

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENOMA E
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO “Papaya
meleira virus”**

CLEIDIANE BORGES DALTRO

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

ABRIL - 2013

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENOMA E
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DO “Papaya
meleira virus”**

CLEIDIANE BORGES DALTRO

BIÓLOGA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA, 2011.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade

Co-orientador: Paulo Ernesto Meissner Filho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

ABRIL - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

D152c

Daltro, Cleidiane Borges.

Caracterização molecular parcial do genoma e estudo da diversidade genética de isolados do “Papaya meleira virus” / Cleidiane Borges Daltro._ Cruz das Almas, BA, 2013.
70f.; il.

Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade.

Coorientador: Paulo Ernesto Meissner Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Mamão – Fitossanidade – Virologia. 2.Variabilidade genética – Vírus. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 632.8

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Cleidiane Borges Daltro

Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Co-orientador)

Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dra. Cristiane de Jesus Barbosa
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia
Agrícola em _____

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que
você não conhece como eu mergulhei. Não se
preocupe em entender, viver ultrapassa
qualquer entendimento.”

(Clarice Lispector)

“Não quero ter a terrível limitação de quem
vive apenas do que é passível de fazer
sentido.”

(Clarice Lispector)

À Deus e à minha Família,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado e direcionado até aqui, possibilitando o meu crescimento científico e profissional;

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos no decorrer do curso de Mestrado;

Aos professores do Mestrado em Microbiologia Agrícola, por compartilhar os seus conhecimentos e experiências profissionais;

Ao Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade, meu orientador, por conduzir com excelência este trabalho, pela amizade, confiança e dedicação durante os cinco anos de minha formação acadêmica;

À Dra. Poliane Alfenas-Zerbini e ao Dr. Francisco Murilo Zerbini, por permitirem a realização de atividades de pesquisa no laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura por disponibilizar toda infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho;

À minha mãe, irmãos, tios, primos, avós, padrinho pelo amor, compreensão, dedicação e encorajamento, dando-me forças para continuar em busca de mais uma vitória;

Ao meu namorado, Joilson Alves Moreira, pelo amor, carinho e força;

Aos colegas de curso que me acompanharam nessa jornada;

A todos os colegas do laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Adriana, Alessandra, Almir, João Paulo, Karinna, Keilla, Neide, Taylane, Taylan.

Aos amigos, pesquisadores e colaboradores: Paulo Ernesto Meissner Filho, Emanuel Felipe Medeiros Abreu e Cristiane de Jesus Barbosa

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	1
INTRODUÇÃO GERAL	3
REVISÃO DE LITERATURA	5
<i>Carica papaya L.</i> - Aspectos gerais.....	5
Doenças de etiologia viral que afetam o mamoeiro no Brasil.....	6
Meleira do mamoeiro.....	10
Aspectos evolutivos gerais dos vírus de dsRNA	13
BIBLIOGRAFIA	19
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO “Papaya Meleira virus”	26
RESUMO	27
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES.....	40
BIBLIOGRAFIA	41
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO “Papaya meleira virus”	426
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....	51
CONCLUSÕES.....	40
BIBLIOGRAFIA	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.	62

RESUMO

Daltro, C.B. Caracterização molecular parcial do genoma e estudo da diversidade genética de isolados do “Papaya meleira virus”.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma fruteira tropical de grande importância econômica e social para o Brasil e demais países produtores. O aumento na produtividade da cultura é negativamente influenciado por diferentes agentes fitopatogênicos. As viroses estão entre as doenças de maior importância fitossanitária. A meleira do mamoeiro, causada pelo “Papaya meleira virus” (PMeV), foi relatada pela primeira vez na década de 80, e atualmente é considerada o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. A doença é caracterizada pela exsudação espontânea de látex dos frutos, que ao se oxidar confere um aspecto “melado”. Apesar de sua importância econômica, informações básicas sobre o vírus, como a constituição e organização do seu genoma, sua classificação taxonômica ainda não foram determinadas. Os objetivos deste trabalho foram a caracterização molecular parcial do PMeV e estudar a diversidade genética entre isolados, com base em uma sequência parcial do gene da replicase viral (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp). As informações moleculares da sequência genômica parcial revelaram a presença de dois genes, um com função desconhecida e outro apresentando similaridade com a RdRp. A análise comparativa destes genes demonstrou uma relação filogenética do PMeV com diferentes mycovirus com genoma de dsRNA. A RdRp do PMeV compartilha identidade de aminoácidos de 32 % com o *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2). Além disso, foram identificados na sequência da RdRp do PMeV, oito motivos conservados presentes em RdRps de vírus com genoma de dsRNA. O estudo da diversidade genética revelou uma conservação acima de 88 % e 90 % nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente entre os isolados de PMeV. Na análise filogenética não foi possível observar o agrupamento dos isolados de acordo com a região onde foram coletados. Os resultados obtidos indicam que apesar do PMeV infectar plantas, possui características moleculares únicas entre os vírus de planta descritos até o momento.

ABSTRACT

Daltro, C.B. Partial molecular characterization of genome and genetic diversity of isolates of the "Papaya meleira virus."

The papaya, *Carica papaya* L. is a tropical fruit of great economic and social importance for Brazil and other producing countries. The increase in crop productivity is negatively influenced by various pathogenic agents. The viruses are among the most important plant diseases. The papaya sticky disease, caused by "Papaya meleira virus" (PMeV), was first reported in the 1980's, and nowadays is considered the main phytosanitary problem to the crop in Brazil. The disease is characterized by a natural exudation of watery latex on the fruit surface, which oxidizes and gives the fruit a stained and sticky aspect. Even with its economic importance, basic information about the virus, like the constitution and genome organization, taxonomic positioning weren't determined. The objectives of this work were to obtain the complete genome sequence to determine your taxonomic classification and study the genetic diversity among isolates, based on a partial sequence of viral replicase (RNA dependent RNA polymerase, RdRp). The genetic diversity study demonstrates a conservation above of 88 % and 90 % in the nucleotide and amino acid sequences, respectively among PMeV isolates. The phylogenetic analysis do not shows the clustering of isolates from the same region of collection. Collectively, the results indicate that besides PMeV infect plants, it has unique molecular characteristics among plant viruses described to date. The partial molecular information obtained from genomic sequence revealed the presence of two genes, one without know function and another with similarity with RdRps. The comparative analysis of these genes indicates a phylogenetic relationship between PMeV and dsRNA mycoviruses. PMeV RdRp share 32 % aminoacid identity with *Phlebiopsis gigantea* mycovirus dsRNA 2 (PgV-2). Furthermore, were identified in the PMeV RdRp sequence, eight conserved motifs present in RdRps from dsRNA virus. The results obtained indicate that although PMeV infect plants, has molecular features more closely to mycovirus than plant viruses described to date.

INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura brasileira avançou nos últimos anos, favorecida principalmente pelo uso de novas tecnologias de produção, que ampliaram a área de cultivo e elevaram a produtividade. A produção de fruteiras vem atingindo de forma mais expressiva o mercado interno e conquistando novos mercados internacionais. É considerada uma das atividades com grande perspectiva de crescimento e expansão, uma vez que, além das condições edafo-climáticas favoráveis, há também a grande disponibilidade de área agricultável, o que permite a atração e instalação de agroindústrias (FACHINELLO et al., 2011).

O Nordeste brasileiro é uma das principais regiões responsáveis pela expansão da fruticultura por apresentar grande potencial para a produção de diferentes espécies de fruteiras tipicamente tropicais, em especial o mamão (*Carica papaya* L.), que atualmente representa uma das atividades agrícolas de maior expressão econômica em comparação às demais regiões produtoras brasileiras. O Nordeste é responsável por 63,34 % da produção nacional e o estado da Bahia é o maior produtor de mamão do país, com 50 % da produção nacional (IBGE, 2011).

Diferentes fatores bióticos influenciam negativamente a expansão da produtividade do mamoeiro. A planta é afetada por várias espécies de pragas e fitopatógenos. Os ácaros são as pragas de maior importância fitossanitária (OECD 2003). Entre os fitopatógenos, as viroses constituem o principal grupo de doenças que se manifestam no mamoeiro, podendo ocasionar a destruição total de plantios levando ao abandono das áreas produtoras de mamão (LIMA e LIMA, 2002).

Os principais vírus que infectam o mamoeiro no Brasil são: o vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus*, PRSV-P) (PURCIFULL et al., 1984), o vírus do amarelo letal ("Papaya lethal yellowing vírus", PLYV) (LORETO et al., 1983) e o vírus da meleira ("Papaya meleira vírus", PMeV) (RODRIGUES et al., 1989; KITAJIMA et al., 1993).

A meleira foi descrita pela primeira vez na década de 80 em pomares no sul da Bahia (NAKAGAWA et al., 1987) e norte do Espírito Santo (RODRIGUES

et al., 1989a; b) e posteriormente nos estados de Pernambuco e Ceará (BARBOSA et al., 1998a, b). O sintoma característico da doença é a exsudação espontânea de látex nos frutos que posteriormente se oxida, resultando em um aspecto “borrado” e “melado” (RODRIGUES, 2006).

Inicialmente, a etiologia da doença foi controversa, atribuindo-se a causas abióticas. Entretanto, observações de microscopia eletrônica de transmissão, e o isolamento de RNA de fita dupla (dsRNA) de tecidos de plantas infectadas indicaram uma causa viral para a doença (KITAJIMA et al., 1993). A etiologia viral foi finalmente comprovada após a purificação e a realização dos postulados de Koch (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003). Atualmente, sabe-se que o vírus é composto de dsRNA com aproximadamente 12.000 nucleotídeos (TAVARES et al., 2004).

Apesar dos prejuízos ocasionados pela meleira na cultura do mamoeiro, o estudo das características moleculares e a geração de informações relevantes sobre os genes e a organização genômica do PMeV necessárias à correta classificação taxonômica e estudo filogenético do vírus são inexistentes. A falta de informações pode ser demonstrada pelo fato de ter se passado mais de vinte anos dos primeiros relatos da ocorrência da meleira no Brasil e até o momento, não existir nenhuma informação sobre a sequência genômica do PMeV depositada no banco mundial de dados, o GeneBank.

Diante do exposto torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para a geração de conhecimentos a respeito das características moleculares desta espécie de vírus. O objetivo deste trabalho foi, portanto, sequenciar parcialmente o genoma do PMeV com o intuito de buscar seu posicionamento taxonômico, assim como gerar informações quanto ao nível de variabilidade genética da população viral presente em diferentes regiões produtoras. As informações geradas neste trabalho irão contribuir para o desenvolvimento de métodos diagnósticos precoces e na busca por métodos de controle da doença baseados na resistência mediada pelo próprio patógeno via obtenção de organismos geneticamente modificados.

REVISÃO DE LITERATURA

***Carica papaya* L. - Aspectos Gerais**

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), com centro de origem na Bacia Amazônica Superior, pertence à classe *Dicotyledoneae*, subclasse *Archichlamydeae*, ordem *Violales*, subordem *Caricineae*, família *Caricaceae* e gênero *Carica* (BADILLO, 1993). O mamoeiro é um híbrido que surgiu após o cruzamento natural de duas espécies de *Carica*, a *C. peltata* e uma espécie selvagem (PURSEGLOVE, 1968). Inicialmente distribuído pela Argentina, Chile e sul do México (MANSHARDT, 1992), hoje é bastante cultivado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os países produtores de mamão estendem-se pelos continentes Americanos, Africano, Asiático e a Oceania (FAO, 2012).

O mamoeiro é uma herbácea semi-lenhosa de rápido crescimento. O caule é único, reto e oco com cicatrizes no pecíolo da folha. As folhas são lobuladas, longas, dispostas em espiral e agrupadas na coroa (SILVA et al., 2007). A fruta é oval, piriforme, alongada, apresentando de 15-50 cm de comprimento e 10 - 20 cm de espessura (MORTON, 1987), pesando em média de 300-500 g (grupo Solo) e 900 a 1200 g (grupo Formosa) (PERMANHANI et al., 2009).

As variedades de mamoeiro mais cultivadas pertencem aos grupos Solo e Formosa, sendo as variedades do grupo Solo preferencialmente exportadas (DANTAS e OLIVEIRA, 2009). No Brasil, o mamão produzido destina-se principalmente ao mercado interno. No entanto, um crescimento contínuo no volume exportado tem sido observado nos últimos 15 anos, tendo se intensificado após a abertura do mercado dos EUA em 1998 (CARDOSO et al., 2007).

O mamoeiro é uma fruteira de grande importância nutricional, econômica e social. Os frutos aromáticos, ricos em vitamina C são utilizados amplamente em dietas alimentares pelo seu valor nutritivo e digestivo. O mamão é uma fruta pobre em calorias (32 kcal/100 g do fruto), rico em vitaminas C e A, riboflavina, ácido fólico, tiamina, caroteno, fibras, cálcio, ferro, niacina, e potássio. São essenciais à saúde e importantes na manutenção da boa forma. A papaína

encontrada em concentrações elevadas nos frutos verdes ajuda na digestão dos alimentos (KRISHNA et al., 2008)

O mamão encontra-se entre os principais produtos agrícolas de lavouras permanentes cultivadas no mundo. Em 2011, a produção mundial de mamão foi de 11.838.651 t em uma área de 421.514 ha. Um total de 37 % foi produzido pelas Américas, 50 % pela Ásia e 12,3 % pela África (FAO, 2011).

O Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de mamão, produzindo 1.854.340 t do fruto em 35.531 ha, com rendimento médio de 52,19 t/ha (FAO, 2011). A região Nordeste é responsável por 63,34 % da produção nacional. Entre os estados brasileiros, a Bahia lidera o ranking de produção, respondendo por 50% da produção brasileira de mamão seguido do Espírito santo (30%) e Ceará (6%) (IBGE, 2011).

O mamoeiro é uma cultura semi-perene cultivada o ano inteiro. Os pomares necessitam de renovação a cada quatro anos, o que contribui para a fixação do homem ao campo devido à necessidade de mão de obra constante para realizar os tratos culturais e colheita do fruto (DANTAS, 1999).

O mamoeiro é hospedeiro de várias espécies de insetos-praga e fitopatógenos que limitam a expansão da produtividade. Os ácaros, pragas de maior importância fitossanitária, reduzem o vigor da planta e afetam a qualidade da fruta (OECD 2003). Entre os fitopatógenos, as viroses constituem o principal grupo de doenças que se manifestam no mamoeiro, ocasionando grandes perdas na produção, podendo chegar à destruição total das plantações infectadas, provocando a mudança constante de zonas produtoras e afastando-as cada vez mais do mercado consumidor (LIMA e LIMA, 2002).

Doenças de etiologia viral que afetam o mamoeiro no Brasil

Três viroses já foram relatadas infectando o mamoeiro, a mancha anelar causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), o amarelo letal causada pelo “Papaya lethal yellowing vírus” (PLYV) e a meleira do mamoeiro, provocada pelo “Papaya meleira vírus” (PMeV) (PURCIFULL et al., 1984; LORETO et al., 1983; RODRIGUES et al 1989).

Dentre as viroses do mamoeiro, a mancha anelar ou mosaico do mamoeiro é considerada a nível mundial, a doença de maior importância econômica e de maior distribuição geográfica (REZENDE e FANCELLI, 1997; TRIPATHI et al., 2008). A primeira observação da ocorrência da mancha anelar no mamoeiro foi na Austrália, em 1929 (SHUKLA e WARD, 1989) e em seguida no Havaí (JENSEN, 1949).

A mancha anelar é bastante comum nos países tropicais e subtropicais em que o mamoeiro é cultivado (CASTILLO et al., 2011). No Brasil, a ocorrência da mancha anelar foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo em 1969 (COSTA et al., 1969) e depois no Ceará (LIMA e GOMES, 1975). A doença ocorre em todas as regiões do Brasil com elevado potencial de destruição dos pomares, já tendo causado a eliminação da cultura na região de Monte Alto-SP (REZENDE, 1994).

