



FRANCIELY MARIA PEREIRA DE RESENDE

**ANÁLISE GENÔMICA DA PROTEÍNA P1 DE ISOLADOS
BRASILEIROS E CUBANO DO *Papaia ringspot virus* (PRSV)
E INTERAÇÃO VÍRUS-PLANTA UTILIZANDO COMO
MODELO O *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV)**

**LAVRAS – MG
2019**

FRANCIELY MARIA PEREIRA DE RESENDE

ANÁLISE GENÔMICA DA PROTEÍNA P1 DE ISOLADOS BRASILEIROS E CUBANO DO *Papaia ringspot virus* (PRSV) E INTERAÇÃO VÍRUS-PLANTA UTILIZANDO COMO MODELO O *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestra.

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Resende, Franciely Maria Pereira de.

Análise genômica da proteína P1 de isolados brasileiros e cubano do *Papaia ringspot virus* (PRSV) e interação vírus-planta utilizando como modelo o *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV)/ Franciely Maria Pereira de Resende,. - 2019.

58 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. PRSV-P. 2. Sequenciamento gênico. 3. Expressão gênica.
I. Figueira, Antonia dos Reis. II. Título.

FRANCIELY MARIA PEREIRA DE RESENDE

ANÁLISE GENÔMICA DA PROTEÍNA P1 DE ISOLADOS BRASILEIROS E CUBANO DO *Papaya ringspot virus* (PRSV) E INTERAÇÃO VÍRUS-PLANTA UTILIZANDO COMO MODELO O *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV)

GENOMICS ANALYSIS OF P1 PROTEIN FROM BRAZILIAN AND CUBAN ISOLATES OF *Papaya ringspot virus* (PRSV) AND VIRUS-PLANT INTERACTION USING AS MODEL *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestra.

APROVADA em 30 de outubro de 2019.

Dra. Carolina da Silva Siqueira

UFLA

Dr. Hugo Adelante Mesquita

EPAMIG

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, pelos momentos bons, ruins, felizes e, principalmente, por ter me dado força para superar os difíceis

À minha mãe Marisa pelo carinho, amor e apoio, por não medir esforços para me ajudar. Ao meu pai Antônio (*in memoriam*), que mesmo ausente sempre se fez presente, pelo apoio de sempre. À minha irmã Fátima pelo companheirismo, pela força e amor. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada, e a todos aqueles que estiveram juntos de mim nos momentos bons e ruins, obrigada pela amizade.

À minha orientadora, Profa. Antonia, pela confiança, incentivo e apoio.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Virologia Molecular.

Aos membros da banca, pela disposição e pelas contribuições que complementaram o trabalho.

À Capes, CNPq UFLA e DFP, pelo suporte e oportunidade de realizar à pesquisa.

RESUMO

O *Papaya ringspot virus* (PRSV) é um dos principais vírus que afetam as lavouras de mamão no Brasil e em outros países onde essa planta é cultivada. Existem duas estirpes que ocorrem naturalmente no campo: a PRSV-P que infecta mamão e cucurbitáceas e a PRSV-W que infecta apenas cucurbitáceas. O seu controle é dificultado pelo fato de que os vírus não possuem controle curativo, o mamoeiro é uma planta semi-perene e o vírus é facilmente disseminado nos campos pelo vetor *Myzus persicae*. No Brasil o vírus tem sido controlado por meio de roquiagem, que nem sempre apresenta os resultados esperados. Em outros países como Austrália e Índia, o PRSV tem sido satisfatoriamente controlado por meio do uso de plantas transgênicas, transformadas com a CP viral. Entretanto, existem algumas evidências que alguns isolados regionais de PRSV são capazes de quebrar a resistência da planta transgênica, indicando que essas plantas devem ser transformadas com genes dos isolados aos quais ela será exposta. Para isso, os isolados devem ser sequenciados e analisados, para oferecer subsídios aos programas de melhoramento visando conferir resistência à planta. Nesse trabalho os genes da proteína P1 de cinco isolados do Brasil e um de Cuba foram sequenciados e analisados com a finalidade de conhecer a sua identidade genética. Os genes foram amplificados empregando os pares de primers específicos e enviados para sequenciamento na GENEWIZ, e analisados utilizando-se o programa NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2015), CLUSTAL W2 (V. 2.0). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Observou-se que a identidade entre os isolados brasileiros e entre esses e o isolado de Cuba foi igual ou maior a 87% e que, quando comparados com os isolados do GenBank a maior identidade foi observada com a proteína P1 da estirpe PRSV-W. Por outro lado, os isolados do PRSV-P disponíveis no GenBank apresentaram uma maior identidade com isolados dessa estirpe. Isso demonstra que os isolados brasileiros analisados possuem uma característica peculiar, que os diferencia da maioria dos isolados já descritos em outras partes do mundo. Em relação ao segundo experimento, proteínas de um membro da família *Potyviridae*, o *Soybean yellow shoot virus* (SOyYSV) recentemente sequenciado e analisado no Brasil, foi escolhido como modelo para estudar a interação vírus-planta devido ao fato de ser o único vírus dessa família que causa lesão local em mamoeiro. Quatro genes desse vírus foram amplificados e clonados no sistema Gateway para serem expressos via *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de mamão: CP, HcPro, P1 e VPg. Vinte dias após a agroinfiltração as folhas das plantas foram analisadas por RT-PCR e por observação em microscópio de Epifluorescência. Nenhuma das proteínas induziu lesão local nas folhas agroinfiltradas e todas elas se translocaram e foram detectadas nas folhas que se expandiram após a agroinfiltração. Isso indica que ou a reação de HR da planta é elicitada ou outras proteínas virais ou elas atuam em combinação para serem reconhecidas pela planta hospedeira.

Palavras-chave: PRSV-P. Sequenciamento gênico. Expressão gênica.

ABSTRACT

Papaya ringspot virus (PRSV) is one of the main viruses affecting papaya crops in Brazil and in other countries where this plant is grown. There are two naturally occurring strains in the field: PRSV-P that infects papaya and cucurbits and PRSV-W that infects cucurbits only. Their control is hindered by the fact that viruses have no curative control, papaya is a semi-perennial plant and the virus is easily spread in the fields by the *Myzus persicae* vector. In Brazil the virus has been controlled by roguing, which does not always present the expected results. In other countries PRSV has been satisfactorily controlled through the use of transgenic plants transformed with viral CP. However, there is some evidence that some regional PRSV isolates are capable of breaking the resistance of the transgenic plant, indicating that these plants should be transformed with genes from the isolates to which it will be exposed. Therefore, the isolates must be sequenced and analyzed, to provide support to breeding programs aiming to obtain pathogen resistance plant. In this work the P1 protein genes from five isolates from Brazil and one from Cuba were sequenced and analyzed in order to know their genetic identity. The genes were amplified using specific primer pairs and sent for sequencing at GENEWIZ, and analyzed using the NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information - NCBI, 2015), CLUSTAL W2 program. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program. The identity between the Brazilian isolates and between them and the Cuban isolate was 87% or greater, and when compared with GenBank isolates the highest identity was observed with protein P1 of strain PRSV-W. On the other hand, PRSV-P isolates available from GenBank had a higher identity with isolates of PRSV-P strain. This shows that the Brazilian isolates analyzed have a peculiar characteristic, which differentiates them from most isolates already described in other parts of the world. In a second experiment, proteins from a member of the *Potyviridae* family, *Soybean yellow shoot virus* (SOyYSV) which was recently sequenced in Brazil, was chosen as a model to study virus-plant interaction because it is the only virus in this family that causes local lesion in papaya. Four genes of this virus were amplified and cloned by the Gateway system to be expressed via *Agrobacterium tumefaciens* in papaya plants: CP, HcPro, P1 and VPg. Twenty days after agroinfiltration the leaves of the plants were analyzed by RT-PCR and by observation under Epifluorescence microscope. None of the proteins induced local lesion in the agroinfiltrated leaves and all of them translocated and were detected in the leaves that expanded after agroinfiltration. This indicates that either the plant's HR reaction is elicited by other viral proteins or they act in combination to be recognized by the host plant.

Keywords: PRSV-P. Gene sequencing. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 –	Mamão exportado pelo Brasil no período de 2017 a 2019.	13
Figura 2 –	Mapa do genoma do isolado havaiano do PRSV (Número de acesso GenBan S46722).	15
Figura 3 –	Descrição dos tamanhos de proteínas, ponto isoelétrico e locais de clivagem na poliproteína do vírus do SoyYSV.	19
Figura 4 –	Poliproteína presente no genoma de SoyYSV.	19

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1 –	Árvore Filogenética construída com base na sequência de Nucleotídeos da Proteína P1 do <i>Papaya ringspot vírus</i> (PRSV-P). A árvore foi construída com o programa Mega 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a porcentagem dos valores de bootstrap (2000 repetições) estão indicadas nos internódios dos ramos.	37
Figura 2 –	Árvore Filogenética construída com base na sequência de Aminoácidos da Proteína P1 do <i>Papaya ringspot vírus</i> (PRSV-P). A árvore foi construída com o programa Mega 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a porcentagem dos valores de bootstrap (2000 repetições) estão indicadas nos internódios dos ramos.	38
Figura 3 –	Alinhamento dos 60 primeiros aminoácidos da proteína P1 dos isolados brasileiros, do isolado de Cuba e dos isolados do GenBank empregados para comparação.	39

ARTIGO 2

Figura 1 –	Plantas agroinfiltradas com as proteínas. A: CP; B: HcPro; C: P1; 4: VPg; 5: Controle sadio. As setas indicam as folhas que foram infiltradas. A folha da planta controle foi infiltrada com solução tampão.	49
Figura 2 –	Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia; (B) Nervura da folha agroinfiltradas; (C) local da agroinfiltração; (D) Nervura da folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína CP.	50
Figura 3 –	Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia. (B) Nervura da folha agroinfiltradas; (C) local da agroinfiltração; (D) Nervura da folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína VPg.	51

- Figura 4 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. **(A)** folha da planta sadia. **(B)** local da agroinfiltração; **(C)** Folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína P1. 52
- Figura 5 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. **(A)** folha da planta sadia. **(B)** local da agroinfiltração; **(C)** Folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína HcPro. . 53
- Figura 6 – Análise eletroforética dos produtos da PCR realizada para detecção das proteínas expressas nas folhas não agroinfiltradas. **1:** Marcador 100bp; **3:** VPg (480pb); **4:** P1 (899pb); **5:** HcPro (914pb); **6:** CP (839 pb). **8:** Marcador 100 bp. 54

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 –	Proteínas e suas possíveis funções.....	16
------------	---	----

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1 –	Origem e denominação dos isolados de <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) estudados.....	31
Tabela 2 –	Primers empregados para amplificação de fragmentos do gene P1.....	33
Tabela 3 –	Isolados do GenBank empregados para comparação.....	34
Tabela 4 –	Identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre os isolados brasileiros e os isolados do GenBank.....	36

ARTIGO 2

Tabela 1 –	Sequência de primers projetada para amplificar as proteínas da sequência vinculada att (em negrito) que são os adaptadores específicos para o plasmídeo “entry clone” do sistema Gateway.	46
------------	--	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Carica papaya</i>: botânica, produção e importância econômica	13
2.2	Doenças do mamoeiro	14
2.3	Mancha anelar do mamoeiro	15
2.4	Vírus do amarelo do broto de soja	18
2.5	Estudo da interação vírus-planta empregando proteínas fluorescentes... 21	
2.6	Sistemas de clonagem: Gateway®	22
	REFERÊNCIAS	24
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	28
	ARTIGO 1 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA P1 DE ISOLADOS BRASILEIROS E CUBANOS DO Papaya ringspot virus (PRSV) 28	
	ARTIGO 2 – ESTUDO DA INTERAÇÃO VÍRUS-PLANTA POR MEIO DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE SOYSV EM <i>Carica Papaya</i>.....	43

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical, sendo descoberto pelos espanhóis na região compreendida entre o sul do México e o norte da Nicarágua. Após a descoberta, o mamoeiro foi amplamente distribuído em várias regiões tropicais, estendendo-se a 32° de latitude norte e sul, com possível introdução no Brasil em 1587. É considerada como uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Seus frutos conhecidos como mamão ou papaya são excelentes fontes de cálcio, pró-vitamina A e vitamina C (ácido ascórbico) (SERRANO; CATTANEO, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de mamão, com uma produção anual de aproximadamente 1,5 milhões de toneladas. Possui uma área de 32 mil hectares e exporta a fruta principalmente para os Estados Unidos e para países da Europa, ficando atrás, apenas da Índia com uma produção de 5 milhões de toneladas. Segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), em janeiro de 2019, 3.5 mil toneladas foram exportadas para diversos países, o que representa um volume 30% maior em relação ao mesmo período do ano anterior (PORTAL EMBRAPA, 2019).

Um dos maiores desafios que essa cultura enfrenta é a convivência com as doenças viróticas. No Brasil, a cultura do mamoeiro pode ser afetada por três viroses: a mancha anelar do mamoeiro, causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV), a meleira ou “sticky disease”, causada pelo *Papaya sticky disease virus* (PSDV) e o amarelo letal do mamoeiro causado pelo *Papaya lethal yellowing viurs* (PLYV). Nas principais regiões que produzem comercialmente o mamão, o PRSV tem sido o principal causador de doenças, exigindo dos produtores um controle severo para tornar possível a produtividade e rentabilidade da cultura. Trata-se de uma espécie do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, transmitido no campo pelo pulgão *Myzus persicae* (LIMA et al., 2001).

O fato de os vírus não terem controle curativo, de a cultura ser semi-perene, o que faz com o inóculo possa permanecer viável no campo por diversos anos, e de ser transmitido de modo bastante eficiente pelo pulgão vetor, torna a convivência com a doença bastante complicada. Atualmente existem dois tipos de controle que são empregados: o roquiung, que tem sido praticamente o único utilizado no Brasil (LIMA et al., 2001; COSMI et al., 2017) e o uso

de plantas transgênicas, que tem tido excelentes resultados em outros países como o Taiwan (GONSALVES, 1998, 2014). No Brasil algumas tentativas de produção de plantas transgênicas para o controle do PRSV têm sido envidadas pela Embrapa (RITZINGER; SOUZA, 2000). Entretanto, até o momento, essas plantas ainda não foram disponibilizadas para cultivo.

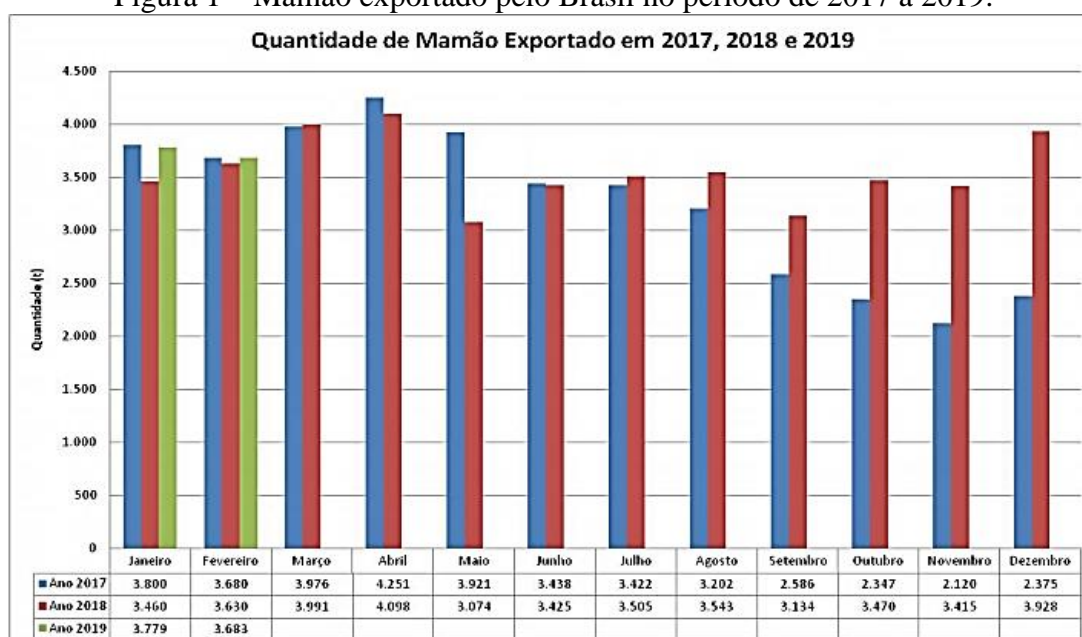
Desse modo, conhecer os genomas dos isolados de PRSV que ocorrem no Brasil, bem como o mecanismo de interação do vírus com a planta é de fundamental importância para embasar futuros métodos de controle via transgenia, que até o momento tem sido o método mais eficiente em outros países. Nesse trabalho foi sequenciada e analisada a proteína P1 de cinco isolados de PRSV do Brasil e de um isolado de Cuba, cujas proteínas da capa e HCPro já haviam sido analisadas em trabalho anterior. Além disso, uma espécie da família *Potyviridae*, denominado *Soybean yellow shoot vírus* (SoyYSV), recentemente detectado e analisado no Brasil (FIGUEIRA et al., 2019) conhecido por ser a única espécie dessa família que causa lesões locais em plantas de mamão, foi utilizado como modelo para o estudo da interação vírus planta. Proteínas do SoyYSV, fusionadas com o GFP foram expressas em plantas de mamão e a sua translocação individual na planta foi monitorada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Carica papaya*: botânica, produção e importância econômica

Os frutos do mamoeiro são conhecidos como mamão ou papaya, são excelentes fontes de cálcio, Vitamina B, pró-vitamina A e vitamina C (ácido ascórbico), por isso são amplamente utilizados em dietas alimentares. São consideradas também como uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SERRANO; CATTANEO, 2010). O mamoeiro cultivado comercialmente (*Carica papaya* L.) pertence à família *Caricaceae*, a qual está dividida em cinco gêneros, com 31 espécies: *Carica* (21 espécies), *Jacaratia* (6 espécies), *Cylicomorpha* (2 espécies), *Jarilla* (1 espécie) e *Horovitzia* (1 espécie). É uma planta de porte arbóreo de caule verde que pode atingir até uma altura de 8 metros. As folhas são recortadas e grandes. O fruto é uma baga alongada, lisa, de tamanho variável, com polpa carnosa, de coloração vermelho-alaranjada e com grande quantidade de sementes pretas (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). As compras do mamão brasileiro continuam bem estáveis, sendo a União Europeia o principal destino, responsável por mais de 80% das compras, segundo a SECEX. Conforme a Figura 1, as exportações de mamão apresentaram um aumento no segundo semestre de 2018, quando comparado a 2017, sendo os maiores compradores a União Europeia e os Estados Unidos. Em janeiro e fevereiro de 2019 elas se mantiveram estáveis (AGROSTAT - MAPA, 2019).

