



DOUGLAS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO *Papaya
ringspot virus* PROCEDENTES DE REGIÕES DO
BRASIL E DE CUBA**

LAVRAS - MG

2012

DOUGLAS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO *Papaya ringspot virus*
PROCEDENTES DE REGIÕES DO BRASIL E DE CUBA**

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

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Rodríguez Martínez, Douglas.

Caracterização de isolados do *Papaya ringspot virus* procedentes de regiões do Brasil e de Cuba / Douglas Rodríguez Martínez. –
Lavras: UFLA, 2012.

121 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Mancha anelar. 2. HC-Pro. 3. Capa protéica. 4. Filogenia. 5. Sequenciamento. 6. Mamoeiro. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 634.65198

DOUGLAS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO *Papaya ringspot virus*
PROCEDENTES DE REGIÕES DO BRASIL E DE CUBA**

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

APROVADA em 18 de maio de 2012.

Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho	EMBRAPA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

LAVRAS - MG

2012

*A minha filha Kátherin; minha esposa, Islaidy e aos meus pais,
fontes constantes de inspiração, exemplos de constância, sacrifício, sinceridade,
honestidade e perseverança.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer a Deus. Sem seu apoio e companhia nada do que sou hoje teria sido possível.

Pelo fato de ser cubano e ter estudado no Brasil, vou dividir os meus agradecimentos às pessoas dos dois países:

Agradeço, no Brasil

À UFLA e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso, bem como ao programa PEC-PG e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Antonia, pela orientação e por ter permitido que este doutorado se realizasse, abrindo sempre as portas, desde o início e colaborando com os trâmites necessários para optar pela bolsa do programa PEC-PG. Também por compartilhar parte de sua experiência para a minha formação.

À Dra. Cristiane de Jesus Barbosa, pelo seu apoio imprescindível e decisivo no momento de optar pela bolsa do programa PEC-PG e pelo apoio profissional no Brasil. Obrigado, Cris, por estar sempre disponível no momento em que precisei de você.

Ao Laboratório de Virologia Molecular e ao Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, pela estrutura disponibilizada, a qual tornou possível a realização deste trabalho. Também pela ótima convivência com todos.

Aos colegas da virologia: Romário, as Priscillas, Suellen, aos Joões, Nara, Thaís, Bárbara, Denise, André, Silvia, Aurivan, Anderson, Matheus, às Danieleles, Aline, Maurício, Sara e do Centro de Indexação de Vírus: Elisangela, às Lucianas, Carzinho, Jaciara e aos colegas todos da fitopatologia, especialmente a Emí, Flávia, Mirella, Érica e Julian Mauricio, entre muitos outros, por terem feito tudo o que foi possível para que minha permanência na UFLA fosse a melhor possível.

Ao professor Dr. Eduardo, à Dra. Cláudia e à MSc. Eloísa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA, pela ajuda no trabalho.

Às Dras. Denise M. Balani, Priscilla S. Geraldino, Suellen B. Ferreira e às MSc. Érica Sfalsin, Nara Edreira Alencar e Thaís Ramalho, e ao Matheus, pelas correções do português.

Ao Dr. Francisco F. Laranjeira, pelo apoio e orientações no desenho de alguns experimentos da tese.

Aos professores e às trabalhadoras do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e companheirismo durante estes anos.

Fora da UFLA, muitas outras pessoas fizeram com que a minha vida no Brasil fosse inesquecível: ao Moisés e ao Thiago, que me receberam e apoiaram durante meus primeiros tempos no Brasil. Ao Paulo e sua família; a minha grande família brasileira, Landa (minha mãe brasileira), Vanda, Lourdes, Filinha, Nina, Giovanna, Fernanda, Yolanda, Milton, Gilmar, Maurício, Camila, Beatriz, Marly, Mayta e Elizabeth, que tantas coisas fizeram por mim durante todo esse tempo longe da família de Cuba. Vocês foram, realmente, um grande apoio para mim em Lavras.

Especialmente a alguém que não poderia deixar de agradecer por ter sido uma pessoa muito especial na minha vida no Brasil. Muito obrigado pela sua amizade, seu carinho e sua sinceridade, Giane.

Aos colegas e amigos cubanos que compartilharam minha vida de estudante no Brasil e deram-me apoio emocional, espiritual e profissional: Saray, Mayta, Elíizabeth, Regla e Justo.

Agradeço, em Cuba

Aos meus dois grandes amores, minha esposa e filha, por terem dado todo este empenho e terem suportado com maturidade todo este tempo de separação que, embora seja irrecuperável, espero, não tenha sido em vão. Pela

grande amizade, confiança e carinho que sempre nos mantiveram unidos, ainda que na longa distância que nos separou.

Aos meus pais, por terem respeitado, embora sofressem, a minha decisão de vir para o Brasil, e apoiado em tudo o que foi possível durante este tempo e toda a minha vida estudantil e profissional. Agradeço pela confiança depositada em mim.

Aos meus sogros, Ada e Adalberto e avôs, Zenaida e Ramón (*in memoriam*), pelo constante apoio e cuidado com a minha família e, especialmente, da Kathy durante todo o tempo que estive fora de Cuba.

A minha irmã Derlin, pelo seu apoio constante de ânimo e comunicação tanto quanto foi possível. Ao meu irmão, Dayke e sua esposa, Liliana pelo apoio sentimental através da internet e financeiro, quando precisei dele para vir ao Brasil e as ajudas oferecidas com as traduções para o inglês.

A toda a minha família: avôs, tios, primos, cunhados, sobrinhos e vizinhos, que deram sempre esse toque especial de família e aos amigos, que sempre fizeram muito grata minha vida e traziam boas lembranças nos momentos tão difíceis e de tanta solidão no Brasil.

A todos aqueles que, uma ou muitas vezes, colaboraram para manter a comunicação com minha família em Cuba: Odalys, Miguel, Balvina, Yenile, José (Pepe), Iosvany, Reglita, Barbarita e esposo, Alexander, Vania, Riaño, Natalia, Milka, Ransés, e os trabalhadores dos policlínicos de Playa Larga e Torriente.

Aos meus inesquecíveis colegas e amigos da Estação Experimental de Cítricos (não posso mencionar nomes), que compartilharam comigo tudo durante pouco mais de 9 anos que marcaram minha vida para sempre. Os momentos tensos e difíceis, mas também momentos de alegrias e sorrisos. Vocês contribuíram, sem dúvida, para que eu tenha chegado até aqui.

A todos meus colegas do IIFT, inclusive aqueles que fizeram tudo que foi possível para dificultar o meu caminho. A eles agradeço o fato de ter me feito mais forte e empreender novos e melhores caminhos. Aos que, de boa vontade, deram-me ânimo, orientação e conhecimento durante o tempo trabalhado aí. A eles agradeço por parte do que sou hoje.

Aos meus pastores e irmãos da igreja, que sempre oraram a Deus por mim, pelo carinho e preocupação e pelo amor que nos une e fortalece.

Às doutoras Esther Lilia Peralta, Yamila Martínez, Regla Toujague, Saray Sánchez e os doutores Miguel Aranguren (imprescindível neste tempo), Romualdo Pérez, Justo González, Nivardo del Valle, René Novo, Eugenio Rodríguez, colegas cubanos da fitopatologia e outras áreas que sempre estiveram dispostos a colaborar e a me dar ânimo e força.

Aos amigos, irmãos e familiares que, embora longe, sempre ou algumas vezes estiveram atentos às minhas necessidades tanto materiais quanto espirituais: Sunarkis, Elvis, Alicia, Raulito, Estrellita e esposo, Nilda, Maritel, Grecia, Adalberto, Yenia, Yamilet, Valeria, Ariel, Deyanira, Carmen, Milka, Pedro, Medford, Zoraida, Luís Ramón, Maylen, Yanet, etc.

Nunca poderia esquecer tanta gratidão.

A todos o meu mais sincero,

MUITO OBRIGADO!!!

“Nunca, embora oculta, a virtude deixa de emitir sinais de si;
quem for digno, capta seus vestígios”

Sêneca

RESUMO

Entre os fatores que reduzem a produção de frutos e a longevidade do mamoeiro, as doenças causadas por vírus ocupam lugar de destaque, sendo o *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), da família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*, o de maior importância econômica. Dentre as estratégias de manejo mais empregadas para tentar diminuir a incidência e as perdas causadas por PRSV-P, a construção de plantas transgênicas resistentes ao PRSV-P e a proteção cruzada com estirpes fracas do vírus são consideradas bastante promissoras, mas ambas as estratégias são dependentes do grau de similaridade genética entre os isolados de cada região. Desse modo, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar, molecular e biologicamente, isolados do PRSV-P coletados em mamoeiros de diferentes regiões do Brasil e de Cuba e de um isolado de viral coletado em planta de abóbora com mosaico, proveniente de Cuba. Foram coletados 21 isolados em diversas regiões do Brasil e 7 em Cuba, que foram inoculados e mantidos dessecados e multiplicados em plantas de mamoeiro sob condições de casa de vegetação, para extração do RNA total e realização do RT-PCR, empregando *primers* específicos para as regiões gênicas da capa proteica (CP), P1 e HC-Pro. Os amplicons obtidos foram sequenciados e analisados com os programas CLUSTALW, MEGA blast, MEGA5 e RDP3 e comparados entre si e com outras sequências de PRSV disponíveis no *GenBank*. Esses isolados foram também inoculados em plântulas de mamoeiro cv. Sunrise solo e abóbora (*Cucurbita pepo* L.) cv. Caserta, para avaliação da reação das plantas a cada isolado. Quando os genes da CP e da HC-Pro foram analisados, observaram-se menores distâncias gênicas e, portanto, maiores identidades, entre as sequências de nucleotídeos (nts) e de aminoácidos (aa) de isolados de regiões geográficas próximas, em comparação com as mais distantes. As árvores filogenéticas baseadas nas sequências de nts agruparam os isolados das Américas com os isolados da Índia, separadamente dos isolados da Ásia. Os isolados brasileiros ficaram agrupados por estado, enquanto os isolados da região oriental de Cuba ficaram separados dos provenientes da região centro-ocidental, sugerindo uma possível diferença em sua origem geográfica. Nas árvores baseadas nas sequências de aa, os agrupamentos foram diferentes, formando *clusters* mistos com isolados americanos e asiáticos. A árvore baseada nas sequências de nts dos genes P1 e HC-Pro confirmou a proximidade dos isolados da América com os da Índia e foram encontradas evidências de um possível recombinante entre os isolados CbMT-2 de Cuba e BrSP-3 do Brasil. As plântulas de mamoeiro e abóbora inoculadas desenvolveram sintomas típicos, permitindo agrupar os isolados segundo as diferenças na intensidade dos sintomas da doença em cada hospedeira. Análises biológicas do isolado viral de abóbora coletado em Cuba mostraram ser ele capaz de induzir sintomas de

mosaico, embolhamento e distorção foliar em abóbora cv. Caserta, mas não em mamoeiro cv. Solo. Observações de preparações *leaf dip* de tecidos de folhas de abóbora infectadas, ao microscópio eletrônico de transmissão, mostraram partículas alongadas e flexuosas de aproximadamente 780-800 x 12nm. Foram amplificados e sequenciados os fragmentos genômicos desse vírus, contendo os genes da capa proteica e HC-Pro, empregando-se *primers* específicos para essas regiões do PRSV, e estes foram analisados e comparados com outros isolados disponíveis no GenBank. A identidade de nucleotídeos e de aminoácidos foi superior a 94%, quando comparada com a de outros isolados de PRSV-W da América. Na árvore filogenética, o isolado agrupou-se com outros isolados de América, Austrália e Índia e ficou mais distante dos isolados asiáticos. Os dados obtidos revelaram ser esse um isolado do PRSV-W, detectado pela primeira vez em Cuba. Os resultados deste trabalho auxiliam no entendimento da diversidade genética do PRSV no Brasil e em Cuba, fornecendo informações valiosas para as estratégias de manejo da mancha anelar do mamoeiro, via proteção cruzada e transgenia.

Palavras-chave: Mancha anelar. Capa protéica. HC-Pro. Sequenciamento. Filogenia.