O agente etiológico da mancha anelar é o *Papaya ringspot virus*, uma espécie da família *Potiviridae*, gênero *Potyvirus*. Os sintomas iniciais da doença aparecem sob a forma de mosaico e distorções foliares, evoluindo para o surgimento de manchas oleosas no caule e anéis oleosos nos frutos, que constituem a principal característica sintomatológica da doença. O PRSV é transmitido de forma não persistente por várias espécies de pulgões, em especial *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* (GONSALVES et al., 2010).

O PRSV-P apresenta genoma monossegmentado constituído de RNA de cadeia simples, sentido positivo, encapsidado em partículas filamentosas flexuosas. Possui 10326 nucleotídeos que codifica para uma poliproteína de 3344 aminoácidos a partir da qual todas as proteínas do vírus são derivadas via auto-proteólise (YEH et al., 1992; ADAMS et al, 2005).

Diversas estratégias de controle do PRSV-P já foram empregadas. Dentre os quais convém citar: os programas fitossanitários baseados na erradicação das plantas sintomáticas (LIMA et al, 2001); o uso de plantas tolerantes desenvolvidas em programas de melhoramento genético convencional (GONSALVES et al, 2006); o uso da proteção cruzada, onde é realizada a inoculação prévia de uma forma atenuada do vírus para evitar o desenvolvimento

de sintomas severos ocasionados pela infecção da planta por uma estirpe virulenta do mesmo vírus (RATCLIFF et al., 1999).

O método de controle da mancha anelar baseado no desenvolvimento de mamoeiros geneticamente modificados resistentes ao vírus tem sido eficaz e foi implantado inicialmente no Havaí. O primeiro mamoeiro transgênico (linha 55-1) foi obtido no início da década de 90 e expressava o gene da capa protéica de um isolado havaiano de PRSV (FITCH et al., 1992). Essa planta transgênica mostrou-se resistente a diferentes isolados havaianos, mas susceptível a isolados de outras regiões geográficas (TENNANT et al., 1994).

Trabalhos visando à obtenção de mamoeiro transgênico resistente aos isolados brasileiros de PRSV-P foram desenvolvidos. Mamoeiros transgênicos expressando o gene da capa protéica de isolado do PRSV proveniente do extremo sul da Bahia foram obtidos e mostraram-se resistentes ao isolado doador e aos isolados do Havaí e da Tailândia (SOUZA Jr. e GONSALVES, 1999). Nos últimos anos, a ênfase direcionada aos possíveis riscos associados ao consumo de organismos geneticamente modificados tem influenciado negativamente na produção e comercialização dos frutos de origem transgênica (SOUZA Jr., 2003).

O PLYV foi relatado inicialmente afetando mamoeiro 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 do vírus 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. O amarelo letal foi inicialmente referido como, possível membro da família *Tombusviridae*, gênero *Carmovirus* (CAMARÇO et al., 1998), porém estudos moleculares recentes têm demonstrado que o PLYV apresenta uma maior relação filogenética com membros da família *Sobemoviridae*, gênero *Sobemovirus* (SILVA et al., 2000, DALTRO et al., 2012). A análise das sequências de aminoácidos deduzidas de duas proteínas do PLYV (replicase e capa proteica) revelou uma maior identidade com sequências correspondentes de diferentes *Sobemovirus*. O percentual de identidade da replicase do PLYV variou de 81- 84 % quando em comparação com quatro espécies de sobemovirus. O grau de identidade das sequências de aminoácidos deduzidas da capa proteica foi de 35 % com o *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV) e 33 % com *Southern bean mosaic virus* (SBMV) (DALTRO et al., 2012). Pereira et al. (2012) realizaram a caracterização molecular do genoma do PLYV e verificaram que a sequência de 4.145 nucleotídeos apresentou 43,5- 52 % de identidade com outros *Sobemovirus*, além da mesma organização genômica.

Testes realizados em casa de vegetação, com mais de 30 espécies vegetais de oito famílias botânicas, indicaram que o PLYV tinha por hospedeiras somente espécies do gênero *Carica* (LIMA et al., 1994). Dados mais recentes divulgados por Amaral et al. (2006) confirmaram que *Vasconcellea cauliflora* (Jacq.), uma fonte de resistência natural ao PRSV-P, pode ser mecanicamente infectada pelo PLYV, sendo esta considerada a segunda hospedeira do PLYV descrita até o momento.

Experimentos para identificar um provável vetor de transmissão do PLYV foram realizados. As espécies de afídeos *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e de besouros *Diabrotica bivitulla*, *D. speciosa* foram selecionadas para os testes, porém a transmissão do vírus não foi observada (LIMA e SANTOS, 1991; SILVA, 1996). Nenhum vetor do PLYV foi detectado até o momento. O vírus do amarelo letal pode ser transmitido mecanicamente por extratos de folhas e frutos de mamoeiros infectados, por enxertia, por ferramentas de cortes. Partículas virais infecciosas também foram detectadas em solo 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 que podem servir como fonte de inóculo para pomares novos.

Algumas medidas de controle são recomendadas para minimizar a disseminação do vírus nas regiões de ocorrência e para regiões não afetadas. Evitar o transporte de mudas e sementes de mamoeiros dos estados em que o vírus já foi detectado para outras regiões, a certificação das mudas produzidas para novos plantios. Nos pomares onde a doença já está instalada deve-se fazer a erradicação sistemática das plantas infectadas, reduzindo assim a disseminação do vírus dentro da cultura e por fim a desinfestação das ferramentas utilizadas na poda, desbrota, desbaste e colheita de frutos com uma solução de 1:10 de hipoclorito de sódio (REZENDE et al., 2005).

Meleira do mamoeiro

A doença conhecida como meleira foi relatada na década de 80 afetando pomares no Sul da Bahia (NAKAGAWA et al., 1987; CORREA et al., 1988) 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 à produção nas regiões onde ocorre (RODRIGUES et al., 1989a; 1989b). Estudos posteriores relataram a presença de mamoeiro infectados com o vírus da meleira nos estados de Pernambuco e Ceará (BARBOSA et al., 1998a, b)

O sintoma característico da meleira é a exsudação espontânea de látex nos frutos que posteriormente se oxida, resultando em um aspecto borrado e melado (Figura 1.). Os primeiros sintomas geralmente surgem aos seis meses, nas extremidades das folhas mais jovens, provocando queima e alterações na sua morfologia, mas sintomas semelhantes podem ser observados nos pecíolos e em flores (RODRIGUES et al., 1989a, b).



Figura 1. Mamoeiro exibindo sintomas de infecção pelo “Papaya meleira virus”

Inicialmente, a etiologia da doença foi controversa, atribuindo-se a causas abióticas. Posteriormente foram isoladas bactérias do tipo *Bartonella* de plantas sintomáticas, porém sua patogenicidade não foi comprovada (AKIBA et al., 1989). Kitajima et al. (1993) examinando o látex de folhas, frutos e hastes do mamoeiro com sintomas evidentes da meleira, por microscopia eletrônica de transmissão, observaram a presença de partículas isométricas com ≈ 50 nm de diâmetro, distribuídas em massas amorfas ou formando agregados de tamanho variado. Neste mesmo estudo, foi possível detectar, por eletroforese, a presença de dsRNA em tecidos de plantas infectadas.

A transmissão experimental do agente da doença foi possível a partir da injeção do látex dos frutos infectados no ponteiro de mamoeiros saudáveis, reproduzindo os sintomas e derrubando a teoria do envolvimento de fatores abióticos na etiologia da doença (BARBOSA et al., 1998; BARBOSA et al., 2000).

Posteriormente Maciel-Zambolim et al. (2000, 2003) relataram a purificação do vírus a partir de plantas infectadas e após cumprir todas as etapas previstas nos postulados de Koch, concluíram que o vírus por eles estudado era o agente causal da meleira do mamoeiro, para o qual sugeriram o nome Papaya mealy virus (PMeV) e que possivelmente este patógeno representa um novo grupo de vírus não relacionado a nenhum outro que infecta plantas, vertebrados, invertebrados ou procariotos. O vírus é composto de RNA de fita dupla (dsRNA) de aproximadamente 12.000 pb, porém não existe nenhuma informação sobre a sequência ou organização do genoma viral (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003).

Observações em campo sugeriam a existência de um inseto vetor, pois foi observado que a disseminação do vírus normalmente se inicia pelas bordas do talhão, progredindo até atingir todo ele, indicando que este provável vetor traz o vírus de fora do plantio. Para comprovar esta hipótese, Nascimento et al. (1998) realizaram estudos de campo comparando duas parcelas de plantas de mamão sadias, sendo uma parcela das plantas mantida protegida em gaiolas e outra parcela exposta à infecção natural. Foi constatado que todas as plantas que permaneceram expostas foram infectadas enquanto que as plantas protegidas não desenvolveram sintomas. Mais tarde, a mosca branca *Bemisia tabaci*, biotipo B foi associada à transmissão do PMeV sob condições experimentais (VIDAL et al., 2005). Recentemente um estudo de transmissão viral demonstrou que a mosca-branca da espécie *Trialeurodes variabilis* ao se alimentar da seiva de mamoeiros infectados com o PMeV era capaz de adquirir partículas virais mas incapaz de transmiti-las a mamoeiros sadios, não desempenhando portanto a função de vetor de transmissão viral (RODRIGUES et al., 2009).

Com relação a gama de hospedeiros, foi constatado que o PMeV mantém uma relação hospedeiro-específica com a espécie *Carica papaya L.*, contudo a gramínea da espécie *Brachiaria decumbens* pode servir de reservatório do vírus sem desenvolver qualquer sintoma da infecção (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003).

A importância fitossanitária da meleira do mamoeiro vem aumentando, uma vez que ela foi relatada recentemente em sete estados do México (PEREZ-BRITO et al., 2012) e foi comprovado que frutos infectados pelo PMeV são mais suscetíveis à infestação por moscas das frutas das espécies, *Ceratitidis capitata* (Wied.) e *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (NASCIMENTO et al., 2000).

A mosca da fruta é uma praga de importância quarentenária que infesta o mamoeiro em estágios avançados de maturidade dos frutos. Isso porque frutos verdes apresentam concentrações elevadas do ovcida benzilisotiocianato (BITC), mas à medida que eles amadurecem a concentração de BITC decresce (TANG, 1973). Em frutos verdes infectados com a meleira, a infestação por *C. capitata* foi de 60,6 pupários/fruto, enquanto que em frutos sadios a infestação foi nula demonstrando a alta suscetibilidade dos frutos doentes a esta espécie de moscas

das frutas (NASCIMENTO et al., 2000). A quebra de resistência natural do mamoeiro à penetração de ovos da mosca da fruta ocasionada pela infecção do PMeV pode modificar a interação inseto-planta existente. O mamoeiro pode deixar de ser um hospedeiro ocasional, e passar a ser um hospedeiro primário preferencial do inseto. Tornando-se necessário o desenvolvimento de rigorosas medidas de controle da meleira para evitar maiores gastos com tratamentos pós-colheita dos frutos para exportação.

Aspectos evolutivos gerais dos vírus de dsRNA

Os vírus de dsRNA representam um grupo diverso e infectam vertebrados, invertebrados, plantas, fungos e procariotos, com membros representativos de importância médica, veterinária ou agrícola (MERTENS, 2004a).

O Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus (ICTV) já reconheceu oito famílias de vírus que possuem dsRNA em seu genoma, sendo elas: *Totiviridae* (4 gêneros), *Birnaviridae* (4 gêneros), *Partitiviridae* (4 gêneros), *Cystoviridae* (1 gênero), *Chrysoviridae* (1 gênero), *Reoviridae* (15 gêneros), *Endornaviridae* (1 gênero), *Picobirnaviridae* (1 gênero) (KING et al., 2011). Estas famílias são diferenciadas entre si pela sua constituição molecular e segmentação do seu genoma (MERTENS, 2004a).

A família *Totiviridae* apresenta espécies que infectam fungos (gêneros *Totivirus* e *Victorivirus*) e outras que infectam protozoários (gêneros *Giardiavirus* e *Leishimaniavirus*) (KING et al., 2011). Esta família é representada por vírus com genoma de dsRNA linear monossegmentado, com tamanho variando entre 4,6- 7 kpb. O genoma codifica dois genes que apresentam-se parcialmente sobrepostos e codificam para uma proteína capsidial e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (WICKNER et al., 2005). Os totivirus possuem diferentes estratégias para a expressão de seus genes: (1) Os dois genes são expressos em um único peptídeo na mesma fase de leitura do ribossomo, (2) Os dois genes são expressos em um único peptídeo, mas com a mudança na fase de leitura do ribossomo ou (3) expressos separadamente (GHABRIAL e SUZUKI, 2009). Os totivirus visualizados por microscopia eletrônica apresentam partículas virais

icosaédricas com diâmetro variando de 30 a 40 nm. Geralmente espécies de totivirus causam infecções latentes em seus hospedeiros (KING et al., 2011).

A família *Partitiviridae* engloba espécies de vírus que infectam fungos (gênero *Partivirus*), plantas (gêneros *Alphacryptovirus* e *Betacryptovirus*) e protozoários (gênero *Cryspovirus*). O seu genoma consiste de dois segmentos de dsRNA linear que dependendo da espécie pode variar de 1,4- 2,4 kbp. O dsRNA1 codifica para uma RdRp e o dsRNA2 para a capa protéica (GHABRIAL et al., 2005). Os partitivirus apresentam partículas capsidiais isométricas que variam de 30- 43 nm de diâmetro. Os vírus estão associados à infecções latentes em seus hospedeiros e não possuem vetores conhecidos (MAISS et al., 2011).

A família *Reoviridae* é a mais representativa de todas (15 gêneros) e abrange uma diversidade de hospedeiros, desde o homem (gênero *Rotavirus*), animais (gênero *Orbivirus*), invertebrados (*Cypovirus*, *Dinovernavirus*), plantas e invertebrados (gêneros *Phytoreovirus*, *Fijivirus* e *Oryzavirus*) (URBANO et al., 1994, KING et al., 2011), fungos (gênero *Mycoreovirus*) (MERTENS et al., 2004b, KING et al., 2011) e protozoários (gênero *Mimoreovirus*) (KING et al., 2011). São vírus isométricos apresentando entre 60 e 80 nm de diâmetro. O seu genoma é de dsRNA multi-segmentado, possuindo de 10 a 12 segmentos, apresentando um tamanho de 1 a 3,9 kpb. Podem codificar de 6 a 12 proteínas distintas (incluindo várias proteínas estruturais e não estruturais, a capa protéica e a replicase) (URBANO et al., 1994; NIBERT e SCHIFF, 2001).

A família *Endornaviridae* possui membros que infectam plantas, fungos e oomicetos. Estes vírus apresentam genoma de dsRNA linear não segmentado longo (14-16 kpb), mas não constituem vírus verdadeiros devido a ausência de uma capa protéica. O genoma codifica para três proteínas, uma helicase, uma UDP- glicosiltransferase e uma replicase (KING et al., 2011).

A família *Chrysoviridae* apresenta genoma com quatro segmentos, que são encapsidados separadamente e capsídeos com diâmetro variando entre 35 a 40 nm. O maior segmento (dsRNA 1) codifica para a RdRp e o dsRNA 2 para a CP, os outros dois genes estão relacionados com a transcrição, ligação e empacotamento do RNA (MERTENS, 2004a).

Os vírus de dsRNA representam um grupo muito diversificado apesar de possuírem estratégia de replicação e estrutura viral semelhantes, além de proteínas cognatas no genoma. Mesmo que, o nível de similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre espécies da mesma família seja geralmente baixo, a identificação de proteínas com as mesmas funções ou estruturas similares em vírus de dsRNA distantemente relacionados, fornecem evidências de ancestralidade comum (MERTENS, 2004a).

Os vírus de dsRNA que infectam fungos apresentam genoma que varia de mono a multi-segmentado e a maioria é encapsidado em partículas isométricas de 25 a \pm 50 nm de diâmetro (GHABRIAL et al, 1995). Os mycovirus são classificados de acordo com o número de segmentos do genoma, em quatro famílias: *Totiviridae* (monossegmentado), *Partitiviridae* (bisegmentado), *Chrysoviridae* (quadrisegmentado) e *Reoviridae* (11-12 segmentos) (KING et al., 2011).