Figura 1 – Mamão exportado pelo Brasil no período de 2017 a 2019.



Fonte: AgroStat - MAPA (2019).

2.2 Doenças do mamoeiro

Dentre as doenças fúngicas a antracnose é considerada a principal doença dos frutos do mamoeiro na maioria das regiões tropicais e subtropicais, causada pelo agente etiológico *Colletrotrichum gloeosporioides* Penz, da classe *Deuteromycetes*, ordem *Melanconiales*, família *Melanconiaceae*. Os frutos atacados tornam-se imprestáveis para a comercialização e o consumo e, mesmo que os sintomas não se evidenciem nas condições de campo, eles podem aparecer na fase de amadurecimento, transporte, embalagem e comercialização (DANTAS et al., 2003).

Outra doença fúngica que também afeta a cultura é a varíola, cujo agente causal é o fungo imperfeito *Asperisporium caricae* (Speg) Maubl., da classe *Deuteromycetes*, ordem *Moniliales*, família *Dematiaceae*, que apresenta estroma subepidérmico, erupentes, produzindo conidióforos curtos, em feixes onde se inserem conídios equinulados e bicelulares. É uma doença muito comum tanto em pomares comerciais como em pomares domésticos, embora não cause prejuízos tão grandes como outras podridões, pelo fato de as manchas se limitarem à superfície dos frutos, o grande número de lesões causa mau aspecto e grande desvalorização comercial. Podemos citar ainda outras doenças fúngicas que afetam a produtividade do mamoeiro como a podridão preta, causada pelo agente etiológico *Phoma caricae-papayae* e perdas enormes em frutos são registradas frequentemente durante períodos de chuvas intensas devido o ataque do fungo *Phytophthora* sp., as chuvas e altas temperaturas podem resultar em severo declínio da planta e ocasionando a morte devido a podridão de raízes em solos pesados e pouco drenados (RITZINGER; SOUZA, 2000).

No Brasil, a cultura do mamoeiro é afetada por três doenças que são atribuídas a vírus: a mancha anelar do mamoeiro, causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV), a meleira ou sticky disease, causada pelo *Papaya sticky disease virus* (PSDV) e o amarelo letal do mamoeiro causado pelo *Papaya lethal yellowing viurs* (PLYV). O grande problema da infecção de uma planta por uma virose é que não há métodos curativos para eliminar uma virose de uma planta, assim como é difícil evitar que ela infecte uma plantação (LIMA et al., 2001).

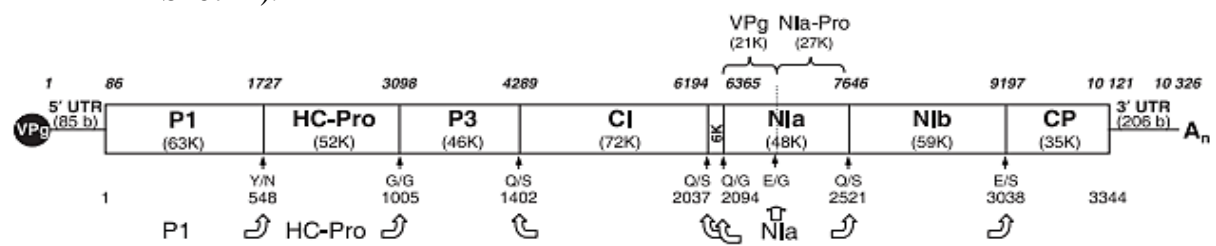
A mancha anelar do mamoeiro é a principal virose, responsável por perdas substanciais na cultura do mamão no Brasil e no mundo. As plantas infectadas apresentam amarelecimento das folhas superiores, há o aparecimento de mosaico, as folhas apresentam áreas com diferentes tonalidades de verde e aparecem também estrias oleosas nos pecíolos e no caule. Nos frutos aparecem anéis esverdeados que, com o passar do tempo, tornam-se necróticos. As folhas podem ficar deformadas e apresentar a lâmina foliar reduzida e geralmente as plantas infectadas

também apresentam porte reduzido. O PRSV é disseminado no campo pelo pulgão *Myzus persicae* e possui um círculo de hospedeiras restrito infectando apenas mamoeiro, cucurbitáceas e chenopodiáceas. O vírus não é transmitido pelas sementes de plantas infectadas (LIMA et al., 2001; RITZINGER; SOUZA, 2000).

2.3 Mancha anelar do mamoeiro

A mancha anelar do mamoeiro (PRSV-P), pertencente ao gênero Potyvirus, família Potyviridae, possui partículas alongadas flexuosas, com cerca de 720 nm de comprimento. Tal vírus infecta plantas da família *Caricaceae*, *Curcubitaceae* e *Amaranthaceae*. Porém, há uma estirpe de PRSV que infecta somente plantas das famílias *Cucurbitaceae* e *Amaranthaceae*, denominada PRSV-W (W type) (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; YEH et al., 1992). O genoma do PRSV é constituído por uma molécula de RNA linear, de fita simples e senso positivo, com aproximadamente 10.326 nucleotídeos. Típico dos potyvirus, o genoma do PRSV produz uma única longa proteína (no caso do PRSV, 3.344 aminoácidos), a qual é posteriormente clivada em proteínas menores com diversas funções. As proteínas clivadas são: P1, HC-Pro, P3, CI, 6K, NIa-Pro, Nib e CP (FIGURA 2) (TRIPATHI et al., 2008; WANG; YEH, 1997; YEH et al., 1992).

Figura 2 – Mapa do genoma do isolado havaiano do PRSV (Número de acesso GenBan S46722).



Legenda: Os números na parte de cima indicam a posição do ácido nucleico. Números na parte de baixo indicam a posição de aminoácidos na poliproteína. Abaixo do nome da proteína viral estão os pesos moleculares entre parênteses. Os 5'e 3' regiões não traduzidas são marcados junto com seus comprimentos entre parênteses em bases. Aminoácidos que flanqueiam os locais de clivagem das proteases P1, HC-Pro e NIa são indicados abaixo das setas pretas, marcando a posição relativa do local de clivagem. O círculo preto denominado Vpg, representa a proteína ligada ao genoma.

Fonte: Tripathi et al. (2008).

As diferentes proteínas funcionais são formadas através de uma série de clivagens em pontos específicos realizadas por três proteases produzidas pelo vírus, P1, HC-Pro e NIa. As possíveis funções das proteínas produzidas pelo genoma do PRSV foram deduzidas a partir de

estudos com vírus do gênero Potyvirus e estão listadas na Tabela 1 (GONSALVES et al., 2010)

Tabela 1 – Proteínas e suas possíveis funções.

Genes	Funções
P1	Proteinase; Movimento célula-à-célula.
Hc-Pro	Transmissão por vetor; Proteinase; Patogenicidade; Supressor do silenciamento gênico; Movimento célula-à-célula.
P3	Não conhecida, mas possível função na replicação.
6K1	Não conhecida, mas possível função na replicação.
CI	Replicação do genoma (helicase do RNA); Ligação com membranas; Estimulação da atividade ATPase do ácido nucleico; Movimento célula-à-célula.
6K2	Mesma da 6K1.
NIa- Vpg	Replicação do genoma (Primer para iniciação da síntese do RNA).
NIa-Pro	Principal protease.
NIb	Replicação do genoma (RdRp-RNA-dependente de RNA polimerase).
CP	Encapsidação do RNA; Transmissão por vetor; Patogenicidade; Movimento célula-à-célula.

Fonte: Gonsalves et al. (2010).

A transmissão do PRSV ocorre de forma não persistente, o vetor adquire e transmite o vírus em um curto espaço de tempo, sem que o vírus se replique no vetor, para plantas de mamoeiro e cucurbitáceas por mais de vinte espécies de afídeos, esse processo envolve as proteínas CP e HC-Pro (PIRONE, 1991; PIRONE; BLANC, 1996; WANG et al., 1998).

As principais espécies que atuam na transmissão do vírus são *Myzus persicae* e *Aphis gossypi*. No Brasil, além delas, foi demonstrado experimentalmente que *Aphis fabae*, *Aphis coreopsis* e *Toxoptera citricidus* também transmitem de forma eficaz o vírus (REZENDE; FANCELLI, 2005).

Apesar dos afídeos não colonizarem plantas de mamoeiro, a aquisição e transmissão do vírus ocorre pelas picadas de prova para reconhecimento de seus hospedeiros, podendo assim ser contaminados por plantas infectadas e, em seguida provando uma planta sadia, fazendo assim a transmissão (KALLESHWARASWAYAMY; KRISHNA, 2008; LIMA et al., 2001; TRIPATHI et al., 2008).

Papaya ringspot vírus infeta sistemicamente mamoeiro e cucurbitáceas. Em mamoeiro, as folhas apresentam mosaico avançado e clorose, com estrias oleosas nos pecíolos e na parte superior do tronco. Sintomas severos são caracterizados pela distorção das folhas jovens, podendo resultar em deformações em formato de cordões de sapato que se assemelham a danos ocasionados por ácaros. As plantas que são infetadas quando jovens permanecem pouco desenvolvidas cessando a produção de frutos. Frutos de plantas infetadas podem apresentar saliências semelhantes às ocasionadas por deficiência de boro e sempre apresentam manchas anelares, sintomas característicos da doença que constituem a base do seu nome comum (GONSALVES et al., 2010).

A forma mais eficaz para prevenir e controlar o PRSV é aderir à prática de cultivo de mamão papaia transgênico resistente ao vírus. O primeiro mamão geneticamente modificado conhecido no mundo, contendo o gene PRSV CP, foi desenvolvido no Havaí (EUA) em 1998. “SunUp” e “Rainbow” se mostram com alta resistência aos isolados de PRSV do Havaí (FUCHS; GONSALVES, 2007; FERREIRA et al., 2002). Essas cultivares foram plantadas no Havaí e permaneceram resistentes nas últimas décadas. Contudo, essas espécies transgênicas exibem comportamentos diversos quando desafiadas por outros isolados de PRSV de outras regiões geográficas, o que indica que a estrutura genética e a população de PRSV na área geográfica devem ser diferentes (WU et al., 2018).

O mamão e os pulgões que disseminam o vírus PRSV tem distribuição cosmopolita (TENNANT; FERMIN; ROYE, 2007). Diversas estratégias de controle são usadas na tentativa do controle da doença, como o “rouging” (erradicação de plantas infectadas, uso de plantas de bordadura, proteção cruzada e resistência transgênica (FERMIN; CASTRO; TENNANT, 2010). O manejo da doença por meio de controle de vetores é muito difícil de ser conduzido, já a proteção cruzada não é eficaz em todo o mundo, devido a variabilidade geográfica (AZAD et al., 2014).

2.4 Vírus do amarelo do broto de soja

O vírus do amarelo do broto da soja *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV) tem sido considerado um excelente modelo para o estudo da interação vírus-planta em mamoeiros, porque é a única espécie da família *Potyviridae* que causa lesões locais nessa planta. O SoyYSV foi detectado em 1984 em Lavras, MG, na estação experimental da Epamig. De um modo geral, os sintomas causados pelo vírus em plantas de soja variam de acordo com a cultivar infectada. Os sintomas mais comuns são mosaico, clareamento das nervuras, com evolução para os sintomas mais característicos, como encrespamento e amarelecimento dos brotos. Geralmente há paralização no crescimento dos ponteiros e, posteriormente, a planta se torna enfezada, mostrando superbrotamento em alguns casos (DESLANDES; COSTA; FIGUEIRA, 1984; FIGUEIRA; COSTA; REIS, 1987). O SoyYSV afeta as sementes, causando perdas na produtividade, devido à diminuição no tamanho e número de sementes produzidas e o aparecimento de manchas e deformações (SANTOS, 2000).

Figueira et al. (2019) inocularam mecanicamente diversas cultivares de soja com o SoyYSV e observaram que esse vírus possui um alto potencial para causar danos severos na maioria das cultivares comerciais plantadas no Brasil. Ressaltaram também que o SoyYSV pode infectar espécies de soja resistentes ao SMV, representando uma ameaça potencial à produção nacional de soja. Além disso, o SoyYSV tem uma ampla gama de hospedeiros, incluindo a *Alternanthera tenella*, que é uma importante planta daninha na cultura da soja (DOURADO-NETO et al., 2013), o que indica que pode facilmente sobreviver em campos durante o ano, uma vez que são disseminados para as culturas de soja por pulgões.

Considerando a morfologia, sintomas citológicos e transmissão do afídeo, o SoyYSV foi considerado inicialmente como sendo uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*. Nas análises moleculares realizadas por Figueira et al. (2019) observou-se que a sequência de ácido nucléico de SoyYSV mostrou organização genômica característica ao de espécies de *Potyvirus*. O SoyYSV apresenta uma única ORF, que se inicia com um AUG na posição 173 e termina em uma UAA na posição 8890. Essa ORF codifica uma poliproteína com 2.905 aa de comprimento, que é posteriormente clivada para gerar os peptídeos na ordem, P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, VPg, 6K2, NIa Pro, NIb e proteína do capsídeo (CP) (FIGURA 3).

Figura 3 – Descrição dos tamanhos de proteínas, ponto isoelétrico e locais de clivagem na poliproteína do vírus do SoyYSV.

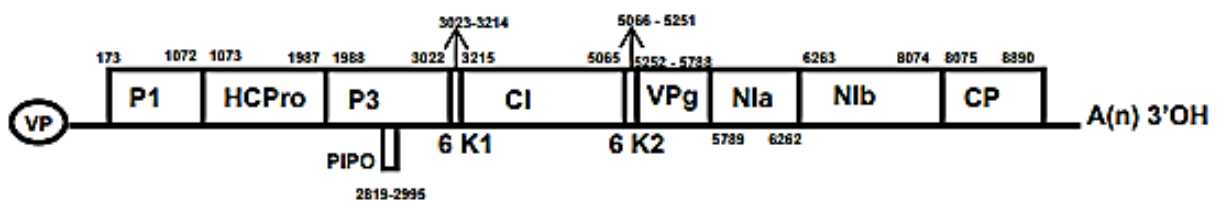
Protein	Size kDa	pI*	Polyprotein cleavage sites 5'→3'	
			Motif	Amino Acid Position
P1	34	9,33	MLFY/G	1 - 300
HC-Pro	33	6,62	YKVG/G	301 - 605
P3	39	9,24	NLQS/K	606 - 950
6K1	7	4,81	ESSEMQ/A	951 - 1014
CI	69	8,06	FSMLKD/N	1015-1631
6K2	7	5,04	ELTTLN/M	1632-1693
VPG	20	7,8	PILNPE/S	1694 – 1872
Nia	17	9,85	VIAQ/S	1873 – 2030
Nib	69	5,45	VLTPQ/N	2031 – 2634
CP	30	6,07	-	2635 – 2905
PIPO	7	6,14	-	883 – 941
Full ORF	329		-	1 – 2905

*pI: isoelectric point

Fonte: Figueira et al. (2019).

Os primeiros 172 nt localizados na região 5' do genoma do vírus correspondem à região não traduzida 5' UTR, e a região 3'UTR é posicionada entre os nucleotídeos 8891 e 9052. Entretanto, ambas as regiões apresentaram grande variação (6% a 21% de identidade) quando comparadas a outros potyvírus. Outra similaridade observada foi a presença do bloco UCAACUC na posição 26-32 e o bloco UCAAGCU na posição 45-51, localizados no terminal 5'UTR de SoyYSV, identificados na maioria dos membros da família *Potyviridae*.

Figura 4 – Poliproteína presente no genoma de SoyYSV.



Fonte: Figueira et al. (2019).