ABSTRACT

Among the factors which reduce both fruit yield and longevity of the papaya tree, the virus-caused diseases play an important role, *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), from the family *Potyviridae* and genus *Potyvirus* being the one of greatest economic importance. Among the management strategies most utilized to try to decrease both the incidence and the losses caused by PRSV-P, the construction of transgenic plants resistant to PRSV-P and the cross-protection with mild strains of the virus are thought of quite promising, but both the strategies are dependent upon the degree of genetic similarity among the isolates of each region. Thus, this work was carried out with the objective of characterizing both molecularly and biologically PRSV-P isolates collected on papaya trees from different regions of Brazil and Cuba and of a viral isolate collected on squash plant with mosaic, coming from Cuba. 21 isolates were collected in several regions of Brazil and 7 in Cuba, which were inoculated and kept dissected and multiplied on papaya plants under greenhouse conditions for total RNA extraction and doing of RT-PCR, employing *primers* specific to the gene region of the coat protein (CP), P1 and HC-Pro. The amplicons obtained were sequenced and analyzed with the CLUSTALW, MEGA blast, MEGA5 and RDP3 programs and compared one with another and with other PRSV sequences available in the *GenBank*. Those isolates were also inoculated on papaya plants cultivar Sunrise solo and squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivar Caserta for evaluation of the reaction of the plants to each isolate. When the genes of the CP and of the HC-Pro were analyzed, shorter distances were found and, therefore, greater identities among the sequences of nucleotide (nts) and of aminoacids (aa) of isolates of nearby geographic regions as compared with the farthest ones. The phylogenetic trees based upon the net sequences grouped the isolates of the Americas together with the isolates of India, separately from the isolates of Asia. The Brazilian isolates were grouped per state, while the isolates of the eastern region of Cuba were separated from the ones coming from the center-western region, suggesting a possible difference in their geographic origin. In the trees based upon aa sequences, the groupings were different, forming *clusters* mixed with American and Asiatic isolates. The tree based on the nt sequences of genes P1 and HC-Pro confirmed the closeness of the America isolates with those of India and evidence of a possible recombinant among the CbMT-2 isolate of Cuba and BrSP-3 isolate of Brazil was found. The inoculated papaya and squash seedlings developed typical symptoms, allowing us to group the isolates together according to the differences in the intensity of the symptoms of the disease in each host. Biological analyses of the viral squash isolate collected in Cuba showed it to be capable of inducing mosaic symptoms, blistering and leaf distortion in squash cultivar Caserta, but not in the papaya tree cultivar Solo.

Observations of *leaf dip* preparations of leaf tissues of infected squashes, under the transmission electron microscope, showed elongated and flexuous particles about 780-800 x 12nm. The genomic fragments of that virus, containing the coat protein and HC-Pro genes were amplified and sequenced, by using *primers* specific for those regions of the PRSV and these were analyzed and compared with other isolates available in GenBank. The identity of nucleotides and aminoacids was superior to 94% as compared with that of other PRSV-W isolates of America. In the phylogenetic tree, the isolate formed a group with other isolates of America, Australia and India and stayed farther from the Asian isolates. The data obtained revealed that to be a PRSV-W isolate, detected for the first time in Cuba. The results of this work helped, in the understanding of the genetic diversity of PRSV in Brazil and in Cuba, furnishing valued information for the management strategy of papaya ringspot virus, via cross protection and tranogenesis.

Keywords: Ringspot. Papaya tree. Cucurbitaceous. Symptom intensity. Coat protein. HC-Pro. Identity. Phylogeny. Recombination.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Origem e disseminação da mancha anelar do mamoeiro	20
2.2	Agente etiológico, propriedades físicas e organização genômica	21
2.3	Transmissão	24
2.4	Gama de hospedeiros, determinantes específicos de hospedeiros e sintomas	25
2.5	Estratégias de controle	27
2.6	Caracterização de isolados de PRSV	31
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	38
	SEGUNDA PARTE ARTIGOS	51
	ARTIGO 1 Caracterização molecular e biológica de isolados de <i>Papaya ringspot virus</i> provenientes do Brasil e de Cuba	51
	ARTIGO 2 Análise dos genes P1 e HC-Pro de isolados de <i>Papaya ringspot virus</i> coletados em regiões do Brasil e de Cuba	78
	ARTIGO 3 Detecção e Caracterização de um isolado do <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W) infectando abóbora em Cuba	100

1 INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), da família *Caricaceae*, foi descoberto pelos espanhóis na região compreendida entre o sul do México e o norte da Nicarágua e é uma das frutíferas mais comuns em quase todos os países da América Tropical. Está amplamente distribuído em várias regiões tropicais, estendendo-se a 32° de latitude norte e sul. A cultura desenvolve-se satisfatoriamente em locais com temperatura média anual de 25 °C, com limites entre 21 °C e 33 °C e precipitação pluviométrica de 1.500 mm anuais, bem distribuída. Nessas condições, apresenta ciclo semiperene, com pico de produção entre três e cinco anos, sendo uma das poucas frutíferas com capacidade de produzir o ano inteiro, com elevada expressão econômica e grande importância social. É considerada uma das frutíferas mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo devido ao fato de seus frutos, conhecidos como mamão ou *papaya*, constituírem excelentes fontes de cálcio, pró-vitamina A e vitamina C (MURAYAMA, 1986; SERRANO; CATTANEO, 2010).

A produção de mamão representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, girando em torno de 8 milhões de toneladas, das quais 39% são produzidas na América Latina e Caribe. Os principais produtores mundiais são Brasil, México, Nigéria, Índia e Indonésia, enquanto os maiores exportadores são o México e a Malásia (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010). O Brasil produziu, no ano de 2009, 1,8 milhão de toneladas, em 34.213 hectares e exportou 30 mil toneladas, com valor da produção estimado em R\$ 1 bilhão (FAO, 2010; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010). Quanto à produção nacional, os principais produtores são os estados da Bahia, Espírito

Santo, Rio Grande do Norte e Ceará, e as cultivares mais exploradas são as dos grupos ‘Solo’ e ‘Formosa’ (SERRANO; CATTANEO, 2010).

Em Cuba, o mamoeiro constitui um dos principais cultivos frutícolas e ocupa área de, aproximadamente, 4.994 hectares, distribuída em todo o país. Essa área deverá ser expandida com o programa de desenvolvimento da agroindústria frutícola, implantado recentemente. Este fato, unido à crescente demanda pelo mamão, por parte da população, além das suas amplas possibilidades de mercado nacional e para a exportação, evidencia a necessidade de se incrementar a produtividade nas áreas dedicadas à cultura (ALONSO et al., 2008).

Como muitas outras espécies vegetais exploradas economicamente, a cultura do mamoeiro pode ser afetada por doenças que reduzem a longevidade das plantas, bem como a produção quantitativa e qualitativa dos frutos, que se traduz em perdas consideráveis. Entre elas encontram-se as causadas por vírus, já tendo sido encontradas várias espécies infectando mamoeiros em diferentes países: *Papaya ringspot virus*, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*; *Papaya mosaic virus*, da família *Flexiviridae*, gênero *Potexvirus*; *Papaya leaf Curl virus*, da família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*; *Tomato spotted wilt virus*, da família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*; *Cucumber mosaic virus*, da família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*; *Tobacco ringspot virus*, da família *Comoviridae*, gênero *Nepovirus*; *Papaya leaf distortion mosaic virus*, proposto como uma nova espécie do gênero *Potyvirus*, dentro da família *Potyviridae* e *Alfalfa mosaic virus*, da família *Bromoviridae*, gênero *Alfavirus* (GONSALVES; TRUJILLO, 1986; MOREIRA; KITAJIMA; REZENDE, 2010; PEÑA, 2008; PURCIFULL et al., 1984; REZENDE; FANCELLI, 2005; SAXENA et al., 1998; WANG; XIE; ZHOUY, 2004; ZAMBOLIM-MACIEL et al., 2003).

Adicionalmente, em mamoeiro foram relatadas outras doenças que, embora a etiologia viral ainda não fosse aceita pelo Comitê Internacional de

Taxonomia de Vírus (ICVT), são atribuídas a vírus, como amarelo letal do mamoeiro (LORETO et al., 1983), amarelo leve do mamoeiro (MARYS; CARBALLO; IZAGUIRRE-MAYARAL, 1995), necrose apical do mamoeiro (WAN; CONOVER, 1981) meleira do mamoeiro (CORREA et al., 1988; NAKAGAWA; TAKAYAMA; SUZUKAMA, 1987) e a doença conhecida como variação amarela (IVANCHEVA; VALDIVIESO; BÉCQUER, 1967).

Até o momento, observou-se que, no Brasil, o mamoeiro é infectado naturalmente por quatro vírus: o da mancha anelar (*Papaya ringspot virus* type P, PRSV-P), o do amarelo letal, o da meleira e o *Alfalfa mosaic virus* (CULIK; MARTINS; VENTURA, 2003; MOREIRA; KITAJIMA; REZENDE, 2010). Em Cuba também têm sido encontradas três doenças viróticas afetando naturalmente o mamoeiro, porém, além do PRSV-P, os demais ainda não foram encontrados no Brasil: a necrose apical, descrita por Mejías, Rodríguez e González (1987) e a variação amarela, descrita por Ivancheva, Valdivieso e Bécquer (1967).

Tanto no Brasil como em Cuba, o PRSV é o vírus mais importante para a cultura do mamoeiro, sendo responsável pela maioria das perdas causadas por doenças viróticas. Esse vírus é transmitido de forma não persistente por mais de vinte espécies de afídeos (KALLESHWARASWAMY; KRISHNA-KUMAR, 2008; MARTINS; VENTURA, 2007) e também mecanicamente, infectando plantas das famílias *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* e *Chenopodiaceae* (GONZÁLEZ et al., 2002). Em 1984, o PRSV foi separado em dois biótipos: PRSV-P (de papaya), capaz de infectar mamoeiro e cucurbitáceas, e PRSV-W (de *watermelon*), limitado apenas à família *Cucurbitaceae*, à qual ocasiona consideráveis perdas econômicas (PURCIFULL et al., 1984).

O comportamento da doença é afetado por diversos fatores, como o genótipo do hospedeiro, as estirpes virais, as condições climáticas, a presença de vetores e as culturas associadas. A doença caracteriza-se pela aparição de

mosqueado e distorção das folhas mais jovens, que podem chegar a apresentar estrutura filiforme. Nos frutos podem ser observados anéis concêntricos ou semicírculos de cor verde-oliva. Os pecíolos e a haste mostram estrias oleosas de cor verde-escura. As plantas produzem poucos frutos, de tamanho pequeno e de inferior qualidade em aroma, sabor, coloração, brix e consistência (BAU et al., 2004; PEÑA, 2008; PURCIFULL, 1984). Plantas infectadas com o PRSV-P diminuem a longevidade, limitando a vida produtiva das plantações a aproximadamente 24 e 12 meses, no Brasil e em Cuba, respectivamente.

Numerosas estratégias de manejo têm sido empregadas para diminuir as perdas causadas pela mancha anelar do mamoeiro, porém, nem sempre elas são eficientes. Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes ao PRSV-P e à proteção cruzada com estirpes fracas do vírus (FERMÍN; CASTRO; TENNAT, 2010). Estudos sobre transformação genética em mamoeiro demonstraram que a resistência a PRSV-P, obtida em algumas linhagens que expressaram o gene da capa proteica (cp), depende, entre outros fatores, do grau de homologia existente entre o gene empregado na transformação da planta e o gene do isolado viral ao qual a planta está sendo exposta, sendo esta resistência descrita como 'isolado-dependente' (TENNANT et al., 2001; TRIPATHI et al., 2008). Por outro lado, a proteção cruzada com estirpes fracas tem demonstrado êxito restrito na proteção contra estirpes severas, inviabilizando um controle duradouro, econômico e seguro, devido, fundamentalmente, a problemas de perda da proteção, além de inespecificidade e instabilidade dos isolados fracos (LIMA et al., 2001; REZENDE; MULLER, 1995; TRIPATHI et al., 2008; WANG et al., 1987; YEH; GONSALVES, 1984).

Devido ao fato de as pesquisas atuais estarem direcionadas à procura de isolados fracos para a proteção cruzada e à obtenção de plantas transgênicas para tentar controlar a mancha anelar do mamoeiro, assim como a dependência das

duas estratégias da homologia entre os isolados protetores e/ou transgênicos com os vírus de cada região, o estudo do grau de variabilidade genética regional do vírus tem alcançado grande importância nos últimos anos. Nesse sentido, o gene *cp* tem sido o mais estudado, em âmbito mundial (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; VEGAS et al., 2004), para determinar a variabilidade genética dos isolados. Entretanto, em alguns locais, outros genes, como *helper component proteinase* (HC-Pro) e, mesmo, o genoma completo de diferentes isolados tem sido sequenciado para essa finalidade (INOUE-NAGATA et al., 2007; LU et al., 2008; MANGRAUTHIA et al., 2008; NOA-CARRAZANA; GONZÁLEZ DE LEÓN; SILVA ROSALES, 2007).

Na tentativa de caracterizar isolados de PRSV em cada região produtora de mamoeiro, com vistas a fornecer informação para a transformação genética de plantas e o uso da proteção cruzada, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar, molecular e biologicamente, isolados virais, coletados em diferentes regiões geográficas do Brasil e de Cuba. Os genes HC-Pro e *cp* foram sequenciados e analisados filogeneticamente, determinando-se a composição de nucleotídeos e aminoácidos e fazendo-se a comparação entre eles e os demais isolados de PRSV disponíveis no *GenBank*. Paralelamente, foi avaliada a intensidade de sintomas causados por esses isolados em mamoeiros (*Carica papaya* cv. Sunrise Solo) e abóbora (*Cucurbita pepo* L. cv. Caserta), quando inoculados mecanicamente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e disseminação da mancha anelar do mamoeiro

Considerando-se as suas características sintomatológicas, a mancha anelar foi primeiramente observada em 1929, na Austrália (SHUKLA; WARD, 1989). Porém, o primeiro relato da doença foi feito por Jensen (1949), que a denominou de mancha anelar, ao descrever uma doença do mamoeiro no Havaí. Desde então, sua ocorrência foi registrada na maior parte das regiões tropicais e subtropicais onde o mamoeiro e as cucurbitáceas são cultivados, principalmente na Ásia, na Índia e na América (BATESON et al., 1994; CONOVER, 1964a, 1964b; COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969; LIMA; GOMES, 1975; QUIOT-DOUINE; LECOQ; QUIOT, 1990; TORRES; GIACOMETTI, 1966).

Em estudo recente realizado com 270 isolados de todo o mundo, sobre a filogeografia do PRSV, com base nas sequências dos genes cp e HC-Pro (do inglês *Helper Component Protease*), foi constatado que este vírus teve origem há cerca de 2.500 anos e que a sua diversificação mostrou um incremento exponencial durante os últimos 500 anos (OLARTE-CASTILLO et al., 2011). Eles inferiram que a origem mais provável para o PRSV é a Península da Índia, confirmando relatos prévios de diferentes autores (BATESON et al., 2002; GIBBS et al., 2008). Os eventos de dispersão parecem ter acontecido a partir da Península da Índia para o resto da Ásia, através da Tailândia ou Vietnã, e para as Américas através do Brasil, Venezuela ou México. Já os isolados australianos parecem ter sido originados de um único evento de dispersão a partir do Caribe (OLARTE CASTILLO et al., 2011).

No Brasil, o primeiro relato da mancha anelar ocorreu no estado de São Paulo, em 1969 (COSTA; CARVALHO; KAMADA, 1969) e, depois, no Ceará (LIMA; GOMES, 1975). Atualmente, a doença ocorre em todas as regiões do

Brasil, tendo causado a eliminação da cultura do mamoeiro na região de Monte Alto, SP e em outras áreas, demonstrando sua capacidade destruidora (REZENDE et al., 1994). Em Cuba, a presença do PRSV foi registrada por Ivancheva, Valdivieso e Bécquer (1967), com incidências altas (80%-99%) nas zonas ocidentais e baixas nas regiões orientais (FARIÑAS; LÓPEZ, 1986), provocando a destruição da maioria das plantações (CABRERA et al., 2008).

2.2 Agente etiológico, propriedades físicas e organização genômica

A mancha anelar do mamoeiro tem como agente etiológico o *Papaya ringspot virus* (PRSV), membro da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (PURCIFULL et al., 1984). Esse vírus tem uma partícula alongada e flexuosa, que mede 760-800 x 12 nm, com 94,5% do peso constituído por proteína e 5,5% por ácido nucleico. Seu ponto de inativação térmica em suco de mamoeiro é de 54 °C a 60 °C, longevidade *in vitro* de aproximadamente 8 horas, à temperatura ambiente, e ponto de diluição igual a 10^{-3} (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; CONOVER, 1964a; GONSALVES et al., 2010; YEH et al., 1992; YEH; GONSALVES, 1985).

O genoma do PRSV é composto por uma fita de RNA senso positivo, contendo, aproximadamente, 10.326 nucleotídeos (excluindo a cauda poli-A no extremo 3'). A região traduzível do genoma (ORF) se inicia no nucleotídeo 86 e termina no 10.120, codificando uma poliproteína de 3.344 aminoácidos, que dará origem a nove proteínas virais: proteinase 1 (P1), HC-Pro, proteína 3 (P3), proteína de inclusão citoplasmática (CI), proteína 6K, proteína ligada ao extremo 5' do RNA (VPg), proteínas de inclusão nuclear (NIa-Pro, NIb), CP. (Figura 1).

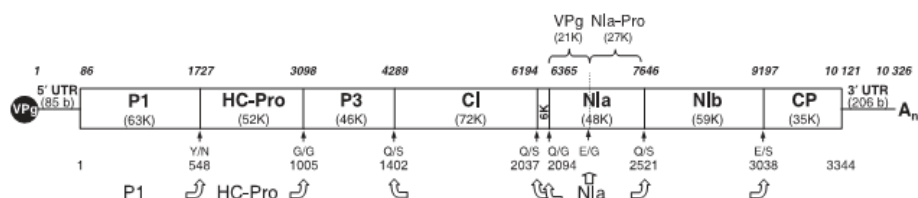


Figura 1 Mapa genômico do PRSV baseado no isolado HA do Havaí (número de acesso no *GenBank* S46722). Números acima indicam a posição do ácido nucleico. Números na parte inferior indicam a posição do aminoácido na poliproteína. Pesos moleculares das proteínas virais individuais são mostrados entre parêntese para cada proteína individual. As regiões não traduzíveis (UTR) 5' e 3' são marcadas junto com seus comprimentos (em bases, b) entre parênteses. Os sítios de clivagem nos aminoácidos pelas proteases P1, HC-Pro e NIa (como indicam as setas em blocos) são indicados abaixo com setas pretas, marcando a posição relativa do sítio da clivagem. O círculo preto sólido rotulado como VPg representa a proteína associada ao genoma. Adaptado de Tripathi et al. (2008)

As possíveis funções das proteínas codificadas pelo genoma de PRSV foram deduzidas por estudos de vários *potyvirus* e são listadas no Quadro 1 (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; GONSALVES et al., 2010; YEH et al., 1992; YEH; GONSALVES, 1985).

Quadro 1 Genes do PRSV e suas possíveis funções (GONSALVES et al., 2010)

Gene	Funções
P1	Proteinase Movimento célula a célula
HC-Pro	Transmissão pelo vetor Proteinase Patogenicidade Supressor do silenciamento gênico mediado por RNA Movimento célula a célula
P3	Desconhecida, mas, possivelmente, envolvida na replicação
6K1	Desconhecida, mas, possivelmente, envolvida em: replicação do RNA; regulação e inibição da translocação de NIa; replicação;
CI	Replicação do genoma (RNA helicase) União à membrana citoplasmática Simulador da atividade ATPase do ácido nucleico Movimento célula à célula.
6K	Desconhecida, mas, possivelmente, envolvida em: replicação do RNA; regulação e inibição da translocação de NIa; replicação
NIa-VPg	Replicação do genoma (<i>Primer</i> para o início da síntese do RNA)
NIa-Pro	Principal proteinase
NIb	Replicação do genoma (RNA polimerase dependente de RNA, RdPp)
CP	Encapsidamento do RNA Transmissão pelo vetor Patogenicidade Movimento célula a célula

Embora seja conhecido que membros do gênero *Potyvirus* possuem uma longa ORF, recentemente, outra pequena ORF codificando uma proteína de 25kDa foi identificada e denominada P3N-PIPO. O papel preciso desta proteína para os *Potyvirus* permanece desconhecido, mas tem sido demonstrado que o *knock out* da expressão de PIPO é letal para o vírus em plantas (CHUN et al., 2008; WEN; HAJIMORAD, 2010).

Em 1984, o PRSV foi separado em dois biótipos que, sorologicamente, são indistinguíveis, mas podem ser identificados pela gama de hospedeiras: o biótipo W (*Watermelon*) (PRSV-W), antigamente denominado de vírus-1 do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus-1*, WMV-1), que infecta naturalmente espécies da família *Cucurbitaceae*, constituindo um fator de importância econômica para estas culturas no mundo e, por outro lado, o biótipo P (Papaya) (PRSV-P), que é capaz de infectar mamão e cucurbitáceas, causando grande impacto na produção de mamão na maioria dos países onde a cultura é desenvolvida (GONSALVES, 1998; PURCIFULL et al., 1984; TENNANT; FERMIN; ROYE, 2007).

2.3 Transmissão

O PRSV é transmitido de forma não persistente para mamoeiro e cucurbitáceas por mais de vinte espécies de afídeos diferentes, em um processo que envolve a proteína da CP e HC-Pro (PIRONE, 1991; PIRONE; BLANC, 1996; WANG et al., 1998). O vírus é adquirido e transmitido pelo vetor em curtos períodos de tempo que podem variar desde segundos até um minuto, sem que o vírus se replique no vetor. As espécies de afídeos mais importantes na transmissão do vírus são *Myzus persicae* e *Aphis gossipii*. No Brasil, além dessas duas espécies, já foi demonstrado experimentalmente que *Aphis fabae*, *Aphis coreopsidis* e *Toxoptera citricidus* são eficientes vetores do vírus (REZENDE; FANCELLI, 2005).

Embora os afídeos normalmente não colonizem plantas de mamoeiro, os processos de aquisição e inoculação do vírus ocorrem por ocasião das picadas de provas para reconhecimento dos seus hospedeiros, durante suas visitas às plantas infectadas e a plantas saudáveis. Por tal razão, a transmissão se dá com mais eficiência, devido às constantes movimentações dos vetores dentro do pomar

(KALLESHWARASWAMY; KRISHNA-KUMAR, 2008; LIMA et al., 2001; TRIPATHI et al., 2008).

A transmissão mecânica do PRSV se dá com facilidade e Bayot et al. (1990) apresentaram evidências de que 2 de 1.355 sementes originadas de frutos coletados de plantas infectadas transmitiram o vírus para plântula. Entretanto, esse tipo de transmissão não foi confirmado por outros autores (BARBOSA; PAGUIO, 1982; GONSALVES et al., 2010; PURCIFULL et al., 1984).

2.4 Gama de hospedeiros, determinantes específicos de hospedeiros e sintomas

A gama de hospedeiros do PRSV, que respondem com sintomas sistêmicos, é limitada a espécies das famílias *Caricaceae* e *Cucurbitaceae*, sendo o mamoeiro o hospedeiro natural de maior importância para a estirpe P. Alguns isolados do vírus podem ocasionar lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa* (YEH; GONSALVES, 1984). Segundo Purcifull e Gonsalves (1984), o mosaico produzido pelo PRSV-P em mamoeiro não deve ser confundido com o mosaico ocasionado pelo vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya mosaic virus*, PMV), que pertence ao gênero *Potexvirus* (PURCIFULL; HIEBERT, 1979). Os dois vírus podem ser facilmente diferenciados pela ausência de sintomas de mancha anelar nos frutos de plantas infectadas pelo PMV, pela morfologia das partículas, pelo tipo de inclusões induzidas nas células hospedeiras e pela sorologia (PURCIFULL; GONSALVES, 1984).

Alguns trabalhos investigaram o papel dos genes virais no processo de infecção do PRSV. Chen et al. (2008), quando analisaram várias regiões gênicas de PRSV-P e PRSV-W, encontraram evidências de que o aminoácido Lys27, da proteína NIa-Pro, possivelmente determina a especificidade do PRSV-P pelo

mamoeiro. Adicionalmente, esses autores afirmaram que a estrutura tridimensional dessa proteína sugere que o Lys27 não afeta a atividade proteolítica da NIa-Pro. Chiang et al. (2007) e Lee, Chiang e Yeh (2001) observaram que mutações nos genes P1 e HC-Pro de um isolado severo desse vírus, denominado de PRSV HA, resultaram em atenuação dos sintomas em mamoeiro, assim como na redução na formação de lesões locais em *C. quinoa*. Os resultados também mostraram que o HC-Pro foi o maior determinante para formar lesões locais em *C. quinoa*.

Como os demais vírus do gênero *Potyvirus*, o PRSV induz a formação de inclusões cilíndricas, na forma de cataventos e espirais, no citoplasma das células infectadas, constituídas por proteínas de aproximadamente 69 kDa (PURCIFULL; GONSALVES, 1984). Considerando-se a morfologia dessas inclusões induzidas pelo PRSV, o mesmo pode ser classificado no subgrupo I do gênero *Potyvirus* (EDWARDSON, 1974; PURCIFULL et al., 1984).

No mamoeiro, os sintomas da planta infectada iniciam-se por um amarelecimento das folhas mais novas que, posteriormente, apresentam aspecto de mosaico, ou seja, áreas verdes misturadas com áreas amarelas de tonalidades, formas e tamanhos variados, com contorno bem definido. Adicionalmente, nas folhas doentes, podem ocorrer intensas deformações e bolhas, as quais se caracterizam como áreas elevadas de coloração verde normal, em contraste acentuado com o restante da folha, que se encontra amarelado. Estes sintomas resultam em diminuição da taxa de crescimento das plantas e em consequente redução da produtividade. Plantas que são infectadas em estádios jovens de desenvolvimento permanecem atrofiadas e não chegam a ser economicamente produtivas. Os frutos podem apresentar manchas na forma de pequenos anéis concêntricos, bem nítidos, com o centro verde. Quando em estádios mais avançados, os anéis podem ficar necrosados e esbranquiçados. Adicionalmente, os frutos de plantas infectadas podem ter caroços similares aos observados em

plantas com deficiência de boro. Na região da haste e nos pecíolos das folhas, podem aparecer estrias de aparência oleosa, sendo estes sintomas bastante característicos da virose (GONSALVES et al., 2010; PURCIFULL, 1972; PURCIFULL et al., 1984).

Nas cucurbitáceas, a doença é descrita como sendo do tipo mosaico e a severidade dos sintomas depende da espécie afetada. Nas folhas das plantas infectadas, observam-se mosaico intenso e redução drástica no limbo foliar e no desenvolvimento vegetativo, além de redução na produção e na qualidade dos frutos, que resultam em prejuízos de até 100%, dependendo da idade em que as plantas são infectadas e da disseminação do vírus nas áreas onde ele ocorre. Plantas mais velhas que se tornam infectadas produzem frutos que, muitas vezes, mostram diferentes mudanças na coloração e são deformados (GONSALVES et al., 2010; GREBER; PERLEY; HERRINGTON, 1988).

2.5 Estratégias de controle

Diversas estratégias têm sido adotadas no intuito de controlar a mancha anelar do mamoeiro, porém, a maioria delas sem obter o resultado esperado. Entre as principais estratégias destacam-se a produção de mudas em casas de vegetação com tela antiafídeos e afastados das áreas de produção. Após a produção das mudas, o local de plantio deve ser escolhido com cuidado. Todas as áreas ou regiões destinados à produção comercial do mamoeiro devem ser mapeadas quanto à presença e à incidência de PRSV, para implantação dos pomares em áreas livres de fonte de inóculo primário, evitando-se, assim, que os vetores introduzam o PRSV no pomar (LIMA; BEZERRA, 1988; REZENDE; COSTA; YUKI, 1986).

A eliminação das fontes de inóculo (*roguing*) dentro e nas proximidades dos pomares pode apresentar boa eficiência no maejo da mancha anelar. O

roguing deve ser orientado e acompanhado por técnicos devidamente treinados, para reconhecer as plantas infectadas (GONSALVES et al., 2010; LIMA et al., 2001). Esses programas de erradicação devem contar com o apoio das associações de produtores e os órgãos governamentais, para garantir que todas as plantas infectadas com essa e outras viroses sejam eliminadas. Nos pomares já instalados, dependendo do grau de incidência, a prática do *roguing* deve ser posta em prática como medida complementar de controle. O uso dessa técnica tem se mostrado eficiente em algumas áreas, como é o caso de Linhares, no Espírito Santo, segundo maior produtor de mamão do Brasil (GONSALVES, 1998; LIMA et al., 2001; REZENDE; COSTA, 1987; SOUZA, 2000). Com o objetivo de impedir as perdas devido aos programas de *roguing*, recomenda-se aumentar a densidade de plantio de 2.500 a 3.200 plantas por hectare, medida que permite a eliminação das plantas com sintomas iniciais, retardando a infecção dentro do pomar, sem reduzir a produção (BECERRA, 1997).

As aplicações de inseticidas químicos são mais eficientes nos viveiros do que nos pomares de produção. No entanto, em vários estudos tem sido mostrado que aspersões periódicas de azeite mineral (citrolina) e de extratos vegetais de *Azadirachta indica* A. contribuem para a diminuição das populações de afídeos e a incidência do PRSV em campo (HERNÁNDEZ-CASTRO et al., 2003, 2005; PÉREZ-MADRIGAL et al., 2000). O uso de armadilhas e de barreiras naturais, tais como milho (*Zea mays* L.), azedinha (*Hibiscus sabdarifa* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* P.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), entre outras, intercaladas dentro do pomar ou ao redor das parcelas, tem contribuído para reduzir a incidência do PRSV, prolongar o período de vida produtiva da cultura e, com isso, elevar a produtividade e incrementar a qualidade das frutas (FLORES-REVILLA et al., 1995; HERNÁNDEZ CASTRO et al., 2010; RIVAS-VALENCIA et al., 2008).

A proteção cruzada foi praticada em Taiwan e no Havaí, na década de 1980. Nos dois países, os isolados de estirpes fracas usadas na pré-imunização foram selecionados entre mutantes que induziam sintomas leves, obtidos pelo tratamento do PRSV com ácido nitroso e apresentaram grande potencial e alta eficiência para o controle da mancha anelar do mamoeiro por meio da pré-imunização (TENNANT et al., 1994; YEH et al., 1988; YEH; GONSALVES, 1994). No período de 1984 a 1991, a proteção cruzada de mais de três milhões de plantas de mamoeiro contribuiu para um considerável incremento na produção de frutos em Taiwan (YEH et al., 1988; YEH; GONSALVES, 1994). Posteriormente, com tentativas da utilização dessas estirpes em larga escala, elas tornaram-se instáveis em poucos anos, permitindo a quebra na resistência, e as plantas pré-imunizadas apresentaram um comportamento variando desde o atraso no surgimento dos sintomas até o retorno da condição de severidade da doença (GONSALVES et al., 2010; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2001).

A partir dos resultados obtidos na proteção cruzada, vários estudos têm sido desenvolvidos nos Estados Unidos, em Taiwan (CHIANG et al., 2007), Bangladesh (MOWLICK; AKANDA; RAHMAN, 2007) e na Venezuela (VEGAS et al., 2000, 2002), à procura por estirpes fracas estáveis e protetoras do PRSV-P. Apesar das pesquisas desenvolvidas no Brasil (REZENDE et al., 1994; REZENDE; MÜLLER, 1995; REZENDE; PACHECO, 1998), os resultados práticos não são consistentes. Algumas estirpes fracas consideradas promissoras em testes experimentais em casa de vegetação e em campo permaneceram estáveis por apenas curtos períodos de tempo, depois de inoculadas em pomares comerciais. Essa instabilidade das estirpes fracas provavelmente seja devido à impureza das mesmas no processo de seleção. Tudo isso, unido à falta de conhecimentos dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo, faz com que esta medida tenha demonstrado êxito restrito e limitado no controle da mancha anelar do mamoeiro, inviabilizando um controle

duradouro, econômico e seguro ao longo de sua aplicação (LIN; SU; WANG, 1989; REZENDE, 1985; REZENDE; COSTA, 1986, 1993; REZENDE; COSTA; SOARES, 1981, 1982; REZENDE; COSTA; VEJA, 1982; REZENDE; MÜLLER, 1995).

Vários estudos envolvendo programas de melhoramento genético convencional têm sido desenvolvidos na procura de cultivares resistentes ao PRSV-P. Esses estudos têm utilizado como fonte de resistência as espécies silvestres *Vasconcella cauliflora*, *V. pubescens* e *V. quercifolia* (MAGDALITA et al., 1997). Entretanto, problemas como incompatibilidade genética, produção de plantas estéreis e não disponibilidade de fontes de resistências têm dificultado o êxito desses trabalhos (SOUZA, 1999; ZERBINI; ZAMBOLIM, 1999, 2000).

Uma alternativa para esses problemas tem sido encontrada na transformação genética de plantas capazes de apresentar resistência ao PRSV. O mamoeiro foi a primeira frutífera modificada por engenharia genética e comercializada. A primeira planta transgênica resistente ao PRSV-P, obtida na década de 1990 e denominada Linha 55-1 (FITCH et al., 1992), expressava o gene *cp* de um isolado mutante do Havaí (PRSV HA 5-1) (YEH; GONSALVES, 1984) e era resistente a este e outros isolados havaianos de PRSV-P (TENNANT, 1996).

A partir dessa e de outras experiências do Havaí, esta estratégia de controle abriu um novo horizonte para a solução do problema da mancha anelar do mamoeiro, de forma mais eficiente e, possivelmente, mais duradoura (LIMA et al., 2001). Neste sentido, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com essa finalidade com outros isolados de Havaí (FUCHS; GONSALVES, 2007; LIUS et al., 1997), assim como do Brasil (SOUZA, 1999), da Jamaica e da Venezuela (FERMÍN et al., 2004; FERMIM; TENNANT, 2011; TENNANT; AHMAD; GONSALVES, 2005), da Tailândia (KERTBUNDIT et al., 2007) e da Índia (SRIVASTAVA et al., 2009). Em Cuba, Mendoza et al. (2004) transformaram

geneticamente plantas de mamoeiro, cultivar ‘Maradol Rojo’ com o gene da orizacistatina de arroz (*Oryza sativa*). Mas, essa metodologia de transformação não conseguiu controlar a doença.

O gene cp tem sido o mais estudado e manipulado na obtenção de plantas transgênicas com resultados satisfatórios. Estudos tentando elucidar a natureza molecular deste mecanismo têm revelado que a resistência no caso de plantas de mamoeiro transformadas com o gene da CP está relacionado aos mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional (CARVALHO et al., 1995; KRUBPHACHAYA; JURICEK; KERTBUNDIT, 2007). Esse mecanismo é altamente dependente da dosagem gênica e da homologia entre o transgene cp e o gene cp dos isolados que infectarem as plantas (SOUZA, 1999; SOUZA; GONSALVES, 1999; TENNANT, 1996).

Embora esta estratégia de controle tenha aberto uma nova possibilidade para a solução do problema da mancha anelar de forma mais eficiente (CAI et al., 1999; FITCH et al., 1992; FUCHS; GONSALVES, 2007; LIUS et al., 1997; SOUZA, 1999; TENNANT, 1996), vários são os seus inconvenientes. Um deles é a resistência da sociedade à transgenia (NAKAMURA et al., 2011). Outro problema é que, quando as plantas transgênicas foram desafiadas por isolados de outras regiões geográficas, apresentaram-se susceptíveis à infecção por PRSV (TENNANT et al., 1994), fato que denominou este tipo de resistência como ‘isolado-dependente’ (TENNANT et al., 2001; TRIPATHI et al., 2008), denotando a grande necessidade do conhecimento das sequências gênicas de isolados de PRSV em diferentes regiões geográficas.

2.6 Caracterização de isolados de PRSV

Devido ao fato da transformação genética e a proteção cruzada serem dependentes da homologia genética entre os isolados protetores e/ou

transgênicos com os vírus de cada região, a caracterização de isolados locais tem alcançado grande importância nos últimos anos. Visando estudar a variabilidade genética entre isolados de cada região, o gene *cp* tem sido o mais estudado globalmente (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; VEGAS et al., 2004). Entretanto, em alguns países, outros genes e, mesmo, o genoma completo de alguns isolados têm sido sequenciados e analisados (INOUE-NAGATA et al., 2007; LU et al., 2008; MANGRAUTHIA et al., 2008; NOA-CARRAZANA; GONZÁLEZ DE LEÓN; SILVA-ROSALES, 2007).

O primeiro estudo sobre a variabilidade do gene CP do PRSV realizado com um grande número de isolados foi desenvolvido na Austrália, por Bateson et al. (1994). Esses autores compararam a sequência parcial do gene CP de 13 isolados de PRSV dos biótipos P e W, sendo seis australianos, três asiáticos e quatro do *GenBank*. Nesse estudo não foram observadas diferenças significativas entre os isolados australianos P e W, sugerindo que o isolado PRSV-P australiano, provavelmente, derivou do PRSV-W. Além disso, confirmaram que a região N-terminal da CP proteica é menos conservada que a C-terminal.

Posteriormente, Jain et al. (1998) encontraram graus de similaridade de 87% entre os nucleotídeos e de 93% entre os aminoácidos, quando compararam as sequências da CP de dois isolados de PRSV-P procedentes da Índia. A partir daí, em muitos outros estudos têm sido avaliadas as sequências da CP de diferentes isolados no Brasil (LIMA et al., 2002; SOUZA, 1999), no México (SILVA-ROSALES et al., 2000), Vietnam, Tailândia (BATESON et al., 2002), Índia (JAIN et al., 1998, 2004), Cuba (AROCHA et al., 2009; PORTAL et al., 2006), Venezuela (CHIN et al., 2007; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; OLARTE-CASTILLO et al., 2011), Jamaica (CHIN et al., 2007), Colômbia (OLARTE-CASTILLO et al., 2011) e Estados Unidos (ABDALLA; ALI, 2012), demonstrando diferentes graus de homologia tanto entre as sequências de

nucleotídeos quanto de aminoácidos. Inclusive, em alguns dos estudos, encontrou-se maior diversidade entre os aminoácidos do que entre os nucleotídeos.

O próprio tamanho da CP tem variado entre isolados de diferentes países: o isolado KA2, da Índia, com 840 nucleotídeos, codificando 280 aminoácidos (JAIN et al., 2004); o isolado PRSV-P-Índia, com CP de 861 nucleotídeos e 287 aminoácidos (MANGRAUTHIA et al., 2008); o isolado VNW-38, do Vietnã, com 870 nucleotídeos e 290 aminoácidos (BATESON et al., 2002); isolados do Brasil, Colômbia, Jamaica e Venezuela, com 924 pb e 308 aminoácidos (CHIN et al., 2007; LIMA et al., 2002; OLARTE-CASTILLO et al., 2011); dois isolados brasileiros de PRSV-P, com 921pb e 307 aminoácidos (LIMA et al., 2002) e outro de PRSV-W, no qual Inoue-Nagata et al. (2007) contabilizaram 930 nucleotídeos na CP, com 310 aminoácidos. Variações nos números de nucleotídeos e aminoácidos da CP de PRSV têm sido encontradas por outros autores, sugerindo que a região da CP é mais variável e também mais sujeita a deleções e inserções (LU et al., 2008; TRIPATHI et al., 2008). Todos descrevem as diferenças no tamanho da CP limitadas aos primeiros 50 aminoácidos do extremo NH₂ terminal e são devidas às mudanças no número de regiões repetitivas conhecidas como EK (BATESON et al., 2002; JAIN et al., 2004).

Finalmente, os estudos genéticos e filogeográficos da CP têm permitido agrupar os isolados de PRSV em diferentes grupos de acordo com a posição geográfica. Em vários estudos tem sido encontrado um grupo formado pelos isolados da Ásia e outro formado por isolados da América e Austrália, sendo que alguns isolados indianos têm sido relacionados com o grupo da América-Austrália e também têm sido encontrados isolados da África associados aos da Austrália (ABDALLA; ALI, 2012; BATESON et al., 2002; FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al., 2008; LIMA et al., 2002; LU et al., 2008;

MANGRAUTHIA et al., 2008; MOREIRA, 2009; OLARTE-CASTILLO et al., 2011).

Lima et al. (2002), quando analisaram filogeneticamente as sequências da CP de 12 isolados de diferentes regiões do Brasil, observaram que esses isolados brasileiros, embora tenham se subagrupado em um *cluster*, ficaram mais próximos de outros isolados de México, Estados Unidos, Jamaica, Austrália e Índia que de outros isolados da Ásia. Resultados similares foram observados por Inohue-Nagata et al. (2007), quando sequenciaram e analisaram o genoma completo de seis isolados brasileiros de PRSV-W. A árvore filogenética baseada na CP desses isolados e outros disponíveis no *GenBank* agruparam todos os isolados brasileiros em um *cluster* que, por sua vez, ficaram mais próximos dos isolados dos restantes países da América e Austrália que dos Asiáticos.

Estudos filogenéticos baseados em sequências parciais da CP de isolados de PRSV-P coletados em diferentes províncias agruparam esses isolados com outros da América, Austrália e Índia e mais distantes dos restantes da Ásia (AROCHA et al., 2009; PORTAL et al., 2006). No estudo mais recente, o isolado da província Oriental de Villa Clara agrupou-se distante dos quatro isolados da região oriental.

Recentemente, estudos genômicos têm mostrado que o gene HC-Pro possui diversas funções, envolvendo mecanismos de supressão do silenciamento gênico da planta (MANGRAUTHIA; SINGH; PRAVEEN, 2010), transmissão pelos afídeos vetores (PIRONE; BLANC, 1996), translocação viral na planta (YAP; DUANGJIT; PANYIM, 2009) e na patogênese (URCUQUI-INCHIMA; HAINNI; BERNARDI, 2001). Por outro lado, Olarte-Castillo et al. (2011) sugerem que estudos deste gene poderiam contribuir para esclarecer questões filo-geográficas que envolvam o PRSV, sendo, então, de grande interesse o estudo deste gene. Nos últimos anos, vários são os artigos que se referem à

caracterização e às funções deste gene, com o objetivo de verificar sua utilidade nos programas de controle da mancha anelar (KASSCHAU; CARRINGTON, 2001; MAIA; HAENNI; BERNARDI, 1996; MANGRAUTHIA; SINGH; PRAVEEN, 2010; YAP; DUANGJIT; PANYIM, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à importância da cultura do mamoeiro nas regiões onde é cultivado e às grandes perdas produzidas pelo PRSV, tanto nessa cultura como nas cucurbitáceas, numerosas pesquisas estão sendo desenvolvidas na atualidade visando à proteção cruzada com estirpes fracas ou atenuadas do vírus e à construção de plantas transgênicas portadoras de algum gene do PRSV que ofereça resistência à infecção viral. Em vários estudos tem sido demonstrado que o êxito dessas medidas depende do grau da homologia existente entre o transgênico ou cepa protetora e os isolados existentes nas regiões onde eles serão utilizados.

O trabalho desenvolvido permitiu conhecer a variabilidade entre diferentes isolados de PRSV coletados em áreas do Brasil e de Cuba, e entre outros disponíveis no *GenBank*, agrupando-os com base nas identidades de nucleotídeos e aminoácidos e análises filogenéticas, com base em sequências dos genes da CP, HC-Pro e P1. Esses isolados também foram agrupados segundo os tipos e a intensidade dos sintomas induzidos após inoculação em plântulas de *C. papaya* cv. Solo e *C. pepo* cv. Caserta.

Os resultados obtidos fazem um importante aporte ao conhecimento dos isolados de PRSV presentes nos dois países, considerando que, em Cuba, apenas algumas sequências parciais da CP estão disponíveis, e no Brasil, poucos estudos baseados nos genes P1 e HC-Pro foram desenvolvidos, além de existirem alguns estados onde este vírus não tinha sido estudado anteriormente. Estes resultados auxiliam no entendimento da diversidade genética do PRSV nos dois países, oferecendo informações valiosas para as estratégias de manejo da mancha anelar do mamoeiro. No entanto, recomenda-se ampliar os estudos genômicos desses isolados para se obter conhecimentos mais amplos sobre a variabilidade dos vírus presentes em ambos os países e nos sintomas produzidos

em outras cultivares de mamoeiro de importância econômica, visando o estabelecimento de estratégias baseadas na transformação genética de plantas e na proteção cruzada. A partir da detecção, pela primeira vez, de um isolado da estirpe PRSV-W infectando abóbora em Cuba, recomenda-se sua inclusão nos programas de vigilância fitossanitária e melhoramento genético das cucurbitáceas no país.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, O. A.; ALI, A. Genetic diversity in the 3'-terminal region of papaya ringspot virus (PRSV-W) isolates from watermelon in Oklahoma. **Archives of Virology**, New York, v. 157, n. 3, p. 405-412, Mar. 2012.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Review: overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n. 3, p. 471-487, June 2005.
- ALONSO, M. et al. Evaluación de tres cultivares de papaya del grupo solo basada en caracteres de crecimiento y productividad. **Cultivos Tropicales**, San José, v. 29, n. 2, p. 59-64, 2008.
- AROCHA, Y. et al. Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) in eastern Cuba. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 8, p. 640-646, Aug. 2009.
- BARBOSA, F. R.; PAGUIO, D. R. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: incidência e efeito na produção do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 365-373, abr./jun. 1982.
- BATESON, M. F. et al. Evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. **Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 10, p. 2575-2585, Oct. 2002.
- _____. *Papaya ringspot potyvirus*: isolate variability and the origin of PRSV type P, Australia. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n. 12, p. 3547-5553, Dec. 1994.
- BAU, H. J. et al. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* in Taiwan. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 6, p. 594-599, June 2004.
- BAYOT, R. C. et al. Seed transmissibility of *Papaya ringspot virus*. **Philippine Journal of Crop Science**, Manila, v. 15, n. 2, p. 107-111, 1990.
- BECERRA, J. X. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. **Science**, New York, v. 276, p. 253-256, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 7 nov. 2011.

CABRERA, D. et al. Diagnóstico y caracterización biológica de un aislado del virus de la mancha anular de la papaya procedente de Cienfuegos, Cuba. **Centro Agrícola**, Santa Clara, v. 35, n. 2, p. 91-93, 2008.

CAI, W. et al. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, Ohio, v. 35, n. 1, p. 61-69, Mar. 1999.

CARVALHO, F. et al. Post-transcriptional cosuppression of β -1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 3, p. 347-358, Mar. 1995.

CHEN, M. et al. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. **Plos One**, Davis, v. 3, n. 5, p. 2280-2284, 2008.

CHIANG, C. H. et al. Genetic analysis of an attenuated Papaya ringspot virus strain applied for cross-protection. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, n. 2, p. 333-348, Feb. 2007.

CHIN, M. et al. Varying genetic diversity of *Papaya ringspot virus* isolates from two time-separated outbreaks in Jamaica and Venezuela. **Archives of Virology**, Vienna, v. 152, n. 11, p. 2101-2106, Oct. 2007.

CHUN, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **PNAS**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.

CONOVER, R. A. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, p. 440-444, 1964a.

_____. Mild mosaic and faint mottle rings pot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Florida State Horticultural Society**, Miami, v. 77, p. 444-448, 1964b.

CORREA, F. J. F. et al. Estudo preliminar sobre exsudação do látex do mamoeiro em Teixeira de Freitas, BA. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA CULTURA DO MAMOEIRO, 2., 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1988. p. 409-428.

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

CULIK, M. P.; MARTINS, D. dos S.; VENTURA, J. A. **Índice de artrópodes pragas do mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Vitória: INCAPER, 2003. 48 p. (Documentos, 121).

EDWARDSON, J. R. **Some properties of the potato Virus Y-Group**. Gainesville: Florida Agricultural Experiment Stations, 1974. 398 p. (Monograph Series, 4).

FARIÑAS, M. E.; LÓPEZ, E. Enfermedades virales en diferentes localidades productoras de frutabomba en Cuba. In: SIMPOSIO DE CITRICULTURA TROPICAL, 10., 1986, Havana. **Anales...** Havana: SCT, 1986. 1 CD-ROM.

FERMIN, G.; CASTRO, L. T.; TENNAT, P. F. CP-transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges. **Transgenic Plant Journal**, Kagawa, v. 4, n. 1, p. 1-15, Apr. 2010.

FERMIN, G.; TENNANT, P. Opportunities and constraints to biotechnological applications in the Caribbean: transgenic papayas in Jamaica and Venezuela. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 681-687, May 2011.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, T. et al. Genetic variation of *Papaya ringspot virus* in Venezuela. **Archives of Virology**, Vienna, v. 153, n. 2, p. 343-349, Feb. 2008.

FITCH, M. M. et al. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. **BioTechnology**, New York, v. 10, n. 11, p. 1466-1472, Nov. 1992.

FLORES-REVILLA, C. et al. Integrated management of papaya in México. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 370, n. 1, p. 151-158, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat (classic): production/crops primary**. Rome, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/2010>>. Acesso em: 7 nov. 2011.

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.

GIBBS, A. J. et al. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. **PLOS One**, San Francisco, v. 3, n. 6, p. 2520-2523, June 2008.

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

GONSALVES, D. et al. *Papaya ringspot virus*. **The Plant Health Instructor**, Saint Paul, 2010. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/PapayaRingspot_virus.aspx>. Acesso em: 10 mar. 2012.

GONSALVES, D.; TRUJILLO, E. E. *Tomato spotted wilt virus* in papaya and detection of the virus by ELISA. **Plant Disease**, Quebec, v. 70, n. 6, p. 501-506, June 1986.

GONZÁLEZ, A. et al. Hospedantes de cepas del *Virus de la mancha anillada de la lechosa* en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 15, n. 1, p. 7-12, 2002.

GREBER, R. S.; PERLEY, D. M.; HERRINGTON, M. E. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 39, n. 6, p. 1085-1094, June 1988.

HERNÁNDEZ-CASTRO, E. et al. Análisis epidemiológico del virus de la mancha anular del papayo bajo diferentes densidades, aplicación de extractos acuosos de semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) y eliminación de plantas enfermas del cv. Maradol roja. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Chapingo, v. 9, n. 1, p. 55-68, 2003.

_____. Corn barriers in an integrated management strategy to control epidemics of *Papaya ring spot virus* (prsv-p). **Agrociencia**, Montevideo, v. 44, n. 3, p. 339-349, 2010.

_____. Extractos de neem en el comportamiento de *Aphis nerii* y la transmisión del virus de la mancha anular del papayo. **Journal Agriculture of the University of Puerto Rico**, San Juan, v. 89, n. 1, p. 75-84, 2005.

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**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 119-127, Feb. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Índice nacional de preços ao consumidor amplo**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21 ago. 2011.

IVANCHEVA, T. G.; VALDIVIESO, A. S.; BÉCQUER, A. Las enfermedades virosas de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) en Cuba. **Revista de Agricultura**, Havana, v. 1, p. 1-21, 1967.

JAIN, R. K. et al. First report of occurrence of *Papaya ringspot virus* infecting papaya in Bangladesh. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 2, p. 221-224, Feb. 2004.

_____. Molecular characterization of *Papaya ringspot potyvirus* isolates from India. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 132, n. 3, p. 413-425, June 1998.

JENSEN, D. D. Papaya virus diseases with special reference to *Papaya ringspot virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 39, p. 191-211, 1949.

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

KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. **Virology**, Washington, v. 285, n. 1, p. 71-81, jan. 2001.

KERTBUNDIT, S. et al. Resistance of transgenic papaya plants to *Papaya ringspot virus*. **Biologia Plantarum**, Karlovce, v. 51, n. 2, p. 333-339, Feb. 2007.

KRUBPHACHAYA, P.; JURICEK, M.; KERTBUNDIT, S. Induction of RNA-mediated resistance to *Papaya ringspot virus* type W. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Rockville, v. 40, n. 3, p. 404-411, May 2007.

LEE, C. Y.; CHIANG, C. H.; YEH, S. D. Analyses of the roles of HC-Pro genes of *Papaya ringspot virus* for the attenuated symptoms on papaya plants and local lesion formation on *Chenopodium quinoa*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 211-212, Feb. 2001.

LIMA, J. A. A.; BEZERRA, D. R. Levantamento da incidência do vírus da mancha anelar do mamoeiro em municípios cearenses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 115-118, jan./abr. 1988.

LIMA, J. A. A.; GOMES, M. N. S. Identificação de *Papaya ringspot virus* no Ceará. **Fitossanidade**, Campinas, v. 1, 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. 689-702, dez. 2001.

_____. Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 174-180, abr./jun. 2002.

LIN, C. C.; SU, H. J.; WANG, D. N. **The control of *Papaya ringspot virus* in Taiwan**. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center, 1989. 19 p. (Technical Bulletin, 114).

LIUS, S. et al. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against *Papaya ringspot virus*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 161-168, 1997.

LORETO, T. J. G. et al. Ocorrência de um amarelo letal no mamoeiro solo no Estado de Pernambuco. **Biológico**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 275-279, abr./jun. 1983.

LU, Y. W. et al. Complete genomic sequence of a *Papaya ringspot virus* isolate from Hainan Island, China. **Archives of Virology**, Vienna, v. 153, n. 5, p. 991-993, May 2008.

MAGDALITA, P. M. et al. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 95, n. 1/2, p. 224-229, Mar. 1997.

MAIA, I. G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, London, v. 77, n. 7, p. 1335-1341, July 1996.

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, p. 835-846, Nov. 2008.

MANGRAUTHIA, S. K.; SINGH, P.; PRAVEEN, S. Genomics of helper component proteinase reveals effective strategy for *Papaya ringspot virus* resistance. **Molecular Biotechnology**, New York, v. 44, n. 1, p. 22-29, Jan. 2010.

MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. Vetores de doenças do mamoeiro: monitoramento e controle. In: _____. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: INCAPER, 2007. p. 115-128.

MARYS, E.; CARBALLO, O.; IZAGUIRRE-MAYARAL, M. L. Properties of a previously undescribed supercoiled filamentous virus infecting papaya in Venezuela. **Archives of Virology**, Vienna, v. 140, n. 5, p. 891-898, May 1995.

MEJÍAS, Y.; RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ, G. Rhabdovirus asociados a síntomas de necrosis apical en fruta bomba (*Carica papaya*) en Cuba. **Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Protección de Plantas**, Havana, v. 10, n. 3, p. 57-62, 1987.

MENDOZA, M. F. et al. Obtención de plantas transgênicas de papaya var. Maradol roja que portan el gen de la orizacistatina de arroz. **Biotecnología Vegetal**, San José, v. 4, n. 4, p. 225-228, 2004.

MOREIRA, A. G. **Caracterização de novos isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro ocorrendo naturalmente no Estado de Espírito Santo**: avaliação da infecção natural de cucurbitáceas com esse vírus: caracterização de um isolado do mosaico da alfafa infectando mamoeiro (*Carica papaya*) em campo. 2009. 162 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

MOREIRA, A. G.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Identification and partial characterization of a *Carica papaya*-infecting isolate of *Alfalfa mosaic virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, Saga, v. 76, n. 2, p. 172-175, Apr. 2010.

MOWLICK, S.; AKANDA, A. M.; RAHMAN, A. H. M. A. Development of mild strains of *Papaya ringspot virus*: papaya strain. **Journal of Agriculture Rural Development**, Gazipur, v. 5, n. 1/2, p. 94-97, 2007.

MURAYAMA, S. J. **Fruticultura**. 2. ed. Campinas: Instituto de Ensino Agrícola, 1986. 371 p.

NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro: estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 1987. p. 555-559.

NAKAMURA, K. et al. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to *Papaya Ringspot Virus* YK strain. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 34, n. 10, p. 1648-1551, Oct. 2011.

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**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 109-117, Jan. 2007.

OLARTE-CASTILLO, X. A. et al. Phylogeography and molecular epidemiology of *Papaya ringspot virus*. **Virus Research**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 132-149, Feb. 2011.

PEÑA, I. Enfermedades virales en el cultivo del papayo (*Carica papaya* L.). **Revista CitriFrut**, Havana, v. 25, n. 1, p. 13-23, 2008.

PÉREZ-MADRIGAL, J. E. et al. Extractos acuosos de nim *Azadirachta indica* A. Juss en el manejo integrado del papayo *Carica papaya* L. **Revista Chapingo - Serie Horticultura**, Chapingo, v. 6, n. 1, p. 81-89, 2000.

PIRONE, T. P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, New Jersey, v. 2, n. 1, p. 81-87, 1991.

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

PORTAL, O. et al. Molecular characterization of two Cuban isolates of *Papaya ringspot virus* by means of coat proteins analysis. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Berlin, v. 71, n. 3, p. 1203-1205, Sept. 2006.

PURCIFULL, D. E. *Papaya ringspot virus*. Kew: CMI/AAB, 1972. 2 p. (Descriptions of Plant Viruses, 84).

PURCIFULL, D. E. et al. *Papaya ringspot virus*. Wallington: CMI/AAB, 1984. 12 p. (Descriptions of Plant Viruses, 209).

PURCIFULL, D. E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. Wallington: CMI/AAB, 1984. 8 p. (Descriptions of Plant Viruses, 292).

PURCIFULL, D. E.; HIEBERT, E. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 2, p. 112-116, 1979.

QUIOT-DOUINE, L.; LECOQ, H.; QUIOT, J. D. Serological and biological variability of virus isolates related to strains of *Papaya ringspot virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 2, p. 256-263, June 1990.

REZENDE, J. A. M. **Tentativas de premunização para controle do mosaico do mamoeiro**. 1985. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 1985.

REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S. Controle do mosaico do mamoeiro por premunização: sucessos e dificuldades. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 258-261, abr./jun. 1993.

_____. Intensificação dos sintomas dificulta o controle do mosaico do mamoeiro por premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 203-210, maio/ago. 1987.

_____. Víroses de mamoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 139, p. 44-48, jul. 1986.

REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S.; SOARES, N. B. Novas observações sobre um isolado fraco do vírus do mosaico do mamoeiro e seu efeito protetivo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 8, n. 1, p. 5-6, 1982.

_____. Ocorrência de um isolado fraco do vírus do mosaico do mamoeiro *Carica papaya* L. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 534-536, 1981.

REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S.; VEJA, J. Obtenção de isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro a partir de 'bolhas' das folhas com mosaico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 542-545, 1982.

REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. S.; YUKI, V. A. Menor disseminação do vírus do mosaico do mamoeiro em Parquera-Açu oferece possibilidades para produção de mamão em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 12, n. 1, p. 11-16, 1986.

REZENDE, J. A. M. et al. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 55-61, jan./mar. 1994.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293-302.

REZENDE, J. A. M.; MULLER, G. W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 3, p. 185-226, 1995.

REZENDE, J. A. M.; PACHECO, D. A. Control of *Papaya ringspot virus*-type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, Quebec, v. 82, n. 1, p. 171-175, Jan. 1998.

RIVAS-VALENCIA, P. et al. Evaluación de barreras vegetales en el manejo integrado de la mancha anular del papayo en Michoacán, México. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 307-312, 2008.

SAXENA, S. et al. Leaf curl disease of *Carica papaya* from India may be caused by a bipartite geminivirus. **Plant Disease**, Quebec, v. 82, n. 1, p. 126-130, Jan. 1998.

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, maio/jun. 2010.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Advances in Virology**, New York, v. 36, n. 2, p. 273-314, June 1989.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SILVA-ROSALES, L. et al. Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of *Papaya ringspot virus* with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. **Archives of Virology**, New York, v. 145, n. 4, p. 835-843, Apr. 2000.

SOUZA, M. T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against *Papaya ringspot potyvirus*, partial characterization of the PRSV, Brazil:** Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. 1999. 277 p. Thesis (Ph.D. in Phytopathology) - Cornell University, Geneva, 1999.

_____. Mamão transgênico: uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 132-137, 2000.

SOUZA, M. T.; GONSALVES, D. Genetic engineering resistance to plant virus diseases: an effort to control *Papaya ringspot potyvirus* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 485-502, jul./set. 1999.

SRIVASTAVA, A. et al. Suppression of *Papaya ringspot virus* infection in *Carica papaya* with CAP-34, a systemic antiviral resistance inducing protein from *Clerodendrum aculeatum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 2, p. 241-246, Feb. 2009.

TENNANT, P. F. **Evaluation of coat protein transgenic *Papaya ringspot virus* isolates and development of transgenic papaya for Jamaica.** 1996. 123 f. Thesis (Ph.D. in Phytopathology) - Cornell University, Geneva, 1996.

TENNANT, P. F. et al. Differential protection against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross protected papaya. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 11, p. 1359-1366, Nov. 1994.

_____. *Papaya ringspot virus* resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 6, p. 645-653, June 2001.

TENNANT, P. F.; AHMAD, M. H.; GONSALVES, D. Field resistance of coat protein transgenic papaya to *Papaya ringspot virus* in Jamaica. **Plant Disease**, Quebec, v. 89, n. 8, p. 841-847, Aug. 2005.

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

TORRES, M. R.; GIACOMETTI, D. C. Virosis de la papaya (*Carica papaya* L.) en el Valle del Cauca. **Agricultura Tropical**, Maracay, v. 22, n. 1, p. 37-38, 1966.

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

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

VEGAS, A. et al. Avances sobre el control integrado del virus de la mancha anillada del lechoso (PRSV) mediante la protección cruzada y la implementación de prácticas agronómicas. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 50, n. 2, p. 303-310, 2000.

_____. Obtención y selección de cepas atenuadas del virus de la mancha anillada de la lechosa mediante mutagénesis in vitro en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 15, n. 1, p. 33-38, 2002.

_____. Virus de la mancha anillada de la Lechosa en Venezuela: descripción e importancia, medidas de prevención y control. **Revista Digital Ceniap Hoy**, Maracay, n. 6, 2004. Disponible em:
<http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/vegas_a/arti/vegas_a.htm>. Acceso em: 7 nov. 2011.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o "roguing". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 536, set. 2001.

WAN, S. H.; CONOVER, R. A. A rhabdovirus associated with a new disease of Florida papayas. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Miami, v. 94, p. 318-321, 1981.

WANG, H. L. et al. Effectiveness of cross-protection by mild mutants of *Papaya ringspot virus* for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. **Plant Disease**, Quebec, v. 71, n. 6, p. 491-497, June 1987.

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, June 1998.

WANG, X. Y.; XIE, Y.; ZHOUY, X. P. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 303-309, Dec. 2004.

WEN, R. H.; HAJIMORAD, M. R. Mutational analysis of the putative PIPO of Soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. **Virology**, London, v. 400, n. 1, p. 1-7, Jan. 2010.