Os mycovirus são comuns em fungos e acredita-se que sejam bastante antigos e tenham evoluído em conjunto com os seus hospedeiros (TAYLOR et al., 2013). Os mycovirus não apresentam vetores, sendo transmitidos intracelularmente durante a anastomose de hifas e heterocariose (transmissão lateral) e são disseminados através de esporos, com exceção dos Ascomycetos, onde os vírus são eliminados durante a formação dos ascósporos (GHABRIAL, 1994; GHABRIAL, 1998; MONTENEGRO, 2010).

As infecções causadas por mycovirus são em geral latentes e persistentes (KING et al., 2011). No entanto, alguns estudos vêm demonstrando que muitos vírus que infectam fungos fitopatogênicos, podem causar consequências fenotípicas que variam de assintomáticas a grave e debilitante, podendo aumentar a virulência do fungo hospedeiro (hipervirulência) (AHN e LEE, 2001) ou reduzi-la (hipovirulência) (YU et al., 2010). O uso de mycovirus que provocam hipovirulência em fitopatógenos pode ser interessante para o desenvolvimento de novas medidas de controle biológico.

Apesar dos mycovirus estarem separados com base na segmentação do genoma, eles são filogeneticamente próximos. Isso acontece porque vírus com genomas múltiplos provavelmente surgiram após aquisição de genes de

linhagens com genoma monossegmentado. A transferência horizontal de genes (HGT) é um importante mecanismo macroevolutivo que ocorre entre muitos vírus de dsRNA (LIU et al., 2012). Membros das famílias *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* e *Totiviridae* apresentam uma relação filogenética tão próxima que foi sugerida a criação da superfamília “Picorna-like” para agrupá-los (KOONIN et al., 2008; LIU et al., 2012).

Recentemente, novos mycovirus monossegmentados foram caracterizados molecularmente, *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 1 (PgV-1) e *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2) (KOZLAKIDIS et al., 2009), *Fusarium graminearum* mycovirus 3 (FgV-3) (YU et al., 2009), Grapevine associated totivirus-2 (AL RWAHNIH et al., 2010) entre outros. Além do genoma monossegmentado característico de espécies da família *Totiviridae*, a análise comparativa da sequência de aminoácidos da replicase revelou uma estreita relação filogenética com diferentes *Totivirus*. Contudo duas características os diferenciam, a ausência de um capsídeo e a presença de uma proteína de função desconhecida. Eventos de HGT vêm sendo observados com maior frequência entre diferentes vírus de dsRNA, como no caso de *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 (mycovirus de genoma bisegmentado e encapsidado) que apresenta uma estreita relação filogenética com o vírus monossegmentado e não encapsidado PgV-1 (CHIBA et al., 2009).

Os vírus de dsRNA que infectam plantas pertencem às famílias *Partitiviridae* (genoma bisegmentado), *Reoviridae* (genoma multi-segmentado), *Endornaviridae* (genoma monossegmentado com 14-16 kpb) (KING et al., 2011). Entretanto, espécies virais com genoma de dsRNA monossegmentado com aproximadamente 3,5 kpb foram recentemente isolados de plantas. De acordo com as características genômicas compartilhadas, estes vírus apresentam uma estreita relação filogenética com membros da família *Totiviridae* e *Partitiviridae* (SABANADZOVIC et al., 2009; MARTIN et al., 2011).

Uma espécie de vírus isolada do tomate na América do Norte, denominada “Southern tomato virus” (STV), tem uma organização genômica similar à de totivirus (monopartido). Entretanto, a análise filogenética mostrou que o STV é evolutivamente mais próximo de membros da família *Partitiviridae*, e que

provavelmente o STV representa um elo perdido entre as famílias *Totiviridae* e *Partitiviridae* (SABANADZOVIC et al., 2009).

O “Blueberry latent virus” (BBLV) recentemente descoberto na América do Norte infectando o mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) foi caracterizado molecularmente. A organização genômica (duas ORFs parcialmente sobrepostas) demonstrou uma relação de similaridade entre BBLV e totivirus. Entretanto, as proteínas apresentaram similaridade com membros da família *Partitiviridae*. A ORF1 codifica uma proteína hipotética semelhante à do STV e a muitos partitivirus. A ORF2 codifica uma replicase que contém os motivos conservados característicos da RdRp de vírus de dsRNAs (MARTIN et al., 2011). Foi sugerida a criação de uma nova família, Amalgamaviridae, por causa do elo apresentado pelos vírus de planta STV e BBLV com membros da família *Totiviridae* e *Partitiviridae* (MARTIN et al., 2011).

Nos últimos anos, o grande enfoque voltado à caracterização molecular de diversos vírus de dsRNA em diferentes hospedeiros (planta, fungos, insetos, protozoários) tem possibilitado uma melhor compreensão dos aspectos evolutivos destes vírus. A transferência horizontal de genes (HGT) é um evento macroevolutivo comum em vírus com genoma de dsRNA, e por isso pode-se observar semelhanças moleculares quanto a organização e sequência genômica em vírus com hospedeiros completamente distintos (LIU et al., 2012). Por exemplo, o domínio Phytoreo_S7 bastante conservado e característico de espécies do gênero *Phytoreovirus* (infecta planta) vem sendo relatado em diferentes mycovirus. Regiões homólogas a este domínio foram encontradas em chrysovirus, endornavirus, e mycovirus não classificados (PgV-1, PgV- 2 e FgV-3) (YU et al., 2009; KOZLAKIDIS et al., 2009; LIU et al., 2012). Outro exemplo, foi a recente observação de dois novos vírus que infectam hemípteros, *Spissistilus festinus* virus 1 (SpFV1) e *Circulifer tenellus* virus 1 (CiTV1) apresentando a mesma organização e composição genômica que diferentes mycovirus (PgV1; PgV2 e FgV3) (SPEAR et al., 2010).

O “Papaya meleira virus” foi pouco estudado do ponto de vista molecular. É um vírus de dsRNA que infecta planta, mas que não apresenta nenhuma relação com outros vírus já relatados em plantas, vertebrados, invertebrados ou

procariotos e provavelmente representa um novo grupo de vírus (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2003). Daltro e Andrade (2012) observaram que o PMeV apresenta algumas semelhanças com espécies de *Mycovirus*.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Review: overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Mol. Plant Pathol*, v. 6, p. 471-487, 2005.

AHN, I. P. E.; LEE, Y. H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 496-507, 2001.

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.

AL RWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; URBEZ-TORRES, J. R.; CORDERO, F.; ROWHANI, A. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Arch Virology*, v.156, p. 397-403, 2011.

AMARAL, P. P.; RESENDE, R. O. e SOUZA Jr., M. T. *Papaya Lethal Yellowing Virus* (PLYV) Infects *Vasconcellea cauliflora*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n.5, p. 4004, 2006.

BADILLO, V. Caricaeae, segundo esquema. Publicada por la asociacion de profesores, Alcance 43, Universidad Central de Venezuela, p. 111, Maracay, 1993.

BARBOSA, C. J.; MEISSNER FILHO, P. E. e HABIBE, T. C. A meleira do mamoeiro. *Bahia Agrícola*, v. 2, p. 57, 1998a.

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

BARBOSA, C. J.; PATROCÍNIO, E.; HABIBE, T. C.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGO, W. J. R. Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com látex de plantas afetadas pela meleira. *Biotemas*, v. 13, p. 47- 53, 2000.

CAMARÇO, R. F. E. A.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. e ANDRADE, G. P. Ocorrência do Papaya lethal yellowing virus no município de Santa Rita, Estado da Paraíba. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.423, 1996.

CAMARÇO, R. F. E. A.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. Transmissão e presença em solo do "Papaya lethal yellowing virus". *Fitopatologia Brasileira*, v.23, p.453-458, 1998.

CARDOSO, L. V.; DE MEDEIROS, J. X.; SANTO, E. E. Competitividade e Coordenação no Sistema Agroindustrial Exportador de Mamão Brasileiro. Estudo de Casos Múltiplos. *Revista Adm. São Paulo*, v.42, n.2, p.178-191, 2007.

CASTILLO, X. A. O.; FERMIN, G.; TABIMA, J.; ROJAS, Y.; TENNANT, P. F.; FUCHS, M.; SIERRA, R.; BERNAL, A. J.; RESTREPO, S. Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus, v. 159, n. 2, p. 132-40, 2011.

CHIBA, S.; SALAIPETH, L.; LIN, Y. H.; SASAKI, A.; KANEMATSU, S.; SUZUKI, N. A novel bipartite double-stranded RNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *Journal Virology*, v. 83, n. 24, p.12801-12812, 2009.

CORREA, F. J. F.; FRANCO, B. J. D. C.; WATANABE, H. S.; SAKAY, M. Y. e YAMASHITA, E. M. A. Estudo preliminar sobre exudação do látex do mamoeiro - Teixeira de Freitas. *Anais do 2º Simp. Bras. Cultura do mamoeiro*, p. 409-428, Jaboticabal (SP), 1988.

COSTA, A. S., CARVALHO, A. M. e KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. *O Agrônomo*, v. 21, p. 38-43, 1969.

DALTRO, C. B.; PEREIRA, A. J.; CASCARDO, R. S.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BEZERRA-JR., J. E. A.; LIMA, J. A. A.; ZERBINI, F. M. E ANDRADE, E. C. Genetic variability of papaya lethal yellowing virus isolates from Ceará and Rio Grande do Norte states, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n. 1, p. 37-43, 2012.

DALTRO, C. B. e ANDRADE, E. C. Estudo da similaridade existente entre a RdRp do vírus da meleira do mamoeiro (*Papaya meleira virus*) e a RdRp de diferentes micovirus. *Reunião Anual de Ciência, Tecnologia, Inovação e Cultura no Recôncavo da Bahia*, 2012. (Resumo).

DANTAS, J. L. L. e OLIVEIRA, E. J. O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: *I Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas. O melhoramento genético no contexto atual: Embrapa Agroindústria Tropical*, v. 1, p. 151-180, Fortaleza (CE), 2009.

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. Anais do Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 1999. p. 1, CDROM.*

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. SITUAÇÃO E PERSPECTIVAS DA FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO NO BRASIL. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 109-120, Outubro 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization (2011). Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acessado dia 23/03/2013.

FERREIRA, S. A.; PITZ, K. Y.; MANSCHARDT, R.; ZEE, F.; FITCH, M.; GONSALVES, D. Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of papaya ringspot virus in Hawaii. *Plant Disease*, v. 86, p. 101-105, 2002.

FITCH, M.; MANSCHARDT, R.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.; SANFORD, J. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, v. 10, p. 1466-1472, 1992.

GHABRIAL, S. A. New developments in fungal virology. *Adv Virus Res*, v.43, p.303-388, 1994.

GHABRIAL, S. A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, v.16, n.1, p.119-31, 1998.

- GHABRIAL, S. A.; BUCK, K. W.; HILLMAN, B. I.; MILNE, R. G. Family *Partitiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, p. 581–590, 2005.
- GHABRIAL, S. A.; SUZUKI, N. *Viruses of Plant Pathogenic Fungi*. *Annual Reviews in Phytopathology*, v. 47, p. 353-384, 2009.
- GHABRIAL, S. A.; BRUENN, J. A.; BUCK, K. W.; WICKNER, R. B.; PATTERSON, J. L.; STUART, K. D.; WANG, A. L. e WANG, C. C. In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli, G.P., Mayo M.A., and Summers M.D.(eds), *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer-Verlag, New York, p. 245-252, 1995.
- GONSALVES, D. Transgenic papaya: development, release, impact, and challenges. *Adv. Virus Research*, v. 67, p. 317-354, 2006.
- GONSALVES, D.; TRIPATHI, S.; CARR, J. B.; SUZUKI, J. Y. Papaya Ringspot virus. *The Plant Health Instructor*. 2010. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2011). Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acessado em 23.01.2013.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA *Produção Vegetal*. In: *Anuário Estatístico do Brasil*, v. 71, p. 172, Rio de Janeiro, 2011.
- JENSEN, D. D. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot virus. *Phytopathology*, v. 39, p.191-211, 1949.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on taxonomy of viruses*. New York: Elsevier, 2011.
- KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, C.; SILVEIRA, J.; ALVES, F.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F. J. L. e OLIVEIRA, L. H. R. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with Meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 8, p.118-122,1993.
- KOONIN, E. V.; WOLF, Y. I.; NAGASAKI, K.; DOLJA, V. V. The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nature Review Microbiology*, v. 6, n. 12, p. 925–939, 2008.
- KOZLAKIDIS, Z.; HACKER, C. V.; BRADLEY, D.; JAMAL, A.; PHOON, X.; WEBBER, J.; BRASIER, C. M.; BUCK KW, COUTTS RH: Molecular characterisation of two novel double stranded RNA elements from *Phlebiopsis gigantea*. *Virus Genes*, v. 39, n.1, p.132–136, 2009.
- KRISHNA, K. L.; PARIDHAVI, M.; PATEL, J. U. Review on nutritional and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya Linn.*). *Natural Product Radiance*, v. 7, n. 4, p. 364-373, 2008.
- LIMA, J. A. A. e GOMES, M. N. S. Identificação de “Papaya ringspot vírus” no Ceará. *Fitossanidade*, v. 1, p. 56-59, 1975.
- LIMA, J. A. A. e SANTOS, C. D. G. Isolamento de possível estirpe do vírus do amarelo letal do mamoeiro no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 16, p.27, 1991.

- LIMA, J. A. A.; LIMA, A. R. T. e MARQUES, M. A. L. Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro obtido no Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p.437-441, 1994.
- LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA JR., M. T.; PIO-RIBEIRO, G. e ANDRADE, G. P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.4, p.689-702. 2001.
- LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA Jr., M. T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p.689-702, 2001.
- LIMA; R. C. A e LIMA, J. A. A. Guerra às viroses do mamão. Universidade Federal do Ceará. *Cultivar Hortaliças e Frutas*, v.14, 2002.
- LIU, H.; FU, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; GHABRIAL, S. A.; LI, G.; PENG, Y.; YI, X. e JIANG, D. Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 91, 2012.
- 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*, v. 49, p.275-279, 1983.
- 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*, v. 49, p.275-279. 1983.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. Identification and partial characterization of papaya .meleira. virus. *Virus: Review & Research*, v.11, p.198. 2000. (Abstract).
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; KUNIEDA-ALONSO, S.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Purification and some properties of Papaya maleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, v. 52, p.389-394, 2003.
- MAISS, E.; NIBERT, M. L.; GHABRIAL, S. A.; BAKER, T. S.; TAO, Y. J. Partitiviridae. In: Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, editors, *Virus Taxonomy*. Oxford: Elsevier, p. 523-534, 2011.
- MANSHARDT, R. M. Papaya. In: Hammerschlag, F. A.; Litz, R. E. (Eds) *Biotechnology in Agriculture Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, v. 8, p. 489-511, 1992.
- MARTIN, R. R.; ZHOU, J.; TZANETAKIS, I. E. Blueberry latent virus: an amalgam of the Partitiviridae and Totiviridae. *Virus Research*, v. 155, nº1, p. 175–180, 2011.
- MERTENS, P. P. C.; HILLMAN, B. I. e SUZUKI, N. Genus Mycoreovirus. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Edited by C. M. Fauquet et al. San Diego: Academic Press, 2004b.
- MERTENS, P. The dsRNA viruses. *Virus Research*, v. 101, p. 3-13, 2004a.
- MONTENEGRO, D. H. RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa*: OBTENÇÃO, CURA, TRANSMISSÃO E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 2010. (Dissertação).

MORTON, J. F. Papaya. In: Morton JF (Ed) Fruits of Warm Climates. Creative Resource Systems, p. 336-346, Miami, 1987.

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

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, 2010.

NASCIMENTO, A. S. Transmissibilidade da meleira do mamoeiro. Congresso Brasileiro de Fruticultura, v.15, p.491.1998. (Resumos)

NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R.; BARBOSA, C. J.; MARQUES, O. M.; HABIBE, T. C. Associação de Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) com a Meleira do Mamoeiro (*Carica papaya* L.) An. Soc. Entomol. Brasil, v.29, n. 4, p.821-825, 2000.

NIBERT, M. L. e SCHIFF, L. A. Reoviruses and their replication. In Fields Virology, v. 2, p. 1679–1729, 2001.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Draft Consensus Document on the Biology of *Carica papaya*.v. 5, p.18, 2003.

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, v. 14, p.114, 1989.

PEREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; QUIJANO-RAMAYO, A.; NEXTICAPAN-GARCEZ, A. e MARTÍN-MEX R. First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. African Journal of Biotechnology, v. 11, n. 71, p. 13564-13570, 2012.

PERMANHANI, M.; CARVALHO, C. E. S.; DA ROCHA, J. G.; DE OLIVEIRA, S. A.; VASCONCELLOS, M. A. S. Expressão Floral e Peso Médio de Frutos em Mamoeiro Formosa Cv. Caliman 01 Submetido à Bifurcação do Tronco. Simpósio Papaya Brasil 2009. Disponível em:<http://www.fundagres.org.br/eventos/cd_papaya2009/arquivos/7_Manejo_Tratos_Culturais/email8.pdf>

PURCIFULL, D. E.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E. e GONSALVES, D. Papaya ringspot virus. Kew:CMI-AAB, Descriptions of Plant Viruses, v. 292, p. 8,1984a.

PURSEGLOVE J. W. Caricaceae. In: *Tropical Crops. Dicotyledons*, Longmans, Green and Co., Bristol, v.1, p 45-51, 1968.

RATCLIFF, F. G.; MACFARLANE, S. A.; BAULCOMBE, D. C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. Plant Cell, v. 11, 1207-1216, 1999.

REZENDE, J. A. M. e FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. e Rezende, J. A. M. (Eds.) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, v. 2, p. 486-496, 1997.

- REZENDE, J. A. M. Situação atual do mosaico do mamoeiro e do endurecimento dos frutos do maracujazeiro em Taiwan e na Austrália. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, Boletim Técnico, v. 47, 1994.
- REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 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. e MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da Meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. Fitopatologia Brasileira, v. 14, p.118, 1989b.
- RODRIGUES, S. P. Interação entre o Papaya meleira vírus (PMeV) e o mamoeiro (*Carica Papaya L.*). Universidade Federal do Espírito Santo, 2006 (dissertação).
- RODRIGUES, S. P.; ANDRADE, J. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B.; LINDSEY, G. G. Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. Journal of Plant Pathology, v. 91, n.1, p. 87-91, 2009.
- SABANADZOVIC, S.; VALVERDE, R. A.; BROWN, J. K.; MARTIN, R. R.; TZANETAKIS, I. E. Southern tomato virus: the link between the families Totiviridae and Partitiviridae. Virus Research, v. 140, n. 1–2, p.130–137, 2009.
- 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, v. 31, p. 79-83, 2006.
- SHUKLA, D. D. e WARD, C. W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. Advances in Virology, v. 36, p. 273-314, 1989.
- SILVA da, A. M. R. "Papaya lethal yellowing virus": Caracterização biológica e molecular. Universidade de Brasília, p.122. 1996 (Dissertação).
- SILVA, A. M. R.; KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O. Nucleotide and amino acid analysis of the polymerase and the coat protein genes of the papaya lethal yellowing virus. Virus: Review and Research, v. 11, p. 196, 2000.
- SILVA, J. A. T.; RASHID, Z.; NHUT, D. T.; SIVAKUMAR, D.; GERA, A.; SOUZA JR. M.T.; TENNANT, P. F. Papaya (*Carica papaya L.*). Tree and Forestry. Science and Biotechnology, v. 1, n. 1, p.. 47-73, Nov. 2007.
- SOUZA JR., M. T. e GONSALVES, D. Genetic engineering resistance to plant virus diseases. an effort to control papaya ringspot potyvirus in Brazil. Fitopatologia Brasileira, v. 24, p. 485-502, 1999.
- SOUZA Jr., M. T. Mamão Transgênico: Uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 6, n. 30, p. 132-137, 2003.

- SPEAR, A.; SISTERTON, M. S.; YOKOMI, R.; STENGER, D. C. Plant-feeding insects harbor double-stranded RNA viruses encoding a novel proline-alanine rich protein and a polymerase distantly related to that of fungal viruses. *Virology*, v. 404, p. 304-311, 2010.
- TANG, C. S. Localizacion of benzylglucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit. *Ibid*, v. 12, p. 769-773, 1973.
- TAVARES, E. T.; TATAGIBA, J. S.; VENTURA, J. A.; SOUZA JR., M. T. Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro *Fitopatol. bras.* v. 29, n.5, Brasília, 2004.
- TAYLOR, D. J.; BALLINGER, M. J.; BOWMAN, S. M. AND BRUENN, J. A. Virus-host co-evolution under a modified nuclear genetic code. *PeerJ*, v. 1, p.50-65, 2013.
- TENNANT, P. F.; GONSALVES, C.; LING, K. S.; FITCH, M. M. M.; MANSARDT, 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*, v. 84, n.11, p. 1359-1366, 1994.
- TRIPATHI, S.; SUZUKI, J. Y.; FERREIRA, S. A.; GONSALVES, D. Papaya ringspot virus -P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control
- URBANO, P. e URBANO, F. G. THE REOVIRIDAE FAMILY. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Disease*,v. 17, n. 3/4, p. 151-161, 1994.
- VEGA, J.; BEZERRA, J. L. e REZENDE, M. L. V. Detecção do vírus do amarelo letal do mamoeiro solo no estado da Bahia através de microscopia eletrônica. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p.147, 1988.
- VIDAL, C. A. Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por insetos. *Magistra*, v.17, n. 2, p.101-106, 2005.
- WICKNER, R. B.; WANG, C. C.; PATTERSON, J. L. Family *Totiviridae*. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/ Academic Press, p. 571–580, 2005.
- YEH, S. D.; JAN, F. J.; CHIANG, C. H.; DOONG, P. J.; CHEN, M. C.; CHUNG, P. H.; BAU, H. J. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *Journal Gen. Virology*, v. 73, p. 2531-2541, 1992.
- YU, J.; KWON, S. J.; LEE, K. M.; SON, M.; KIM, K. H. Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. *Arch Virology*, v.154, n. 11, p. 1855–1858, 2009.
- YU, X.; LI, B.; FU, Y.; JIANG, D.; GHABRIAL, S. A.; LI, G.; PENG, Y.; XIE, J.; CHENG, J.; HUANG, J.; YI, X. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *PNAS*, v. 107, n. 18, p. 8387-92, May 2010.

CAPÍTULO 1

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO “Papaya meleira
virus”**

RESUMO

Daltro, C.B. Caracterização molecular parcial do “Papaya meleira virus”

No final da década de 1980, foram observados os primeiros mamoeiros apresentando uma exsudação espontânea de látex dos frutos que oxidava e conferia um aspecto “melado” ao mamão. Desta sintomatologia originou o nome da doença meleira do mamoeiro. O agente causal foi isolado e caracterizado como um vírus de partícula isométrica e genoma de RNA fita dupla, com ≈ 12 kpb, denominado de Papaya meleira virus (PMeV). No entanto, apesar da sua importância econômica, até os dias atuais não existe nenhuma informação molecular sobre o PMeV. O objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização molecular parcial do PMeV. O sequenciamento parcial revelou a existência de dois genes, um com função desconhecida (Ptn.Hip) e outro apresentando similaridade com a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Análises comparativas das proteínas do PMeV com as sequências disponíveis nos bancos não identificaram proteínas similares em outros vírus de planta, mas identificaram proteínas homólogas em vírus de dsRNA isolados de fungos (*Mycovirus*). As duas proteínas compartilham maior identidade com proteínas presentes no genoma de *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2), com 20 % de identidade na Ptn.Hip. e de 32 % na RdRp. Foram identificados na RdRp do PMeV, oito motivos conservados característicos da replicase de vírus de dsRNA.. Apesar do PMeV apresentar partícula, o gene da proteína capsial não foi identificado neste estudo e provavelmente está situado na região do genoma não sequenciada. Os resultados obtidos indicam que apesar do PMeV infectar plantas, possui características moleculares mais próximas de *Mycovirus*.

Palavras-chave: PMeV, *Mycovirus*, evolução e taxonomia

ABSTRACT

Daltro, C.B. Partial molecular characterization of the Papaya meleira virus

In the late 1980's, were observed the first papaya plants displaying a spontaneous exudation of latex which oxidized and gave a "sticky" aspect to the fruit. These symptoms allowed the characterization of the disease as Papaya sticky disease. The causal agent was isolated and characterized as a virus with isometric particle and dsRNA genome with ≈ 12 kpb, named Papaya meleira virus (PMeV). However, besides its economic importance, until today there is no molecular information about PMeV. The objective of this work was the partial molecular characterization of PMeV. The partial sequencing revealed the presence of two genes, one with unknown function (Ptn.Hip) and other with similarity with RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Comparative analysis of PMeV proteins not identified similar proteins in other plant virus, but identified a close relationship between the proteins present in PMeV with homologous proteins found in dsRNA viruses from fungi (mycovirus). Both proteins share higher identity with its homologous present in *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2), with 20 % of identity in the Ptn.Hip. and 32 % in the RdRp. Furthermore, were identified into the PMeV RdRp, eight conserved motifs characteristics of RdRps of dsRNA viruses. Besides have viral particles, the capsid protein gene was not found, and probably is located in the genome region not sequenced. The results obtained indicate that although PMeV infect plants, has molecular features more closely *Mycovirus*.

Keywords: PMeV, *Mycovirus*, evolutionary, taxonomy

INTRODUÇÃO

Os vírus com RNA fita dupla (dsRNA) representam um grupo grande e diversificado de agentes patogênicos que infectam uma gama de hospedeiros, desde vertebrados a invertebrados, plantas, fungos e procariotos, vários apresentando importância médica, veterinária ou agrícola (MERTENS, 2004).

Os vírus com dsRNA são classificados em oito famílias: *Totiviridae*, *Birnaviridae*, *Partitiviridae*, *Endornaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae* e *Cystoviridae*, de acordo com suas características moleculares e pela segmentação do genoma (MERTENS, 2004; KING et al., 2011).

Os vírus de dsRNA apesar de ocuparem nichos ecológicos diferentes, compartilham semelhanças quanto à estratégia de replicação, propriedades estruturais, bioquímicas e moleculares. O nível de similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre espécies da mesma família é geralmente baixo, mas a identificação de proteínas com as mesmas funções ou estruturalmente similares em vírus de dsRNA distantemente relacionados, fornecem evidências de ancestralidade comum (MERTENS, 2004).

O “Papaya meleira virus” (PMeV) é um vírus de dsRNA com aproximadamente 12 kpb que infecta o mamoeiro (*Carica papaya L.*), uma fruteira amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Maciel-Zambolim et al., 2000; 2003). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão. A região Nordeste é responsável por 63,34% da produção nacional e a Bahia por 50% da produção brasileira de mamão (IBGE, 2011).

O mamoeiro é uma das fruteiras de maior importância econômica para o mercado brasileiro, entretanto diferentes viroses vêm ocasionando grandes perdas na produção (Lima e Lima, 2002). As viroses já relatadas infectando o mamoeiro no Brasil são: a mancha anelar (Purcifull et al., 1984), o amarelo letal (Loreto et al., 1983) e a meleira (Rodrigues et al., 1989).

A meleira foi inicialmente relatada no Brasil, em mamoeiros no Sul da Bahia (Nakagawa et al., 1987) e Norte do Espírito Santo (Rodrigues et al.,

1989a), posteriormente em Pernambuco e Ceará (Barbosa et al., 1998a), e atualmente foi detectada no México (Perez-Brito et al., 2012).

No período de frutificação, o mamoeiro infectado pelo PMeV apresenta exsudação espontânea de látex nos frutos que posteriormente se oxida, resultando em um aspecto melado, também há o aparecimento de manchas claras na parte externa na polpa (Rodrigues et al., 1989), que contribui para a desvalorização comercial do fruto.

O PMeV é um vírus que não apresenta similaridade com nenhum outro vírus que infecta vertebrado, invertebrado ou planta (Maciel-Zambolim et al., 2000; 2003). A análise comparativa de uma sequência de 150 aminoácidos da RdRp do PMeV revelou a existência de similaridade com diferentes *Mycovirus*. Esta região apresentou 34 % de identidade com a RdRp do *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2) e nenhuma similaridade com genes de vírus de planta (Daltro e Andrade, 2012).

A ausência de informações quanto ao restante do genoma, quais genes estão presentes, a organização genômica e a classificação taxonômica do PMeV justifica o desenvolvimento deste trabalho, que teve como objetivo sequenciar parcialmente o genoma do PMeV a fim de obter informações genômicas mais precisas para classificá-lo taxonomicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração e Purificação do RNA total

A amostra de látex utilizada para a extração de RNA total foi coletada de um mamoeiro com sintomas clássicos de meleira, na fazenda Velame, município de Baraúnas, no estado do Rio Grande do Norte, no ano de 2010.

O látex foi diluído em 2 volumes (V) de tampão citrato de amônio 0,1 M, pH 6,5 e foi realizada a extração de RNA com o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo as instruções do fabricante. O RNA precipitado foi ressuspenso em água livre de nuclease e armazenado a -20 °C. A presença de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 %.

O RNA total foi tratado com RQ1 RNase-free DNase (Promega) seguindo o protocolo do fabricante, purificado novamente e quantificado.

Sequenciamento parcial e Análise genômica do “Papaya meleira virus”

Um total de 30 µg dsRNA precipitado em 1 mL de etanol absoluto foi enviado para +Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), onde foi realizada a síntese de cDNA usando hexâmeros aleatórios, a construção de uma biblioteca de cDNA genômico e o sequenciamento pela Plataforma 454 GS FLX - Titanium. Este método foi escolhido porque o sistema 454 é uma plataforma de sequenciamento de nova geração baseado no pirosequenciamento (Ronaghi et al.,1998). Além disso, a série Titanium de pirosequenciamento apresenta uma capacidade metodológica que permite um aumento no tamanho das leituras (400 pb) e no número de leituras por corrida (Roche, 2008).

Os contigs resultantes do pirosequenciamento foram montados utilizando o programa Geneious 5.4.5 As sequências finais geradas após a montagem dos contigs foram comparadas às depositadas no banco de dados mundial de sequências. O programa BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para encontrar as sequências genômicas similares às do PMeV. A busca por regiões de leitura aberta que provavelmente correspondem a genes virais foi realizada com auxílio do programa ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf). Os genomas dos vírus que apresentaram

maior similaridade com as sequências do PMeV foram estudados a fim de determinar a organização e estrutura genômica do vírus da meleira e efetuar sua classificação taxonômica.

As sequências de aminoácidos deduzidos das proteínas do PMeV e outras espécies de vírus utilizadas neste estudo foram comparadas entre si e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Árvores filogenéticas das proteínas (sequências de aminoácidos) encontradas neste estudo foram construídas com auxílio do programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), utilizando o método Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Sequenciamento parcial do genoma do “Papaya meleira vírus”

Os dados brutos gerados pelo sequenciamento consistiram de 96.215 leituras e 39.081.589 nt com um comprimento médio de leitura de 406 nt. Utilizando o programa Geneious 5.4.5 foi possível montar 519 contigs.

Todos os contigs foram comparados às sequências armazenadas no banco de dados públicos de sequências. Os contigs que apresentaram homologia com vírus foram selecionados e utilizados em uma nova rodada de montagem no programa Geneious 5.4.5 visando obter contigs maiores. Entre os contigs obtidos, foram selecionados dois, um contig de 4666 nt e outro de 3324 nt montados a partir de 20.334 e 12.579 leituras respectivamente. Somados, estes contigs correspondem a aproximadamente 75 % do genoma do PMeV.

O contig maior apresentou similaridade com uma proteína de função desconhecida (Ptn.Hip) encontrada em diferentes *Mycovirus*., *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2), *Diplodia scrobiculata* virus 1 (DsV-1), *Fusarium graminearum* mycovirus 3 (FgV-3), *Phytophthora infestans* virus 3 (PiV-3). O contig menor apresentou similaridade com a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) das mesmas espécies de *Mycovirus* citadas acima, com um vírus que infecta protozoário *Trichomonas vaginalis* virus (TvV), e dois vírus que infectam inseto, *Spissistilus festinus* virus 1 (SpFV1) e *Circulifer tenellus* virus 1 (CiTV1).

Análise das sequências genômicas do “Papaya meleira vírus”

As informações parciais da sequência genômica do PMeV revelaram a presença de dois genes (Ptn.Hip e RdRp). No entanto, a visualização de partículas isométricas no látex de mamoeiros infectados pelo vírus da meleira permite concluir que deve haver, pelo menos um terceiro gene no genoma do PMeV, o da capa protéica.

O nível de similaridade observado entre a sequência parcial de aminoácidos da Ptn.Hip (985 aa) do PMeV e diferentes vírus de dsRNA, variou de 6-20 % (*Mycovirus*), e de 3 % com vírus que infectam inseto (Tabela 1).

Apesar da ausência de informações funcionais sobre a Ptn.Hip, a presença deste gene em vírus isolados de diferentes hospedeiros indica que ele seja funcional. Em alguns vírus como o PgV-1, PgV-2, FgV-3, SpFV-1 e CiTV-1, a Ptn.Hip é uma PARP (proteína rica em resíduos de prolina e alanina) (Spear et al., 2010). Proteínas com estas regiões estão associadas a interação com componentes da membrana celular. Regiões ricas em resíduos de prolina ocorrem em múltiplas proteínas de todos os reinos e facilitam interações proteína-proteína, principalmente em vias de sinalização ou sistemas mecânico-estruturais (Rath et al, 2005). Uma diversidade de vírus que infectam animais possuem proteínas com regiões similares, cuja função é de interagir com proteínas de transporte da membrana celular (Chen e Lamb, 2008). No caso de *Mycovirus* (PgV-1, PgV-2; FgV-3) e vírus que infectam inseto (CiTV-1, SpFV-1) em que a proteína hipotética encontra-se fusionada à RdRp, ela pode ancorar o complexo de replicação na superfície da membrana via interações proteína-proteína. Essa é só uma hipótese, análises funcionais devem ser realizadas para comprovar o papel da Ptn.Hip no ciclo de infecção viral (Spear et al., 2010).

Tabela 1. Percentual de identidade entre sequência de aminoácidos da proteína hipotética (Hip.Ptn) do PMeV e vírus com genoma de dsRNA isolados de diferentes hospedeiros.

Virus	PMeV	PgV-2	SsV-L	FgV-3	GrAV-2	PiV-3	FvV-2	CiTV-1	SpFv-1	PgV-1
PMeV		20	12	11	11	10	10	3	3	6
PgV-2			15	15	14	12	13	6	3	6
SsV-L				42	77	14	22	7	7	11
FgV-3					42	14	21	7	6	10
GrAV-2						13	23	8	7	11
PiV-3							13	6	6	9
FvV-2								7	5	7
CiTV-1									38	10
SpFV-1										10
PgV-1										

Phlebiopsis gigantea mycovirus 2 (PgV-2, GI: 237761989); *Sclerotinia sclerotiorum* virus L (SsV-L, GI: 387600888); *Fusarium graminearum* mycovirus 3 (FgV-3, GI: 262530252); Grapevine associated Totivirus-2 (GraV-2, GI: 108594.1); *Phytophthora infestans* virus 3 (PiV-3, GI: 372125333); *Fusarium viguliforme* virus 2 (FvV-2, GI: 374534512); *Circulifer tenellus* virus 1 (CiTV-1, GI: 302317584);

Spissistilus festinus virus 1 (SpFV-1, GI: 302317587); *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 1 (PgV-1, GI:292559580).

A sequência parcial de aminoácidos da replicase (545 aa) do PMeV foi alinhada com sequências correspondentes de diferentes espécies de vírus com genoma de dsRNA para verificar a similaridade existente entre eles. O nível de identidade observado entre a replicase do PMeV variou de 26 a 32 % (*Mycovirus* não classificado), 12-15 % (vírus da família *Totiviridae*) e 9-11 % (CtV-1, SfV-1) (Tabela 2). A análise comparativa de sequências demonstrou que o PMeV é mais próximo de *Mycovirus* do que dos demais vírus de dsRNA estudados. Apesar de relativamente baixo (32 %), o nível de identidade foi semelhante ao encontrado entre outros mycovirus analisados, com exceção do FgV-3 e *Sclerotinia sclerotiorum* mycovirus-L (SsV-L) em que a identidade foi de 56 %.

Níveis de identidade semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados em um estudo de caracterização molecular do *Mycovirus Chalara elegans* RNA Virus 1 (CeRV1). O percentual de identidade da sequência de aminoácidos da RdRp de CeRV1 com mycovirus da família *Totiviridae* variou de 19 a 39 % (Park et al., 2005).

Segundo Mertens (2004), apesar dos vírus de dsRNA apresentarem estratégias de replicação, estrutura genômica semelhantes, além de, proteínas cognatas, eles representam um grupo muito diversificado. O nível de similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da replicase de espécies de vírus com dsRNA pertencentes à mesma família é geralmente baixo.

Uma árvore filogenética foi construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos da RdRp do PMeV e espécies de vírus de dsRNA. O PMeV foi agrupado juntamente com *Mycovirus* não classificados que formaram um ramo separado das demais espécies analisadas (Figura 1).

A análise do alinhamento das sequências de aminoácidos da RdRp do PMeV e de vírus de dsRNA, identificou a presença de oito motivos conservados (Tabela 3) característicos de RdRp de vírus de dsRNA. Estes motivos também estão presentes nas espécies de vírus isolados de insetos reforçando a relação filogenética entre o PMeV e demais vírus (Spear et al., 2010).

Tabela 2. Percentual de identidade entre a sequência de aminoácidos da replicase (RdRp) do PMeV e de vírus com genoma de dsRNA isolados de diferentes hospedeiros.

virus	PMeV	PgV-2	DsV-1	FgV-3	SsV-L	PiV-3	FvV-2	MoV-1	TvV-1	CiTV-1	SpFV-1	ScVL-A
PMeV		32	30	28	27	26	27	14	15	9	11	12
PgV-2			33	33	34	28	28	16	12	16	11	10
DsV-1				36	34	26	30	16	12	18	14	13
FgV-3					56	28	39	13	14	17	13	10
SsV-L						28	39	10	13	17	13	10
PiV-3							27	14	14	15	10	14
FvV-2								11	9	9	16	4
MoV-1									22	15	12	18
TvV-1										16	9	11
CiTV-1											36	15
SpFV-1												11
ScVL-A												

Diplodia scrobiculata virus 1 (DsV-1, GI: 282937677); *Trichomonas vaginalis* virus 1 (TvV-1, GI: 332015906), *Saccharomyces cerevisiae* virus LA (ScVL-A, GI: M28353.1); *Magnaporthe oryzae* virus 1 (MoV-1, GI: 54193769).

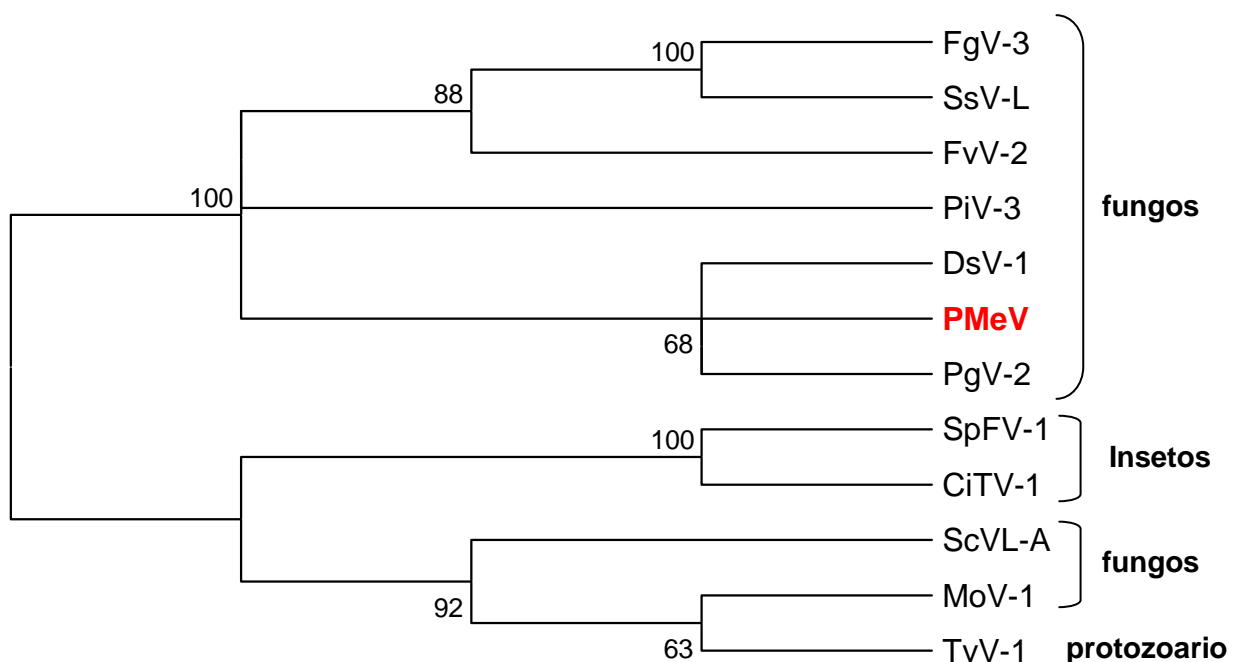


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína RdRp do PMeV e de vírus com genoma de dsRNA isolados de diferentes hospedeiros). Foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 1000 repetições.

Tabela 3. Motivos conservados encontrados na RdRp do PMeV, em diferentes espécies de vírus da família *Totiviridae* (*Totivirus*, *Victoriavirus*, *Leishmanivirus*, *Trichomonasvirus*, *Giardiavirus*) e em vírus de dsRNA não classificados.

Gêneros	vírus	RdRP							
		Motivo I	Motivo II	Motivo III	Motivo IV	Motivo V	Motivo VI	Motivo VII	Motivo VIII
Nao classificados	PMeV	LLGPS	WSASGG	G-KNRVIW	DYSDFNINH	LESGERGTSFINTFLSNICYIR	QGDD	EFLER	RSTSGL
	PgV1	LV-GRA	VAPRGS	GLRLRQII	DYADFNYLH	LWSGWRTTTTMINNTMNLVYN	QGDD	EYLR	RSCAS
	PgV2	LLPGPS	WAASGG	G-KRRAIW	DFSDFNINH	LASGERATSFTNTILSRVYR	NGDD	EFLR	RAGLG
	DsV1	VLPGRN	WAASGG	G-KRRIIW	DYADFNINH	LASGERATSFVNTVLSRAYR	QGDD	EFLR	RSAMG
	FgV3	VLPGRS	WAASGG	G-KLRSIL	DFADFNINH	LQSGERATSWINTLRNHVDH	TGDD	EFVR	RALTG
	SpFV-1	LLTGRS	WIASGS	G-KARAIY	DYADFNRRH	MFSGTRSTDLINTILLNLAYF	QGDD	EYLR	RSLAN
	CiTV-1	LSFGRS	WMASGS	G-KARAIY	DYADFNRRH	MFSGTRSTDLLNTILLNLAYF	QGDD	EYLR	RAIAN
<i>Totivirus</i>	ScVL-Bc	GL-GRE	VIMPGG	G-KVRALY	DFDDFNSQH	LFSGWRLTTFNTALNYCYL	NGDD	EFLR	RGIAT
	ScVL-A	VLMNRG	WVPGGS	G-KQRAIY	DYDDFNSQH	LLSGWRLTTFMNTVLNWAYM	NGDD	EFLR	RSCAT
	HW190S	TLQGGRY	WCVNGS	G-KDRAIF	DYDNFNSQH	LMSGHRATTFNSVLNAAIY	AGDD	EFLR	RAIAS
<i>Victoriavirus</i>	GaRV-L1	LL-GRA	WAVNGA	G-KTRAIY	DYDDFNSHH	LMSGHRGTTFINSVLNKAYL	VGDD	EFLR	RAVAS
	LRV1-1	LL-GRG	WAANGS	G-KTRLLL	DYDDFNSQH	LMSGHRATSFINSVLNRAYI	VGDD	EFLR	RVISS
<i>Leishmanivirus</i>	LRV2-1	LR-GRG	WAANGG	G-KSRLLL	DFEDFNSQH	LMSGHRATSFINTILNTAYL	VGDD	EFLR	RAIAS
<i>Trichomonavirus</i>	TW1	LL-GRG	WSRSGS	G-KERFIY	DYDFNSQH	LPSGHRATTFINTVLNWCYT	AGDD	EFLR	RAIAS
	TW2	TLQGGRG	WVKKGA	G-KTRFIY	DYDFNSQH	LPSGHRATTFINSVLNRAYL	TGDD	EFLR	RAISS
<i>Giardiavirus</i>	GIV	LL-GKV	WGTTGS	T-KVRAVI	DQSNFDRQP	LPSGWKWTALLGALINVTQL	QGDD	EFLR	RMMIK

PgV1 = *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 1, PgV2 = *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2, DsRV1 = *Diplodia scrobiculata* RNA virus-1, FgV3- *Fusarium graminearum* mycovirus 3, CtV-1 = *Circulifer tenellus* virus 1, SfV-1 = *Spissistilus festinus* virus 1, ScVL-A = *Saccharomyces cerevisiae* virus LA e ScVL-Bc = *Saccharomyces cerevisiae* virus L-BC; HvV190S = *Helminthosporium victoriae* virus 190S e GaRV-L1 = *Gremmeniella abietina* RNA virus L1; LRV1-1 = *Leishmania* virus RNA 1-1 e LRV2-1 = *Leishmania* virus RNA 2-1; TvV1 = *Trichomonas vaginalis* virus 1 e TvV2 = *Trichomonas vaginalis* virus 2 ; GIV = *Giardia lamblia* virus.

O grau de similaridade observado entre as proteínas (RdRp e Ptn.Hip) dos *Mycovirus* (PgV-2, FgV-3, DsV-1) e as proteínas do PMeV, atrelado às características moleculares: genoma grande (≥ 9 kpb) constituído de dsRNA e presença de domínios conservados típicos da RdRp de diferentes *Mycovirus*, revelam a estreita relação existente entre eles.

Os *Mycovirus* (PgV-2, FgV-3 e DsRV-1), assim como o CiTV-1 e SpFV-1, compartilham características moleculares importantes: genoma dsRNA monopartido; a mesma organização genômica, similaridade entre suas proteínas e ausência de um capsídeo (não sendo considerados vírus verdadeiros). A ausência de um capsídeo é uma característica marcante que diferenciam estes vírus dos *Totivirus* descritos. Alguns autores suportam que estes vírus sejam agrupados em dois gêneros (um contendo os *Mycovirus* e outro os vírus de inseto), classificados em uma nova família, ao invés de classificados como membro da família *Totiviridae* (Spear et al., 2010, Liu et al., 2012).

A presença da partícula viral indica a existência do gene do capsídeo no genoma do PMeV. Acredita-se que, com base na posição dos genes do PMeV (Ptn.Hip e RdRp) em relação ao PgV-2, que dos 25 % do genoma ainda não sequenciados, a maior percentagem corresponde a região 3', que na maioria dos vírus de planta, é região do genoma na qual a CP esta posicionada.

Apesar das características moleculares compartilhadas pelo PMeV com diferentes *Mycovirus*, a presença de uma proteína capsidial no genoma do PMeV afasta a possibilidade de agrupá-lo dentro de um suposto novo gênero/família junto com os *Mycovirus* ainda não classificados. Talvez o PMeV represente um elo de ligação entre os dsRNA virais não classificados e as espécies da família *Totiviridae*.

O PMeV não é o único vírus de planta que apresenta relação filogenética com *Mycovirus* da família *Totiviridae*. O “Southern tomato virus” (STV, vírus de dsRNA isolado de tomateiro) e o “Blueberry latent virus” (BBLV, vírus isolado do mirtilo) apresentaram a mesma organização genômica que vírus da família *Totiviridae* (duas ORFs parcialmente sobrepostas). Entretanto, a análise filogenética de suas proteínas revelou uma estreita relação com

espécies da família Partitiviridae (Sabanadzovic et al., 2009; Martin et al., 2011). Foi sugerida a criação de uma nova família, Amalgamaviridae, por causa do elo apresentado pelos vírus de planta STV e BBLV com membros da família *Totiviridae* e *Partitiviridae* (Martin et al., 2011).

CONCLUSÕES

O genoma do PMeV foi parcialmente sequenciado (aproximadamente 75 %), fornecendo informações importantes sobre sua organização genômica e relacionamento filogenético. Acredita-se que o gene do capsídeo esteja contido dentro dos 25 % do genoma ainda não sequenciado. Foram identificados dois genes (Ptn.hip e RdRp), também presentes em outros vírus de dsRNA isolados de fungos e insetos. A análise comparativa da sequência de aminoácidos da RdRp do PMeV indica uma maior similaridade com *Mycovirus*. Além disso, a identificação de oito motivos conservados na RdRp reforça o relacionamento do PMeV com estes outros vírus. Pelo fato dos vírus mais relacionados ao PMeV não estarem classificados em nenhuma família/gênero, seu posicionamento taxonômico também fica indefinido.

Mesmo com a obtenção da sequência completa do PMeV, ainda será preciso um estudo comparativo profundo de todos estas novas espécies de vírus de dsRNA caracterizadas recentemente para se ter elementos concretos para o correto posicionamento taxonômico destas espécies de vírus.

BIBLIOGRAFIA

Barbosa CJ, Meissner-Filho PE e Habibe TC (1998) A meleira do mamoeiro. *Bahia Agrícola* 2:57.

Bruenn JA (1993) A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research* 21(24):5667-5669.

Chen BJ, Lamb RA (2008) Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372: 221–232

Daltro CB e Andrade EC (2012) Estudo da similaridade existente entre a RdRp do vírus da meleira do mamoeiro (Papaya meleira virus) e a RdRp de diferentes micovirus. Reunião Anual de Ciência, Tecnologia, Inovação e Cultura no Recôncavo da Bahia (Resumo).

IBGE-*INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA* (2011) <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> (23/03/2013).

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2011) *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on taxonomy of viruses*. New York: Elsevier: 30.

Kitajima EW, Rodrigues C, Silveira J, Alves F, Ventura JA, Aragão FJL and Oliveira, LHR (1993) Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers with Meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira* 8:118-122.

Lima RCA e Lima JAA (2002) Guerra às viroses do mamão. *Universidade Federal do Ceará. Cultivar Hortaliças e Frutas*:14.

Liu H, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Peng Y, Yi X e Jiang D (2012) Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. *BMC Evolutionary Biology* 12:91.

Loreto TJG, Vital AF, Rezende JAM (1983) Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico* 49: 275-279.

Maciel-Zambolim E (2000) Identification and partial characterization of Papaya meleira virus. *Virus: Review & Research* 11:198.

Maciel-Zambolim E, Kunieda-Alonso S, Matsuoka K, Carvalho MG, Zerbini FM (2003) Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology* 52: 389-394.

Martin RR, Zhou J., Tzanetakis IE (2011) Blueberry latent virus: an amalgam of the Partitiviridae and Totiviridae. *Virus Research* 155(1): 175-180.

Mertens, P (2004) The dsRNA viruses. *Virus Research* 101: 3-13.

Park, Y; James, D; Punja, Z K. (2005) Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (Thielaviopsis basicola), *Virus Research* 109 (1) 71-85.

Perez-Brito D, Tapia-Tussell R, Cortes-Velazquez A, Quijano-Ramayo A, Nexticapan-Garcez A e Martín-Mex R (2012) First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 11(71):13564-13570.

Purcifull DE, Edwardson J, Hiebert E and Gonsalves D (1984) Papaya ringspot virus. CMI-AAB Descriptions of Plant Viruses 292:8.

Roche 454 Sequencing (2008) System features for GS FLX Titanium series. <<http://www.454.com/products-solutions/system-features.asp>> (23/01/2013).

Rodrigues CH, Alves FL, Marin SLD, Maffia LA, Ventura, JA and Gutierrez ASD (1989) Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. In: Selecta de Trabalhos sobre a Meleira do mamoeiro. Linhares, EMCAPA.

Ronaghi M (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 281:363-365.

Sabanadzovic S, Valverde RA, Brown JK, Martin RR, Tzanetakis IE (2009) Southern tomato virus: the link between the families Totiviridae and Partitiviridae. Virus Research 140(1-2):130–137.

Spear A, Sisterson MS, Yokomi R, Stenger DC (2010) Plant-feeding insects harbor double-stranded RNA viruses encoding a novel proline-alanine rich protein and a polymerase distantly related to that of fungal viruses. Virology 404(2): 304–311.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.

Yu J, Kwon SJ, Lee KM, Son M, Kim KH: (2009) Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. Arch. Virology 154(11):1855–1858.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA MELEIRA
DO MAMOEIRO “Papaya meleira virus”**

(Tropical Plant Pathology)

RESUMO

RESUMO

Daltro, C.B. Estudo da diversidade genética do vírus da meleira do mamoeiro “Papaya meleira virus”

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil e demais países produtores. O Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial e somente a região nordeste é responsável por 63,4 % da produção nacional. A meleira, doença causada pelo “Papaya meleira virus” (PMeV), tem provocado grandes perdas na produção de mamão nos estados brasileiros de maior representatividade produtiva. Com o intuito de estimar a diversidade genética do PMeV, amostras de látex foram coletadas em mamoeiros provenientes da Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte, e utilizadas para a extração do dsRNA viral. Um oligonucleotídeo específico para região da replicase viral permitiu amplificar por RT-PCR, um fragmento de aproximadamente 550 pb de 31 isolados virais. A análise das sequências indicou uma alta conservação entre eles, acima de 89 %. Além disso, análises comparativas indicaram que o PMeV possui similaridade com *Mycovirus* da família *Totiviridae*. Esta relação filogenética é reforçada pela presença de motivos conservados encontrados em RdRPs de outras espécies de *Mycovirus* com genoma de dsRNA.

Palavras-chave: PMeV, *Carica papaya*, Variabilidade genética

ABSTRACT

Daltro, C.B. Study of genetic diversity of isolates of "Papaya sticky disease virus "

Papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit crop of great economic and social importance for Brazil and other producing countries. Brazil is the second largest producer in the world. The papaya sticky disease, caused by the "Papaya meleira virus" (PMeV), has caused great losses in the Brazilian states responsible for more than 90 % of the country production. In order to estimate the genetic diversity of PMeV, latex samples were collected from papaya plants from Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Ceará and Rio Grande do Norte, and total RNA was extracted. Specific primer for the replicase region allowed the amplification, by RT-PCR, of a fragment of approximately 550 bp from 31 isolates. The sequence analysis indicated a level of conservation above 89 %. Furthermore, comparative analyzes indicated that PMeV has similarity with *Mycovirus* of the family *Totiviridae*. This phylogenetic relationship was reinforced by the presence of conserved motifs found in RdRPs of other species of *Mycovirus* with dsRNA genome.

Keywords: PMeV, *Carica papaya*, Genetic variability

INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya L.*) fruteira originária do sul do México encontra-se mundialmente distribuída, sendo cultivada em diferentes países dos continentes: Americanos, Africano, Asiático e na Oceania. Dados divulgados pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), informam que a produção mundial de mamão em 2011 foi de cerca de 11.838.651 toneladas o que corresponde a mais de 10 % de todos os frutos tropicais produzidos no mundo. Os países que lideram o rank de produção mundial são a Índia (35 %) e o Brasil (15,7 %). O Brasil produziu 1.854.340 toneladas em 35.531 hectares com um valor de produção estimado em U\$ 531 milhões (FAO, 2011). Dentre os estados brasileiros, o estado da Bahia é o principal produtor responsável por 50 % da produção nacional seguido pelo Espírito Santo (30%) e Ceara (6%) (IBGE, 2011).

No mamoeiro, os principais fatores que limitam a expansão da produtividade, são as pragas e as doenças, destacando-se as viroses. A meleira do mamoeiro, doença causada pelo “Papaya meleira virus” foi relatada na década de 80 afetando pomares no sul da Bahia (Nakagawa et al.,1987; Correa et al., 1988) e norte do Espírito Santo (Rodrigues et al., 1989a e b), mais recente nos estados de Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte (Barbosa et al., 1998a e b). Por muito tempo, a meleira foi uma doença de ocorrência restrita ao Brasil, mas em 2012 foi detectada em mamoeiros provenientes de sete estados no México (Perez-Brito et al., 2012).

Os sintomas característicos da meleira são observados no período de frutificação, com a exsudação espontânea de látex dos frutos que ao oxidar confere um aspecto borrado e melado ao fruto, desvalorizando-o comercialmente (Rodrigues et al., 1989a;b).

A composição e tamanho do genoma do PMeV são pouco comuns em vírus de planta. O PMeV é um vírus composto de RNA fita dupla (dsRNA) de aproximadamente 12 kpb, envolto por uma partícula isométrica de cerca de 50 nm de diâmetro (Kitajima et al., 1993; Maciel-Zambolim et al., 2003). Apesar de mais de 20 anos da sua descoberta, e atualmente considerado a principal

virose do mamoeiro, não há informações quanto a organização e a sequência genômica ou mesmo sobre a diversidade genética do vírus em áreas produtoras. Araújo et al. (2007) relata em seu trabalho ter obtido aproximadamente 65 % da sequência genômica, porém estas informações não estão disponíveis no banco de dados públicos, apenas uma sequência parcial da replicase publicada no referido trabalho. Diante desta ausência de informações, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética existente entre isolados do PMeV provenientes de diferentes regiões produtoras de mamão do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de látex de *Carica papaya L.*

Amostras de látex foram coletadas de mamoeiros com sintomas clássicos de meleira nos estados de Pernambuco (Petrolina); Espírito Santo (Sooretama, Linhares); Bahia (Juazeiro, Porto Seguro, Eunápolis, Teixeira de Freitas); Ceará (Paraipaba, Quixeré, Acaraú) e Rio Grande do Norte (Baraúnas, Vera Cruz, São José de Mipidú), como descrito na Tabela 1. As coletas foram realizadas entre os anos de 2008 e 2011, com exceção do isolado PMeV-47, que foi coletado no ano de 2000.

Extração de RNA total

O látex, 150 µL, proveniente de frutos sintomáticos foi diluído em 2 volumes (V) de tampão citrato de amônio 0,1 M, pH 6,5, e a extração de RNA foi realizada com o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo as instruções do fabricante. O RNA precipitado foi ressuspendido em 20 µL de água livre de nuclease e armazenado a -80°C. A presença de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Transcrição reversa, amplificação e clonagem do fragmento gênico viral

A transcrição reversa (RT) consistiu de duas etapas consecutivas. Durante a primeira etapa foram adicionados em um microtubo: 5 µg de RNA total, 2 pmol de hexâmeros de sequência aleatória e água livre de nucleases completando o volume para 12 µL. A amostra foi incubada por 3 min a 95 °C e, transferida imediatamente para o gelo. Na segunda etapa foram adicionados ao microtubo: 4 µL do tampão 5x da reação, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M, 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM; 1 µL (200 u) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A reação final foi incubada a 37 °C por 1 h e em seguida, a 70 °C por 15 min.

A região genômica de interesse foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se 2,5 µL do cDNA, 5 µL do tampão 10x da PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,5 µL (1U) da Taq Platinum DNA polimerase

(Invitrogen), 0,5 µM do oligonucleotídeo descrito por Araújo et al. (2007), o PMeV 5'-ACCACAATGGGTATTTAAAG-3', o volume da reação foi completado para 50 µL adicionando-se água livre de nuclease. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos que envolvem as etapas sequenciais de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento do oligonucleotídeo a 42 °C por 1 minuto e, extensão a 72 °C por 2 minutos, por fim, a amostra foi incubada a 72 °C por 10 minutos (Araújo et al., 2007). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %.

Os amplicons foram clonados utilizando o kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), seguindo a metodologia recomendada pelo fabricante. Cerca de 5 µL da reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, pelo método do choque térmico (Sambrook et al., 1989). As células bacterianas foram posteriormente plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 mg/mL), acrescido de IPTG e X-Gal. As colônias recombinantes foram identificadas pela coloração branca e transferidas para meio LB líquido com ampicilina (100 mg/mL) e incubadas a 37°C por 12 horas a 250 rpm. A clonagem foi confirmada após a extração do DNA plasmidial (Zhou et al., 1990), clivagem enzimática com a *EcoRI* e análise por eletroforese em gel de agarose a 1 %. Os clones confirmados foram mantidos em *Escherichia coli*, na forma de culturas armazenadas a -80°C na presença de glicerol.

Sequenciamento e análise das sequências genômicas do PMeV

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados utilizando os primer M13 forward (F) e reverso (R). A sequência consenso de cada isolado foi obtido pelo alinhamento das sequências F e R geradas pelo programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O programa tBlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para a identificação de sequências similares no banco de dados, GenBank. As sequências de aminoácidos parciais para a RdRp foram deduzidas utilizando a ferramenta ORFinder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da replicase dos diferentes isolados virais foram

analisadas, comparadas entre si e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011), usando o algoritmo de Neighbor-Joining com 1000 bootstrap de repetições.

Tabela 1. Isolados de “Papaya meleira virus” estudados durante o desenvolvimento deste trabalho e suas respectivas regiões de origem.

ISOLADOS	LOCAL	Ano da coleta
1. P03	Eunápolis, BA	2011
2. P10	Sooretama, ES	2009
3. P20	Quixeré (Itaitinga), CE	2008
4. P21	Quixeré (Itaitinga), CE	2008
5. P22	Acaraú, CE	2008
6. P23	Sooretama, ES	2009
7. P27	Quixeré (Oiticica do Miranda), CE	2008
8. P36	Sooretama, ES	2009
9. P38	Sooretama, ES	2009
10. P40	Sooretama, ES	2009
11. P41	Linhares (bebedouro), ES	2009
12. P47	Teixeira de Freitas, BA	2000
13. P107	Linhares, ES	2009
14. P122	Linhares, ES	2009
15. P131	Linhares, ES	2009
16. P135	Linhares, ES	2009
17. P136	São José de Mipidú, RN	2009
18. P137	Petrolina (projeto Nilo Coelho, N10, lote 1405), PE	2008
19. P140	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 44), BA	2008
20. P 145	Baraúnas, RN	2009
21. P148	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 52), BA	2008
22. P151	Baraúnas, RN	2008
23. P153	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 52), BA	2009
24. P154	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 42), BA	2008
25. P166	Porto Seguro, BA	2010
26. P170	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 44), BA	2008
27. P172	Porto Seguro, BA	2010
28. P173	Porto Seguro, BA	2010
29. P174	Porto Seguro, BA	2010
30. P 175	Juazeiro (Projeto Mandacarú I, lote 51), BA	2008
31. P200	Petrolina (projeto Nilo Coelho, N9 lote 1114), PE	2008
32. P000*	Espírito Santo	N/I

*sequência retirada do trabalho de Araújo et al. (2007). N/I= não informado

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Extração do RNA total

As amostras de látex foram coletadas em mamoeiros apresentando sintomas de meleira em plantios comerciais. A diagnose molecular do PMeV foi realizada com sucesso. Nas 31 amostras de látex testadas, foi detectada a presença do dsRNA viral de aproximadamente 12 kb (Figura 1A).

Transcrição reversa, amplificação e clonagem do fragmento gênico viral

A região genômica escolhida para a análise corresponde a uma parte do gene que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Esta escolha foi baseada na disponibilidade de um oligonucleotídeo descrito por Araújo et al. (2007), e também por ser um gene geralmente conservado entre gêneros/famílias de vírus devido a sua importância funcional (Bruenn, 1993; Routhier e Bruenn, 1998).

Utilizando o RNA total extraído do látex como molde nas reações de RT-PCR, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 560 pb (Figura 1B). Os fragmentos foram clonados, e a confirmação da clonagem foi realizada por meio da clivagem do DNA plasmideal e visualização em gel de agarose (Figura 1C). Os fragmentos foram sequenciados resultando em uma sequência de 556 pb.

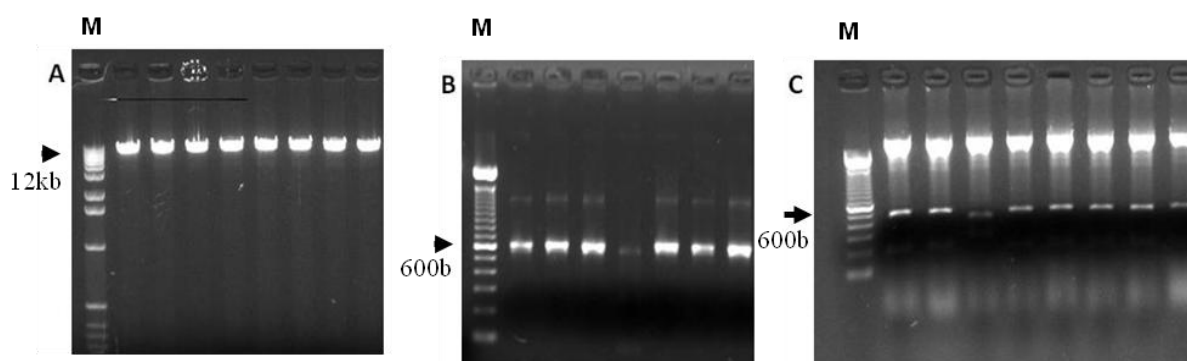


Figura 1. (A) Extração de RNA total a partir do látex de amostras de mamoeiro sintomáticos. **(B)** Fragmento de 600 pb amplificado por RT-PCR a partir do RNA total extraído. **(C)** Clivagem enzimática (EcoRI) dos plasmídeos para a liberação do fragmento viral clonado. M, marcador de peso molecular 1 kb (A) e 100 pb (B e C).

Análise da sequência genômica do PMeV

Visando obter informações relativas à classificação taxonômica do PMeV, foi escolhida aleatoriamente a sequência do isolado PMeV-41 para ser utilizada nos estudos de busca de sequências similares junto ao banco de dados de sequências, o GenBank. Foi utilizada a ferramenta de busca tBlastX.

A sequência do PMeV-41 possui similaridade com RdRp de vírus com genoma de dsRNA. Entretanto, nenhuma das sequências similares pertence a vírus que infectam plantas, mas a replicases de *Mycovirus* não classificados e espécies da família *Totiviridae* (Tabela 2). Alguns destes *Mycovirus*, como o *Phlebiopsis gigantea mycovirus 2* (PgV-2), possui genoma de tamanho similar ao do PMeV (12 kb) (Kozlakidis et al., 2009).

A tradução da sequência de nucleotídeos do PMeV-41 pelo programa ORFinder resultou na obtenção de uma sequência de 153 aminoácidos. A busca de sequências de proteínas similares pela ferramenta Blastp levou à identificação das mesmas sequências obtidas na busca pelo tBlastX.

A identidade na sequência de aminoácidos entre o PMeV-41 e outros *Mycovirus* variou de 26 a 32 % (tabela 2). Apesar de não ser elevada, os valores estão próximos aos observados entre os *Mycovirus* representados na tabela 2, que variou de 24 a 37 %, com exceção do Grapevine associated totivirus 2 que possui identidade de 83 e 63 % com o *Fusarium graminearum mycovirus 3* (FgV-3) e *Sclerotinia sclerotiorum mycovirus-L* (SsV-L), respectivamente e entre o FgV-3 e SsV-L com 63 %. Resultado similar foi obtido quando comparadas as sequências de nucleotídeos. O nível de identidade observado entre o PMeV-41 e outros mycovirus variou de 47-55 %, enquanto que entre os *Mycovirus* a variação ficou entre 53 e 72 %.

Os valores de identidade encontrados entre o PMeV e *Mycovirus* são similares aos outros observados em diferentes trabalhos sobre a caracterização de diferentes vírus da família *Totiviridae* (Cheng et al., 2003; Park et al., 2005; Spear et al., 2010; Goodman et al., 2011). O percentual de identidade na sequência de aminoácidos da RdRp do mycovirus *Coniothyrium minitans* RNA virus (CmRV) em comparação com seis vírus da família

Totiviridae variou de 46-64 % (Cheng et al., 2003). Park et al. (2005) encontraram uma homologia que variou de 19 e 39 % entre o *Chalara elegans* RNA virus 1 (CeRV1) e *Mycovirus* da família *Totiviridae*. O mesmo nível de conservação foi observado entre vírus de dsRNA que infectam outros organismos. Os vírus, *Spissistilus festinus* virus 1 (SpFV1) e *Circulifer tenellus* virus 1 (CiTV1), apesar de terem sido isolados de insetos da mesma classe (Hemiptera), a homologia entre as sequências de aminoácidos da RdRp ficou em 41,7 % (Spear et al., 2010). Goodman et al. (2011) verificaram que a homologia na sequência de aminoácidos da RdRp entre quatro prováveis espécies de *Trichomonas vaginalis* virus (TVV) estava entre 26 a 56 %.

O alinhamento da sequência de isolados de PMeV representativos de cada região com o PgV-2, identificou seis regiões conservadas entre o PMeV e o PgV-2 (Figura 2). Destas seis sequências conservadas, duas (WSASGG e o GKNRVIWNT) representam domínios conservados de RdRPs de vírus de dsRNA descritos (Bruenn, 1993; Spear et al., 2010). Estes resultados reforçam um provável relacionamento filogenético entre o PMeV e vírus de dsRNA isolados de outros hospedeiros (fungos, protozoários, insetos).

Tabela 2. Percentual de identidade entre o PMeV-41 e membros da família *Totiviridae*. Valores acima da diagonal referem-se à identidade de aminoácidos e os valores abaixo da diagonal à de nucleotídeos.

	PgV-2	FgV-3	DsRV-1	GraTV-2	SsV-L	PiRV-3	PMeV-41
PgV-2		34	37	37	37	28	32
FgV-3	57		36	63	63	24	27
DsRV-1	55	53		39	37	29	30
GraTV-2	54	59	54		83	28	28
SsV-L	56	57	54	72		26	26
PiRV-3	53	53	53	55	57		26
PMeV-41	52	49	47	55	53	50	

PgV-2: *Phlebiopsis gigantea* mycovirus -2 (AM111097.2); GraTV-2: Grapevine associated Totivirus-2 (GU108594.1); DsRV-1: *Diplodia scrobiculata* RNA virus 1 (EU547739.1); FgV-3 : *Fusarium graminearum* mycovirus 3 (GQ140626.1); SsV-L: *Sclerotinia sclerotiorum* mycovirus-L (JQ513382.1); PiRV-3: *Phytophthora infestans* RNA virus 3 (JN603241.1)

P41ES	LSLYKGGSRGNNTYSTTIESMNRREENIRKDMYNSLFFSIVKRIHRPFRTFRDWFVKVFS
P137PE	LSLYKGGSRGNNTYSTTIESMNRREENIRKDMYNSLFFSIVKRIHRPFRTFRDWFVKVFS
P170BA	LSLYKGGSRGNNTYSTTIESINRREENIRKDMYNSMFFSIVKRIHRPFKTFRDWFVKVFS
P21CE	LSLYKGGSRGNNTYSTTIESINRREENIRKDMYNSVFFSIVKRIHRPFKTFRDWFVKVFS
P145RN	LSLYKGGSRGNNTYSTTIESINRREENIRKDMYNSMFFSIVKRIHRPFKTFRDWFVKVFS
PgV-2	INSIPRLKSSSELHQERIHYSRLRYDQAFKNALTLTMRELIPHTIRTPPTFSEWYNDRMA
	:. . . . : . * . . * : : * : . : : : * . ** :* : : : :
P41ES	WSASGGCPGAKVKWSDDER-IRVNKRGALLNVSVEEVKAIKINDSYHNPVHYSKAARKYEK
P137PE	WSASGGCPGAKVKWSDDER-IRVNKRGALLNVSVEEVKAIKINDSYHNPVHYSKAARKYEK
P170BA	WSASGGCPGAKVNWSDER-IRVNKRGALLNVSVEEVVKAINDSFQNPVHYSKAARKYEK
P21CE	WSASGGCPGAKVNWSDER-IRVNKRGALLNVSVEEVVKAINDSFQNPVHYSKAARKYEK
P145R	WSASGGCPGAKVNWSDER-IRVNKRGALLNVSVEEVVKAINDSFQNPVHYSKAARKYEK
PgV-2	WAASGGAPGARVVWDEGTRGERINKRGALLAIPPEEDLRKVLIMSAG-AVLYSKAASKFEK
	<u>*:*****.***:* *</u> . . : <u>*:*****</u> :. *:: *.: * . * <u>***** *:*</u>
P41ES	GKNRVIWNTSLLMYLAQSYLLYTFESILDPLQHDQSFELNQISSWNASTANADL
P137PE	GKNRVIWNTSLLMYLAQSYLLYTFESILDPLQHDQSFELNQISSWNASTANADL
P170BA	GKNRVIWNTSLLMYLAQSYLLYTFESVLDPLQHDQSFELNQISSWNASTANADL
P21CE	GKNRVIWNTSLLMYLAQSYLLYTFESVLDPLQHDQSFELNQISSWNASTANADL
P145RN	GKNRVIWNTSLLMYLAQSYLLYTFESVLDPLQHDQSFELNRISSWNASTANADL
PgV-2	GKRRAIWNTAIEHYLFQAYILDIDASAISEGASG-----LPVSWNAATH----
	<u>**.*.*****:</u> <u>** *:*:*</u> : : : . . <u>*****:*</u>

Figura 2. Motivos conservados encontrados na RdRP de isolados do PMeV representativo de cada estado brasileiro e a RdRp de *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2 (PgV-2).

Estudo da variabilidade genética

Para realizar o estudo da diversidade genética foi incluída às demais sequências de nucleotídeo obtidas, a sequência de um isolado publicada no trabalho de Araújo et al. (2007), proveniente do Espírito Santo, aqui denominado de P000-ES, mas que ainda não foi depositada no GenBank.

As análises comparativas das sequências parciais de nucleotídeos dos 32 isolados indicaram um grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos de 88-100 % (Tabela 3, abaixo da diagonal) e de aminoácido 90 a 100 % (Tabela 3, acima da diagonal).

Os valores observados demonstram que a região analisada se mostra conservada, mesmo entre isolados provenientes de regiões distantes (p.ex.: PMeV-20 e os isolados 107, 131, 135) ou coletados em intervalo de até onze anos (p.ex.: PMeV-47 e os isolados 3, 172 e 173).

Os valores de identidade entre os isolados de PMeV estão próximos aos observados em estudos similares realizados com RdRp de outras espécies de vírus de dsRNA (Kim et al., 2009; Goodman et al., 2001; Fraga et al., 2012).

A conservação na sequência de aminoácidos da RdRp entre quatro isolados Coreanos do *Cryphonectria nitschkei* chrysovirus-1 (CnV-1, família *Chrysoviridae*) foi maior que 98 % (Kim et al., 2009). Estudo realizado com dezenove isolados virais identificados nos Estados Unidos, pertencentes a quatro possíveis espécies de *Trichomonas vaginalis virus* (TVV-1 a 4) determinaram que o nível de identidade na proteína RdRp variou de 82 a 94 %, dependendo do vírus analisado (Goodman et al., 2011). Em outro estudo com TVVs isolados em Cuba, verificou-se que a conservação em nível de aminoácidos da RdRp era, em média de 81 a 85 %, dependendo do vírus (Fraga et al., 2012). Além disso, o nível de identidade de aminoácidos da RdRp era similar ao nível de identidade observado para o genoma completo (Fraga et al., 2012).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da RdRp viral foram utilizados para a geração de árvores filogenéticas (Figuras 3 e 4, respectivamente). A maioria dos isolados foi agrupada de forma similar nas duas árvores filogenéticas geradas. Acredita-se que, as pequenas diferenças observadas entre as árvores geradas foram ocasionadas pela maior variação existente entre as sequências de nucleotídeo em comparação com as sequências de aminoácidos. Não foi observada uma tendência dos isolados se agruparem de acordo com a região onde foram coletados, fato já esperado em vista da alta conservação entre os isolados.

Tabela 3. Percentual de identidade existente entre as sequências aminoácidos deduzidos da RdRp (valores acima da diagonal) e as sequências de nucleotídeos (valores abaixo da diagonal) dos 32 isolados de “Papaya meleira virus”

ISOLADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
1.P3BA		95	99	95	100	97	99	95	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	94	99	94	94	94	94	95	99	100	95	95	99	95
2.P10ES	91		94	99	95	91	94	99	94	99	95	94	94	93	94	94	94	94	94	99	94	99	99	99	99	100	94	95	100	100	94	100	
3.P20CE	95	90		94	99	98	100	94	99	94	99	99	100	99	100	100	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	94	99	99	94	94	99	94
4.P21CE	91	99.8	90		95	91	94	98	94	99	95	94	94	93	94	94	94	94	94	99	94	99	98	98	99	99	94	95	99	99	94	99	
5.P22CE	95	91	94	91		97	99	95	99	95	99	99	99	98	99	99	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	95	99	100	95	95	99	95
6.P23ES	97.5	89.5	98	89.5	98		98	91	97	91	97	98	98	96	98	98	97	98	96	91	97	90	90	90	90	91	96	97	91	91	96	91	
7.P27CE	98	90	95	90	98	99		94	99	94	99	99	100	99	100	100	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	94	99	99	94	94	99	94
8.P36ES	89	97.5	89	97	90	88	89		94	99	95	94	94	94	94	94	94	94	94	98	94	98	99	99	98	99	94	95	99	99	94	99	
9.P38ES	98	90	95	90	98	98	98	88		94	99	99	99	98	99	99	99	99	99	93	99	93	93	93	93	93	94	98	99	94	94	99	94
10.P40ES	90	98	89	98	90	89	89	98	89		95	94	94	94	94	94	94	94	94	99	94	99	99	99	99	99	94	95	99	99	94	99	
11.P41ES	95	90	95	90	98	98	95	89	98	89		99	99	99	99	99	99	99	98	94	99	94	94	94	94	94	95	98	99	95	95	98	95
12.P47BA	95	90	95	90	94	99	95	89	98	89	95		99	98	99	99	99	99	98	93	99	93	93	93	93	93	94	98	99	94	94	98	94
13.P107ES	94	90	94	90	94	98	94	88	97.5	89	94	94		99	100	100	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	94	99	99	94	94	99	94
14.P122ES	94	90	94	90	94	98	94	89	97.5	89	94	94	93		99	99	99	98	98	92	98	92	92	92	92	93	98	98	93	93	98	93	
15.P131ES	95	91	95	90.5	94	98	95	89	96	90	95.5	95	94	94		100	99	99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	99	99	94	94	99	94
16.P135ES	95	91	95	90.5	94	98	95	89	96	90	95.5	95	94	94	95		99	99	99	94	99	94	94	94	94	94	94	99	99	94	94	99	94
17.P136RN	94	90	94	90	94	98.5	94	89	98	89	95	94	94	93	94	94		99	98	93	99	93	93	93	93	93	94	98	99	94	94	98	94
18.P137PE	97	90	95	90	97	99	98	89	98	89	98	97.5	94	94	95	95	95		98	93	99	93	93	93	93	93	94	98	99	94	94	98	94
19.P140BA	95	90	95	90	95	98	95	89	99	89	95	94	94	94	95	95	94	95		94	98	94	94	94	94	94	94	99	99	94	94	100	94
20.P145RN	90	98	90	98	91	89	90	97.5	89	98	90	90	89	90	90	90	90	90	90		93	99	98	98	98	99	99	94	94	99	99	94	99
21.P148BA	98	90	95	90	98	98.5	98	89	98	89	95.5	95	94	94	95	95	94	98	95	90		93	93	93	93	93	94	98	99	94	94	98	94
22.P151RN	90.5	99	90	98	91	89	90	97	90	98	90	90	90	90	90	90	90	90	90	99	90		98	98	98	99	99	94	94	99	99	94	99
23.P153BA	90	98	90	98	90	89	90	98	89	99	89	90	89	89	90	90	89	90	89	98	89	98		100	98	99	94	94	99	99	94	99	
24.P154BA	90	99	90	98	90	89	90	98	89	99	90	90	89	89	90	90	90	90	89	99	90	98	99.8		98	99	94	94	99	99	94	99	
25.P166BA	90.5	99.8	90	99.6	91	89	90	97	90	98	90	90	90	90	90	90	90	90	99	90	99.6	98	98		99	94	94	94	99	99	94	99	
26.P170BA	91	100	90	99.8	91	89.5	90	97.5	90	98	90	90	90	90	90.5	90.5	90	90	90	99.6	90	99	98	99	99.8		94	95	100	100	94	100	
27.P172BA	95	91	94	91	95	98	98	90	97	90	98	94	93	93	94	94	94	97	94	90.5	98	91	90	90	91	91	99	94	94	99	94	99	94
28.P173BA	95	91	94	91	95	98	98	90	97.5	90	98	98	93	94	98	98	94	97.5	95	91	98	91	90	90	91	91	94	99	95	95	99	95	
29.P174BA	91	100	90	99.8	91	89.5	90	97.5	90	98	90	90	90	90	90.5	90.5	90	90	90	99.6	90	99	98	99	99.8	100	91	91		100	94	100	
30.P175BA	91	98	90	97.5	91	90	90.5	97	90	98	90	90.5	90	90	91	91	90	90.5	90	98	90	99.6	98	98	99.6	98	91	91	98		94	100	
31.P200PE	95	90	95.5	90	95.5	98	95	89	99	89	95	95	94	94	95.5	95.5	94	95	95.5	90	95	90	89	90	90	90	94	95	90	90		94	
32.P000ES	91	99	90	99	91	89.5	90	98	90	99	90	90	90	90	90.5	90.5	90	90	90	99	90	99	99	99	99	99	99	90.5	91	99	99	90	

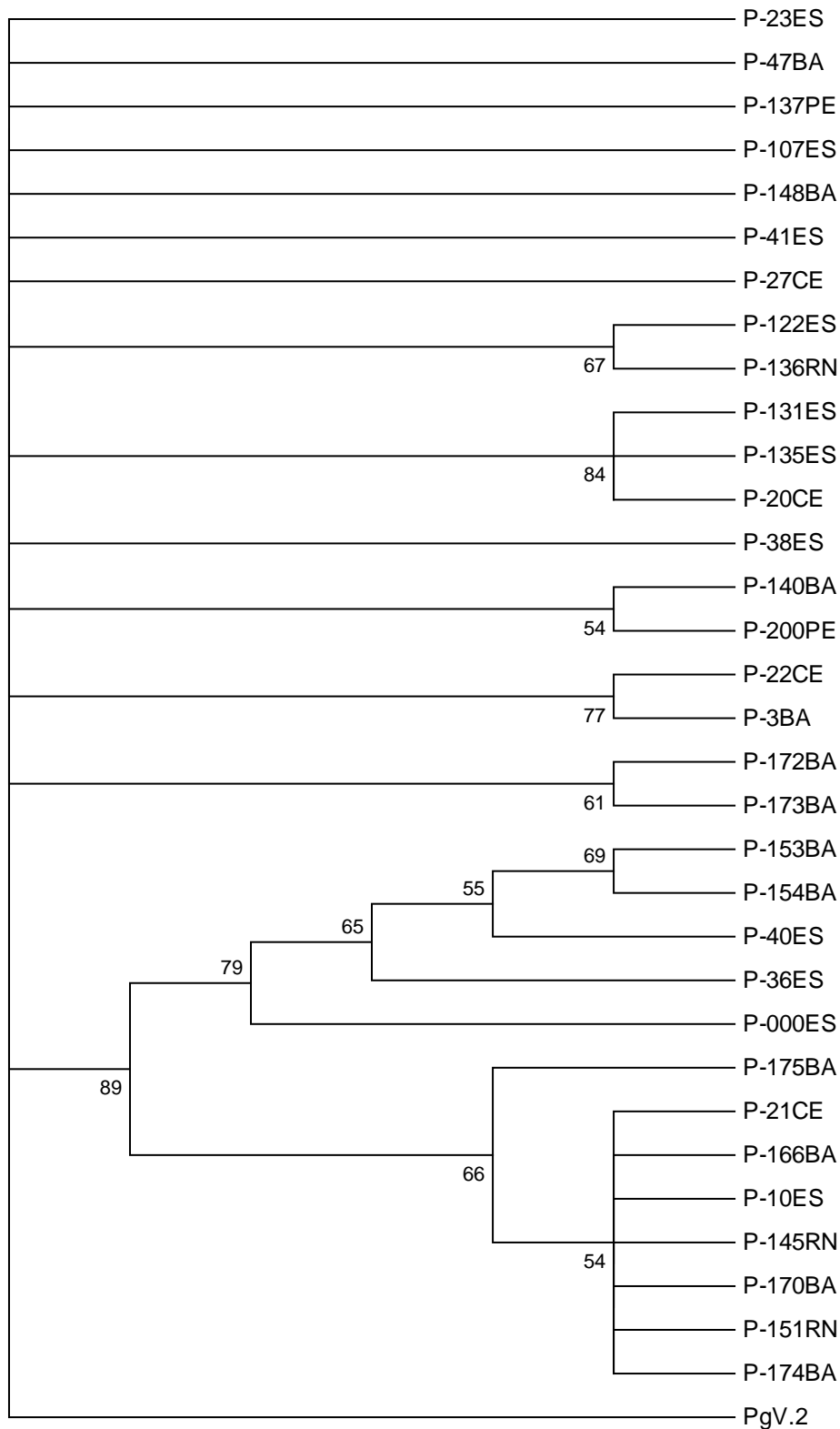


Figura 3. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene RdRp dos isolados de Papaya mealybug virus (PMeV). Foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), método Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 repetições. PgV-2, *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2

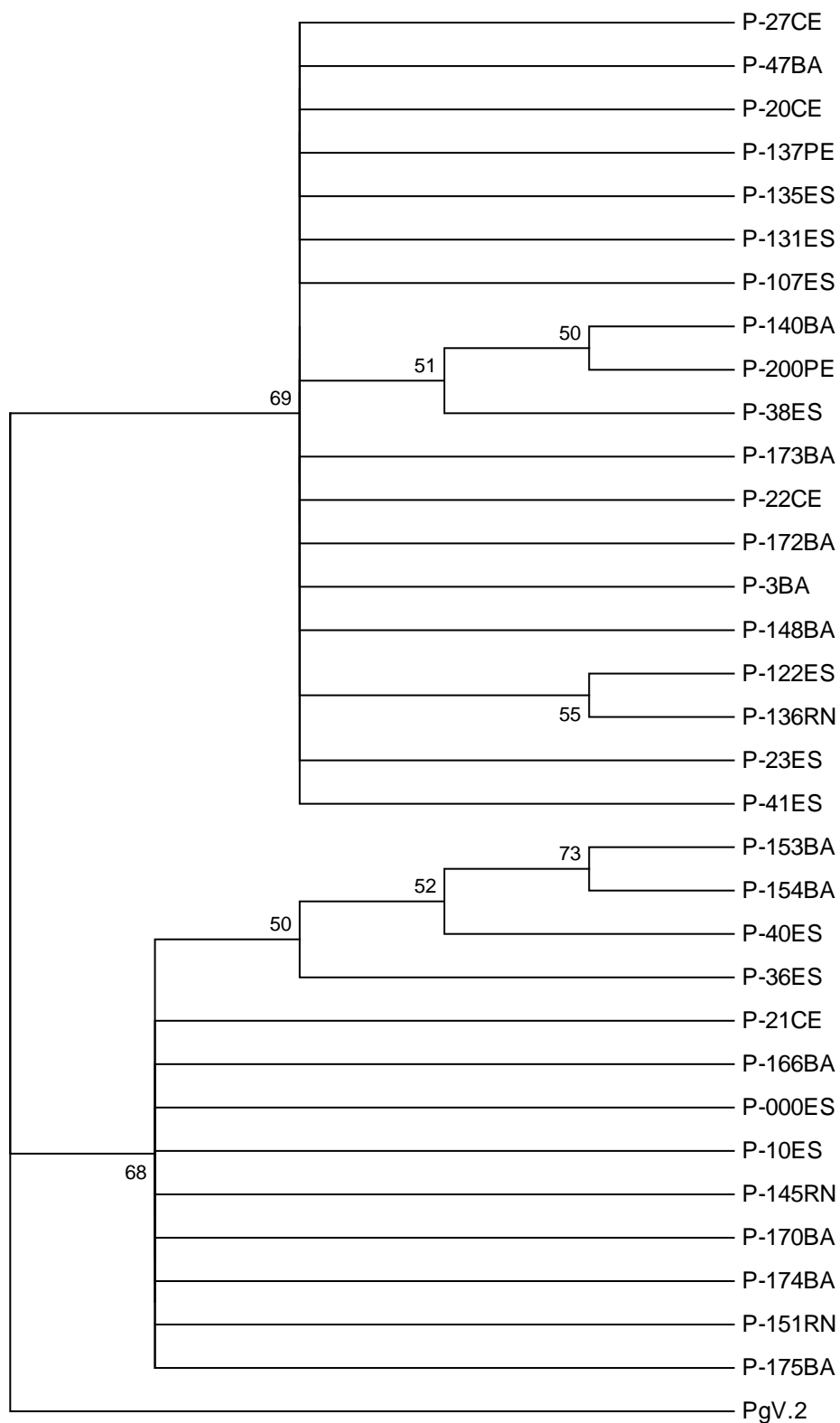


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína RdRp dos isolados de Papaya mealyra virus (PMeV). Foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 1000 repetições. PgV-2, *Phlebiopsis gigantea* mycovirus 2.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos da análise comparativa da sequência parcial de nucleotídeo e aminoácidos deduzidos da replicase do PMeV com sequências armazenadas no banco de dados público, apontam a existência de uma proximidade filogenética entre o PMeV e vírus de dsRNA que infectam fungos. Além disso, a sequência de aminoácidos analisada contém dois domínios conservados presentes na RdRp de vírus da família *Totiviridae*, reforçando um provável relacionamento filogenético do PMeV com vírus desta família. Uma definição concreta sobre o correto posicionamento taxonômico do PMeV poderá ser realizada após a obtenção de sua sequência genômica completa.

O estudo de diversidade genética revelou que a região analisada se mostra conservada entre os diferentes isolados do PMeV, com nível de identidade similar aos verificados para outras espécies de vírus com genoma de dsRNA. As regiões que apresentaram os maiores níveis de identidade entre os isolados de PMeV podem ser usadas visando à produção de plantas resistentes ao vírus da meleira via transformação de plantas, como já realizado para o vírus da mancha anelar do mamoeiro.

BIBLIOGRAFIA

- Araújo MMM, Tavares ET, Da Silva, FR, Marinho VLA, Souza Jr. MT (2007) Molecular detection of Papaya meleira virus in the látex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 146: 305-310.
- Barbosa CJ, Meissner-Filho PE and Habibe TC (1998a) A meleira do mamoeiro. *Bahia Agrícola* 2: 57.
- Barbosa CJ, Meissner-Filho PE, Habibe TC, Patrocínio E, Tatagiba J, Nascimento AS and Matrangolo WJR (1998b) Detecção de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro inoculadas com a meleira. *Summa Phytopathologica* 24: 60.
- Bruenn JA (1993) A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research* 21(24): 5667-5669.
- Cheng J, Jiang D, Fu Y, Li G, Peng Y and Ghabrial SA (2003) Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research* 93: 41-50.
- Correa FJF, Franco BJDC, Watanabe HS, Sakay MY and Yamashita, EMA (1988) Estudo preliminar sobre exsudação do látex do mamoeiro - Teixeira de Freitas. *Anais do 2º Simp. Brasileiro Cultura do mamoeiro* 2: 409-428.
- FAO- Food and Agriculture Organization (2011) < <http://www.fao.org>> (15/03/2013).
- Fraga J, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A (2012) Genetic characterization of three Cuban *Trichomonas vaginalis* virus. Phylogeny of Totiviridae family. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 113–120.
- Goodman RP, Freret TS, Kula T, Geller AM, Talkington MW (2011) Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* species (Family Totiviridae). *J Virol* 85: 4258–4270.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2011) <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> (23/03/2013).
- Kitajima EW, Rodrigues C, Silveira J, Alves F, Ventura JA, Aragão FJL and Oliveira, LHR (1993) Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers with Meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira* 8: 118-122.
- Kozlakidis Z, Hacker CV, Bradley D, Jamal A, Phoon X, Webber J, Brasier, CM, Buck KW, Coutts RHA (2009) Molecular characterization of two novel doublestranded RNA elements from *Phlebiopsis gigantea*. *Virus Genes* 39: 132-136.
- Maciel-Zambolim E (2000) Identification and partial characterization of papaya meleira virus. *Virus: Review & Research* 11: 198.
- Nakagawa J, Takayama Y and Suzukama Y (1987) Exsudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. *Anais IX Congresso Brasileiro de Fruticultura* 9: 555-559.

- Park, Y; James, D; Punja, Z K. (2005) Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*), *Virus Research* 109 (1): 71-85.
- Perez-Brito D, Tapia-Tussell R, Cortes-Velazquez A, Quijano-Ramayo A, Nexticapan-Garcez A e Martín-Mex R (2012) First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 11(71): 13564-13570.
- Purcifull DE, Edwardson J, Hiebert E and Gonsalves D (1984a) Papaya ringspot virus. *CMI-AAB Descriptions of Plant Viruses* 292: 8.
- Rodrigues CH, Alves FL, Marin SLD, Maffia LA, Ventura, JA and Gutierrez ASD (1989a) Meleira do mamoeiro no estado do Espírito Santo: enfoque fitopatológico. In: *Selecta de Trabalhos sobre a Meleira do mamoeiro*. Linhares, EMCAPA.
- Rodrigues CH, Ventura JA and Maffia LA (1989b) Distribuição e transmissão da Meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* 14: 118.
- Routhier E e Bruenn JA (1998) Functions of Conserved Motifs in the RNA-Dependent RNA Polymerase of a Yeast Double-Stranded RNA Virus. *Journal of Virology* 72(5):4427-4429.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spear A, Sisterson MS, Yokomi R, Stenger DC (2010) Plant-feeding insects harbor double-stranded RNA viruses encoding a novel proline-alanine rich protein and a polymerase distantly related to that of fungal viruses. *Virology* 404:304-311.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990) Mini-prep in ten minute. *Biotechniques* 8(2):172-173.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PMeV apesar de ser um vírus que infecta o mamoeiro apresenta características moleculares que o aproxima de diferentes *Mycovirus* e alguns vírus que infectam inseto. As características moleculares do PMeV são semelhantes às de *Mycovirus* descritos recentemente tais como; genoma grande (dsRNA com \approx 12kpb), organização genômica similar com a presença das mesmas proteínas, o nível de conservação observado entre as sequências de aminoácidos da RdRp do PMeV com a RdRp de diferentes *Mycovirus* não classificados (PgV-1; PgV-2; FgV-3, DsRV-1, PiRV-3), a presença de domínios conservados característicos de vírus de dsRNA, encontrados principalmente em membros da família *Totiviridae*, reforça um provável relacionamento filogenético do PMeV com diferentes *Mycovirus* e demais membros da família *Totiviridae*.

O estudo da diversidade genética demonstrou um elevado grau de conservação na região da RdRp analisada (\geq 88 % na sequência de nucleotídeo e \geq 90 % na de aminoácidos). Esta elevada conservação indica que esta região pode ser utilizada em uma estratégia de resistência derivada do patógeno, via geração de mamoeiros geneticamente modificados resistentes à meleira.