As proteínas P1, CI, VPg, Nib e CP, assim como o genoma completo da SoyYSV, apresentaram maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos com o BVY do gênero *Brambyvirus*, variando de 46% a 56% para nucleotídeos e de 21% para 54% para aminoácidos. As proteínas HC-Pro, P3, 6K1, 6K2 e PIPO apresentaram maior identidade de nucleotídeos com as seguintes espécies de *Potyvirus*: *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV), and *Beet mosaic virus* (BtMV), variando de 40% a 50%. No entanto, apenas o HC-Pro e o PIPO

apresentaram maior identidade de aminoácidos com os potyvírus ZYMV e BCMNV. As proteínas P3 e 6K1 apresentaram maior identidade de aminoácidos com o brambyvírus BVY, enquanto o 6K2 apresentou maior identidade de aminoácidos com o rymovírus AgMV (29%). NIA apesar de apresentar 46% de identidade de nucleotídeos com brambyvírus apresentou maior identidade (29%) com o potyvírus CABMV. Assim sendo, as identidades de nucleotídeo e aminoácidos entre SoyYSV e os potyvirus, bem como com as espécies de outros gêneros da família *Potyviridae*, não permitiram colocá-lo gênero já descrito nessa família (FIGUEIRA et al., 2019). Com base nesses resultados, os autores chegaram à conclusão de que a SoyYSV é uma espécie pertencente a um novo gênero da família *Potyviridae*, uma vez que não se enquadra em nenhum dos gêneros já descrito.

Novas espécies e gêneros emergentes de *Potyviridae* têm sido frequentemente relatados. Dentro dos atuais critérios de demarcação, que considera como sendo da mesma espécie membros com identidades mínimas de nucleotídeos iguais a 70%, três novos gêneros na família *Potyviridae* foram recentemente aprovados pelo ICTV: *Bevemovirus*, *Roymovirus* e *Poacevirus* (MOLLOV; LOCKHART; ZLESAK, 2013; SEO et al., 2017; TATINENI et al., 2009; WYLIE et al., 2017; XU et al., 2010). Outro vírus, *Spartina mottle virus*, foi reconhecido pelo ICTV como uma nova espécie de *Potyviridae*, no entanto, ainda não foi formalmente inserido em nenhum gênero (GÖTZ et al., 2002; WYLIE et al., 2017).

O SoyYSV possui uma ampla gama de hospedeiras e lesões locais induzidas em folhas de *Carica papaya* e *Chenopodium quinoa* características deste vírus. Os hospedeiros selecionados quanto à suscetibilidade ao SoyYSV foram quatro espécies da família *Amaranthaceae* (*Alternanthera tenella*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*); duas *Asteraceae* (*Bidens pilosa* e *Lactuca sativa*); *Caricaceae* (*Carica papaya*); duas *Cucurbitaceae* (*Cucurbita maxima* e *C. pepo*); uma *Passifloraceae* (*Passiflora* sp.); oito *Solanaceae* (*Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Physalis floridana*) e vinte e seis cultivares de cinco *Fabaceae* espécies (*Canavalia* sp., *Phaseolus lunatus*, *Vigna unguiculata*, *P. vulgaris*, cv. Carioca, e cv. Preto Campinas, nove cultivares de *Glycine max* suscetíveis a SMV e oito cultivares de *G. max* resistentes ao SMV). Cultivares sensíveis ao SMV de soja foram Conquista, Confiança, Cristalina, Doko, Liderança, Monsoy, Santa Rosa, Vitória e UFV5; e cultivares resistentes ao SMV foram Favorita, IAC8, Juliana, Numbaíra, Paraná, UFV1, UFV2, Uirapuru. Quatro linhagens de *G. max* também foram testados cultivares resistentes ao SMV, DM399, NS7100 RR, TMG 1176 RR e TMG1179 RR (FIGUEIRA et al., 2019).

2.5 Estudo da interação vírus-planta empregando proteínas fluorescentes

Proteínas fluorescentes possuem grande importância como sondas fluorescentes, principalmente na área biológica. Esta aplicação se tornou possível e viável após a descoberta, determinação estrutural e clonagem da GFP (green fluorescent protein), isolada de espécies marinhas bioluminescentes (KREMERS et al., 2011). Atualmente, outras proteínas fluorescentes similares à GFP já foram escritas e são utilizadas na rotina laboratorial. Em geral, essas proteínas possuem um cromóforo formado a partir de uma reação de ciclização do esqueleto proteico que forma um anel do tipo imidazol ou imidazolona, e pequenas modificações nesses cromóforos estão por trás de desvios espectrais em algumas proteínas da família do GFP (CHUDAKOV et al., 2010).

A natureza proteica dessas sondas abre a possibilidade de diversificação de emissão através de mutagênese, a partir da qual diversas proteínas fluorescentes nunca isoladas na natureza e com emissão diversificada já foram obtidas. Outra vantagem é a possibilidade de clonar os genes e expressar essas proteínas em sistemas biológicos, sendo que esses genes são rotineiramente aplicados como gene repórter e a obtenção de linhagens celulares fluorescentes possibilitam diversos estudos aplicando técnicas baseadas na fluorescência.

A GFP é uma pequena proteína constituída por 238 aminoácidos que formam onze cadeias β antiparalelas, cujo conjunto forma um cilindro no centro do qual encontra-se uma hélice α . Após ciclização e oxidação de três dos aminoácidos da hélice central, os aminoácidos serina, tirosina e glicina (nas posições 65, 66 e 67) forma-se um cromóforo, um grupo químico com capacidade de absorver e emitir luz. Quando uma luz ultravioleta (UV) ou azul incide no cromóforo, este absorve a luz e, a seguir, liberta energia emitindo luz verde. As extremidades N-terminal e C-terminal da GFP estão livres e acessíveis para ligação com outras proteínas. A GFP foi descoberta em 1962, pelo investigador Osamu Shinomura e pelos seus colaboradores, nos laboratórios Friday Harbor da Universidade de Washington, quando estes estudavam a bioluminescência da medusa *Aequorea victoria*, um cnidário presente no Oceano Pacífico ao largo da América do Norte. Ele isolou e purificou uma proteína bioluminescente dependente do cálcio, à qual deu o nome de aequorina (referente à medusa) e verificou a presença de uma outra proteína que apresentava uma forte fluorescência verde quando exposta à luz UV. Esta proteína foi então designada de proteína verde fluorescente ou GFP. Verificaram que quando a aequorina se liga ao cálcio, esta emite uma luz azul que, por sua vez, é absorvida pela GFP levando à emissão de uma luz verde .

No final dos anos 1980, o investigador americano Martin Chalfie começou a trabalhar com a GFP com o intuito de utilizar o gene desta proteína para visualizar a ativação de outros genes e a subsequente produção de proteínas. Chalfie e colaboradores identificaram a localização do gene responsável pela síntese da GFP no genoma da *Aequorea victoria*. Em 1994, conseguiram incorporar este gene, por manipulação genética, na bactéria *Escherichia coli*, a qual passou a exibir a luz verde característica da GFP quando iluminada com uma luz UV. A seguir, inseriram o gene da GFP no nematoide *Caenorhabditis elegans* e conseguiram visualizar e entender pela primeira vez o desenvolvimento das células nervosas. Em 1996, um outro grupo de investigadores eliminaram os íntrons do gene da GFP permitindo a sua aplicação nas plantas (CHARLFIE; KAIN, 2006).

2.6 Sistemas de clonagem: Gateway®

Os vetores binários compatíveis com gateway melhoraram bastante a eficiência de clonagem de projetos de marcação de AFP (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003; EARLEY et al., 2006). Resumidamente, a clonagem de Gateway utiliza o sistema de recombinação específico do local utilizado pelo fago X para transferir fragmentos de DNA entre plasmídeos contendo locais de recombinação compatíveis (WALHOUT et al., 2000). O que torna essa estratégia tão atraente é que, uma vez que os clones de DNA de interesse são capturados em um vetor de entrada (pDONR), eles podem ser mobilizados em uma infinidade de vetores que permitem a expressão em bactérias, células de insetos, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), animal ou células de plantas. Isso evita a situação frustrante comumente encontrada com a clonagem mediada por ligase, a saber, que muitas vezes não existem locais de restrição compatíveis para permitir a fácil mobilização de um vetor para o próximo. Isso resulta na necessidade de reclinar e reequilibrar fragmentos de DNA de interesse, que podem não ser viáveis em termos de custo e tempo quando realizados em larga escala. Uma vez que as construções de pDONR são geradas e validadas, todos os sistemas de expressão a jusante podem ser utilizados, o que aumenta a eficiência do compartilhamento de clones para a pesquisa genômica (HILSON et al., 2004; HILSON; SMALL; KUIPER, 2003).

O conjunto atual de vetores pSITE pode ser usado para expressar proteínas nativas ou fusões aprimoradas de CFP, GFP, YFP ou RFP para os terminais C ou N de proteínas de interesse. Esses vetores foram validados com respeito a cinco critérios essenciais para estudos de localização de proteínas de alto rendimento associados ao estudo de interações planta-patógeno. Tais experimentos requerem sistemas vetoriais fáceis que permitem a construção de

alto rendimento de vetores de expressão recombinantes, expressão de proteínas em ensaios transitórios ou plantas transgênicas sem a necessidade de subclonagem em vetores diferentes, a capacidade de fornecer proteínas de maneira eficiente e seus alvos ou substratos em interação com a mesma célula, expressão de proteínas em células infectadas por patógenos e a capacidade de monitorar a dinâmica de membranas ou proteínas em um grande número de células, de modo a permitir análises estatísticas rigorosas (CHAKRABARTY et al., 2007).

Na técnica Gateway, a clonagem é realizada em duas reações. Na primeira reação chamada de reação BP, ocorre a recombinação entre os sítios attB1/attB2, inseridos por PCR no gene a ser clonado, e os sítios attP1/attP2, presentes no vetor de entrada (pDONR), gerando um clone de entrada no sistema. Na segunda reação, chamada de reação LR, ocorre a recombinação entre os sítios attL1/attL2, presentes no clone de entrada, e os sítios attR1/attR2, presentes no vetor de destinação escolhido, que vai permitir a expressão em bactérias, insetos, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), animais e plantas. Isso evita a situação frustrante comumente encontrada com a clonagem mediada por ligase, ou seja, muitas vezes, o vetor não possui sítios de restrição compatíveis (GOODIN et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 6, n. 4, p. 471-487, 2005.
- AGROSTAT – MAPA. **Estatística de comércio do agronegócio brasileiro**. 2019. Disponível em: < <http://sistemaweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 set. 2019.
- AZAD, M. A. K. et al. Gene technology for papaya ringspot virus disease management. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2014, Article ID 768038, p. 1-11, 2014.
- CHAKRABARTY, R. et al. PSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 20, n. 7, p. 740-750, 2007.
- CHARLFIE, M.; KAIN, S. R. **Green fluorescent protein: Properties, applications and protocols**. 2nd ed. New Jersey: Wiley – Interscience, 2006. 464 p.
- CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 90, n. 3, p. 1103-1163, 2010.
- COSMI, F. C. et al. Epidemiologic analysis of temporal evolution of papaya sticky disease. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 303-309, 2017.
- CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 2, p. 462-469, 2003.
- DANTAS, S. A. F. et al. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 528-533, 2003.
- DESLANDES, J. A. ; COSTA A. S.; FIGUEIRA A. R. Amarelo do broto de soja causado por *Potyvirus* do mosaico comum, registrado em Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, Piracicaba, v.10, n.1/2, p. 25-26, 1984.
- DOURADO-NETO, D. et al. Interactions between soybean and weeds in a replacement series system, considering the effects of water stress. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 749-776, 2013.
- EARLEY, K. W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant Journal**, Hoboken, v. 45, n. 4, p. 616-629, 2006.
- FERMIN, G. A.; CASTRO, L. T.; TENNANT, P. F. CP-transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges. **Transgenic Plant Journal**, Ikenobe, v. 4, n. S1, p. 1-15, 2010.

FERREIRA, S. A. et al. Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii. **Plant Disease**, St Paul, v. 86, n. 2, p. 101-105, 2002.

FIGUEIRA, A. R. et al. Characterization of *Soybean yellow shoot virus*, a new member of the family *Potyviridae* infecting soybean plants in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v. 103, n. 6, p. 1172-1180, 2019.

FIGUEIRA, A. R.; COSTA, A. S.; REIS, C. H. Mosaico dourado em certas variedades de soja e feijoeiro associado á infecção pelo vírus do Amarelo de broto de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 145-149, 1987.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 173-202, 2007.

GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 415-437, 1998.

GONSALVES, D. et al. *Papaya Ringspot virus*. **The Plant Health Instructor**, St Paul, 2010. doi: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01.

GONSALVES, D. Hawaii's transgenic papaya story 1978–2012: a personal account. In: MING, R.; MOORE, P. H. (Eds.). **Genetics and genomics of papaya**. New York: Springer, 2014. p. 115-142.

GOODIN, M. M. et al. Membrane and protein dynamics in live plant nuclei infected with *Sonchus yellow net virus*, a plant-adapted rhabdovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 6, p. 1810-1820, 2007.

GÖTZ, R. et al. Molecular and serological relationships of *Spartina mottle virus* (SpMV) strains from *Spartina spec.* and from *Cynodon dactylon* to other members of the *Potyviridae*. **Archives of Virology**, Wien, v. 147, n. 2, p. 379-391, 2002.

HILSON, P. et al. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. **Genome Research**, Plainview, v. 14, n. 10B, p. 2176-2189, 2004.

HILSON, P.; SMALL, I.; KUIPER, M. T. European consortia building integrated resources for *Arabidopsis* functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 426-429, 2003.

KALLESHWARASWAMY, C. M.; KRISHNA, N. K. Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. **Phytopathology**, St Paul, v. 98, n. 5, p. 541-546, 2008.

KREMERS, G.-J. et al. Fluorescent proteins at a glance. **Journal of Cell Science**, Hilton, v. 124, n. 2, p. 157-160, 2011.

LIMA, R. C. A. et al. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 689-699, 2001.

MOLLOV, D.; LOCKHART, B.; ZLESAK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family Potyviridae. **Archives of Virology**, Wien, v. 158, n. 9, p. 1917-1923, 2013.

MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 28 p. (Documentos, 106).

PIRONE, T. P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, San Diego, v. 2, p. 81-87, 1991.

PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 227-247, 1996.

PORTAL EMBRAPA. **Mamão: Estatísticas nacionais e internacionais**. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 26 set. 2019.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 706 p.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. da S. **Mamão: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 91 p. (Frutas do Brasil, 11).

SANTOS, R. C. **Caracterização parcial de um novo Potyvirus detectado em *Glicine max* L. (Merrill)**. 2000. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SEO, J.-K. et al. The complete genome sequence of a novel virus, bellflower veinal mottle virus, suggests the existence of a new genus within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, Wien, v. 162, n. 8, p. 2457-2461, 2017.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 657-959, 2010.

TATINENI, S. et al. Triticum mosaic virus: a distinct member of the family Potyviridae with an unusually long leader sequence. **Phytopathology**, St Paul, v. 99, n. 8, p. 943-950, 2009.

TENNANT, P. F.; FERMIN, G. A.; ROYE, R. E. Viruses infecting papaya (*Carica papaya* L.): etiology, pathogenesis, and molecular biology. **Plant Viruses**, Ikenobe, v. 1, n. 2, p. 178-188, 2007.

TRIPATHI, S. et al. Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 9, n. 3, p. 269-280, 2008.

WALHOUT, A. J. M. et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 328, n. IN7, p. 575-592, 2000.

WANG, R. Y. et al. Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 6, p. 1519-1524, 1998.

WANG, C.-H.; YEH, S.-D. Divergence and conservation of the genomic RNAs of Taiwan and Hawaii strains of papaya ringspot potyvirus. **Archives of Virology**, Wien, v. 142, n. 2, p. 271-285, 1997.

WU, Z. et al. Characterization of *Papaya ringspot virus* isolates infecting transgenic papaya 'Huanong No. 1' in South China. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 8206, 2018.

WYLIE, S. J. et al. ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. **Journal of General Virology**, London, v. 98, n. 3, p. 352-354, 2017.

XU, D.-L. et al. Complete nucleotide sequence and taxonomy of Sugarcane streak mosaic virus, member of a novel genus in the family Potyviridae. **Virus Genes**, Netherlands, v. 40, n. 3, p. 432-439, 2010.

YEH, S.-D. et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 10, p. 2531-2541, 1992.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA P1 DE ISOLADOS BRASILEIROS E CUBANOS DO *Papaya ringspot virus* (PRSV)

Norma NBR 6022 (ABNT 2003)

RESUMO

O *Papaya ringspot virus* (PRSV) é a principal doença virótica que afeta o mamoeiro no Brasil, sendo responsável por perdas bastante significativa. O fato de ser de difícil controle, pois não existem medidas curativas, tem feito com que áreas que antigamente eram empregadas no cultivo do mamão fossem abandonadas, por se tornarem improdutivas. Existem duas estirpes de vírus: a PRSV-P que infecta mamão e cucurbitáceas e a PRSV-W que infecta apenas cucurbitáceas. Por ser transmitido pelo pulgão *Myzus persicae* e o mamão ser uma planta semi-perene, a rentabilidade dessa cultura é frequentemente ameaçada. Nas lavouras comerciais do Brasil o controle do PRSV tem sido feito pela prática do pelo vetor roguing, que nem sempre é capaz de oferecer um resultado satisfatório. Em outros países, são empregadas plantas transgênicas e proteção cruzada, o que tem oferecido um controle bastante promissor. Entretanto, para que essas técnicas sejam empregadas, existe a necessidade de se conhecer as peculiaridades genômicas dos isolados de PRSV que ocorrem no Brasil. Nesse estudo cinco isolados brasileiros de PRSV-P e um de Cuba tiveram o gene da proteína P1 sequenciado e analisado. Eles foram amplificados empregando-se os pares de primers específicos e enviados para sequenciamento na GENEWIZ, e analisados utilizando-se o programa NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2015), CLUSTAL W2 (V. 2.0). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Quando os isolados brasileiros comparados entre si e com o isolado de Cuba as identidades foram maior ou igual a 87%, mas quando comparados com os isolados do GenBank a maior identidade ocorreu com a proteína P1 da estirpe PRSV-W. Comportamento diferente foi observado entre os isolados PRSV-P disponíveis no GenBank, pois apresentaram maior identidade entre si e identidades em torno de 70 a 75% com os isolados de PRSV-W. Assim sendo, os isolados brasileiros analisados possuem uma característica peculiar, que os diferencia da maioria dos isolados já descritos em outras partes do mundo.

Palavras-chave: PRSV-P. PRSV-W. Sequenciamento gênico. Mancha anelar do mamoeiro.

ABSTRACT

Papaya ringspot virus (PRSV) is the main viral disease affecting papaya in Brazil, accounting for very significant losses. They are very difficult to control, since there are no curative measures, which led farmers to abandon commercial crop areas because they became unproductive. There are two strains of viruses: PRSV-P that infects papaya and cucurbits and PRSV-W that infects cucurbits only. Since it is transmitted by aphid *Myzus persicae* and papaya is a semi-perennial plant, the profitability of this crop is often threatened. In Brazilian commercial crops the control of PRSV has been done by the practice of the roguing, which is not always able to offer a satisfactory result. In other countries, transgenic plants and cross protection are employed, which has offered quite promising control. However, for these techniques to be employed, there is a need to know the genomic peculiarities of PRSV isolates that occur in Brazil. In this study, five Brazilian PRSV-P isolates and one from Cuba had the P1 protein gene sequenced and analyzed. They were amplified using specific primer pairs and sent for sequencing at GENEWIZ, and analyzed using the NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2015), CLUSTAL W2 (V. 2.0) program. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program. When the Brazilian isolates compared with each other and with the Cuba isolate the identities were greater than or equal to 87%, but when compared with GenBank isolates the highest identity occurred with protein P1 of strain PRSV-W. Different behavior was observed among PRSV-P isolates available from GenBank, as they presented higher identity to each other and identities around 70 to 75% with PRSV-W isolates. Thus, the Brazilian isolates analyzed have a peculiar characteristic that differentiates them from most isolates already described in other parts of the world.

Keywords: PRSV-P. PRSV-W. Gene sequencing. Papaya ringspot.

INTRODUÇÃO

O mamão é uma das frutas mais apreciadas e consumidas no mundo, não apenas por seu excelente sabor, quando consumido in natura, e sua versatilidade no uso de doces e geleias, mas também pelo seu valor alimentício e terapêutico. Ele pode atuar favoravelmente nos sistemas digestivo, cardiovascular e imunológico, reduz inflamações, e pode também prevenir câncer de cólon, pulmão e próstata. Como é rico em vitamina B, ácido fólico, potássio e ácido pantotênico, o mamão age como detoxificante, contribuindo para a homeostase e o rejuvenescimento do corpo. É fonte também de vitaminas A, E, K e C, além de diversos íons como cálcio, magnésio, manganês, etc. Cremes à base de componentes do mamão podem ser usados externamente no tratamento de machucados e queimaduras da pele (ALI; CHIN; LAZAN, 2004).

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking internacional de produção de mamão, com mais de 1,5 milhões de toneladas/ano, além de ser um dos principais países exportadores, principalmente para o mercado europeu. A produção brasileira de mamão é fonte de renda para várias regiões brasileiras, responsável por cerca de 33 mil empregos, movimentando em torno de 900 milhões de reais. As exportações em anos recentes ultrapassam os US\$ 50 milhões (PORTAL EMBRAPA, 2019).

O mamoeiro pode ser afetado por diversas doenças bióticas e abióticas, dentre as quais as causadas por vírus consistem um grande desafio pelo fato de não possuírem controle curativo. Uma das principais viroses encontradas no Brasil é mancha anelar causada pelo *Papaya ringspot vírus* (PRSV), que se encontra disseminado por todo o território brasileiro. O primeiro relato dessa doença no Brasil foi no estado de São Paulo, em meados dos anos 60 (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969), em Monte Alto. A partir daí essa doença se disseminou rapidamente, inviabilizando a cultura nessa região e fazendo com que ela se tornasse nômade, até ser totalmente abandonada no Estado de São Paulo. Menos de dez anos depois foi detectada no Ceará (LIMA; GOMES, 1975), sendo que, nos tempos atuais, ocorre em todas as regiões do país onde o mamoeiro é cultivado (RUGGIERO; MARIN; DURIGAN, 2011).

Estudos sobre a filogeografia do PRSV, realizados recentemente com 270 isolados de todo o mundo, com base nas sequências dos genes CP e HC-Pro (do inglês *Helper Component Protease*), mostraram que este vírus teve origem há cerca de 2.500 anos, com um incremento na variação exponencial durante os últimos 500 anos. Os eventos de dispersão provavelmente ocorreram na Península da Índia para o resto da Ásia, por meio da Tailândia ou Vietnã, e para as Américas pelo Brasil, Venezuela ou México. Por outro lado, os isolados oriundos da

Austrália provavelmente foram originados de um evento de divergência, a partir do Caribe (OLARTE CASTILLO et al., 2011).

O PRSV é um vírus pertencente ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*, e pode ser transmitido de modo bastante eficiente pelo afídeo *Myzus persicae*. Como não existem variedades naturalmente resistentes e o seu controle deve ser essencialmente de maneira preventiva, o controle desse vírus no campo é uma tarefa bastante difícil. No Brasil, o roguing tem sido o método utilizado para conviver com a doença no campo (LIMA et al., 2001; COSMI et al., 2017), ao passo que em outros países têm empregado plantas transgênicas que apresentam um excelente nível de resistência a esse vírus (GONSALVES, 1998, 2014).

Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que esse vírus possui uma alta variabilidade genética e uma capacidade de recombinação entre isolados diferentes (TRIPATHI et al., 2008; MANGRAUTHIA et al., 2008), de modo que existe a necessidade de caracterizar os isolados de PRSV, de acordo com a sua origem geográfica, com a finalidade de embasar os métodos de controle através da transgenia. Nesse trabalho, cinco isolados de PRSV do Brasil e um de Cuba tiveram a suas proteínas P1 sequenciadas e analisadas. Os resultados obtidos são aqui apresentados e discutidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados sequenciados

A origem e a denominação dos isolados estão discriminadas na Tabela 1. Esses isolados foram coletados no período de 2010 a 2011, dessecados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para multiplicação por ocasião dos experimentos.

Tabela 1 – Origem e denominação dos isolados de Papaya ringspot virus (PRSV) estudados.

País	Isolado	Estado/Prov.	Município
Brasil	BrDF-1	D. Federal	Distrito Federal
Brasil	BrBA-2	Bahia	Cruz das Almas
Brasil	BrMA-8	Maranhão	São Luís
Brasil	BrSP-5	São Paulo	Mococa
Brasil	BrRJ-2	Rio de Janeiro	Río de Janeiro
Cuba	CbMT-1	Matanzas	Colón

Fonte: Do autor (2019).

A multiplicação foi feita por trituração das folhas em almofariz na proporção de 1 g folha/5 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade. O extrato foi friccionado com uma espátula enrolada em gaze em folhas de mamoeiro cultivar Solo, previamente polvilhadas com carborundo (CSi). A obtenção das plantas de mamão foi por semeadura em bandejas e posterior transplântio para vasos de 2 kg, contendo substrato esterilizado.

Extração do RNA total da planta

A extração do RNA total foi realizada seguindo o método Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2002). As folhas jovens infectadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e o pó obtido foi homogeneizado com a solução extratora Trizol (38% de fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4 M de tiocianato de amônio e 0,1 M de acetato de sódio, pH 5 e 5% de glicerol), na proporção de 1 g de tecido/5 mL solução. Em seguida, o extrato obtido foi transferido para microtubos e esses foram incubados em banho-maria por 5 minutos a 60 °C e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O pellet foi descartado e o sobrenadante transferido para novos microtubos, adicionando-se a eles 300 µL de clorofórmio. Esses tubos foram agitados em vórtex e deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C.

Após a transferência da fase aquosa para novos tubos, foi adicionado ½ volume, do sobrenadante coletado, de solução contendo 0,8 M de Citrato de Sódio + 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Em seguida, os tubos foram agitados cuidadosamente por inversão e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado (-20 °C). O RNA foi, então, seco a vácuo e ressuspendido em 25 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), antes de ser utilizado nos testes subsequentes. A avaliação de integridade e pureza do RNA total extraído foi realizada pelo equipamento NanoVue Plus™ (GE Healthcare), separado em alíquotas e armazenado a -80 °C para posterior utilização.

RT-PCR

Os primers empregados para a amplificação do gene P1 estão discriminados na Tabela 2. O cDNA foi sintetizado por meio da seguinte reação: 1 µL do total viral extraído, 1 µL de dNTP's (10 mM), 1 µL do primer reverse, 10,5 µL de água ultrapura tratada com DEPC e autoclavada. A suspensão foi incubada durante 10 minutos a 70 °C, e imediatamente transferida para o gelo. Foram adicionados 4 µL do tampão e 1 µL da enzima M-MLV Transcriptase Reversa (Ludwig Biotec). Os microtubos foram incubados a 50 °C durante 50 minutos, seguidos por incubação a 70 °C durante 15 minutos.

Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizados 2 µL do cDNA juntamente com 1,0 µL de dNTP's (10 mM), 1,5 µL de primer "forward" (10 mM), 1,5 µL de primer "reverse" 10 mM (tabela), 5,0 µL de tampão da enzima, 1,5 µL de MgCl e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (Ludwig). Foram empregados 30 ciclos de 95 °C durante 2 minutos; 95 °C por 30 segundos, 42 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguido por 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 0,7%, corado com gel red (Biotium).

Tabela 2 – Primers empregados para amplificação de fragmentos do gene P1.

Primer	Sequência	T (°C) de anelamento
PRSV 8F	5'-ACA TCT CAA CAC AAC-3'	42.1
PRSV963R	5'-RTG YAA YTC AAG RTC ARC-3'	47.3
PRSV713F	5'-ACR ATA CAG ATT GGG G-3'	46.3
PRSV1824R	5'-GTA ACR TCC ATR TCA GAY GTG C-3'	54.6
PRSV1539F	5'-TYA ARC CRA ART TYG CYG-3'	51.0
PRSV2516R	5'-GCT GCC GAA AYC THT CC-3'	53.1
PRSV2243F	5'-AAA GCT GGC AGY GTK GAR AG-3'	57.1
PRSV3079R	5'-CATTTCACTATCGAGYGG-3'	48.9

Fonte: Do autor (2019).

Sequenciamento e Análise das Sequências

Os fragmentos obtidos foram sequenciados pela empresa GeneWiz e analisados utilizando-se o programa NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2015), CLUSTAL W2 (V. 2.0). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o

programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Os isolados do GenBank empregados para comparação estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 – Isolados do GenBank empregados para comparação.

Nº. Acesso	Origem	Espécie	Referência
DQ374152	Brasil	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Inoue-Nagata et al. (2006)
KP462721	Brasil	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Não publicado
DQ374153	Brasil	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Inoue-Nagata et al. (2006)
EU475877	India	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Mangrauthia et al. (2008)
AY010722	Tailândia	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Attasart et al. (2002)
AY027810	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Não publicado
KY039583	USA	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Ali (2017)
NC001785	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Wang et al. (1996)
X67673	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W)	Inoue-Nagata et al. (2007)
KC345609	França	<i>Papaya ringspot virus</i> ((PRSV-T?))	Romay et al. (2014)
EU126128	Havaí	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-?)	Não Publicado
KF791028	China	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Zhao et al. (2015)
KT895257	China	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
HQ424465	China	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Shen et al. (2014)
KT633943	China	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
EF183499	China	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
EF017707	India	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Parameswari et al. (2007)
KP743981	India	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
JX448373	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
AB369277	Koreia	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV- P)	Não Publicado
AY231130	México	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Noa-Carrazana et al. (2007)
AY162218	Tailândia	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
KJ755852	India	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
JX448370	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
DQ340770	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não Publicado
DQ340769	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não Publicado
JX448369	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado
EU882728	Taiwan	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-P)	Não publicado

Fonte: Do autor (2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o uso dos Primers discriminados na Tabela 3 foi possível amplificar diversos fragmentos da proteína P1, que combinados deram origem ao fragmento com 1641 pares de bases, que codifica os 547 aminoácidos da proteína P1. Quando a sequência de nucleotídeos dos cinco isolados brasileiros foi comparada entre si (Tabela 4) observou-se uma identidade variando entre 92% e 93%. Quando esses foram comparados com o isolado CbMT-1 de Cuba, a identidade ficou entre 87 e 88%. Por outro lado, as identidades de aminoácidos ficaram entre 88% e 91%, mostrando que as substituições observadas nos nucleotídeos foram não sinônimas, resultando na mudança de aminoácidos (MARTÍNEZ et al., 2014).

Na comparação os isolados brasileiros com os isolados de PRSV disponíveis no GenBank foi observado um resultado bastante interessante, ou seja, a grande maioria das identidades maiores foram registradas com os isolados de PRSV-W, ao invés de PRSV-P. Os cinco isolados apresentaram identidades iguais ou maiores que 90% com outros três isolados de PRSV-W brasileiros (DQ374152, KP462721 e DQ374153) e entre 84% e 92% com os isolados PRSV-W (NC001785 e X67673 do Taiwan, AY010722 da Tailândia, KC345609 da França e KY039583 dos Estados Unidos). Exceção ocorreu entre as identidades dos isolados brasileiros e os isolados PRSV-W AY027819 do Taiwan e EU 475877 da Índia, que ficou entre 70 e 75%. Por outro lado, a identidade entre os isolados brasileiros e o isolado PRSV-P AY231130 do México e o EU126128 do Havaí, que ficaram entre 85 e 87%. É interessante notar que esses dois isolados tipo P foram descritos como isolados atípicos, que apresentaram sintomas mais severos (NOA-CARRAZANA; GONZÁLEZ-DE-LEÓN; SILVA-ROSALES, 2007). Comportamento idêntico foi observado nas identidades do isolado CbMT-1 de Cuba.

Na árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos mostraram dois clados distintos, com dois subclados cada um com 100% de probabilidade pelo bootstrap. No primeiro clado, os isolados brasileiros e o Cubano se agruparam num subclado com os isolados PRSV-W e os dois isolados PRSV-P citados acima (Figura 1). No outro subclado ficaram o EU 475877 da Índia, e dois isolados PRSV-P da China (EF017707 e KT633943). No segundo lado todos os demais isolados P empregados para comparação ficaram no primeiro subclado e o isolado AY010722 da Tailândia ficou sozinho no segundo subclado.

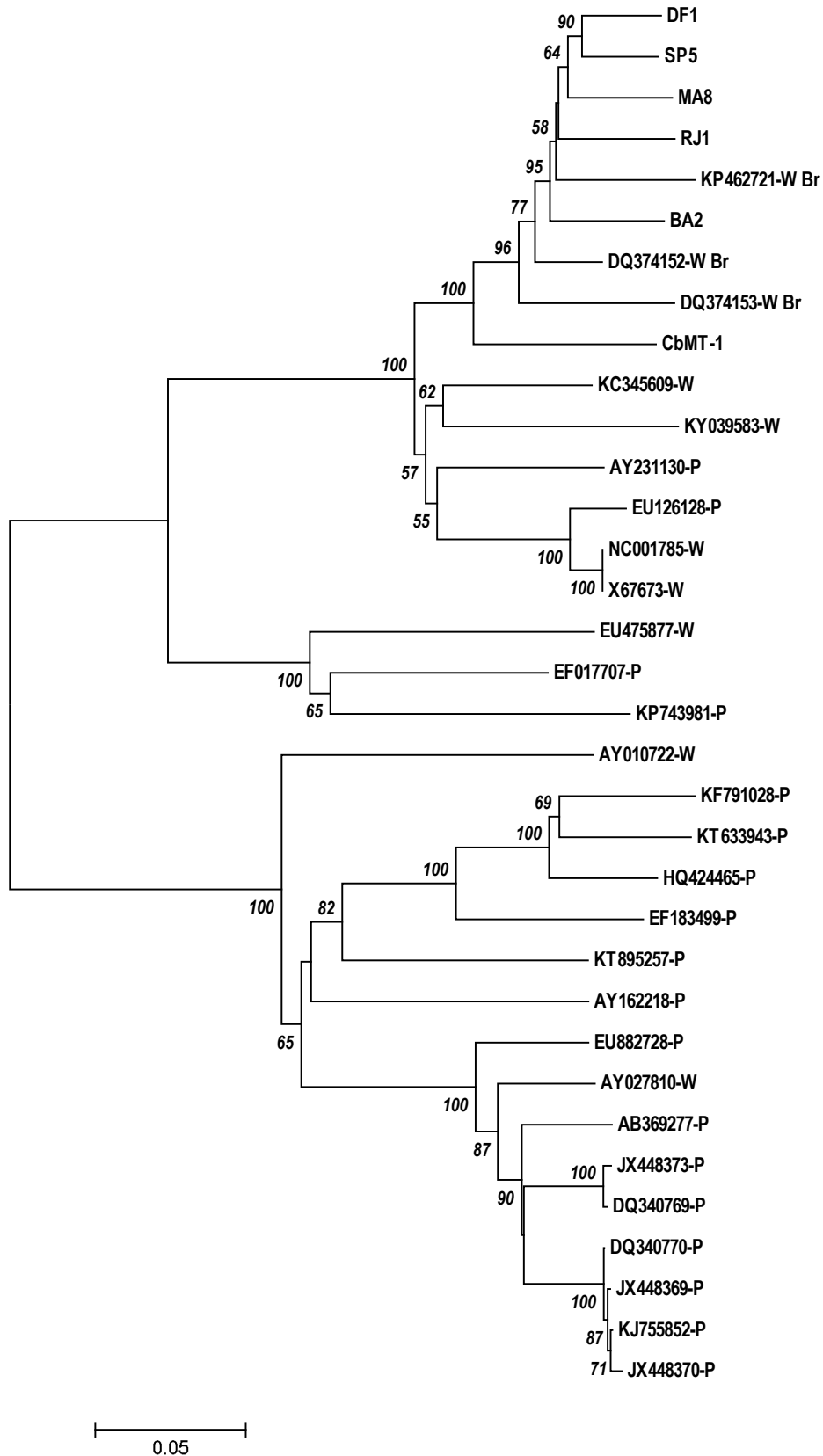
Na árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos, a maioria dos grupamentos foi semelhante, com exceção de que os isolados AY62218 (PRSV-P) e o isolado AY010722 (PRSV-W) da Tailândia se agruparam no mesmo subclado, mostrando uma proximidade provavelmente relacionada à sua mesma origem geográfica (Figura 2).

Tabela 4 – Identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre os isolados brasileiros e os isolados do GenBank.

Nº	Isolado	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	33	34
1	DF1	-	92	93	95	93	88	93	87	70	67	76	92	87	70	87	70	90	70	67	69	69	69	69	85	68	86	74	70	86	69	75	69	69	69
2	BA2	91	-	92	92	92	88	93	87	70	67	77	91	87	71	87	71	90	0	69	70	70	70	70	85	68	86	75	71	86	69	76	70	70	70
3	MA8	93	90	-	93	92	88	93	86	70	67	77	92	87	71	86	70	90	70	69	69	69	69	69	84	67	86	75	70	85	69	75	69	69	69
4	SP5	89	89	88	-	93	88	94	87	70	67	76	92	87	70	87	70	91	70	69	70	70	70	70	84	68	86	75	70	86	69	75	70	70	70
5	RJ1	91	89	90	88	-	87	93	86	70	68	76	92	86	70	86	70	90	70	68	70	69	69	70	84	68	87	74	70	86	69	75	70	69	70
6	CbMT-1	87	85	85	85	85	-	92	87	70	69	76	87	87	70	87	70	87	70	70	70	70	70	70	85	69	86	76	70	86	69	75	70	70	70
7	DQ374152	92	90	91	90	91	91	-	87	70	68	76	92	87	70	87	70	92	70	69	70	70	70	70	85	68	87	76	71	87	69	76	70	70	70
8	NC001785	84	82	83	82	83	83	85	-	70	69	77	86	90	71	100	70	87	71	69	70	70	70	70	86	69	89	75	71	97	71	77	70	70	69
9	AY010722	66	66	66	66	65	65	67	66	-	81	70	70	70	82	70	82	70	81	80	81	81	81	81	70	80	71	70	81	70	81	73	82	82	82
10	KF791028	63	64	62	63	63	64	64	64	80	-	69	68	69	82	69	82	68	82	91	81	81	81	82	68	91	69	69	81	69	87	70	82	76	82
11	EF017707	74	75	74	75	75	74	75	74	69	67	-	76	79	71	77	71	76	70	70	71	70	71	76	70	78	85	70	77	70	85	71	71	71	71
12	KP462721	89	88	89	88	88	84	90	83	66	63	74	-	86	70	86	70	89	70	68	69	69	69	69	84	68	86	75	7	85	69	75	69	70	69
13	KC345609	84	83	82	83	83	82	85	86	66	66	77	83	-	71	90	70	86	71	70	70	70	70	70	88	69	89	76	70	89	71	77	70	70	70
14	AY162218	67	67	66	67	67	66	67	67	82	80	69	67	67	-	71	82	70	83	82	82	82	82	82	70	81	71	70	82	71	82	71	83	82	82
15	X67673	84	82	83	82	83	83	85	100	66	64	74	83	86	67	-	70	87	71	69	70	70	70	70	86	69	89	75	71	97	71	77	70	70	69
16	EU882728	65	64	65	65	66	63	65	66	80	80	68	64	66	80	66	-	70	83	83	93	92	92	93	70	82	70	72	92	71	82	72	93	92	92
17	DQ374153	87	86	88	86	87	85	89	83	66	65	75	86	83	68	83	65	-	70	69	70	69	69	70	85	68	87	75	70	86	68	76	70	70	69
18	KT895257	66	65	65	65	65	65	65	65	79	80	67	64	68	80	65	79	66	-	82	83	82	82	83	70	81	71	70	82	72	85	70	83	83	83
19	HQ424465	66	66	65	65	66	65	66	65	80	90	68	65	67	80	65	81	66	80	-	82	82	82	82	70	92	70	70	82	69	87	71	82	82	82
20	KJ755852	65	64	64	64	65	64	65	65	80	80	67	64	65	80	65	90	65	78	81	-	94	99	99	70	8	70	70	93	70	81	71	99	94	94
21	JX448373	64	64	63	64	65	64	64	64	79	80	67	64	65	80	64	89	64	78	80	91	-	94	94	69	82	69	71	93	69	81	72	94	99	94
22	JX448370	64	64	64	64	65	64	65	65	80	80	67	63	65	81	65	90	65	78	81	99	91	-	99	70	81	69	71	93	70	81	71	99	94	94
23	JX448369	65	64	64	64	65	64	65	65	80	81	67	64	65	81	65	90	65	78	81	99	91	99	-	70	82	70	71	93	70	82	71	99	94	94
24	KY039583	80	79	79	80	79	81	82	81	67	65	72	79	83	67	81	65	79	66	66	65	65	65	65	-	68	86	76	70	86	70	76	70	69	69
25	KT633943	65	64	64	64	65	64	64	65	79	89	67	63	65	78	65	79	65	78	89	80	80	80	81	65	-	69	69	81	69	87	70	82	82	82
26	AY231130	85	83	84	84	84	83	85	87	67	66	75	82	85	68	87	66	84	67	67	66	65	66	66	82	67	-	76	70	89	70	77	70	69	70
27	KP743981	73	73	72	72	73	71	73	72	67	67	80	72	74	67	72	68	72	67	69	67	66	67	67	72	67	75	-	72	75	70	82	71	71	71
28	AY027810	65	64	64	64	65	65	66	65	81	80	68	64	65	81	65	90	66	78	80	91	89	91	91	66	80	66	69	-	71	81	72	94	93	92
29	EU126128	84	82	82	82	83	81	84	96	65	64	73	82	85	67	96	66	82	65	65	65	64	64	65	80	65	86	72	65	-	70	76	70	70	70
30	EF183499	65	65	64	65	65	65	65	65	79	86	69	65	67	80	65	80	65	82	87	79	78	79	79	66	84	67	68	79	65	-	71	82	81	81
31	EU475877	75	74	75	75	76	73	76	74	70	68	83	75	76	70	74	69	76	67	69	68	68	68	68	74	69	77	80	69	74	69	-	71	72	71
32	DQ340770	65	65	64	65	65	64	65	65	80	81	68	64	65	81	65	91	66	79	82	99	91	99	99	66	81	66	67	92	65	80	69	-	94	94
33	DQ340769	64	63	63	64	64	64	64	64	79	80	67	64	65	80	64	89	64	78	80	91	99	91	91	65	80	65	66	90	64	78	68	92	-	94
34	AB369277	63	63	63	63	64	64	64	64	79	80	67	63	64	79	64	88	64	77	80	91	91	91	91	65	80	65	66	90	64	77	69	92	91	-

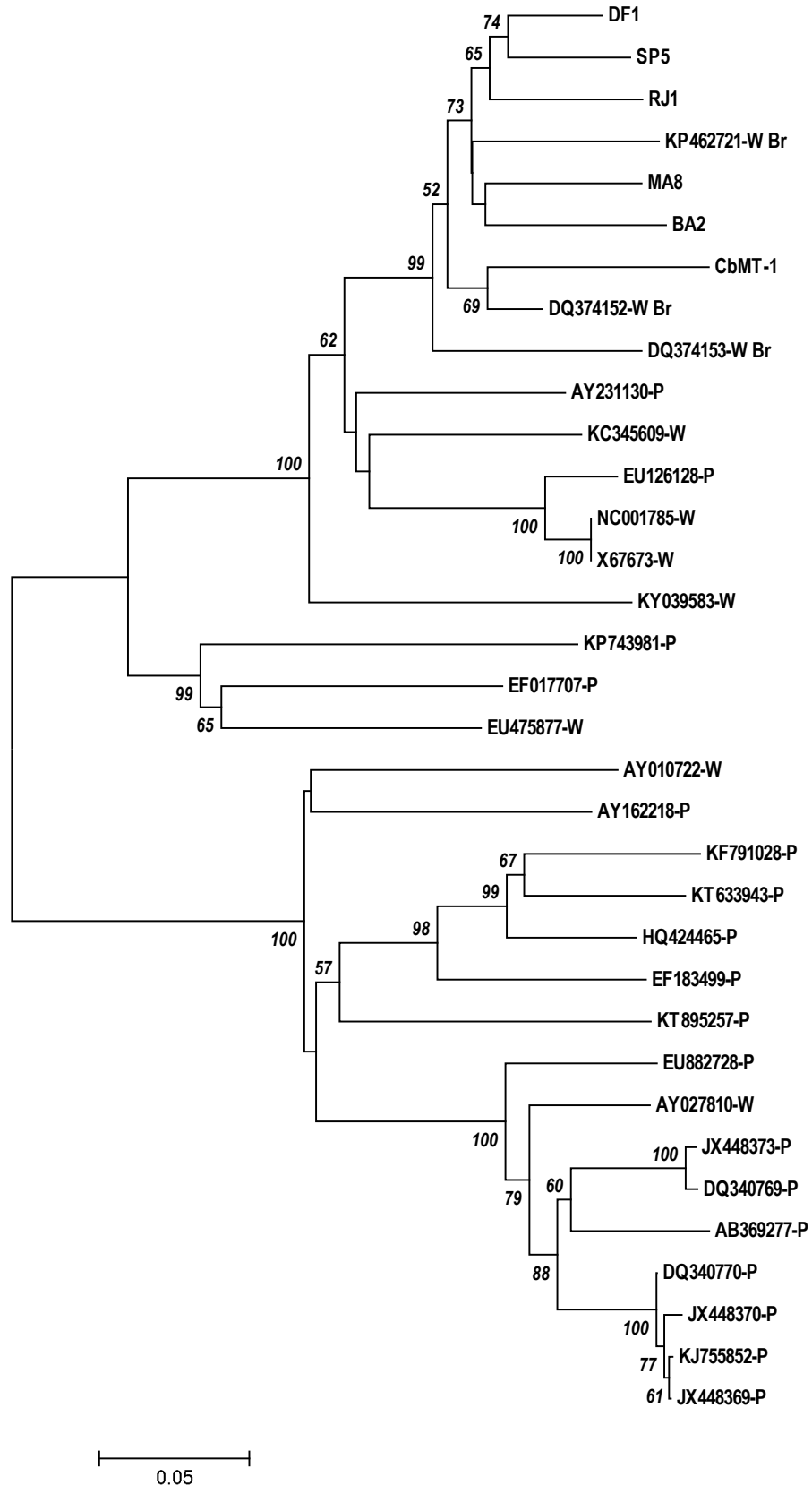
Fonte: Do autor (2019).

Figura 1 – Árvore Filogenética construída com base na sequência de Nucleotídeos da Proteína P1 do Papaya ringspot vírus (PRSV-P). A árvore foi construída com o programa Mega 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a porcentagem dos valores de bootstrap (2000 repetições) estão indicadas nos internódios dos ramos.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 2 – Árvore Filogenética construída com base na sequência de Aminoácidos da Proteína P1 do *Papaya ringspot vírus* (PRSV-P). A árvore foi construída com o programa Mega 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e a porcentagem dos valores de bootstrap (2000 repetições) estão indicadas nos internódios dos ramos.



Fonte: Do autor (2019).

Quando as sequências de aminoácidos são alinhadas pode-se notar que os isolados brasileiros e o de Cuba tendem a apresentar as mesmas regiões conservadas que existem nos isolados do tipo PRSV-W. Por exemplo, na Figura 3 pode-se ver, na região circundada pelo retângulo, os 9 primeiros aminoácidos são altamente conservados na maioria dos isolados PRSV-P: MSSLYQLQP. Nos isolados brasileiros e no cubano esses aminoácidos tendem a ser igualmente conservados, sendo que os primeiros cinco aminoácidos são iguais nas duas estirpes mas o quinto muda de Q para T no da mesma forma que nos isolados de PRSV-W (MSSLYTLRP) e os três últimos aminoácidos (7-8 e 9) apresentam um maior polimorfismo. Isso pode ser notado também em outras regiões da P1 dos isolados analisados.

Figura 3 – Alinhamento dos 60 primeiros aminoácidos da proteína P1 dos isolados brasileiros, do isolado de Cuba e dos isolados do GenBank empregados para comparação.

AY010722	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	W*
AY162218	MSSLYQLQP	IALKDRLLAHERGKGWIEHKLERKGDGRNTRHVGEFVSEGAKILQLIQIG	60	P
EU882728	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVSEGAKILQLVQIG	60	P
AY027810	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGERGNSRHVGEFVISEGARILQLIQIG	60	W
JX448370	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRYVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
DQ340770	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRYVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
KJ755852	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRYVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
JX448369	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRYVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
DQ340769	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
JX448373	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
JX448372	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
AB369277	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
JX448371	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
DQ340771	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
KT895257	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGDGRNTHYVGEFVISEGAKILQLIQIG	60	P
EF183499	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHERGKGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVISEGAKILQLIQIG	60	P
KT633943	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGEAGNTRHVGEFVISEGAKILQLIQIG	60	P
KF791028	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHKRGKGWIEHKLERKGEAGNTRHVGEFVISEGAKILQLIQIG	60	P
HQ424465	MSSLYQLQP	IALKDRLLSHQRGKGWIEHKLERKGEAGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	P
KY039583	MSSLYTLQP	PAAQRDRRLESKKGSGWIEHKLERKGDGRNTHYCGEFDICKGANILQLVQIG	60	W
DQ374153	MSSLYTLRP	PAAQHRRLESKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDICKGAKILQLVQIG	60	W Br
BA2	MSSLYTLRP	PAAQPRKLESEKKGSGWIEHKLEIKGEKGNTHYCFDIRRGAKILQLVQLG	60	P
KP462721	MSSLYTLRP	PAAQHRRLESKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	W Br
CbMT-1	MSSLYTLRP	PAAQHRRLESKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDISRGAKILQLVQIG	60	P
MA8	MSSLYTLRP	PAAQHDRLESKKGSGWIEHKLEIKGEKGNTHYCFNISKGAKILQLVQIG	60	P
RJ1	MSSLYTLRP	TAQRDRLEIKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	P
DQ374152	MSSLYTLRP	PAAQHRRLESKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDISRGAKILQLVQIG	60	W Br
DF1	MSSLYTLRP	PAAQRDRRLESKHCSGFIEHKLERKGERGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	P
SP5	MSSLYTLRP	PAAQHRRLESKKGSGWIEHKLERKGEKGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	P
KC345609	MSSLYTLQP	PAAQRDRRLENKKGSGWIEHKLERKGDGRNTHYCFVISKAKILQLVQIG	60	T?
AY231130	MSSLYTLRAA	AQYDRRLESKKGAGWIEHKLERKGDGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	P
NC001785	MSSLYTLRAA	AQYDRRLESKKGSGWIEHKLERKGERGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	W
X67673	MSSLYTLRAA	AQYDRRLESKKGSGWIEHKLERKGERGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	W
EU126128	MSSLYTLRAA	AQYDRKLESKKGSGWIEHKLERKGERGNTHYCFDISKAKILQLVQIG	60	P
EF017707	MSSLYQLQP	IALRDRLLGHKKGSGWIEHKLERKGERGNTRHVGEFVSEGAKILQLVQIG	60	W
EU475877	MSSLYQLQP	IALKDRLLGHKKGSGWIEHKLEMKGDRGNTRHVGEFVISEGAKILQLVQIG	60	W
KP743981	MSSLYQLQP	IALKDRLLGHKKGSGWIEHKLERKGDGRNTRHVGEFVISEGAKILQLIQIG	60	

*W = PRSV-W W Br= PRSV-W do Brasil P = PRSV-P.

T? = isolado atípico encontrado na França denominado de PRSV-T.

Fonte: Do autor (2019).

Essa variabilidade no gene tem sido mostrado por outros autores também em outros genes do PRSV (TRIPATHI et al., 2008). Mangrauthia et al. (2008) encontrou diversos pontos de recombinação no gene P1, P3, CI e HcPro, entre as estirpes. Wu et al. (2018) analisaram diversos isolados de PRSV-P que foram capazes de quebrar a resistência transgênica de plantas resistentes, transformadas com o gene da capa proteica desse vírus. Eles observaram que novas linhagens, diferentes daquelas originais que foram empregadas para a transformação das plantas estão surgindo que mais de 27% dos isolados apresentaram recombinação no gene da capa proteica viral, o que explicaria a quebra de resistência dos mamoeiros transgênicos.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que os isolados brasileiros de PRSV-P apresentam características peculiares, indicando que provavelmente as plantas transgênicas, que apresentam resistência à mancha anelar em outros países, poderiam não apresentar a mesma resistência caso fossem estabelecidas em solo brasileiro. O mesmo deve ser verdade para Cuba, pois mesmo tendo sido analisado apenas um isolado, esse apresentou as mesmas tendências dos isolados brasileiros analisados. Um levantamento mais amplo seria desejável, para confirmar os estudos preliminares realizados nesse estudo.

CONCLUSÃO

A proteína P1 codificada pelos isolados do PRSV-P dos isolados brasileiros apresentou alta identidade com o isolado cubano, ou seja, foi igual ou maior a 87%. Tanto os isolados brasileiros como o isolado cubano mostraram maior identidade com a maioria dos isolados de PRSV-W, mostrando um comportamento diferente do observado para essa estirpe proveniente de outros países onde esse vírus ocorre. Existe uma alta probabilidade de as plantas transgênicas que apresentam resistência ao PRSV-P em outros países não apresentarem a mesma resistência aos isolados desse vírus presentes no Brasil.

REFERÊNCIAS

AFGC PROTOCOLS. **Trizol RNA Isolation Method**. 2002. Disponível em: <<https://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>>. Acesso em: 14 out. 2019.

ALI, A. First Complete Genome Sequence of *Papaya ringspot virus-W* Isolated from a Gourd in the United States. **Genome Announcements**, New York, v. 5, n. 2, p. e01434-16, 2017.

- ALI, Z. M.; CHIN, L. H.; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 2, p. 317-327, 2004.
- ATTASART, P. et al. Nucleotide sequence of a Thai isolate of *Papaya ringspot virus* type W. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 46, n. 4, p. 241-246, 2002.
- COSMI, F. C. et al. Epidemiologic analysis of temporal evolution of papaya sticky disease. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 303-309, 2017.
- COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 21, n. 3/4, p. 38-43, 1969.
- GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 415-437, 1998.
- GONSALVES, D. Hawaii's transgenic papaya story 1978–2012: a personal account. In: MING, R.; MOORE, P. H. (Eds.). **Genetics and genomics of papaya**. New York: Springer, 2014. p. 115-142.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al. Genome analysis of a severe and a mild isolate of Papaya ringspot virus-type W found in Brazil. **Virus Genes**, Gz Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 119-127, 2007.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 8, p. 1329-1332, 2006.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LIMA, J. A. A.; GOMES, M. N. S. Identificação de *Papaya ringspot virus* no Ceará. **Fitossanidade**, Fortaleza, v. 1, n. 2, p. 56-59, 1975.
- LIMA, R. C. A. et al. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 689-699, 2001.
- MANGRAUTHIA, S. K. et al. Role of genetic recombination in the molecular architecture of Papaya ringspot virus. **Biochemical Genetics**, New York, v. 46, n. 11-12, p. 835-846, 2008.
- MARTÍNEZ, D. R. et al. Molecular and biological studies of Papaya ringspot virus isolates from Brazil and Cuba. **American Journal of Agriculture and Forestry**, New York, v. 2, n. 5, p. 209-221, 2014.
- NOA-CARRAZANA, J. C.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D.; SILVA-ROSALES, L. Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. **Virus Genes**, Gz Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 109-117, 2007.

OLARTE CASTILLO, X. A. et al. Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 132-140, 2011.

PORTAL EMBRAPA. **Mamão: Estatísticas nacionais e internacionais**. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>>. Acesso em: 26 set. 2019.

PARAMESWARI, B. et al. Complete genome sequence of an isolate of Papaya ringspot virus from India. **Archives of Virology**, Wien, v. 152, n. 4, p. 843-845, 2007.

ROMAY, G.; LECOQ, H.; DESBIEZ, C. Zucchini tigré mosaic virus is a distinct potyvirus in the papaya ringspot virus cluster: molecular and biological insights. **Archives of Virology**, Wien, v. 159, n. 2, p. 277-289, 2014.

RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D.; DURIGAN, J. F. Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 76-82, 2011.

SHEN, W. et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Papaya ringspot virus*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 204, p. 93-100, 2014.

TRIPATHI, S. et al. Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 9, n. 3, p. 269-280, 2008.

WANG R. R.-C., et al. Genome symbols in the Triticeae (Poaceae). In: Wang R. R.-C.; JENSEN; K. B.; JAUSSE C. (Eds.). **Proceedings of the 2nd International Triticeae Symposium**. Logan: Digital Commons, 1996. p. 29–34.

WU, Z. et al. Characterization of *Papaya ringspot virus* isolates infecting transgenic papaya ‘Huanong No. 1’ in South China. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 8206, 2018.

ZHAO, G. et al. Complete genome sequence of papaya ringspot virus isolated from genetically modified papaya in Hainan Island, China. **Genome Announcements**, New York, v. 3, n. 5, p. e01056-15, 2015.

ARTIGO 2 – ESTUDO DA INTERAÇÃO VÍRUS-PLANTA POR MEIO DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE SOYSV EM *Carica Papaya*

Norma NBR 6022 (ABNT 2003)

RESUMO

O *Soybean yellow shoot virus* (SoyYSV) é um vírus que foi encontrado em Lavras-MG, cujo genoma foi recentemente sequenciado e analisado. Trata-se de uma nova espécie da família *Potyviridae* que não apresentou a identidade necessária para que fosse alocado em nenhum dos gêneros já descritos. Esse vírus é o único vírus dessa família capaz de causar lesões locais em plantas de mamão, sendo considerado um bom modelo para ser empregado em estudos da interação vírus planta, envolvendo reações de resistência do tipo hipersensibilidade. Nesse estudo quatro proteínas desse vírus: CP, HcPro, P1 e VPg foram primeiramente clonadas no “entry” clone do sistema Gateway (PDONOR221) e em seguida foram subclonadas no vetor de expressão pSITE, fusionado à proteína fluorescente GFP. Esses plasmídeos foram empregados para transformar a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, que foi posteriormente infiltrada em folhas de mamoeiro. As folhas foram submetidas à análise por RT-PCR e por observação ao microscópio de epifluorescência aos vinte dias após a agroinfiltração. Nenhuma dessas quatro proteínas foi capaz de induzir reações de HR na planta. Todas elas se translocaram e foram detectadas por RT-PCR e por microscópio de epifluorescência nas folhas novas, não infiltradas, que foram emitidas após a infiltração. Provavelmente ou essas proteínas não estão associadas à indução de HR ou existe a necessidade de haver a combinação de mais de uma proteína viral para induzir essa reação na planta.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*. Expressão gênica. GFP.

ABSTRACT

The Soybean yellow shoot virus (SoyYSV) is a virus that was found in Lavras-MG, whose genome was recently sequenced and analyzed. It is a new species of the *Potyviridae* family that did not have the required identity to be allocated in any of the *Potyviridae* genera already described. It is the only *Potyviridae* species able to induce necrotic local lesions in papaya plants, and is considered a good model to be employed in studies of plant virus interaction involving reactions of hypersensitivity response in plants. In this study four SoyYSV proteins: CP, HcPro, P1 and VPg were first cloned into the Gateway entry clone (PDONOR221) and then subcloned into the pSITE expression vector fused to the fluorescent protein GFP. These plasmids were used to transform *Agrobacterium tumefaciens*, which was later infiltrated in papaya leaves. The leaves were submitted to RT-PCR and analysis at epifluorescence microscope 20 days after agroinfiltration. None of these four proteins was able to induce HR reactions in the plant. All of them translocated and were detected by RT-PCR and by fluorescence on the new, noninoculated leaves, which were expanded after infiltration. Probably either these proteins are not associated with induction of HR or there is a need to combine more than one viral protein to induce this reaction in the host plant.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*. Gene Expression. GFP.

INTRODUÇÃO

O estudo da interação vírus-planta é um pré-requisito para conhecer o mecanismo que o patógeno usa para vencer as respostas de defesa da planta, conseguindo se multiplicar e se translocar sistemicamente para os tecidos não inoculados. Diversos autores têm investigado o mecanismo de defesa das plantas nas reações de hipersensibilidade, bem como as estratégias que os vírus utilizam para superar essas reações (CULVER; DAWSON, 1991; HILLUNG et al., 2016; PADGETT; BEACHY, 1993; POQUE et al., 2017; ZHAO et al., 2018).

O vírus do mosaico do broto da soja (*Soybean yellow shoot virus* - SoyYSV) é um vírus que foi recentemente sequenciado e analisado no Brasil, capaz de infectar, além da soja, diversas hospedeiras pertencentes às famílias *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae*, *Caricaceae* e *Amaranthaceae*. Os sintomas induzidos por esse vírus em plantas de soja variam com a cultivar, podendo causar mosaicos de diferentes intensidades, variando de leve a necrótico severo, amarelecimento e encrespamento dos brotos. Figueira e colaboradores (2019) observaram que o SoyYSV, quando inoculado mecanicamente em diversas cultivares de soja, foi capaz de causar perdas significativas na qualidade e quantidade de produção de sementes, sendo portanto considerado potencialmente importante para as lavouras de soja no Brasil. Além disso, o SoyYSV infecta espécies de soja resistentes ao *Soybean mosaic virus* (SMV), representando um risco extra para as cultivares que geralmente são plantadas.

O SoyYSV apresenta diversas características dos membros da família *Potyviridae* como possuir uma partícula alongada, flexível, ssRNA+ com o número e distribuição de genes semelhantes, e a habilidade de induzir inclusões na forma de catavento. Entretanto, quando a sua sequência de nucleotídeos e aminoácidos foi comparada com as espécies dos diversos gêneros dessa família, a identidade observada não permitiu colocá-lo em nenhum dos gêneros já descritos até o momento. Portanto, trata-se não somente de uma nova espécie, mas também de um novo gênero da família *Potyviridae*.

Outra característica peculiar é o fato desse ser o único vírus conhecido capaz de causar lesões necróticas locais em folhas de mamoeiro *Carica papaya*, o que torna o SoyYSV um excelente modelo para investigar a interação vírus planta, visando descobrir os mecanismos de resistência que envolvem reações de hipersensibilidade (HR). Com base neste contexto, algumas proteínas do SoyYSV, fusionadas com proteínas fluorescentes, foram expressas em plantas de mamão para observar o seu envolvimento na indução da reação do tipo HR da planta e a sua capacidade de translocação. Os dados obtidos, bem como as inferências sobre o papel desses genes na interação com a planta, são aqui apresentados e discutidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Laboratório de Virologia Molecular e Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Manutenção do vírus e das plantas

As plantas de mamão e soja empregadas nesse experimento foram obtidas por semeadura em bandejas com posterior transplante para vasos de 2 kg contendo substrato esterilizado, dez dias após a germinação. Durante o experimento as plantas de soja empregadas para a multiplicação do inóculo e as plantas de mamão no estágio pré-infiltração com a *A. tumefaciens* transformada com os plasmídeos contendo os genes em estudo foram mantidas em casa de vegetação. Após a infiltração as plantas de mamão foram mantidas em contenção em câmara de crescimento a 15 °C com 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Extração do RNA total da planta, RT-PCR e PCR para clonagem dos genes no sistema gateway

O RNA total das plantas de soja infectadas com o SoyYSV foi extraído utilizando-se o método Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2002). As folhas jovens infectadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e o pó obtido homogeneizado com a solução extratora Trizol (38% de fenol saturado, 0,8 M de tiocianato de guanidina, 0,4 M de tiocianato de amônio e 0,1 M de acetato de sódio, pH 5 e 5% de glicerol), na proporção de 1 g de tecido/5 mL solução. Em seguida, o extrato obtido foi transferido para microtubos e esses incubados em banho-maria por 5 minutos a 60 °C e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O pellet foi descartado e o sobrenadante transferido para novos microtubos, adicionando-se a eles 300µL de clorofórmio. Esses tubos foram agitados em vórtex e deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi então transferida para novos tubos, adicionando-se ½ volume, do sobrenadante coletado, de solução contendo 0,8 M de Citrato de Sódio + 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Em seguida, os tubos foram agitados cuidadosamente por inversão e deixados à

temperatura ambiente por 10 minutos, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado (-20 °C). O RNA foi secado e ressuspendido em 25 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), antes de ser utilizado nos testes subsequentes.

A síntese do cDNA e a reação em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas utilizando a enzima Transcriptase Reverse (Ludwig) e a enzima DNA polimerase multiplex (Fermentas). Para a amplificação dos genes: P1, HCPro, Vpg e CP do SoyYSV, foi utilizado um par de primers específicos, contendo as sequências att específicas para o plasmídeo “entry clone” do sistema Gateway (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência de primers projetada para amplificar as proteínas da sequência vinculada att (em negrito) que são os adaptadores específicos para o plasmídeo “entry clone” do sistema Gateway.

Nome primer	Sequência de nucleotídeos (ATT e Primer)
attB-P1-foward	5’AAAAAGCAGGCTTAATGGCAGCAATGAT3’
attB-P1-reverse	5’AGAAAGCTGGGTAATAAAACAACATGTT3’
attB-HCPRO-foward	5’AAAAAGCAGGCTTAGGGGCACAACAGAC3’
attB-hcpro-reverse	5’AGAAAGCTGGGTATCCAAC TTTGTAGTC3’
attB-CP-foward	5’AAAAAGCAGGCTTAGGCGTTGTTGTTT3’
attB-CP-reverse	5’AGAAAGCTGGGTAAGCGAAGTCCATGC3’
attB-Vpg-foward	5’AAAAAGCAGGCTTAATGGAAGGCAAGAA3’
attB-Vpg-reverse	5’AGAAAGCTGGGTATTCGGGATTAAGTAT3’

Fonte: Do autor (2019).

A amplificação dos genes por PCR foi feita em 35 ciclos e a reação foi montada com 5 µl de tampão, 1 µl de dNTP, 0,2 µl de Taq DNA polimerase, 1 µL de primer *foward*, 1 µL de primer *reverse* e 1 µL de cDNA. As temperaturas de anelamento foram específicas para cada par de primers. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 0,7% e purificados usando o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de recombinação da Bp clonase e LR CLONASE

Para a inserção do produto de PCR obtido na amplificação dos genes no plasmídeo do sistema Gateway, foi montada a reação contendo 5 µl do produto do PCR, 2 µl do vetor pDONR221, 4 µl do tampão 5x Te da clonase BP e 2 µl da enzima Bp clonase. Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de Proteinase K (2 µg/mL) e novamente incubados a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, o plasmídeo recombinante obtido foi utilizado para transformar a célula competente de *E. coli* Omnimax (Invitrogen) pelo método de choque térmico. Esta técnica consistiu na adição de 5 µl da reação da clonase Bp a 50 µl de célula de *E. coli*, seguida de incubação em gelo por 30 min. O próximo passo foi incubar a reação a 42 °C por 45 segundos e colocar no gelo por 5 minutos. Foi adicionado 1 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani) e incubado a 37 °C durante 1 hora, agitando a 150-200 rpm. Em seguida, as células bacterianas foram plaqueadas em meio sólido LB contendo Kanamicina (50 µg/ml) e incubadas por 12 a 16 h a 37 °C.

Para testar se o produto foi adequadamente clonado, eles foram inicialmente submetidos a RT-PCR com iniciadores específicos para cada gene, de acordo com a técnica descrita acima, e estes foram enviados para sequenciamento genético. Após verificação das sequências clonadas, as colônias foram multiplicadas em meio líquido LB a 37 °C durante a noite e o plasmídeo de DNA foi extraído pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Este DNA foi utilizado para a reação de LRclonase.

A recombinação foi feita colocando-se em um tubo de 1,5 ml, 5 µl de água ultrapura, 1,5 µl do *entry clone* (derivado da reação da clonase Bp), 1,5 µl de pSITE-2NB (GFP) (fornecido por Michael Goodin, University of Kentucky) (GOODIN et al., 2007) e, finalmente, 1,5 µl da enzima LR clonase (Invitrogen). A reação foi então incubada por 1 hora à temperatura ambiente, seguida pela adição de 2 µl de Proteinase K (2 µg/µl), reincubação a 37 °C por 10 minutos e transformação da célula competente de *E. coli* Omnimax (Invitrogen), como descrito acima, alterando apenas os antibióticos utilizados para estreptomicina (100 µg/ml) e espectromicina (100 µg/ml).

Agrotransformação

Os vetores binários recombinantes foram utilizados para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404, por meio do método de “congelamento e descongelamento”: 5 µl de plasmídeo (derivado da LR clonase) foram incubadas com 100 µl de suspensão de

Agrobacterium em 10 Mm de CaCl_2 . A mistura obtida foi congelada em nitrogênio líquido e submetida a choque térmico a 37 °C, durante cinco minutos e, em seguida, incubadas a 28 °C, durante 2 horas, seguida da adição de 1 ml de meio LB líquido. As bactérias foram precipitadas por centrifugação e plaqueadas em meio LB ágar, contendo antibióticos de seleção, estreptomicina (100 µg/ml), espectromicina (100 µg/ml) e rifampicina (100 µg/ml).

Agroinfiltração

Para cada proteína do SoyYSV expressa foram utilizadas três plantas de mamoeiro e duas folhas de cada planta, foram infiltrada com colônias frescas (2-3 dias de idade) de *A. tumefaciens* transformadas conforme descrito anteriormente. Antes da infiltração, a concentração dessas colônias foi ajustada para um OD600 de 0,6 em tampão MES (10 Mm de MgCl_2 , 10 Mm de MES, pH 5,6) contendo acetoseryngone (150 mM), e a suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente durante 2-3 horas. As infiltrações foram realizadas no meio da folha, por meio de uma suave pressão com uma seringa descartável de 1 ml na superfície inferior das folhas. Uma quantidade suficiente de suspensão bacteriana foi utilizada para infiltrar completamente as folhas, até tomar toda a folha. Essas infiltrações foram feitas com cada proteína separadamente: CP, HcPro, P1 e VPg.

Microscopia de epifluorescência

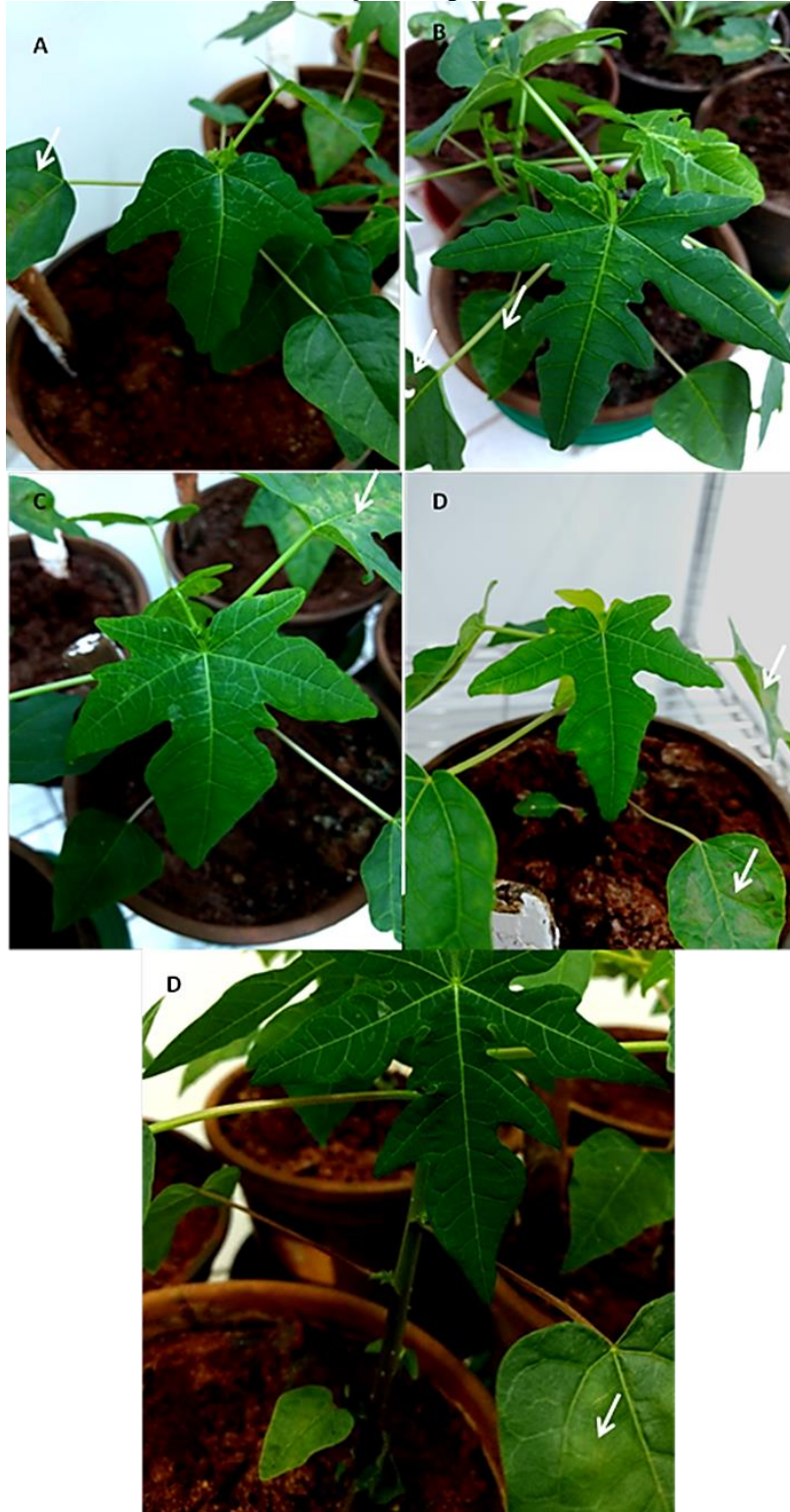
Cerca de 10 dias após a agroinfiltração, as folhas agroinfiltradas e as mais novas, não agroinfiltradas, foram examinadas ao microscópio de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) com filtro 470 a 490 nm e pico de transmissão em 510 a 560 nm. Após visualização ao microscópio de epifluorescência o RNA total das folhas mais novas, não agroinfiltradas, foi extraído e esse RNA foi submetido ao RT-PCR para as respectivas proteínas para confirmar se houve translocação do produto dos genes expressos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aproximadamente 20 dias após a agroinfiltração, foram observados sintomas nas folhas não agroinfiltradas, mais novas, quando a planta foi transformada com as proteínas estudadas: HcPro, P1, Vpg e CP (Figura 1:A-E; Figura 2: A-D; Figura 3: A-D; Figura 4 A-C; e Figura 5:

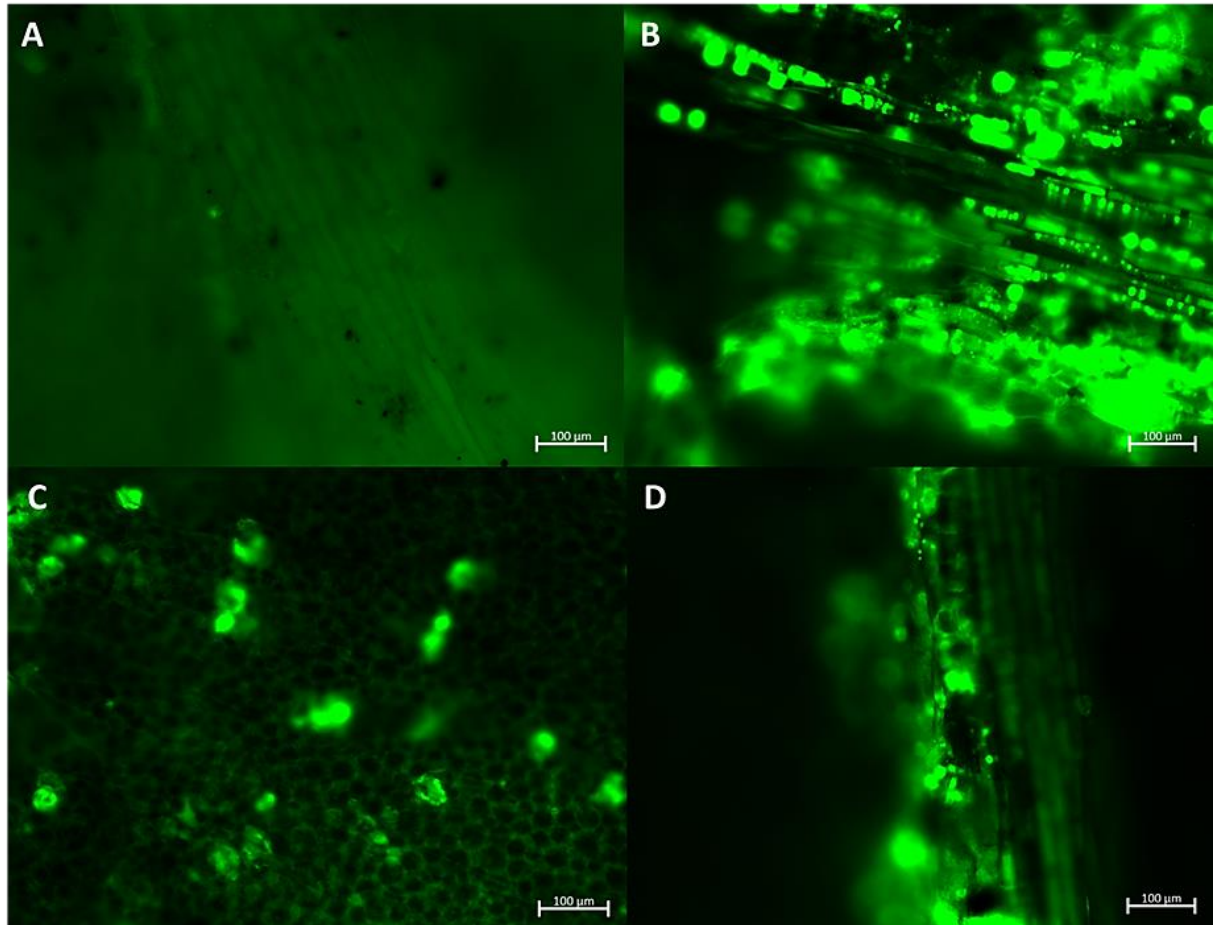
A-C). Uma das possibilidades seria que a CP pudesse estar envolvida na indução das lesões necróticas locais provocadas quando o vírus é inoculado.

Figura 1 – Plantas agroinfiltradas com as proteínas. **A:** CP; **B:** HcPro; **C:** P1; **4:** VPg; **5:** Controle sadio. As setas indicam as folhas que foram infiltradas. A folha da planta controle foi infiltrada com solução tampão.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 2 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia; (B) Nervura da folha agroinfiltradas; (C) local da agroinfiltração; (D) Nervura da folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína CP.

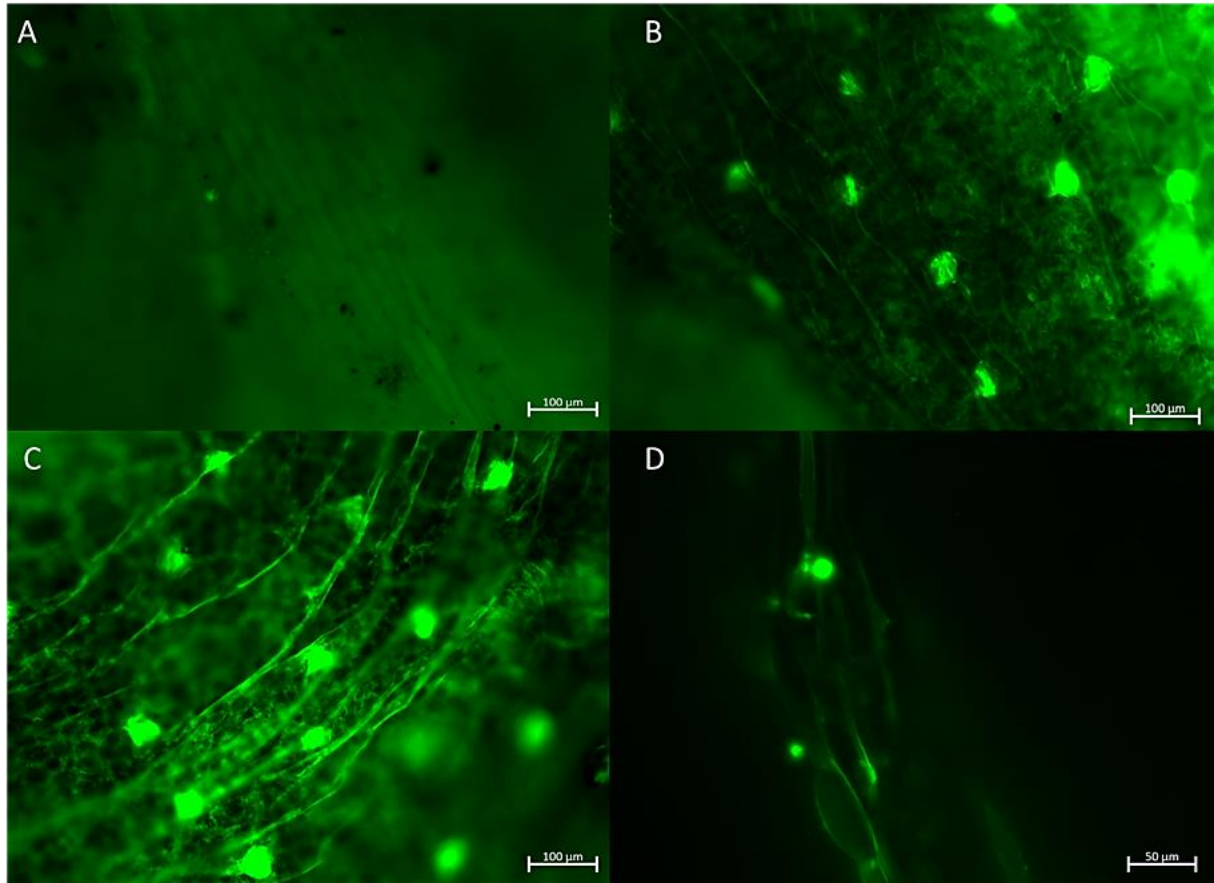


Fonte: Do autor (2019).

Diversos artigos mostrando o envolvimento da proteína do capsídeo dos tobamovirus na indução de respostas HR do hospedeiro têm sido publicados. O primeiro a descobrir o envolvimento da CP na indução de HR em fumo foram os pesquisadores Saito et al. (1988). Eles trabalharam com duas estirpes do *Tobacco mosaic virus* (TMV): a TMV-O que não induzia lesão necrótica local em fumo com o par de genes NN, responsável pela reação HR e outra denominada TMV-OM que induzia lesão local. Nesse experimento eles substituíram a CP do TMV-O pela CP do TMV-OM e esta passou a induzir lesão local na planta.

Logo depois, Knorr e Dawson (1988), induziram mutantes na região da CP para determinar a região dessa proteína que estaria envolvida na indução da HR. Descobriram que a substituição de uma única base, na posição 6.157 do genoma, citosina por uracila, levou à substituição de uma serina por fenilalanina, seria capaz de superar a resistência da hospedeira, passando de infecção local para infecção sistêmica.

Figura 3 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia. (B) Nervura da folha agroinfiltradas; (C) local da agroinfiltração; (D) Nervura da folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína VPg.



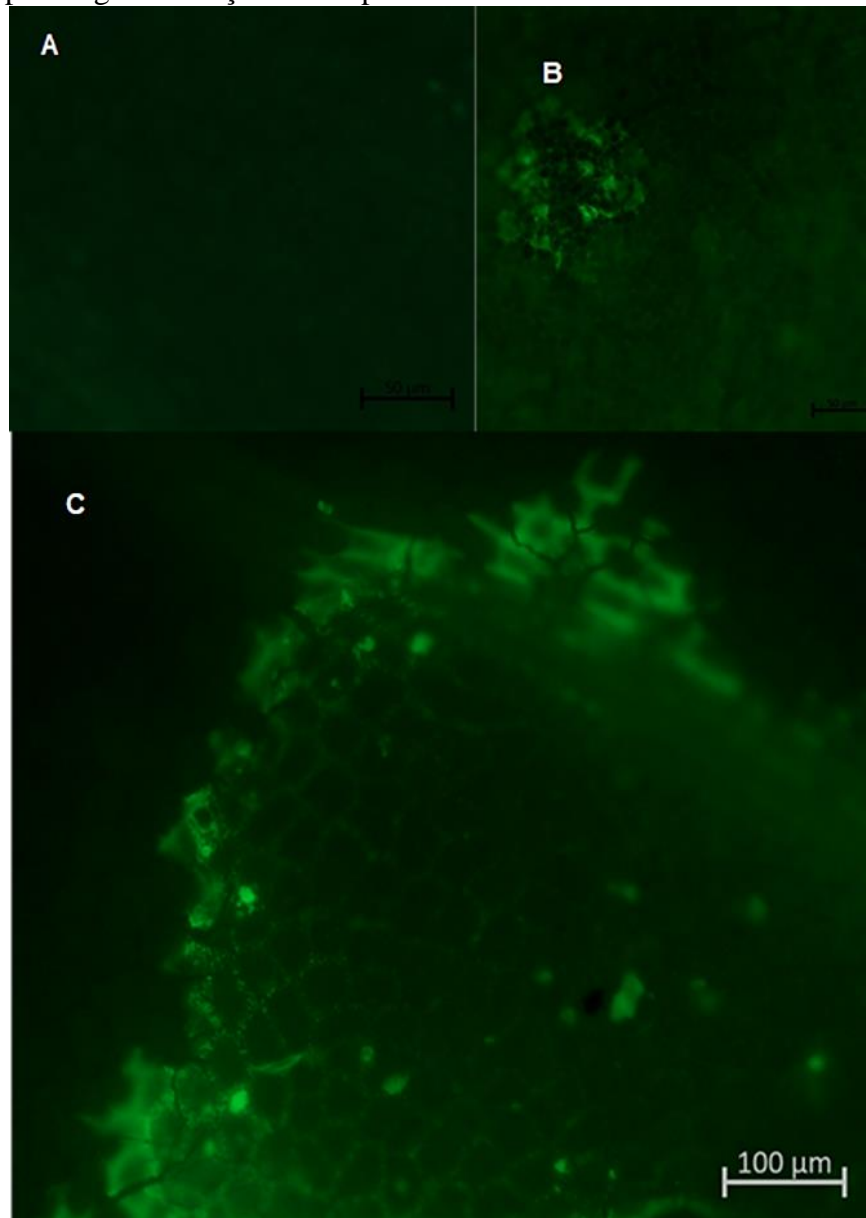
Fonte: Do autor (2019).

