.; FERNANDES, P. M. B. A Capsid Protein Fragment of a Fusagra-like Virus Found in *Carica papaya* Latex Interacts with the 50S Ribosomal Protein L17. *Viruses*. 2023 Feb 15;15(2):541. DOI: 10.3390/v15020541.

MELZER, M.; AYIN, C.; SUGANO, J.; UCHIDA, J.; KAWATE, M.; BORTH, W.; HU, J. Differentiation and distribution of Cordyline viruses 1-4 in Hawaiian ti plants (*Cordyline fruticosa* L.). **Viruses**, v. 5, n. 7, p. 1655–1663, 2013. DOI:10.3390/v5071655

NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAWA, Y. **Exsudação do látex do mamoeiro: estudo da ocorrência em Teixeira de Freitas, BA**. Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...**Campinas-SP: SBF/UNICAMP, 1987.

PEIXOTO, A. L.; MAIA, L. C. **Manual de Procedimentos para Herbários** [recurso eletrônico] / organizadoras: Ariane Luna Peixoto e Leonor Costa Maia; [escritos]: Pedro da Costa Gadelha Neto... [et al.] – Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2013

PETRZIK, K.; KOLONIUK, I.; SARKISOVÁ, T.; ČÍHAL, L.. Detection of herbaceous-plant pararetrovirus in lichen herbarium samples. **Acta virologia**, v. 60, p. 196–200, 2016. DOI: 10.4149/av_2016_02_196.

QUITO-AVILA, D. F.; REYES-PROAÑO, E.; CAÑADA, G.; CORNEJO-FRANCO, J. F.; ALVAREZ-QUINTO, R.; MOREIRA, L.; GRINSTEAD, S.; MOLLOV, D.; KARASEV, A. V. Papaya Sticky Disease Caused by Virus "Couples"; A Challenge for Disease Detection and Management. **Plant Disease**, 107(6):1649-1663, 2023.

RIEUX, A., CAMPOS, P.; DUVERMY, A.; SCUSSEL, S.; MARTIN, D.; GAUDEUL, M.; LEFEUVRE, P.; BECKER, N.; LETT, J. Contribution of historical herbarium small RNAs to the reconstruction of a cassava mosaic geminivirus evolutionary history. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00518-w

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 Phytopathologica**, v. 31, p. 273-275, 2005.

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

RODRIGUES, C. H.; VENTURA, J. A.; MARIN, S. L. D. Ocorrência e sintomas da “meleira” do mamoeiro (*C. papaya* L.) no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 118, 1989.

ROTTA, E.; CARVALHO, L. C.; BELTRAMI, M. Z. Manual de Prática de Coleta e Herborização de Material Botânico. **Documentos [Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária]**, v. 173, p. 1–31, 2008.

RWAHNIH, M. AL; ROWHANI, A.; GOLINO, D. First Report of Grapevine red blotch-associated virus in archival grapevine material from Sonoma County, California. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 895, 2015.

SÁ-ANTUNES, T. F.; MAURASTONI, M.; MADROÑERO, L. J.; FUENTES, G.; SANTAMARIA, J. M.; VENTURA, J. A.; ABREU, E. F.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. Battle of three: The curious case of papaya sticky disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.104, n.11, p.2754-2763, 2020. DOI: 10.1094/PDIS-12-19-2622-FE.

SANTOS FILHO, H. P.; OLIVEIRA, A. A. R.; HADDAD, F. **Controle alternativo de doenças do mamoeiro**. Cruz das Almas BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016.

SMITH, O.; CLAPHAM, A.; ROSE, P.; LIU, Y.; WANG, J.; ALLABY, R. G. A complete ancient RNA genome: Identification, reconstruction and evolutionary history of archaeological Barley Stripe Mosaic Virus. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4003, 2014. DOI: 10.1038/srep04003

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. D. O. Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. **Boletim Técnico**, Belo Horizonte, MG: EPAMIG, 48p., 1998

TAVARES, E. T.; TATAGIBA, J. S.; VENTURA, J.A.; SOUZA JR., M. T. Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 563–566, 2004. DOI: 10.1590/S0100-41582004000500018

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; LIMA, I.de M. Conilon Coffee Disease Management. In: FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A. da; FERRÃO, M. A.G.; De MUNER, L.H. **Conilon Coffee**. 3. ed updated and expanded. Vitória, ES:Incapar, 2019 p.535-591.

VENTURA, J. A.; Costa, H.; Tatagiba, J. S.; Andrade, J. S. Meleira do mamoeiro: Etiologia, sintomas e epidemiologia. In: MARTINS, D. DOS S. (Ed.).

. **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, Brazil: Incaper, p. 267–276, 2003.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. da S. Papaya Diseases and Integrated Control. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**. Dordrecht, EUA: Springer, p. 201–268, 2014.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. de F. **Ferrugem do cafeeiro**. Folder, Porto Velho – RO: Embrapa Rondônia, 2009

VIDAL, C. A.; NASCIMENTO, A. S.; HABIBE, T. C. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro por insetos. In: MARTINS, D. S. (Ed.). . **Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno**. Vitória, Brasil: Incaper, p. 612–615, 2003.

ZAMUDIO-MORENO, E.; RAMIREZ-PRADO J. H.; MORENO-VALENZUELA, O. A.; LOPEZ-OCHOA, L. A. Early diagnosis of a Mexican variant of *Papaya meleira virus* (PMeV-Mx) by RT-PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1145–1154, 2015. DOI: 10.4238/2015

APÊNDICE

Herborização e diagnóstico molecular do PMeV e PMeV2

1 – Coleta das folhas: As folhas de plantas de *Carica papaya* devem ser coletadas observando os sintomas visuais para a doença da meleira do mamoeiro. Deve-se utilizar estiletes descartáveis, a fim de evitar contaminação cruzada.

2 – Transporte: As folhas devem ser transportadas em recipientes herméticos (isopor) contendo gelo, gelo seco ou *packs* gel congelados e mantidas sob refrigeração até o momento da herborização;

2 – Herborização das folhas: O processo de herborização deve ser realizado conforme estabelecido na Figura 4 deste documento por um período de 50 dias, com o preceito de se obter folhas herbarizadas.

3 – Tratamento das amostras para diagnósticos: Regiões da folha devem ser retiradas visando homogeneidade da amostragem.

4 – Diagnóstico molecular: O processamento das amostras segue os pressupostos estabelecidos neste documento de dissertação e estudos pré-estabelecidos pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA).