

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CLEIDIANE BORGES DALTRO

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DO AMARELO
LETAL (“Papaya lethal yellowing virus”, PLYV) E DO VÍRUS DA
MELEIRA DO MAMOEIRO, (“Papaya meleira virus”, PMeV)**

**CRUZ DAS ALMAS
DEZEMBRO - 2010**

CLEIDIANE BORGES DALTRO

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DO AMARELO LETAL
("Papaya lethal yellowing vírus", PLYV) E DO VÍRUS DA MELEIRA DO
MAMOEIRO, ("Papaya meleira vírus", PMeV)**

Monografia apresentada à disciplina Tese de conclusão de Curso II do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Co-orientador:

Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

CRUZ DAS ALMAS-BA

DEZEMBRO- 2010

CLEIDIANE BORGES DALTRO

TERMO DE APROVAÇÃO

Tese de Conclusão de Curso de Graduação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Jorge Teodoro de Souza – professor orientador

Emanuel Abreu- mestre convidado

Paulo Ernesto Meissner Filho– pesquisador convidado

A Deus:

Por ser meu guia e instrutor em todos os momentos de minha vida

Aos meus pais Corbiniano Pedreira Daltro (in memória) e Ailda Borges Daltro:

Por me gerar, amar, criar, educar, incentivar, colaborar na conquista de horizontes desconhecidos, a me levantar durante as dificuldades e a fazer de mim uma vitoriosa

Aos meus irmãos:

Por todo carinho e apoio por me ajudar a fazer deste sonho uma realidade

Aos tios:

Pelo amor, compreensão, colaboração e por acreditar e desejar a minha vitória

Dedico e Agradeço

AGRADECIMENTOS

A Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade, pela imensa atenção, dedicação, incentivo, confiança e encorajamento durante os três anos de desenvolvimento deste trabalho.

Aos avaliadores: Jorge Teodoro de Souza; Paulo Ernesto Meissner Filho e Emanuel Abreu pela participação na banca e contribuições concedidas para o aprimoramento deste trabalho.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura que permitiu a minha qualificação e por garantir toda infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Virologia Vegetal pelo auxílio, amizade e compreensão.

A todos os docentes do curso de Ciências Biológicas desta instituição que contribuíram diretamente para minha formação intelectual, ética e moral.

Aos todos os amigos pela compreensão, dedicação e solidariedade.

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma fruteira de grande importância social e econômica para o Brasil. As viroses estão entre as doenças que causam os maiores danos a cultura. O vírus do amarelo letal do mamoeiro ("Papaya lethal yellowing virus", PLYV) e o vírus da meleira ("Papaya meleira virus", PMeV) apesar de provocarem declínios na produção, os relatos referentes ao estudo de seus genomas e sobre a variabilidade genética entre os diferentes isolados são escassos. O objetivo deste trabalho foi gerar informações sobre a variabilidade genética de isolados do PLYV e PMeV. Para o PLYV, foi sequenciado um fragmento correspondente a região 3' da replicase viral, juntamente com a região 5' da capa proteica, enquanto que para o PMeV, o fragmento compreende parte da replicase viral. As análises *in silico* das sequências nucleotídicas de PLYV indicaram maior identidade com espécies de *Sobemovirus*, enquanto que o PMeV não mostrou identidade com nenhuma espécie de vírus vegetais já descrita. As comparações das sequências de aminoácidos deduzidos entre os isolados de PLYV revelaram baixa variabilidade genética, enquanto que para o PMeV observou-se uma maior variabilidade.

Palavras-chaves: viroses, mamão, diversidade genética

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit of great social and economic importance to Brazil. The viruses are among the diseases that cause the greatest damage to the crop. The “Papaya lethal yellowing virus” (PLYV) and “Papaya meleira virus” (PMeV), despite the damages to production, there is little information on their genomes and genetic variability. The objective of this work was to generate information on genetic variability between different isolates of PLYV and PMeV. For PLYV, we performed the sequencing of a fragment comprising the 3' region of the viral replicase and the 5' region of the coat protein, and for PMeV the fragment comprised a portion of the viral replicase. The analysis of PLYV nucleotide sequences showed high identity with Sobemovirus species, while PMeV showed no identity with any plant virus previously described. Comparisons of the deduced amino acid sequences among PLYV isolates revealed low genetic variability, while for PMeV was observed a greater variability.

Key words: viruses, papaya, genetic diversity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral a partir do RNA total extraído das amostras de mamoeiros com sintomas do amarelo letal (linhas 1 à 8). (B) Os fragmentos amplificados foram clonados e a confirmação foi realizada por meio da clivagem com a enzima de restrição *Eco* RI, liberando o fragmento amplificado (linhas 11 à 15). M, marcador de peso molecular 1kb.....19
- Figura 2.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína RdRp dos isolados de “Papaya lethal yellow vírus” (PLYV). Foi utilizado o método “UPGMA” e bootstrap com 500 repetições, *Sesbania mosaic vírus*-SeMV (Banco de dados público n°: NP066393.2).....21
- Figura 3.** Extração de RNA total para verificar a presença de dsRNA do PMeV. M é o marcador de peso molecular 1Kb, do número 1- 6 são as amostras infectadas e a 7 é a amostra sadia.....22
- Figura 4.** (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral a partir do RNA total extraído das amostras de mamoeiros com sintomas de meleira (linhas 1,2, 6 e 7), amostras sadias (3, 4, e 5). (B) Os fragmentos amplificados foram clonados e a confirmação foi realizada por meio da clivagem com a enzima de restrição, liberando o fragmento amplificado (linhas 8,9,10,11 e 12). M, marcador de peso molecular 1kb.23
- Figura 5.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene RdRp dos isolados de “Papaya meleira vírus” (PMeV). Foi utilizado o método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 500 repetições. *Phlebiopsis gigantea mycovirus*-PGV (Banco de dados público. n°: CAJ34335.2).....25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localidades onde foram coletados os isolados de PLYV utilizados neste estudo.....18
- Tabela 2.** Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos do fragmento correspondendo aos genes RdRp ou CP do PLYV-1 e *Sobemovirus* relacionados.....20
- Tabela 3.** Identidade entre as sequências de aminoácidos das proteínas RdRp (valores acima da diagonal) e CP (valores abaixo da diagonal) dos dez isolados do PLYV coletados em diferentes localidades do estado do Ceará.....21
- Tabela 4.** Localidades onde foram coletados os isolados do PMeV.....22
- Tabela 5.** Identidade das sequências de nucleotídeo da proteína RdRp (valores abaixo da diagonal) e da sequência de aminoácidos (valores acima da diagonal) de sete isolados do PMeV e um isolado do *Phlebiopsis gigantea mycovirus* - PGV, coletados nos estados Ceará, Bahia e Espírito Santo.....24

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 3 |
| 3. OBJETIVO..... | 4 |
| 4. REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 4.1 Virologia vegetal e técnicas de diagnose viral..... | 5 |
| 4.2 O mamoeiro: Importância social e econômica..... | 6 |
| 4.3 O mamoeiro e as viroses associadas | 7 |
| 4.4 Estudo genômico..... | 11 |
| 5. METODOLOGIA..... | 13 |
| 5.1 Coleta de Material Vegetal | 13 |
| 5.2 Testes diagnósticos | 13 |
| 5.2.1 Testes sorológicos | 13 |
| 5.2.2 Testes moleculares..... | 14 |
| 5.3 Análise da diversidade genética dos vírus da meleira e do amarelo letal do mamoeiro | 14 |
| 5.3.1 Extração de RNA viral a partir de tecido vegetal infectado..... | 14 |
| 5.3.2 Amplificação, clonagem e análise das sequências | 15 |
| 6. RESULTADOS e DISCUSSÃO | 17 |
| 6.1 Estudo da variabilidade genética do PLYV | 17 |
| 6.2 Análise das sequências genômicas do PLYV | 18 |
| 6.3 Estudo da variabilidade genética do PMeV..... | 20 |
| 6.4 Análise das sequências genômicas do PMeV | 22 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 25 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 26 |

1. INTRODUÇÃO

No Brasil ocorre representantes de quase todos os gêneros de vírus de plantas já descritos. Fazem parte dos exemplares brasileiros muitos vírus encontrados no exterior assim como inúmeros vírus inéditos na literatura (KITAJIMA, 2002). Segundo Kitajima (2002) as condições ambientais brasileiras favorecem a presença constante de plantas e vetores (insetos, nematóides, ácaros) fator que propicia o aparecimento de um maior número de plantas doentes no campo em um menor tempo de exposição do vegetal ao vírus.

A maior incidência observada se deve ao fato de que a maioria das viroses apresentam interações com vetores, os quais se encarregam de transmiti-los e disseminá-los no pomar. Os vírus das fruteiras cultivadas no Brasil e que são transmitidos por insetos são encontrados na família *Luteoviridae* e nos gêneros *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Potyvirus*, *Tymovirus* e *Vitivirus* (COSTA, 2002).

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma fruteira rica em vitaminas e sais minerais, que apresenta grande importância econômica e social. No Brasil, o cultivo do mamoeiro destina-se basicamente para a produção de frutos visando seu consumo como fruta fresca, tanto no mercado nacional como no internacional (BENASSI, 2006). A produção brasileira de mamão vem crescendo nos últimos anos, em 1995 a produção foi de 827,33 mil toneladas, em 2004 foi de 1.264,17 mil toneladas (FAO, 2006) e em 2008 foi de 1.890.286 toneladas (IBGE, 2008). Sua importância social reside na necessidade constante de mão de obra para realização dos tratos culturais, colheita e comercialização (BENASSI, 2006).

As viroses constituem um grave problema para mamoeiro no Brasil, as viroses já detectadas causando declínios na produção da cultura foram a mancha anelar, causada pelo *Papaya ringspot virus* - PRSV-P, amarelo letal do mamoeiro, causada pelo "Papaya lethal yellowing virus" – PLYV e a meleira, causada pelo "Papaya meleira virus" – PMeV. A mancha anelar é a virose de maior importância

fitossanitária, foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1969, nas áreas produtoras de mamão de São Paulo onde causou uma devastação na cultura.

A meleira e o amarelo letal do mamoeiro só ocorrem no Brasil, o que tem ocasionado perdas ainda maiores. A meleira foi relatada na década de 80 no sul da Bahia (NAKAGAWA *et al.*, 1987) e o amarelo letal também na mesma década no estado de Pernambuco (LORETO *et al.*). Atualmente a meleira encontra-se disseminada nas regiões produtoras de mamão da Bahia, Espírito Santo (RODRIGUES *et al.*, 1989a), Pernambuco, Rio Grande do Norte e Ceará (BARBOSA *et al.*, 1998a), enquanto que o amarelo letal pode ser encontrado nos estados do Ceará (LIMA e SANTOS, 1991) e Rio Grande do Norte (OLIVEIRA *et al.*, 1989). A meleira é considerada a virose de maior risco para a cultura, pois a planta infectada demora a exibir os sintomas, o que permite uma permanência destas plantas no pomar servindo como fonte de inoculo, além disso, ela apresenta um potencial vetor, a mosca branca, *Bemisia tabaci* (VIDAL *et al.*, 2000) que favorece sua disseminação na cultura. Já no caso do amarelo letal, os sintomas são aparentes logo após o início da infecção o que facilita a erradicação da planta e também não apresenta vetor (LIMA *et al.* 1994), o que possivelmente reduz a sua disseminação no campo. Ambas as viroses causam grandes danos à cultura, reduzindo a quantidade e qualidade de seus frutos, gerando grandes distúrbios fisiológicos e morfológicos nas plantas, provocando deformações foliares e nos frutos, levando a perda de vigor destas.

Apesar dos enormes prejuízos acarretados pelo PLYV e pelo PMeV na cultura do mamoeiro no Brasil, poucos trabalhos estão sendo dedicados a caracterização dos seus genomas, sobre sua classificação taxonômica e estudo de variabilidade genética, estudos sobre os mecanismos de patogenicidade do vírus e sobre as interações vírus-hospedeiro. Após vinte anos dos primeiros relatos destas viroses apenas uma informação sobre a sequência genômica do PLYV foi depositada no banco de dados, o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), enquanto que nenhum dado foi registrado com relação a sequência genômica do PMeV.

2. JUSTIFICATIVA

Em vista da carência de conhecimentos genético/molecular dos vírus do amarelo letal e da meleira do mamoeiro, este trabalho irá contribuir para a geração de informações a respeito da variabilidade genética dentro da população destas espécies de vírus, o que possivelmente facilitará a sua classificação taxonômica, aumentará a eficiência dos métodos de diagnose baseados em RT-PCR, assim como possibilitará a identificação de regiões conservadas do genoma viral na população de cada espécie a fim de desenvolver métodos de controle baseado na produção de plantas transgênicas resistentes a uma gama de isolados.

3. OBJETIVO

Analisar a diversidade genética dos vírus do amarelo letal e da meleira do mamoeiro em diferentes regiões produtoras de mamão.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Virologia vegetal e técnicas de diagnose viral

A virologia vegetal iniciou no Brasil na década de 30, no estado de São Paulo. Inicialmente os métodos de caracterização e descrição da infecção viral eram baseados em sintomas macroscópicos e anormalidades citológicas, porém com os avanços tecnológicos na ciência e o aumento da importância dos vírus vegetais, os trabalhos de detecção e caracterização virais começaram a avançar, baseando-se também em estudos das propriedades químicas da partícula viral e posteriormente combinando técnicas de microscopia eletrônica e cristalografia com técnicas sorológicas, como o teste Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA), (ZERBINI e ALFENAS-ZERBINI, 2007).

A partir da década de 70, cientistas começaram a desenvolver técnicas para a manipulação, clonagem e sequenciamento do genoma de alguns vírus. Atualmente a análise das sequências geradas juntamente com os dados biológicos e estruturais, têm permitido o estudo filogenético e tem levado a avanços no sistema taxonômico dos vírus vegetais (ZERBINI e ALFENAS-ZERBINI, 2007).

A técnica de ELISA é uma das mais utilizadas no diagnóstico de vírus, contudo esta não é sensível o suficiente para diagnosticar vírus que ocorrem em baixas concentrações nos tecidos vegetais, nem RNA satélites, encapsidados pela proteína capsidial dos vírus associados, ou viróides. A alta sensibilidade, aliada à especificidade e à rapidez, colocam a PCR (Polimerase Chain Reaction) como uma técnica poderosa (COLINET *et al.*, 1994), que apresenta inúmeras vantagens sobre os demais métodos de detecção: (1) utiliza uma pequena quantidade de amostras de tecido, (2) permite a detecção do vírus em baixas concentrações e em amostras guardadas por longos períodos, (3) possibilita a caracterização molecular por meio do sequenciamento completo ou parcial do genoma viral para estudos de infectividade (ZERBINI *et al.*, 2001).

A técnica de PCR para a detecção de vírus vegetais foi introduzida no Brasil

em 1992 e tem sido amplamente utilizada na obtenção de clones genômicos, na seleção inicial de plantas transgênicas, na produção de sondas moleculares específicas e na diagnose de diferentes espécies virais (MEISSNER FILHO, 1996).

Entretanto para detecção de vírus com genoma de RNA é necessário realizar um processo inicial de transcrição reversa, comumente chamado de RT-PCR ("Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction") (DANTAS, 2002), isto porque a técnica de PCR utiliza somente o DNA como fita molde para a reação, necessitando portanto, de uma técnica inicial que venha transformar o RNA viral em um DNA complementar (cDNA).

4.2 O mamoeiro: Importância social e econômica

O mamoeiro (*Carica papaya L.*) é uma planta herbácea pertencente à classe *Dicotyledoneae*, subclasse *Archichlamydeae*, ordem *Violales*, subordem *Caricaceae*, família *Caricaceae* e gênero *Carica* (DANTAS, 1999). Originária da Bacia Amazônica Superior é amplamente cultivada em vários países tropicais e subtropicais. É uma fruteira com capacidade de produção o ano inteiro, possui frutos aromáticos, ricos em vitamina C, e de grande valor nutritivo. Os grupos de mamoeiro mais explorados no Brasil são: Solo e Formosa. O grupo "Solo" é constituído por variedades melhor trabalhadas geneticamente, os frutos têm polpa avermelhada, e são de pequeno tamanho. O grupo "Formosa" é constituído por híbridos, os frutos são de tamanho médio e com polpa avermelhada (MAYER & RONCATTO, 2004).

Vários são os produtos e subprodutos que podem ser obtidos a partir do mamoeiro e seus frutos, como doces, compotas, geleias, néctar e papaína, porém a maior parte da sua produção se destina ao seu consumo como fruta fresca (BENASSI, 2006). O cultivo do mamoeiro no Brasil tem grande importância social, gerando emprego e renda, devido a necessidade de mão de obra durante o ano todo, para realização de manejo, tratamentos culturais, colheita e comercialização, efetuadas nas lavouras.

Segundo a FAO (2006), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, representando 20,9% da produção mundial. A produção brasileira de mamão em 2008 foi de 1.890.286 toneladas, a área colhida somou 36.585 ha, com rendimento médio de 51,67 t/ha. A região Nordeste produziu 1.179.101 toneladas, o que corresponde a 62,38% da produção nacional, dentre os estados brasileiros a Bahia liderou com uma produção de 902.525t, o que equivale a 47,75% da produção total nacional (IBGE, 2008).

4.3 O mamoeiro e as viroses associadas

Dentre os fatores que limitam a cultura do mamoeiro no Brasil, as viroses constituem o principal grupo de doenças que tem ocasionado maiores perdas na produtividade do mamoeiro. Os vírus registrados até o momento em pomares de mamoeiro no Brasil foram: o vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV): vírus do amarelo letal do mamoeiro (“Papaya lethal yellowing vírus”, PLYV) e o vírus da meleira, (“Papaya meleira vírus”, PMeV). A mancha anelar causada pelo PRSV-P, constitui o maior problema fitossanitário do mamoeiro e seu controle no Brasil é feito por meio do monitoramento e erradicação constante das plantas doentes (REZENDE *et al.*, 1993). O uso de plantas transgênicas para o controle do PRSV-P tem funcionado muito bem em cultivos de mamão no Havaí, tornando possível o cultivo de mamão em locais com elevada incidência do vírus e do seu vetor (GONSALVES, 2004).

O PLYV foi relatado inicialmente afetando mamão da variedade ‘Solo’ no Estado de Pernambuco (LORETO *et al.*, 1983), depois foi detectado na Bahia (VEGA *et al.*, 1988), Rio Grande do Norte (OLIVEIRA *et al.*, 1989) e Paraíba (CAMARÇO *et al.*, 1996). Em áreas produtoras do Rio Grande do Norte já foi observada uma incidência de cerca de 40% (OLIVEIRA *et al.*, 1989). Sua origem é desconhecida, havendo suspeitas de que se originou de plantas nativas ou ser uma possível mutação de outro vírus (LIMA *et al.*, 2001).

Os sintomas do amarelo letal iniciam-se geralmente com o amarelecimento de folhas do terço superior da copa, com a evolução da doença, as folhas

apresentam-se ligeiramente retorcidas, com aspecto clorótico, murcham e morrem, levando a planta à morte. Nos frutos, aparecem manchas circulares, inicialmente esverdeadas e depois, com o amadurecimento, tornam-se amareladas (LIMA *et al.*, 2001).

O PLYV é um vírus de partículas isométricas, com diâmetro entre 29 e 32 nm constituído por uma fita de RNA monocatenária. Estudos recentes tem indicado sua possível classificação como sendo do gênero *Sobemovirus*. A caracterização molecular parcial do PLYV foi baseada na análise de nucleotídeos da região do genoma que codifica a capa proteica (CP). O gene CP do PLYV possui uma identidade de 48% com o sobemovírus *Southern bean mosaic virus* (SBMV), e de apenas 38% em relação ao *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (SILVA *et al.*, 2000).

Testes realizados em casa de vegetação, com mais de 30 espécies vegetais de oito famílias botânicas, indicam que o PLYV tem por hospedeiras somente espécies do gênero *Carica*. Também foram realizados experimentos para se identificar o vetor do PLYV, utilizando a espécies de afídeos *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e de besouros *Diabrotica bivitulla*, *D. speciosa* para os testes, porém não se obteve sucesso (LIMA e SANTOS, 1991; SILVA, 1996) e não foi detectado nenhum vetor para o PLYV. Porém sua transmissão já foi realizada de forma mecânica por extratos de folhas e frutos de mamoeiros contaminados, por enxertia, por ferramentas de cortes. Partículas virais infecciosas também foram detectadas em solo, água de rega de plantas infectadas e na superfície de sementes de mamão provenientes de plantas doentes constituindo estes os prováveis focos de transmissão do PLYV (REZENDE *et al.*, 2005; SARAIVA *et al.*, 2006). Trabalhos realizados por Nascimento *et al.* (2010) demonstraram a presença de partículas virais ativas em solo e restos de culturas podendo servir como fonte de inóculo para pomares novos.

Por ser uma doença pouco estudada não se tem estabelecida medidas de controle. No entanto algumas recomendações podem ser feitas no intuito de minimizar a disseminação do vírus nas regiões de ocorrência e para regiões não afetadas. Recomendam-se as seguintes medidas: proibir a saída de mudas e

sementes de mamoeiros dos estados em que o vírus já foi detectado, as mudas para criação de novos plantios devem ser decorrentes de locais com histórico de ausência da doença. Nos pomares onde a doença já se encontra instalada deve fazer a erradicação sistemática das plantas afetadas reduzindo assim a disseminação do vírus dentro da cultura e por fim a desinfestação das ferramentas agrícolas utilizadas nos processos de desbrota, desbaste de frutos e colheita, como as facas e tesouras de poda, com uma solução de 1:10 de hipoclorito de sódio, (REZENDE *et al.*, 2005).

A meleira foi relatada na década de 80 afetando pomares no sul da Bahia (NAKAGAWA *et al.*, 1987) e norte do Espírito Santo (RODRIGUES *et al.*, 1989a; 1989b). A partir de 1989, disseminou-se rapidamente atingindo 100% de incidência em algumas plantações, tornando-se fator limitante a produção nas regiões onde ocorre (RODRIGUES *et al.*, 1989a; 1989b). Atualmente está disseminada também nos estados de Pernambuco e Ceará (BARBOSA *et al.*, 1998a,b).

Os sintomas observados em plantas infectadas pelo vírus são caracterizados por uma exsudação espontânea do látex nos frutos, que posteriormente se oxida, dando um aspecto borrado ou 'melado' ao fruto, do qual deriva o nome da doença. Normalmente os frutos apresentam maturação desuniforme levando a formação de manchas claras na casca. O látex pode exsudar nas bordas das folhas e pétalas das flores e ao se oxidar, leva a necrose destas regiões (VIDAL *et al.*, 2005).

Inicialmente a etiologia da doença foi atribuída a causas abióticas, mas com a análise detalhada através da microscopia eletrônica realizada em látex obtido de folhas, frutos e hastes do mamoeiro com sintomas, foram observadas partículas isométricas com diâmetro variando entre 38 e 42 nm. Posteriormente foi detectada a presença de moléculas dsRNA de aproximadamente 12 Kb em tecidos de plantas com sintomas da meleira. Sua morfologia e composição genômica indicam ser este um vírus totalmente distinto de outros vírus vegetais já descritos. Geralmente os vírus apresentam um genoma composto por RNA fita simples, DNA fita dupla ou DNA fita simples. Os vírus de dsRNA representam um pequeno grupo entre as

viroses de plantas e se encontram agrupados nas famílias *Reoviridae*, *Bimaviridae* e *Cystoviridae* (RODRIGUES, 2005).

Além da associação do vírus com o gênero *Carica* já foi detectado o dsRNA do PMeV associado a gramínea da espécie *Brachiaria decumbens* (ZAMBOLIM *et al.*, 2003). Estudos realizados por Rodrigues (2006) revelaram um maior acúmulo de partículas virais nos órgãos ricos em laticíferos, as quais se ligam aos polímeros presentes no látex induzindo alterações morfológicas e reduzindo as suas quantidades, a presença do vírus também induz um acúmulo de potássio, fósforo e aumento de água no látex. Rodrigues (2006) sugeriu ainda que, a síntese de alcalóides o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio, assim como a síntese de H_2O_2 nos laticíferos e células do floema de plantas doentes, podem estar relacionadas com mecanismos de defesa desenvolvidos pelo mamoeiro para combater a infecção pelo patógeno.

Experimentos de campo realizados por Nascimento *et al.* (1998) comprovaram que plantas protegidas não desenvolveram sintomas enquanto que plantas expostas foram infectadas pelo vírus, comprovando a existência de um vetor na disseminação e transmissão desta virose. Experimentos realizados por Vidal *et al.* (2000) na Bahia sob condições controladas demonstraram a transmissão do vírus da meleira pela mosca branca da espécie *Bemisia tabaci*. Entretanto moscas brancas da espécie *Trialeurodes variabilis*, são capazes de adquirir o vírus ao se alimentar de mamoeiros infectados, mas não de transmiti-los para mamoeiros sadios (RODRIGUES *et al.*, 2009). O vírus da meleira é também transmitido mecanicamente, através de ferimentos produzidos por instrumentos perfurantes contaminados, sendo detectada a transmissão para plântulas sadias de mamoeiro via ferimentos com lâminas ou agulhas embebidas em látex de plantas infectadas (LIMA *et al.*, 2001).

A erradicação sistemática de plantas doentes em pomares tem sido a medida mais utilizada no controle da doença. Embora não se conheça a forma de disseminação e sobrevivência do vírus, o correto é utilizar mudas certificadas na instalação de novos pomares; fazer inspeções semanais aos pomares, eliminando

as plantas com sintomas de vírus ("roguing"), e fazer a desinfestação das ferramentas agrícolas, especialmente facas, com uma solução de 1:10 de hipoclorito de sódio (água sanitária) / água e erradicar todos os pomares de mamoeiro com mais de 50% das plantas infectadas (LIMA *et al.*, 2001).

4.4 Estudo genômico

O sequenciamento completo do genoma de membros de cerca de 30 dos 37 grupos de vírus que atacam plantas proporcionou avanços na compreensão da organização e função dos genes virais (HULL, 1994), e o acesso a regiões conservadas do genoma tem permitido o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações.

O sequenciamento associado ao aprimoramento de métodos de introdução de DNA exógeno no genoma das plantas (técnicas de transformação) têm contribuído para o desenvolvimento da proteção não-convencional ou resistência mediada pelo próprio patógeno (RDP), (HULL, 1994).

Segundo Beachy (1997) o emprego da RDP para obtenção de plantas resistentes a vírus são mais vantajosas que a resistência proveniente de proteção convencional, devido à maior facilidade de manipulação de genes virais em comparação com os genes vegetais; a provável condição de relativa estabilidade e de expressão de genes com pequeno impacto na planta. Estudos apontam para existência de dois tipos de resistência mediada pelo patógeno (BUCK, 1991):

1. A resistência mediada pela proteína, que depende da transcrição e tradução do transgene viral;
2. A resistência mediada pelo RNA, que depende apenas da transcrição do transgene.

A RDP mediada pela proteína da capa de vírus vem sendo usada desde 1986, envolvendo espécies de *Solanaceae* e *Leguminosae*, e já obteve sucesso para mais de 20 viroses (BARBIERI; CARVALHO e FEDERIZZI, 1995). Estudos relatam que a proteção mediada pela proteína do capsídeo ocorre por meio da

inibição da desencapsidação viral nas primeiras células infectadas, que pode ser quebrada pelo emprego de RNAs virais como fonte de inóculo (CLARK *et al.*, 1995).

Com relação à RDP mediada pelo RNA, o primeiro fragmento de genoma viral a ser empregado na obtenção desta foi o gene da proteína do capsídeo viral (cp) do TMV (ABEL *et al.*, 1986) tornando-se o gene mais utilizado para induzir resistência em plantas transgênicas. Outro gene que também vem sendo utilizado é o gene da replicase viral, onde a presença deste transgene na planta ocasiona uma inibição da síntese, ou atividade da proteína codificada pelo vírus gerando assim uma forte resistência a infecção por vírus homólogos ou relacionados (HULL e DAVIES, 1992).

Um bom exemplo do sucesso da utilização da RDP mediada por RNA é o primeiro mamoeiro transgênico resistente PRSV obtido no início da década de 90 (FITCH *et al.*, 1992), onde resistência foi alcançada pela utilização do gene cp de um isolado havaiano de PRSV, e a planta transgênica mostrou-se resistente a este e a outros isolados havaianos, porém mostrou-se suscetível quando testados com isolados virais de outras regiões geográficas, inclusive o Brasil (TENNANT *et al.*, 1994). Este fato estimulou a Embrapa Mandioca e Fruticultura na Bahia, a realizar estudos em prol da obtenção de mamoeiro transgênico resistente aos isolados brasileiros de PRSV. Alguns dos mamoeiros transgênicos já obtidos, expressando o gene cp do isolado brasileiro, mostraram-se resistentes não somente ao isolado doador, como também a isolados do Havaí e da Tailândia (SOUZA JR., 1999).

Segundo Souza Jr. (1999) a resistência proveniente do gene da cp, opera através do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, sendo este mecanismo dependente da dosagem gênica (quanto maior a dosagem gênica maior é o espectro de resistência ao vírus) e do grau de homologia entre o gene da capa protéica (cp) utilizado no processo de transformação e o gene da cp dos diferentes isolados virais. Portanto a dependência de homologia para o sucesso da resistência mediada pelo RNA torna necessária a realização de estudos de variabilidade genética de um vírus vegetal que se pretende controlar.

5. METODOLOGIA

5.1 Coleta de Material Vegetal

Amostras de folhas de mamoeiro apresentando sintomas de infecção pelo vírus do amarelo letal foram coletadas em diferentes regiões produtoras de mamão nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte enquanto que, as amostras de látex de mamoeiros com sintomas de meleira foram coletadas nas regiões produtoras de mamão nos estados de Pernambuco, Espírito Santo, Bahia e Ceará.

5.2 Testes diagnósticos

Todas as amostras coletadas foram avaliadas para a presença do PLYV pelo teste de ELISA, utilizando anti-soro policlonal, enquanto que as amostras com sintomas de meleira foram testadas pela detecção do dsRNA viral.

5.2.1 Testes sorológicos

As amostras de mamão coletadas apresentando sintomas de PLYV foram avaliadas por meio do teste de ELISA indireto, seguindo os procedimentos descritos por Mowat e Dawson (1987). Poços de placas de ELISA foram cobertos com 100 µL de extratos obtidos de folhas infectadas ou de folhas sadias usadas como testemunhas, preparados em tampão carbonato de sódio pH 9.6, na proporção de 1:10 (p/v). Após incubação a 37°C por 1 h, foram efetuadas três lavagens com PBS-Tween pH 7.4 (PBS-T) e adicionado 100 µL do anti-soro correspondente diluído na proporção de 1:1000 em tampão de diluição (PBS-T com 2 % polivinilpirrolidona e 0,2 % de ovoalbumina). As placas foram incubadas novamente a 37°C por 1 h, e logo depois, lavadas com PBS-T. Em seguida, serão adicionados 100 µL de imunoglobulina (IgG) de cabra anti-IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina, diluída na proporção 1:2000, em tampão de diluição e novamente incubadas a 37°C

por 1 h. Após as lavagens com PBS-T, 100µL do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração de 0,5 mg/mL dissolvido em tampão (MgCl₂ 0,5 mM, pH 9.8, contendo 12 % de dietanolamina) foram depositados em todos os poços usados. As leituras foram realizadas utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm, em intervalos de 15 minutos, totalizando três leituras. Obedecendo ao critério adotado para as análises, foram consideradas positivas as reações que corresponderam ao dobro dos valores de absorbância registrados para os extratos de plantas sadias, usados como testemunhas.

5.2.2 Testes moleculares

As amostra de látex de plantas com sintomas de meleira foram testadas utilizando o método descrito por Tavares *et al.* (2004). Este método consistiu em diluir o látex retirado da planta ou fruto em 2 volumes (V) de tampão citrato de amônio 0,1 M, pH 6.5. Seguida da adição de 1 V de fenol saturado com Tris-HCl (pH 7.5), agitando-se vigorosamente por alguns segundos. Realizando-se logo após uma centrifugação a 8000 rpm por 4 min a temperatura ambiente para separar a fase fenólica da aquosa. A fase aquosa foi adicionada 0,1 V de acetato de sódio 3M (pH 5.2) e 2,5 V de etanol absoluto gelado (-20 °C), incubando no congelador ou freezer por 20 min. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12000 rpm por 20 min à temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante. O ácido nucléico precipitado permaneceu em repouso por 15 min ao ar livre para secar e depois foi ressuspendido em 20-50 µL de água livre de nucleases. A presença do dsRNA viral foi analisada em gel de agarose 1 %, utilizando-se como controle os ácidos nucléicos extraídos de látex de plantas de mamão sadio.

5.3 Análise da diversidade genética dos vírus da meleira e do amarelo letal do mamoeiro

5.3.1 Extração de RNA viral a partir de tecido vegetal infectado

A extração do RNA total de tecido foliar infectado por PLYV foi realizada com

o auxílio do reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total precipitado foi lavado com etanol 75%, seco ao ar e ressuspenso em 30 µL de água livre de nucleases. A qualidade do RNA total foi analisado em gel de agarose a 1% sendo em seguida acondicionado no ultra-freezer (-80 °C) até seu uso nas etapas de amplificação por RT-PCR. A extração do dsRNA do PMeV foi realizada a partir de látex, conforme descrito no item 5.2.2

5.3.2 Amplificação, clonagem e análise das sequências

As amostras com resultado positivo na detecção para PLYV e PMeV foram armazenadas em freezer para fazer parte da coleção de isolados do CNPMF. Para o estudo de variabilidade genética, os isolados de PMeV e PLYV selecionados tiveram um fragmento do genoma amplificado por RT-PCR, clonado e sequenciado. No caso do PMeV a região utilizada na amplificação foi a que codifica o gene da RNA polimerase dependente de dsRNA (dsRdRp), e para o PLYV foi a região da polimerase- dsRdRp juntamente com a região que codifica para o gene cp. Esta escolha está baseada na disponibilidade de amplificação destas regiões pelos oligonucleotídeos atualmente descritos na literatura.

Para a detecção do PMeV, foi utilizado o oligonucleotídeo PMeV 03-5 (5'-ACCACAATGGGTATTTAAAG-3') (ARAÚJO *et al.*, 2007) e para o PLYV os oligonucleotídeos PLYV-3F (5'-GGTTCGTGTCTCTCCT-3') e PLYV-4R (5'-GGGCGGGAAAGAGTACAG-3') (SILVA, 1996).

Para transcrever o cDNA a partir do RNA viral foram adicionados em um microtubo 5 µg de RNA viral, 2 pmol do oligonucleotídeo específico ao vírus e água livre de nucleases completando o volume para 12 µL a reação foi incubada por 5 min a 65°C, sendo transferida imediatamente ao gelo. Em seguida, foi adicionado 4µL do tampão da reação, 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 2 µL de ditiotretitol (0,1M) e 1 µL (200u) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A solução foi incubada a 37°C por 1 h e em seguida, a 70°C por 10 min.

Na reação de PCR foram utilizados 2,5 µL do cDNA, 5µL do tampão da PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL dos

dNTPs (10 mM), 0,5 μ M de cada 'primer', 0,5 μ L (5 u/ μ L) da Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), e o volume foi completado para 50 μ L com água ultra-pura. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a clonagem dos fragmentos amplificados foi utilizado o "kit TOPO TA Cloning" (Invitrogen), seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante. Cerca de 2 μ L da reação de ligação foi utilizada para a transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α pelo método do choque térmico e plaqueadas em meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) com ampicilina (100 mg/mL), acrescido de IPTG e X-Gal. As colônias recombinantes foram identificadas e transferidas para meio LB líquido com ampicilina (100 mg/mL) e incubadas a 37 °C durante 12 horas a 250 rpm. A clonagem foi confirmada por meio de extração dos plasmídeos (ZHOU *et al.*, 1990), clivagem com a enzima *Eco*RI e análise por eletroforese em gel de agarose 1%.a fim de comprovar a presença e tamanho do inserto.

Os clones confirmados foram mantidos em *E. coli*, na forma de culturas armazenadas a -80 °C na presença de glicerol. Os plasmídeos recombinantes foram enviados para sequenciamento em empresas especializadas.

As sequências obtidas dos diferentes isolados de PLYV e de PMeV foram analisadas, comparadas entre si e com as sequências já depositadas no Banco de dados público, e alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw).

Árvores filogenéticas foram preparadas utilizando-se o programa MEGA (www.megasoftware.net). O método de Neighbor-Joining e bootstrap com 500 repetições foi utilizado para gerar a árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de nucleotídeos da replicase do PMeV, e o método "UPGMA" e bootstrap com 500 repetições foi utilizado na geração da árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências parciais de aminoácidos da replicase do PLYV.

6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

6.1 Estudo da variabilidade genética do PLYV

As coletas das amostras com sintomas típicos de infecção pelo PLYV foram realizadas em diferentes regiões produtoras de mamão no Ceará e Rio Grande do Norte, obteve-se 28 amostras, das quais 22 se mostraram infectadas pelo PLYV após a realização do teste de ELISA e amplificação do fragmento viral por RT-PCR e a partir de então cada uma destas amostras foi considerada como um isolado viral. Dos 22 isolados obtidos, apenas 10 provenientes do Ceará foram utilizados neste estudo, os quais encontram-se listados na Tabela 1. O fragmento genômico amplificado por RT-PCR (Figura 1A) possui aproximadamente 1000 pb e contém a região 5' do gene cp e a região 3' do gene RdRp. O fragmento amplificado foi clonado e a confirmação da clonagem foi realizada pela digestão do plasmídeo com a enzima de restrição *Eco* RI (Figura 1 B). Após a confirmação da clonagem o material foi enviado para sequenciamento.

Tabela 1: Localidades onde foram coletados os isolados de PLYV utilizados neste estudo

| Isolados | Local de coleta |
|-----------------|---|
| PLYV-1 | Paraipaba 1 |
| PLYV-3 | Paraipaba 2 |
| PLYV-7 | Distrito de Itatinga –Quixeré-1 |
| PLYV-8 | Distrito de Itatinga –Quixeré-2 |
| PLYV-9 | Distrito de Boa Esperança – Quixeré-1 |
| PLYV-11 | Distrito de Boa Esperança – Quixeré-2 |
| PLYV-14 | Distrito de Oiticica dos Mirandas – Quixeré |
| PLYV-19 | Perímetro Irrigado (C136/3C2)- Baixo Acaraú-1 |
| PLYV-20 | Perímetro Irrigado (C136/3C2)- Baixo Acaraú-2 |
| PLYV-21 | Baixo Acaraú |

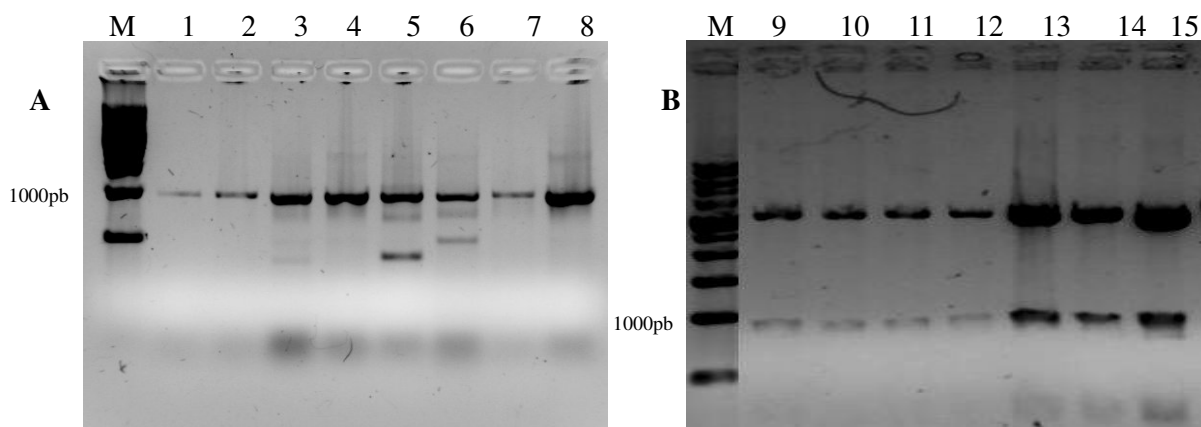


Figura 1: (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral a partir do RNA total extraído das amostras de mamoeiros com sintomas do amarelo letal (linhas 1 à 8). **(B)** Os fragmentos amplificados foram clonados e a confirmação foi realizada por meio da clivagem com a enzima de restrição *Eco* RI, liberando o fragmento amplificado (linhas 11 à 15). M, marcador de peso molecular 1kb.

6.2 Análise das sequências genômicas do PLYV

No primeiro momento, as sequências obtidas foram comparadas as depositadas no banco mundial de sequências (GenBank). As análises das sequências nucleotídicas parciais dos genes RdRp e CP foram realizadas separadamente. Verificou-se que as sequências nucleotídicas de ambos os genes, cp e RdRp do isolado PLYV-1, apresentaram maior identidade com as espécies de Sobemovírus, comparado ao Tombusvírus. Contudo o nível de identidade entre os genes analisados variaram, com o gene RdRp apresentando uma identidade de 69% com relação ao *Rice yellow mottle virus* (RYMV) e *Sesbania mosaic virus* (SeMV), e de 68% com o *Southern bean mosaic virus* estirpe São Paulo (SBMV), enquanto que o gene CP apresentou valores inferiores: SeMV (45%), SBMV (45%) e *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV) (43%). Verificou-se também o grau de identidade entre a região que codifica para o gene RdRp e cp do isolado PLYV-1 com a região correspondente ao do tombusvírus *Tomato Sunshy stunt vírus* (TBSV) foi de 42% para ambos (Tabela 2). Inicialmente acreditava-se que o PLYV pertencia ao gênero *Tombusvirus*, porém estudos mais aprimorados de caracterização molecular afloraram as suspeitas de o PLYV pertencer ao gênero *Sobemovirus*. Estudos moleculares desenvolvidos por Silva *et al.* (2000) e por Nascimento *et al.* (2010)

corroboram os resultados encontrados neste trabalho, e afirmam ser o PLYV um possível Sobemovírus.

A análise das sequências nucleotídicas demonstrou uma alta conservação entre os diferentes isolados do PLYV, indicando ser esta uma sequência que codifica regiões importantes dos genes RdRp e CP. Visando verificar se a elevada identidade se mantinha na sequência das proteínas virais, foram obtidas as sequências parciais de aminoácidos deduzidos das proteínas RdRp e CP. A análise comparativa demonstrou uma elevada conservação entre os isolados em ambas as proteínas, entretanto, a identidade entre as sequências das proteínas foi menor do que o observado para a sequência do RNA viral. A menor identidade entre as proteínas RdRp foi de 94% e as proteínas CP foi de 89%, ambas entre os isolados 19 e 20 (Tabela 3).

As sequências de aminoácidos da RdRp e CP dos isolados foram alinhadas para possibilitar a geração de árvores filogenéticas. As árvores geradas com base nos alinhamentos apresentaram uma topologia similar para ambas as proteínas, com os isolados mantendo-se nos mesmos ramos e formando os mesmos grupos, assim optamos por mostrar somente a árvore filogenética correspondente às sequências da RdRp (Figura 2).

Tabela 2: Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos do fragmento correspondendo aos genes RdRp ou CP do PLYV-1 e Sobemovírus relacionados.

| | RdRp* | CP** |
|--------------|--------------|-------------|
| TBSV | 42 | 42 |
| RMoV | 65 | 42 |
| RYMoV | 65 | 41 |
| SBMV | 62 | 44 |
| SesMV | 65 | 45 |
| SCMoV | 64 | 43 |
| TuRV | 65 | 42 |

*Identidade do gene RdRp (419nt) ** Identidade do gene CP (678nt)

Tabela 3: Identidade entre as sequências de aminoácidos das proteínas RdRp (valores acima da diagonal) e CP (valores abaixo da diagonal) dos dez isolados do PLYV coletados em diferentes localidades do estado do Ceará.

| Isolados | 1 | 3 | 7 | 8 | 9 | 11 | 14 | 19 | 20 | 21 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|
| PLYV-1 | █ | 100 | 100 | 100 | 99 | 100 | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-3 | 99 | █ | 100 | 100 | 99 | 100 | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-7 | 99 | 100 | █ | 100 | 99 | 100 | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-8 | 100 | 99 | 99 | █ | 99 | 100 | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-9 | 99 | 98 | 98 | 99 | █ | 99 | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-11 | 100 | 99 | 99 | 100 | 99 | █ | 99 | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-14 | 99 | 98 | 98 | 99 | 100 | 99 | █ | 98 | 95 | 95 |
| PLYV-19 | 92 | 91 | 91 | 92 | 91 | 92 | 91 | █ | 94 | 94 |
| PLYV-20 | 97 | 96 | 96 | 97 | 96 | 97 | 96 | 89 | █ | 100 |
| PLYV-21 | 97 | 96 | 96 | 97 | 96 | 97 | 96 | 89 | 100 | █ |

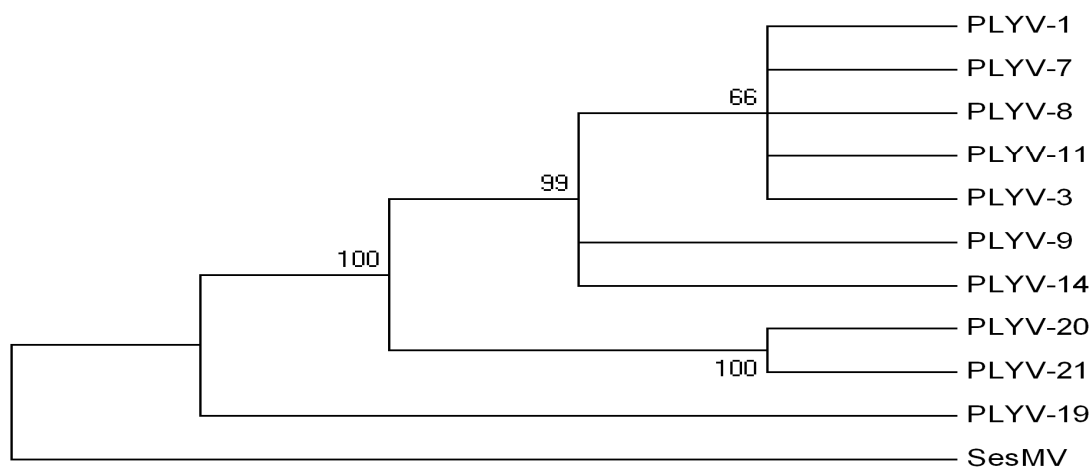


Figura 2. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína RdRp dos isolados de “Papaya lethal yellow vírus” (PLYV). Foi utilizado o método “UPGMA” e bootstrap com 500 repetições, *Sesbania mosaic vírus*- SeMV (Banco de dados público n°: NP066393.2).

6.3 Estudo da variabilidade genética do PMeV

A coleta de amostras de látex de plantas com sintomas típicos de meleira foram realizadas em diferentes propriedades produtoras dos estados do ES, BA e CE. Devido à alta incidência do PMeV, foram coletadas diversas amostras em cada uma das propriedades visitadas, totalizando 188 amostras. A partir da extração de

RNA total das amostras de látex pode-se verificar que 100% das amostras analisadas mostraram-se positivas para a presença do vírus (Figura 3) e então cada amostra foi considerada como um isolado viral diferente. Foram escolhidos aleatoriamente isolados de algumas regiões levantadas para os trabalhos iniciais de análise molecular e estudo da variabilidade genética (Tabela 4).

Foram amplificados dois fragmentos genômicos, o de tamanho esperado, com aproximadamente 600 pb e um segundo de 500 pb. Dentre os 20 isolados que tiveram o fragmento desejado amplificado e clonado quatro estão representados na (Figura 4 A e B) respectivamente. Destes somente seis foram sequenciados até o momento.

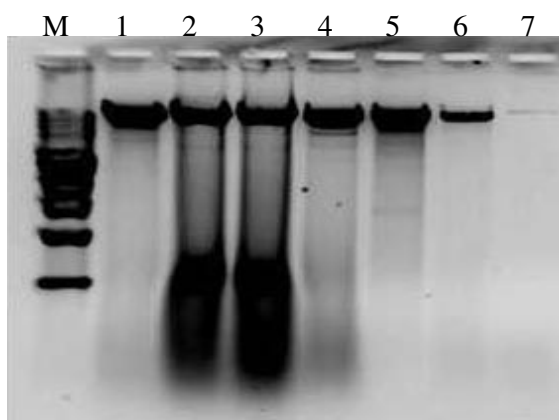


Figura 3: Extração de RNA total para verificar a presença de dsRNA do vírus PMeV. M é o marcador de peso molecular 1Kb, as amostras do número 1 ao 6 são as amostras infectadas e a sétima é a amostra sadia.

Tabela 4: Localidades onde foram coletados os isolados do PMeV

| Isolados virais | Local de coleta |
|-----------------|-------------------|
| PMeV-2 | Eunápolis – BA |
| PMeV-23 | Sooretama – ES |
| PMeV-27 | Quixeré –CE |
| PMeV-36 | Bebedouro – ES |
| PMeV- 47 | Miguel Calmon –BA |
| PMeV-157 | Juazeiro –BA |
| PMeV-Man* | Espírito Santo |

*Sequência incorporada ao trabalho. Fonte: Araújo *et al.* 2007

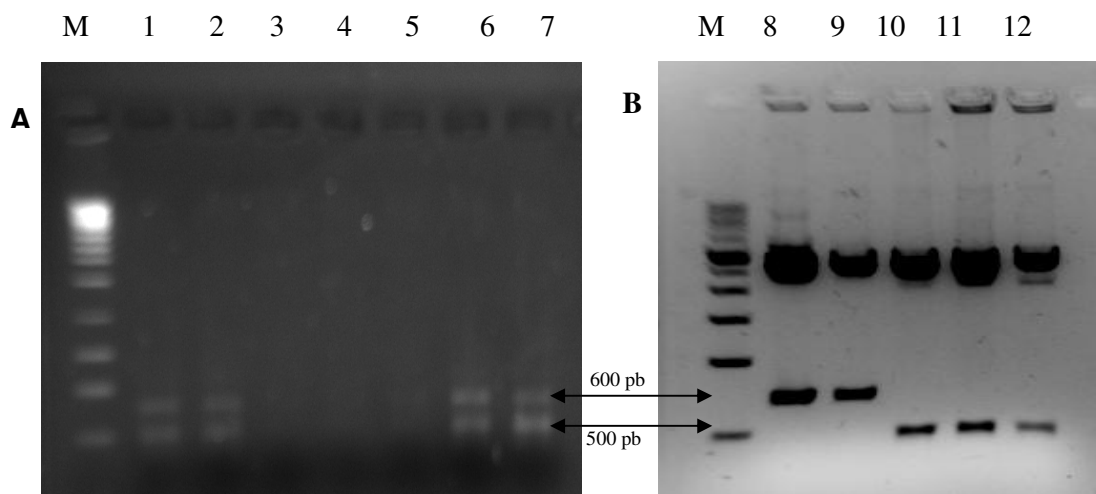


Figura 4: (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral a partir do RNA total extraído das amostras de mamoeiros com sintomas de meleira (linhas 1,2, 6 e 7), amostras sadias (3, 4, e 5). (B) Os fragmentos amplificados foram clonados e a confirmação foi realizada por meio da clivagem com a enzima de restrição, liberando o fragmento amplificado (linhas 8,9,10, 11 e 12). M, marcador de peso molecular 1kb.

6.4 Análise das sequências genômicas do PMeV

As sequências obtidas foram comparadas às depositadas no banco mundial de sequências (GenBank). A análise comparativa da sequência de aminoácidos deduzidas não identificou nenhuma outra proteína de vírus de planta com similaridade à do PMeV, Entretanto, foi identificada uma baixa identidade com uma proteína de replicação (RdRp) de espécies de vírus que possuem genoma composto de dsRNA, porém que infectam fungos, como o Phlebiopsis gigantea mycovirus - PGV, Diplodia scrobiculata virus e Fusarium graminearum mycovirus-3, resultado que reforça a hipótese levantada por Maciel-Zambolin *et al.* (2003) que afirmou ser o PMeV um vírus bastante distinto de qualquer outro vírus de planta já descrito, esta identidade pode indicar a possível origem deste patógeno que até anos atrás não se associava a cultura do mamão.

Posteriormente foi realizada uma análise comparativa entre as sequências de nucleotídeos dos isolados. Nesta análise foi utilizada a sequência de um isolado (denominado de PMeV-Man) obtida por Araújo *et al.* (2007). Foi observada uma

conservação relativamente alta, variando entre 72-99% (Tabela 5). Visando verificar se conservação se mantinha na sequência da proteína codificada, foram então comparadas as sequências parciais de aminoácidos deduzidos da proteína RdRp, verificando que o nível de identidade entre os isolados nesta região da proteína se mantinha similar ao observado para nucleotídeo, variando entre 79-99% (Tabela 5). O isolado 2 foi o que apresentou o menor grau de identidade quando comparado aos demais isolados, tanto a nível de nucleotídeo quanto de aminoácidos, variando de 72-79 e de 79-80%, respectivamente.

As sequências de nucleotídeos dos isolados foram alinhadas para possibilitar a geração de árvores filogenéticas. As árvores apresentaram uma topologia que não demonstrou agrupamento dos isolados por região geográfica o agrupamento dos isolados estão baseados no grau de identidade existente entre eles. É possível que o sequenciamento de um número maior de isolados possibilite uma melhor compreensão das relações entre isolados e suas respectivas regiões geográficas (Figura 5).

Tabela 5 Identidade das sequência de nucleotídeo da proteína RdRp (valores abaixo da diagonal) e da sequência de aminoácidos (valores acima da diagonal) de sete isolados do PMeV, coletados nos estados Ceará, Bahia e Espírito Santo, e um isolado do Phlebiopsis gigantea mycovirus - PGV

| Isolados | 2 | 23 | 27 | 36 | 47 | 157 | PMeV-Man | PGV |
|----------|----|----|----|----|----|-----|----------|-----|
| PMeV-2 | | 80 | 80 | 79 | 80 | | 79 | 38 |
| PMeV-23 | 77 | | 97 | 89 | 97 | | 89 | 39 |
| PMeV-27 | 72 | 99 | | 92 | 99 | | 92 | 31 |
| PMeV-36 | 79 | 89 | 88 | | 91 | | 94 | 32 |
| PMeV-47 | 72 | 99 | 99 | 88 | | | 91 | 31 |
| PMeV-157 | 74 | 74 | 84 | 85 | 84 | | | |
| PMeV-Man | 79 | 90 | 90 | 95 | 90 | 82 | | 32 |
| PGV | | 28 | 30 | 20 | 30 | 36 | 34 | |

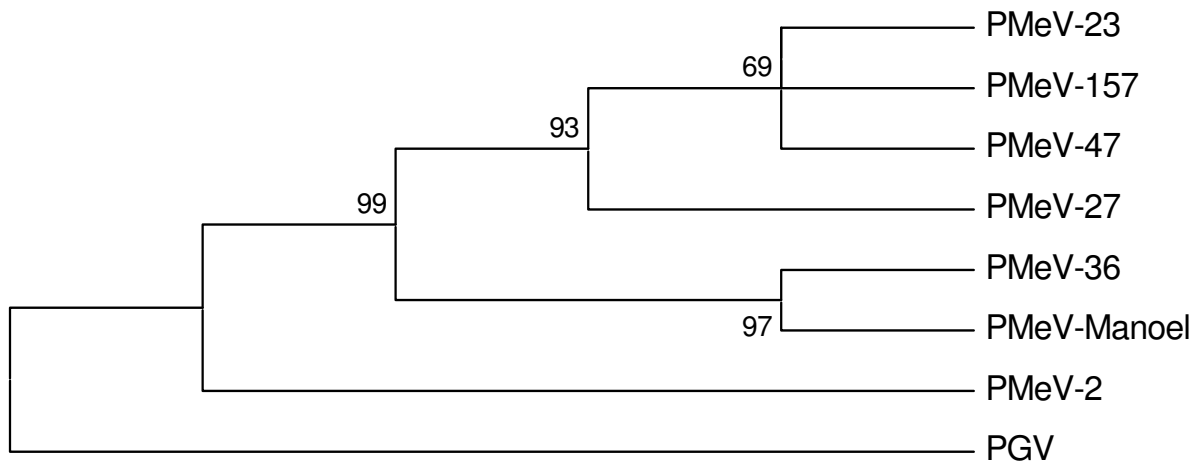


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene RdRp dos isolados de “Papaya meleira vírus” (PMeV). Foi utilizado o método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 500 repetições. Phlebiopsis gigantea mycovirus- PGV (Banco de dados público n°: CAJ34335.2)

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultado da comparação das sequências nucleotídicas dos genes cp e RdRp do vírus do amarelo letal com as sequências depositadas no Banco de dados indicam que provavelmente o PLYV seja membro do gênero *Sobemovirus*. As sequências analisadas são altamente conservadas entre os diferentes isolados virais indicando que esta região do genoma viral codifica partes importantes das proteínas RdRp e CP, podendo ser úteis no desenvolvimento de estratégias de resistência baseada na geração de plantas transgênicas.

As análises moleculares iniciais indicam que o PMeV é uma espécie de vírus distinto de outros vírus vegetais já descritos, assemelhando-se com espécies virais que infetam fungos. Evidências como o tamanho e a composição do genoma, o grau de identidade observado entre as sequências de nucleotídeos da replicase do PMeV com as sequências correspondentes de diferentes vírus que infectam fungo, tais como, *Phlebiopsis gigantea mycovirus*, *Diplodia scrobiculata virus* e *Fusarium graminearum mycovirus-3* reforçam esta hipótese. Possivelmente o PMeV pode ter sido originado de uma alteração genética em um vírus que infecta fungo que então passou se replicar no mamoeiro.

A comparação das sequências nucleotídicas dos diferentes isolados do PMeV demonstrou uma maior variabilidade entre os isolados, porém pôde-se observar a ocorrência de regiões dentro do fragmento analisado que possuem elevada conservação e que também poderão ser úteis para o desenvolvimento de um controle baseado na produção de plantas transgênicas resistentes a esta virose. Espera-se que o aumento no número de isolados sequenciados possibilite estudos mais aprofundados com relação à determinação de grupos de isolados relacionados a regiões produtoras do Brasil.

8. BIBLIOGRAFIA

ABEL, P.P.; NELSON, R.S.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v.232, p. 738-743, 1986.

ARAÚJO, M.M.M.; TAVARES, E.T.; DA SILVA, F.R.; MARINHO, V.L.A.; SOUZA JR., M.T. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the látex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**. (146), p. 305-310. 2007.

BARBIERI, R.L.; DE CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C. Importância, problemas e perspectivas do melhoramento visando resistência a viroses em plantas. **Ciência Rural**, v.25, n.3. Santa Maria, 1995.

BARBOSA, C.J., MEISSNER FILHO, P.E. & HABIBE, T.C. A meleira do mamoeiro. *Bahia Agrícola* 2:57. 1998a. (Resumo)

BARBOSA, C.J., MEISSNER FILHO, P.E., HABIBE, T.C., PATROCÍNIO, E., TATAGIBA, J., NASCIMENTO, A.S. & MATRANGOLO, W.J.R. Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com a meleira. **Summa Phytopathologica** 24:60. 1998b. (Resumo)

BEACHY, R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 215-220, 1997.

BENASSI, A.C., 2006. Disponível em : <<http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=14291>>. Acesso dia 14/11/2010.

BUCK, K.W. Virus resistance. In: Plant genetic engineering. New York: Chapman and Hall, 1991.

CAMARÇO, R.F.E.A., LIMA, J.A.A., PIO-RIBEIRO, G. & ANDRADE, G.P. Ocorrência do papaya lethal yellowing virus no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira** (29) p.423. 1996. (Resumo).

CLARK, W.G.; FITCHEN, J.M.; BEACHY, R.N. Studies of coat protein mediated resistance to TMV. **Virology**, v. 208, p.485-491, 1995.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. Identification of distinct potyviruses in mildly infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Phytopathology**, St. Paul, MN, USA, v. 84, p. 65-69, 1994.

COSTA, C.L. Inter-relações dos insetos vetores com vírus de plantas frutíferas cultivadas no Brasil. In Zambolim, L. (Ed.) Manejo Integrado – Fruteiras Tropicais. Doenças e Pragas. Viçosa, UFV. p.105-153. 2002.

DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; RODRIGUES, J.D.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Padronização da metodologia do RT-PCR utilizado para identificação do mRNA da α -amilase em sementes de milho. **Rev. bras. Sementes**. v.24. nº2. Pelotas 2002.

DANTAS, J. L. L. ; SOUZA, J. S. ; PINTO, R. M. S.; LIMA, J. F. Variabilidade genética e melhoramento do mamoeiro. In: Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, 1999, Petrolina. Embrapa Semi-árido. p. 1-CDROM

FAO - Food and Agriculture Organization: Disponível em <<http://www.fao.org>> Acessado em 23/05/2010.

FITCH, M.M., MANSHARDT, R.M., GONSALVES. D., SLIGHTOM, J.L & SANFORD, J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. **Bio-Technology** 10:1466-1472. 1992.

GONSALVES, D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. **AgBioForum**, 7(1&2): 36-40. 2004

HULL, R. Resistance to plant viruses: obtaining genes by non-convencional approaches. **Euphytica**, Wageningen, v. 75, p. 195-205, 1994.

HULL, R.; DAVIES, J.W. Approaches to non convencional control of plant virus diseases. **Critical Review in Plant Science**, v. 11, p. 17-33, 1992.

IBGE, 2008. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acessado em 23.09.2010.

KITAJIMA, E.W. Taxonomia de vírus. In: de AZEVEDO, J.L. e VAZOLLER, R.F. Taxonomia microbiana. **Genomics and Taxonomy for All**. Nature 2002; 417 (6889): 573.

LIMA, J.A.A. & SANTOS, C.D.G. Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. **Fitopatologia Brasileira** 16:27. 1991.

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

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**, Brasília, 19(3). p.437-441.1994.

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

MACIEL-ZAMBOLIM, E., S. KUNIEDA-ALONSO, K. MATSUOKA, M.G. DE CARVALHO and F.M. ZERBINI. Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathol.** (52) p. 389-394. 2003.

MATHEWS, R.E.F. **Fundamentals of plant virology**. San Diego: Academic Press, p. 403. 1992.

MAYER, N.A., RONCATTO, G. TODA FRUTA: Variedades e Seleção de Plantas Matrizes de Mamoeiro (Carica papaya L.). ,2004 Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/todafruta>>. Acesso dia: 15 de agosto de 2010

MEISSNER FILHO, P.E. Vírus X do Patchuli. Caracterização biológica e molecular Brasília..Universidade de Brasília. p.172-196.1996. Dissertação (Tese de Doutorado)

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virology Methods** 15: 233-247. 1987.

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

NASCIMENTO, A. S. et al.. Transmissibilidade da meleira do mamoeiro. Congresso Brasileiro de Fruticultura, 15:491.1998, (Resumos)

NASCIMENTO, A.K.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.L.L.; BESERRAJR., E.A. Biological, Physical, and Molecular Properties of a *Papaya lethal yellowing virus* Isolate. **Plant Disease**. v. 94, n. 10. p. 1206 - 1212. 2010.

NASCIMENTO, A.L.L.; LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; GONÇALVES, M.F.B. Sorologia e sobrevivência do vírus do amarelo letal do mamoeiro. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 448-455, jul-set, 2010.

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

RAMOS, N.F., NASCIMENTO, A.K.Q., Maria Fátima B. GONÇALVES, M.F.B., e LIMA, J.A.A. Presença dos vírus da mancha anelar e do amarelo letal em frutos de mamoeiro comercializados. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, 6, p. 449-452. 2008.

REZENDE, J.A.M. & COSTA, A.S. Controle do mosaico do mamoeiro por premunização: sucessos e dificuldades. **Fitopatologia Brasileira** 18:258. 1993.

REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Agronômica Ceres**. Ed. 4, v.2, p.435-443. 2005.

RODRIGUES, C.H., ALVES, F.L., MARIN, S.L.D., MAFFIA, L.A, VENTURA, J.A. & GUTIERREZ, A.S.D. Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. In: Selecta de Trabalhos sobre a Meleira do mamoeiro. Linhares, EMCAPA. 1989a.

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

RODRIGUES, S.P. Bioquímica e Biologia molecular da Interação entre o Papaya meleira vírus (PMeV) e o mamoeiro (*Carica papaya* L.). Universidade Federal do Espírito Santo, 2006. Dissertação de mestrado. Disponível em: <http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/21278313.html>. Acessado dia 26/09/2010

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**, 31(3). p. 273 -275. 2005.

RODRIGUES, S.P.; ANDRADE, J.S.; VENTURA, J.A.; LINDSEY, G.G; FERNANDES, P.M.B. Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *trialeurodes variabilis*. **Journal of Plant Pathology** (2009), 91 (1), 87-91 *Edizioni ETS Pisa*, (87) 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SARAIVA, A.C.M., PAIVA, W.O., RABELO FILHO, F.A.C., LIMA, J.A.A. Transmissão por mãos contaminadas e ausência de transmissão embrionária do vírus do amarelo letal do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 31:79-83. 2006.

SILVA da, A.M.R. "Papaya lethal yellowing virus": Caracterização biológica e molecular. Brasília:UnB, p.122. 1996 (Dissertação, Mestrado).

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** 11:196.2000 (Abstract).

SOUZA JR., M. T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. (Ph.D. Dissertation). Ithaca. Cornell University. 1999.

SOUZA JR., M.T. & GONSALVES, D. Genetic engineering resistance to plant virus diseases. an effort to control papaya ringspot potyvirus in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 24:485-502. 1999.

TENNANT, P. F., GONSALVES, C., LING, K. S., FITCH, M. M. M., MANSHARDT, R., SLIGHTOM, J. L. & GONSALVES, D. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. **Phytopathology** 84(11): 1359-1366. 1994.

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

VIDAL, C.A.; NASCIMENTO, A.S.; BARBOSA, C.J.; MARQUES, O.M.; HABIBE T.C. Experimental transmission of "sticky disease" of papaya by *Bemisia argentifolli* (Bellows & Perring). 21st International Congress of Entomology, Foz do Iguaçu. p.819, 2000.

VIDAL, C.A.; NASCIMENTO, A.S., HABIBE, T.C. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por insetos. **Magistra** 17(2):101-106. 2005

ZAMBOLIM, E.M.; ALONSO, S. K.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p.389- 394, 2003.

ZERBINI, F.M. & ALFENAS-ZERBINI, P. Métodos em Virologia Vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em Fitopatologia. Viçosa. Ed. UFV. 1ªed. cap. 12, p. 293-358, 2007.

ZERBINI, F.M.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. Princípios e Técnicas de Diagnose aplicados em Fitovirologia. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 95-124, 2001.

ZHOU, C., YANG, Y., JONG, A.Y. Mini-prep in ten minute. **Biotechniques**, Natick, v.8, n. 2, p. 172-173, 1990.