YAP, Y. K.; DUANGJIT, J.; PANYIM, S. N-terminal of *Papaya ringspot virus* type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 461-467, June 2009.

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, Oct. 1992.

_____. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. **Plant Disease**, Quebec, v. 72, n. 5, p. 375-380, May 1988.

YEH, S. D.; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of *Papaya ringspot virus* for control by cross-protection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 9, p. 1086-1091, Sept. 1984.

_____. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. In: HARRIS, K. F. (Ed.). **Advances in disease vector research**. New York: Nek, 1884. p. 237-257.

_____. Translation of *Papaya ringspot virus* RNA in vitro: detection of a possible polyprotein that is processed for capsid protein, cylindrical-inclusion protein, and amorphous-inclusion protein. **Virology**, Washington, v. 143, n. 1, p. 260-271, May 1985.

ZAMBOLI-MACIEL, E. et al. Purification and some properties of *Papaya meleira virus* infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 389-394, June 2003.

ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M. Família Potyviridae: parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 1-67, 1999.

_____. Família Potyviridae: parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 225-265, 2000.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

**Caracterização molecular e biológica de isolados do *Papaya ringspot virus*
provenientes do Brasil e de Cuba**

Caracterização molecular e biológica de isolados de *Papaya ringspot virus* provenientes do Brasil e de Cuba

Resumo Atualmente, as estratégias de manejo da mancha anelar, uma das doenças mais importantes do mamoeiro, causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), têm se concentrado na obtenção de plantas transgênicas e na proteção cruzada. Isso demanda um maior conhecimento do genoma dos isolados que ocorrem nos diferentes países e regiões de cultivo. Neste trabalho, 21 isolados de PRSV provenientes do Brasil e 7 de Cuba tiveram o gene da capa proteica (CP) sequenciado e comparado com os de outras regiões disponíveis no *GenBank*. Foram também avaliados os sintomas induzidos em mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Solo) e abóbora (*Cucurbita pepo* L. cv. Caserta). As maiores identidades de nucleotídeos e de aminoácidos ocorreram entre isolados da mesma região e as árvores filogenéticas mostraram os isolados agrupados por regiões geográficas. Houve a formação de um *cluster* com isolados da América e da Índia e os isolados do Brasil ficaram agrupados por estado, ao passo que os da região oriental de Cuba ficaram mais perto de outros isolados da América do que dos da região centro-ocidental. As plântulas de mamoeiro e abóbora que foram inoculadas desenvolveram sintomas típicos de mosaico, permitindo agrupar os isolados segundo as diferenças na intensidade dos sintomas da doença em cada hospedeira. Os dados obtidos neste trabalho, somados aos mostrados por outros autores, indicam a necessidade de utilização de isolados virais específicos para diferentes regiões produtoras, em ambos os países, quando se pretende fazer a construção de mamoeiros transgênicos com resistência a PRSV-P ou, mesmo, empregar medidas de controle envolvendo a proteção cruzada.

Palavras-chave: PRSV-P. Capa proteica. Identidade. Filogenia. Mamoeiro. Abóbora. Intensidade de sintomas.

Molecular and biological characterization of *Papaya ringspot virus* isolates from Brazil and Cuba

Abstract The main strategies currently employed to control the ringspot caused by *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), which is considered one of the most important diseases of papaya, are the use of cross-protection and of transgenic plants. However, in order to succeed in PRSV-P control using both strategies, it is necessary a detailed knowledge of the diverse virus isolates genome, coming from different countries and regions where the papaya is grown. In this work the coat protein gene (CP) of 21 PRSV isolates from Brazil and of 7 isolates from Cuba were sequenced and compared among themselves and with other PRSV-P isolates available in GenBank. It was also evaluated the symptoms induced, by the 28 virus isolates studied, in papaya (*Carica papaya* L. cv. Solo) and squash (*Cucurbita pepo* L. u. Caserta). In the phylogenetic trees, the virus isolates grouped by geographic regions and the highest nucleotide and amino acid identities were seen among the virus isolates coming from the same region. The virus isolates from America and India were grouped in one cluster, with the Brazilian isolates grouped by state. However the virus isolates from eastern region of Cuba were closer to the American isolates than to the ones from central-west of Cuba. Typical mosaic symptoms were developed by the inoculated papaya and pumpkin seedlings, allowing to grouping the isolates, in each host, according to the differences in the symptoms intensity. The data obtained in this work, along with those reported by other authors, showed that the use of cross protection and transgenic plants for PRSV-P control requires the selection of virus isolates specific for each region in Brazil and Cuba.

Keywords: PRSV-P. Coat protein. Identity. Phylogeny. Papaya. Squash. Symptom intensity.

Introdução

A mancha anelar, virose causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV), é considerada a principal doença do mamoeiro (*Carica papaya* L.) no mundo [33]. Esse vírus é transmitido naturalmente por mais de 20 espécies de afídeos para plantas das famílias *Caricaceae* e *Cucurbitaceae* [16, 22], o que, somado à ausência de variedades de mamoeiro resistentes, torna o seu controle e manejo extremamente difíceis, em todas as regiões onde o mamoeiro é cultivado.

O PRSV pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* e suas partículas são alongadas e flexuosas, medindo 760 - 800 x 12 nm, com ssRNA senso positivo [25]. Contém cerca de 10,326 nucleotídeos com uma ORF, que codifica uma poliproteína de 350 KDa, começando nas posições 86/88 e terminando nas posições 10.118/10.120 e, ao final, possui uma região poli A-3' [38]. Essa poliproteína, depois de sintetizada, é proteoliticamente clivada em nove produtos finais: 5' - P1 (63 K), HC-Pro (52 K), P3 (46 K), CI (72 K), 6 K, VPg (21K), NIaPro (27K), NIb (59 K), CP (35 K) [35]. Os isolados de PRSV têm sido divididos em dois biótipos: PRSV-P e PRSV-W [25], sendo ambos capazes de infectar naturalmente plantas da família *Cucurbitaceae* e apenas o PRSV-P infecta naturalmente a família *Caricaceae* [11, 25].

Muitas estratégias têm sido adotadas para tentar controlar a virose, porém, sem resultados satisfatórios. Atualmente, as pesquisas estão focadas na procura por plantas transgênicas que expressem algum gene do PRSV, fundamentalmente a capa proteica (CP), e na seleção de estirpes fracas ou atenuadas para serem usadas na proteção cruzada [9]. Estudos sobre transformação genética em mamoeiro demonstraram que a resistência a PRSV obtida em algumas linhagens que expressaram o gene da CP depende, entre outros fatores, do grau de homologia existente entre o transgênico CP e o gene cp do isolado viral, sendo descrita esta resistência como 'isolado-dependente'

[31, 33, 35]. Por outro lado, a proteção cruzada com estirpes fracas tem demonstrado êxito restrito na proteção contra estirpes severas, inviabilizando um controle duradouro, econômico e seguro, devido, principalmente, a problemas de perda da proteção, além de inespecificidade e instabilidade dos isolados leves [17, 26, 35, 36, 37].

Em Cuba, existem numerosas áreas com condições favoráveis para o plantio do mamoeiro. Esta frutífera representa 7% da área cultivada e é responsável por 15% a 20% dos rendimentos da produção de frutas no país [13]. Atualmente, o cultivo do mamoeiro constitui uma alternativa para a diversificação da fruticultura, como parte de um programa nacional de desenvolvimento da agroindústria frutícola cubana, que visa satisfazer à crescente demanda desta fruta pela população e ampliar as possibilidades de mercado nacional e para a exportação. No Brasil, a cultura do mamoeiro tem grande importância, evidenciada pelas estatísticas que marcam este país como o maior produtor e terceiro exportador de mamão do mundo [8]. Em 2009, o Brasil produziu 1,8 milhões de toneladas em 34,213 hectares, e exportou cerca de 30 mil toneladas [28].

Nos dois países, assim como na maioria das áreas produtoras de mamão no mundo, o PRSV-P é o principal vírus que infecta esta cultura e tem sido um fator limitante ao seu estabelecimento e desenvolvimento. É muito comum encontrar plantas infectadas por este vírus em plantios comerciais, áreas de pequenos produtores, quintais de casas, nos centros urbanos e bordas das estradas. Isso faz com que existam fontes constantes deste vírus distribuídas por quase todo o território nacional, evidenciando a necessidade de serem desenvolvidas e implementadas estratégias de manejo e controle, que permitam diminuir os efeitos nocivos provocados por este patógeno, elevando os rendimentos e a qualidade da produção desta fruta nas áreas cultivadas.

Neste contexto, é necessário conhecer o grau de variabilidade genética dos isolados virais que ocorrem em cada região geográfica específica, como base para o desenvolvimento de plantas transgênicas e/ou desenvolvimento de programas de proteção cruzada. Visando conhecer essa variabilidade, Lima et al. [18] realizaram estudos filogenéticos sobre a CP de doze isolados de PRSV-P de diferentes regiões do Brasil, verificando um grau de homologia médio de 97,3% entre eles. Em Cuba, poucos foram os estudos realizados, havendo apenas sequências parciais da CP do PRSV-P disponíveis no *GenBank* [3, 24].

Neste trabalho são apresentados e discutidos os resultados do sequenciamento, análise e comparação do gene da CP de 28 isolados de PRSV-P, coletados em diversas regiões do Brasil e de Cuba, incluindo outras sequências disponíveis no *GenBank*, bem como os sintomas iduzidos por esses isolados, em plantas de mamão cv. Solo e abóbora cv. Caserta.

Material e Métodos

Coleta e manutenção de isolados

Entre os anos de 2010 e 2011, foram coletadas 28 amostras de plantas de mamão apresentando sintomas característicos de PRSV-P em plantios comerciais de dez estados do Brasil e de cinco províncias de Cuba. Detalhes das origens dos isolados e de sequências adicionais do gene cp de 28 isolados depositadas no *GenBank* encontram-se na Tabela 1. Os isolados coletados foram inoculados mecanicamente em plântulas de mamoeiro e mantidos em condições de casa de vegetação, dessecados e armazenados a -20 e a -80 °C.

Tabela 1 Origem e denominação dos isolados de *Papaya ringspot virus* (PRSV) estudados e relação dos isolados provenientes do *GenBank*, utilizados para comparação

Isolados estudados, coletados no Brasil e em Cuba				Isolados do <i>GenBank</i>		
País	Isolado	Estado/Prov.	Município	País	Isolado	Acesso No.
Brasil	BrMG-1	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Br-PRSV-W-1	DQ374153
Brasil	BrMG-2	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Br-PRSV-W-C	DQ374152
Brasil	BrMG-3	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Brazil-CE	AF344647
Brasil	BrMG-4	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Brazil-PE	AF344646
Brasil	BrBA-1	Bahia	Cruz das Almas	Brasil	Brazil-DF	AF344650
Brasil	BrBA-2	Bahia	Cruz das Almas	México	Mx-VrPro	AY231130
Brasil	BrSP-1	São Paulo	Itapira	USA	USA-Haw-PG	EU126128
Brasil	BrSP-2	São Paulo	Itapira	USA	USA-B9	JN132432
Brasil	BrSP-3	São Paulo	Itapira	USA	USA-T14b	JN132470
Brasil	BrSP-4	São Paulo	Itapira	Venezuela	Ve-Merida-6	EF189736
Brasil	BrSP-5	São Paulo	Mococa	Venezuela	Ve-Merida-8	EF189733
Brasil	BrRJ-1	Paraná	Maringá	Venezuela	Ve-Trujillo-1	EF189734
Brasil	BrPR-1	Paraná	Maringá	Venezuela	Ve-Trujillo-5	EF189735
Brasil	BrPR-2	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Venezuela	Ve-Zulia-7	EF189732
Brasil	BrES-1	Espírito Santo	Linhares	Taiwan	Ta-PRSV-SLM	DQ340771
Brasil	BrES-3	Espírito Santo	Linhares	Taiwan	Ta-PRSV-1	X67672
Brasil	BrAM-1	Amazonas	Manaus	Taiwan	Ta-PRSV-2	X97251
Brasil	BrMA-7	Maranhão	São Luís	Taiwan	Ta-PRSV-SLD	DQ340769
Brasil	BrMA-8	Maranhão	São Luís	Taiwan	Ta-PRSV-P-5-19	EU882728
Brasil	BrPA-1	Paraíba	Pombal	Taiwan	Ta-CI	AY027810
Brasil	BrDF-1	D. Federal	DF	China	Ch-HN-1	HQ424465
Cuba	CbMY-1	Mayabeque	Nueva Paz	China	Ch-PRSV-P	EF183499
Cuba	CbMT-1	Matanzas	Colón	Índia	In-PRSV	EU475877
Cuba	CbMT-2	Matanzas	Jagüey Grande	Índia	PRSV-DEL	EF017707
Cuba	CbVC-1	Villa Clara	Santa Clara	Coreia do Sul	SK-PRSV-W	AB369277
Cuba	CbGR-1	Granma	Jiguani	Tailândia	Th-PRSV-P	AY162218
Cuba	CbGR-2	Granma	Jiguani	Tailândia	Th-PRSV-W	AY010722
Cuba	CbHG-1	Holguín	Holguín	Malassia	Ma-PRSV	AB044342

Extração de RNA, RT-PCR, purificação e sequenciamento

O RNA total foi extraído a partir de folhas jovens de mamoeiros, infectadas pelo PRSV, pelo método de Trizol [1]. A partir das sequências de bases de PRSV disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foi desenhado o par de *primers* PRSV9016-F (5'-CTTGARCARGCTCCATTC-3') e PRSV10253-R (5'-CTAAAAGCACGGAGG-3'), que amplificam um fragmento de aproximadamente 1,238 pb, contendo a CP.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total extraído, usando o *primer* PRSV1053-R e a enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega Corp. Madison/WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A amplificação do fragmento da CP foi realizada com a enzima GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Corp. Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e com ambos os *primers*, utilizando-se uma desnaturação inicial de 95 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 42 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 1 minuto e extensão final, a 72 °C, por 5 minutos. O produto obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, purificado com o kit de purificação da QIAGEN, seguindo as recomendações do fabricante (Qiagen, São Paulo, SP, Brasil) e enviado para sequenciamento na empresa *Genewiz* (South Plainfield, NJ, USA).