Ehrenfeld et al. (2008) compararam a estrutura espacial das proteínas do capsídeos de duas estirpes de TMV: TMV-Cg que induz lesão local em plantas de fumo resistentes e a TMV (CPU1) que não induz lesão local. Eles examinaram o efeito da substituição de 4 aminoácidos na CP dessas estirpes e observaram que essas modificações modificaram significativamente a estrutura espacial dessas proteínas e sugeriram que a integridade estrutural da proteína CP é fundamental para a elicitação da resposta HR na planta.

Outra possibilidade seria de que a CP do SoYYSV pudesse estar envolvida de alguma forma na movimentação do vírus na célula. Nos potyvirus, além do papel da CP na encapsidação da partícula, a CP tem um papel na amplificação, translocação e transmissão do vírus pelo vetor, além de interagir com a proteína rubisco, que parece ter papel no sequestro da proteína para dentro de organelas como os cloroplastos (FEKI et al., 2005; QUI et al., 2018; ZHAO et al., 2013). O fato de a proteína ter se translocado para outras folhas da planta indicou que ela não apenas não induziu a HR observada quando o vírus é inoculado, mas também foi

capaz de se movimentar livremente de uma célula para outra e através do floema e xilema para alcançar outras partes da planta. A presença dessas proteínas nas folhas não inoculadas foi confirmada por PCR (FIGURE 6) e por observação no microscópio confocal de fluorescência.

Figura 4 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia. (B) local da agroinfiltração; (C) Folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína P1.

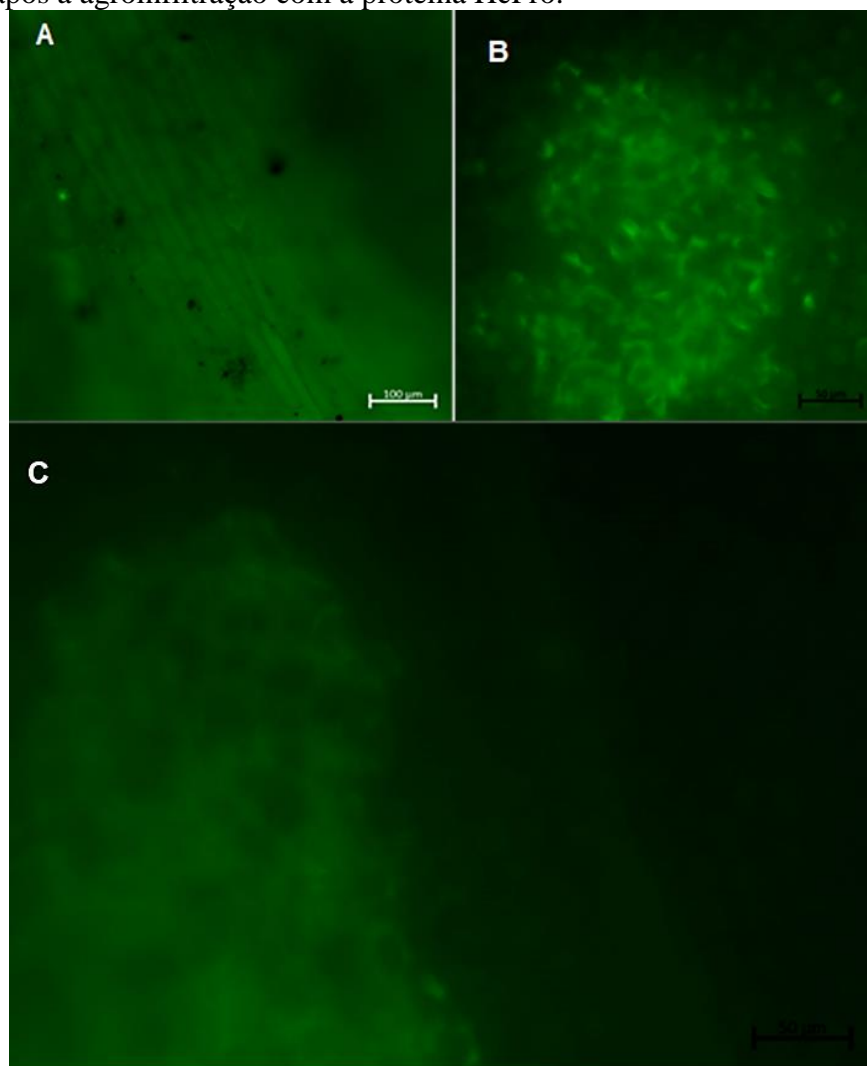


Fonte: Do autor (2019).

A proteína HcPro (*Helper Component Proteinase*) dos potyvirus tem sido uma das mais estudadas, revelando-se como uma proteína multifuncional. Primeiramente tem a função de protease, função essencial para clivar a poliproteína do vírus em unidades funcionais, mas também parece estar envolvida na transmissão por pulgões e suprimir o silenciamento gênico

pós-transcricional (CARRINGTON; FREED; SANDERS, 1989; DEL TORO et al., 2017; GONZALEZ-JARA et al., 2005; GOVIER; KASSANIS; PIRONE, 1977; IVANOV et al., 2016; JAY et al., 2011; KASSCHAU et al., 2003; MALLORY et al., 2002; SOITAMO; JADA; LEHTO, 2011; SYLLER et al., 2005). Nesse trabalho havia a expectativa de que ela e a proteína P1 fossem as que teriam mais chance de se translocar na planta quando expressa em suas células.

Figura 5 – Fotos obtidas ao microscópio de epifluorescência 20 dias após a agroinfiltração. (A) folha da planta sadia. (B) local da agroinfiltração; (C) Folha jovem, emitida após a agroinfiltração com a proteína HcPro.

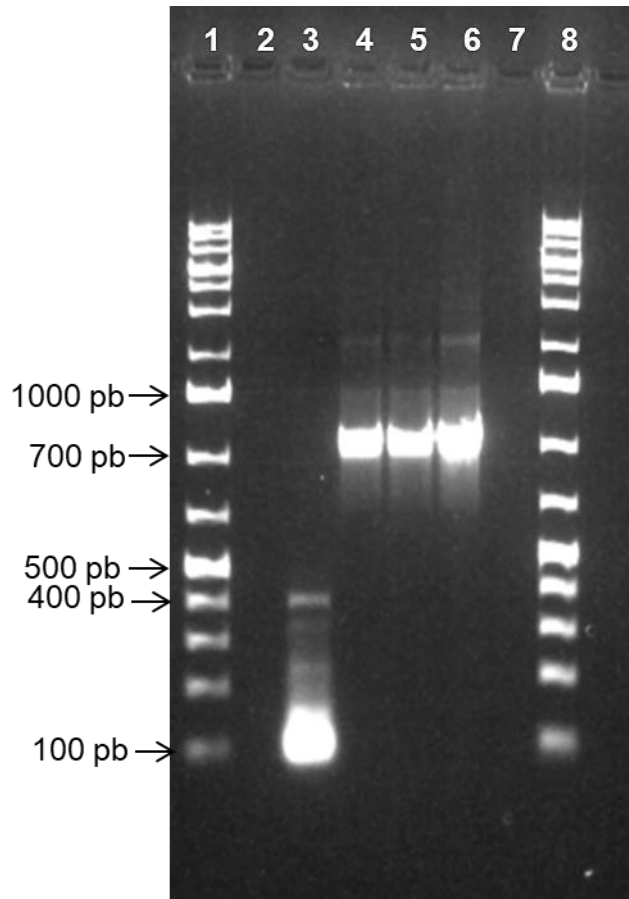


Fonte: Do autor (2019).

A proteína P1 também é uma proteinase, que entre os membros do gênero *Potuvirus* é a que apresenta maior variabilidade. A sua função, além de atuar como proteinase, é semelhante à da HcPro, ou seja, também atua na transmissão pelos afídeos e na supressão do silenciamento

gênico gênico (URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001). Alguns autores evidenciaram que essa proteína estimula a atividade de silenciamento gênico da HcPro (RAJAMAKI et al., 2005; VALLI et al., 2014). Tena Fernandez et al. (2013) postularam que provavelmente porque a sua presença aumenta a síntese da HcPro, enquanto que outros autores sugerem que o papel desempenhado por essa proteína no silenciamento gênico seria de modo independente das demais (CHENG; WANG, 2017; PASIN; SIMON-MATEO; GARCIA, 2014).

Figura 6 – Análise eletroforética dos produtos da PCR realizada para detecção das proteínas expressas nas folhas não agroinfiltradas. **1:** Marcador 100bp; **3:** VPg (480pb); **4:** P1 (899pb); **5:** HcPro (914pb); **6:** CP (839 pb). **8:** Marcador 100 bp.



Fonte: Do autor (2019).

A VPg (*virus protein genome linked*), por sua vez, como o próprio nome indica, é uma proteína que se liga à extremidade 5' do genoma viral, e está presente em diversos gêneros de vírus, incluindo os gêneros da família *Potyviridae*. Existem indícios de que essa proteína pode ser fosforilada após a sua tradução, o que seria importante na regulação de suas diversas funções (MATHUR; SAVITHRI, 2012). Quando testada *in vitro*, ela interage com praticamente todas

as outras proteínas virais (ELENA; RODRIGO, 2012) e também com diversos fatores do hospedeiro: eIF4E – fator de iniciação dos eucarióticos (WANG et al., 2012), com a proteína presente no núcleo denominada de fibrilarina fibrilarina (RAJAMAKI; VALKONEN, 2009), PABP (BEAUCHEMIN; BOUTET; LALIBERTE, 2007) e com a proteína AtRH8, semelhante à RNA helicase de pêssigo (HUANG et al., 2010). Sua atuação na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional também tem sido aventada (CHENG; WANG, 2017; RAJAMAKI; STRENG; VALKONEN, 2014).

Essa interação entre proteínas virais tem sido observada em vírus de diferentes gêneros e tipos de RNAs. Ramalho et al., (2015) estudaram a interação entre as proteínas do *Coffee ringspot* vírus (CoRSV), que é um vírus de ssRNA-, e observaram que a proteína P interagiu com a proteína M, com a proteína N e com ela mesma, a passo que a proteína M interagiu também com a proteína N e a G interagiu apenas com ela mesma. Isso demonstra que, provavelmente, a reação de HR das plantas depende de outras proteínas além das testadas, ou então depende da interação entre elas para a formação de um fator elicitor específico.

CONCLUSÃO

As proteínas CP, HCPro, P1 e VPg, quando expressas separadamente nas células, não induziram reação de HR em folhas de mamoeiro. Todas as quatro proteínas testadas foram capazes de se translocar na planta, sendo detectadas nas folhas não inoculadas.

REFERÊNCIAS

- AFGC PROTOCOLS. **Trizol RNA Isolation Method**. 2002. Disponível em: <<https://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>>. Acesso em: 14 out. 2019.
- BEAUCHEMIN, C.; BOUTET, N.; LALIBERTE, J. F. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 2, p. 775-782, 2007.
- CARRINGTON, J. C.; FREED, D. D.; SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the Potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, n. 10, p. 4459-4463, 1989.

CHENG, X.; WANG, A. The *Potyvirus* silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. **Journal of Virology**, Washington, v. 91, n. 1, p. e01478-16, 2017.

CULVER, J. N.; DAWSON, W.O. Tobacco Mosaic Virus Elicitor Coat Protein Genes Produce a Hypersensitive Phenotype in Transgenic *Nicotiana sylvestris* Plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 4, n. 5, p. 458-463, 1991.

DEL TORO, F. J. et al. Potato virus Y HCPro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. **Journal of Virology**, Washington, v. 91, n. 2, p. e00367-17, 2017.

EHRENFELD, N. et al. Structure–function relationship between the tobamovirus TMV-Cg coat protein and the HR-like response. **Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 3, p. 809-817, 2008.

ELENA, S. F.; RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. **Current Opinion in Virology**, Oxon, v. 2, n. 6, p. 719-724, 2012.

FEKI, S. et al. Interaction between tobacco ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit (Rubisco-LSU) and the PVY coat protein (PVY-CP). **European Journal of Plant Pathology**, Gz Dordrecht, v. 112, n. 3, p. 221-234, 2005.

FIGUEIRA, A. D. R. et al. Characterization of *Soybean yellow shoot virus*, a new member of the Family *Potyviridae* infecting soybean plants in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v. 103, n. 6, p. 1172-1180, 2019.

GONZALEZ-JARA, P. et al. A single amino acid mutation in the plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. **Phytopathology**, St Paul, v. 95, n. 8, p. 894-901, 2005.

GOODIN, M. M. et al. New gateways to discovery. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 1100-1109, 2007.

GOVIER, D. A.; KASSANIS, B.; PIRONE, T.P. Partial purification and characterization of the *Potato Virus Y* helper component. **Virology**, San Diego, v. 78, n. 1, p. 306-314, 1977.

HILLUNG, J. et al. The transcriptomics of an experimentally evolved plant-virus interaction. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 6, p. 24901, 2016.

HUANG, T. S. et al. A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, n. 1, p. 255-266, 2010.

IVANOV, K. I. et al. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 85, n. 1, p. 30-45, 2016.

JAY, F. et al. Misregulation of Auxin Response Factor 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e1002035, 2011.

- KASSCHAU, K. D. et al. P1-HCPro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 205-217, 2003.
- KNORR, D. A.; DAWSON, W.O. A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 1, p. 170-174, 1988.
- MALLORY, A. C. et al. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 23, p. 15228-15233, 2002.
- MATHUR, C.; SAVITHRI, H. S. Novel ATPase activity of the polyprotein intermediate, viral protein genome-linked-nuclear inclusion-a protease, of *Pepper vein banding Potyvirus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 427, n. 1, p. 113-118, 2012.
- PADGETT, H. S.; BEACHY, R. N. Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 5, p. 577-586, 1993.
- PASIN, F.; SIMON-MATEO, C.; GARCIA, J. A. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e1003985, 2014.
- POQUE, S. et al. Potyviral gene-silencing suppressor HCPro interacts with salicylic acid (SA)-binding protein 3 to weaken SA-mediated defense responses. **Molecular plant-microbe interactions**, St Paul, v. 31, n. 1, p. 86-100, 2017.
- QUI, Y. et al. Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1205, 2018.
- RAJAMAKI, M. L.; VALKONEN, J. P. T. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of Picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* Species. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 8, p. 2485-2502, 2009.
- RAJAMAKI, M. L. et al. A novel insertion site inside the Potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. **Virology**, San Diego, v. 342, n. 1, p. 88-101, 2005.
- RAJAMAKI, M. L.; STRENG, J.; VALKONEN, J. P. T. Silencing suppressor protein VPg of a *Potyvirus* interacts with the plant silencing-related protein SGS3. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 27, n. 11, p. 1199-1210, 2014.
- RAMALHO, T. O. **Interação do Coffee ringspot virus (CoRSV) com a célula hospedeira empregando proteínas fluorescentes**. 2014. 90 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SAITO, T. et al. Interviral homologies of the 30K proteins of tobamoviruses. **Virology**, San Diego, v. 167, n. 2, p. 653-656, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SOITAMO, A. J.; JADA, B.; LEHTO, K. HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, p. 68, 2011.

SYLLER, J. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by Potyvirus es and caulimoviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3-5, p. 119-130, 2005.

TENA FERNANDEZ, F. et al. The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of *Potato virus Y* HCPro in heterologous systems and its suppression of silencing activity. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 14, n. 5, p. 530-541, 2013.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 157-175, 2001.

VALLI, A. et al. A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 17, p. 9808-9818, 2014.

WANG, M. B. et al. RNA Silencing and Plant Viral Diseases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 25, n. 10, p. 1275-1285, 2012.

ZHAO, J. et al. The Rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2²-mediated extreme resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 161, p. 374-383, 2013.

ZHAO, Q. et al. Salicylic acid and broad spectrum of NBS-LRR family genes are involved in SMV-soybean interactions. **Plant physiology and biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 123, p. 132-140, 2018.