Alinhamento e análise das sequências

Os contigs, baseados nas sequências obtidas, foram construídos utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler v2 (www.dnabaser.com). Posteriormente, esses contigs foram analisados por intermédio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível online no *website* do NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As sequências finais foram analisadas pelo programa BLAST e os alinhamentos múltiplos foram feitos pelo programa CLUSTALW, incluso no *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA5) [32], utilizando-se, para comparação, isolados de PRSV disponíveis no *GenBank* (Tabela 1). As árvores filogenéticas foram construídas por meio do programa MEGA5, empregando bootstrap com 2,000 repetições.

Intensidade de sintomas e gama de hospedeiros

Para avaliar as diferenças quanto à intensidade dos sintomas induzidos por isolado em plântulas de mamoeiro (*C. papaya* L. cv. Solo), foram realizados dois ensaios, sendo um no inverno (julho/2010), com a temperatura mínima de 4,8 °C e a máxima de 25,2°C (média de 15 °C) e outro no verão (fevereiro/2012), com valores de temperaturas mínima e máxima de 19,8 °C e 34 °C, respectivamente (média de 26,9 °C). Estas duas épocas foram escolhidas para se verificar a variabilidade dos sintomas quando as plantas inoculadas foram colocadas em diferentes temperaturas.

Os isolados em estudo foram inoculados mecanicamente em plantas de 15 a 20 cm de altura, em condições de casa de vegetação. Para cada isolado, foram utilizadas 9 pântulas (3 repetições de 3 plântulas cada uma), obtidas por semeadura em vasos, contendo o substrato adequado. A inoculação mecânica foi feita com o extrato de folhas jovens das plantas infectadas, obtido por maceração em almofariz de porcelana na presença de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1:10 (peso/volume). O extrato foi friccionado nas folhas das plantas-teste receptoras, previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício e, em seguida, as plantas foram lavadas com água corrente para eliminar o excesso de carbureto. Plantas saudáveis, inoculadas somente com o tampão fosfato, serviram como controle negativo. A avaliação dos sintomas foi feita até 45 dias após inoculação.

Adicionalmente, com o objetivo de identificar a reação de plantas à infecção por isolados de PRSV-P, foi feito um experimento nas condições de verão descritas anteriormente, no qual plântulas de *Cucurbita pepo* L. cv. Caserta, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaraticolor* e *C. papaya* L. foram inoculadas no primeiro par de folhas definidas, no estágio de dois terços de sua expansão, e os sintomas foram avaliados até 21 dias após inoculação.

Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até o final da avaliação dos sintomas, que foi feita de acordo com a escala descritiva utilizada por Rodríguez et al. [27], para avaliar plântulas de mamoeiro inoculadas com PRSV-P.

Resultados e Discussão

Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos

Dos 28 isolados de PRSV que tiveram o gene cp sequenciado neste trabalho, 26 apresentaram tamanho de 924 nucleotídeos. Os isolados brasileiros BrBA-1 e BrSP-5 apresentaram apenas 921 nucleotídeos, e a deleção desses três nucleotídeos correspondeu ao aminoácido 22 para o isolado BrSP-5 e ao 18 para o isolado BrBA-1, a partir do domínio conservado DAG.

O fato de ter encontrado diferenças no tamanho do gene cp entre os diferentes isolados estudados neste trabalho coincide com resultados de estudos anteriores realizados por Lima et al. [19]. Esses autores encontraram dez isolados brasileiros com o gene cp constituído por 924 nucleotídeos e dois isolados, procedentes da Bahia e do Paraná, com apenas 921 nucleotídeos.

Inoue-Nagata et al. [12] compararam as sequências genéticas de duas estirpes de PRSV-W (uma fraca e outra severa) e observaram que a estirpe fraca tinha um genoma com seis nucleotídeos a mais, localizados na região da CP desse isolado, onde apareceram dois aminoácidos adicionais (Asn e Asp). Variações nos números de nucleotídeos e aminoácidos da CP de PRSV têm sido encontradas por outros autores [6, 15], sempre nos primeiros 50 aminoácidos do N terminal, especificamente nas regiões repetitivas EK, sugerindo que esta região da CP é mais variável e também mais sujeita às deleções e às inserções de nucleotídeos [19]. Por isso, tem sido sugerida a utilização do terminal 3' do gene cp para a obtenção de plantas transgênicas, uma vez que esta região é mais

conservada que a 5' [30]. Neste trabalho, também se observou maior conservação da região 3' (dados não mostrados), confirmando que esta região é a mais adequada para ser empregada nos programas de transformação genética de plantas.

Como apresentado na Fig. 1, a comparação da distância gênica entre as sequências de nts, mediante uso da ferramenta *pairwise*, dos 28 isolados estudados neste trabalho com os do *Genbank* (n=56), indicou uma distância de 0 a 0,131. Quando foram analisados os isolados procedentes do Brasil e de Cuba, sequenciados neste trabalho (n=28), a distância gênica foi menor, entre 0 e 0,092, o que poderia estar relacionado ao fato de se tratar de isolados de apenas dois países diferentes. Neste caso, o valor zero foi observado entre isolados provenientes dos mesmos estados e municípios no Brasil (BrMG-1 e BrMG-2, BrES-1 e BrES-3), fato que evidencia a similaridade genética entre isolados de uma mesma região. Por outro lado, os isolados mais distantes (0,092) são os de países diferentes (BrAM-1 com CbMT-2 e CbVC-1). Quando apenas os isolados brasileiros foram analisados (n=21), observou-se uma menor distância de até 0,082 e os valores mais altos (0,66-0,82) corresponderam ao isolado BrMA-1, proveniente do estado do Amazonas com os outros isolados, o que, provavelmente, deve-se à distância geográfica existente entre esse e os outros estados onde os isolados foram coletados, uma vez que, entre os outros isolados brasileiros, as distâncias variaram entre 0 e 0,063.

Quando os isolados cubanos foram analisados (n=7), observou-se uma menor distância gênica, com valores de até 0,073, o que sugere que a condição isolada de Cuba e suas menores dimensões, quando comparadas às do Brasil, fazem com que os isolados de PRSV, existentes no país, sejam mais conservados. No entanto, um fato a ser destacado é que a maior distância foi observada entre dois isolados mais distantes geograficamente dentro do arquipélago (CbMT-2 e CbHG-1), enquanto os menos distantes foram de

províncias vizinhas (CbMY-1 e CbMT-2), reforçando a hipótese de maior conservação genética entre isolados de regiões próximas.

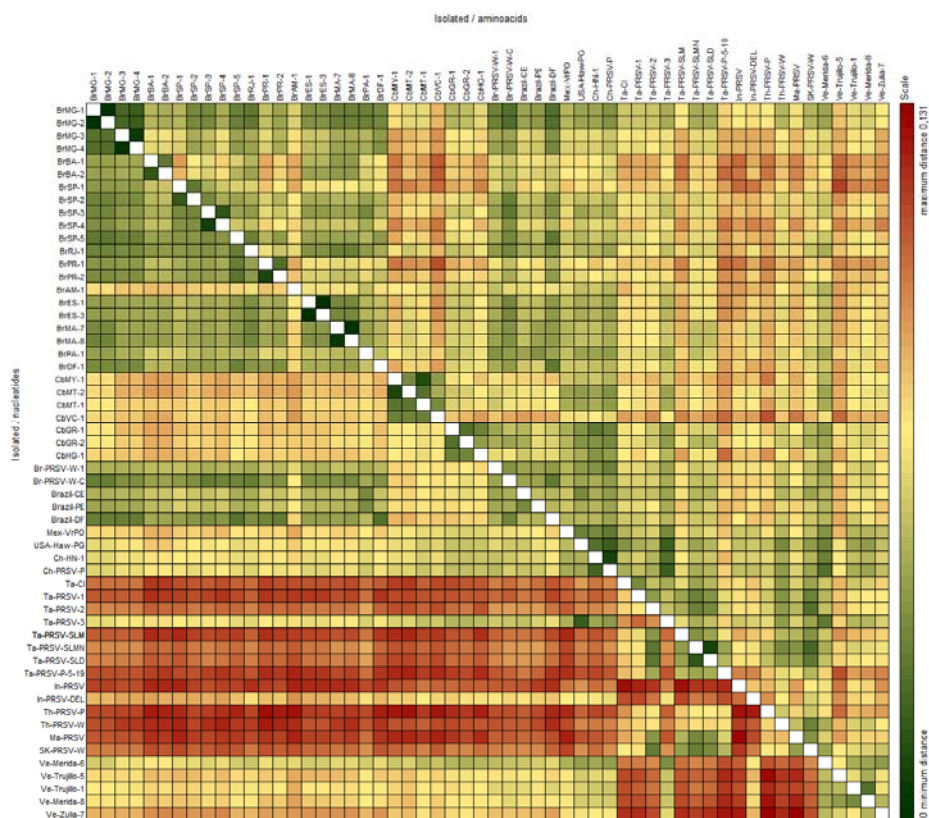


Figura 1 Distâncias genéticas estimadas (análise de *pairwise* mediante deleção de *gaps*) entre seqüências de nucleotídeos e entre seqüências de aminoácidos do gene da capa proteica de isolados de PRSV procedentes do Brasil e de Cuba, e outras regiões do mundo disponíveis no *GenBank*. Alinhamentos múltiplos de seqüências e análises evolutivas foram realizados pelo programa MEGA5

As identidades entre seqüências gênicas (valores não mostrados) corroboraram os resultados das análises de *pairwise*, tendo os menores valores sido observados entre isolados da América e os de Ásia. Os valores mais baixos (inferiores a 86%) foram observados quando os isolados brasileiros BrBA-2,

BrSP-1, BrSP-4, BrPR-1 e BrMA-8 foram comparados com os asiáticos Ch-HN-1, Th-PRSV-P e Th-PRSV-W. As identidades de nucleotídeos entre os isolados brasileiros variaram de 91% (entre o isolado BRAM-1 e os isolados BrMA-8 e BrDF-1) a 100% (entre BrMG-1 e BrMG-2 e entre BrES-1 e BrES-3). Entre os isolados cubanos, a identidade variou de 99% (entre os isolados CbMY-1 e CbMT-2) a 92%, entre os isolados da região ocidental (Mayabeque, Matanzas e Villa Clara) e os da região oriental (Granma e Holguín).

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, os estudos realizados por Lima et al. [17] mostraram maiores identidades entre as sequências da CP dos isolados de PRSV de diferentes regiões do Brasil, fato interessante devido à grande distância geográfica existente entre os isolados avaliados por estes autores. Provavelmente, as maiores diferenças observadas neste trabalho devem-se à inclusão, neste estudo, de um isolado do estado Amazonas, que ficou bem mais diverso e mais distante do resto dos isolados brasileiros, tanto na análise de *pairwise* quanto nas árvores filogenéticas.

Quando foram analisadas as sequências de aminoácidos, tanto nos isolados estudados neste trabalho quanto nos obtidos do *GenBank*, observaram-se os domínios conservados DAG, WCIEN e QMKAAA (dados não mostrados), também identificados por outros autores, que os associam a funções relacionadas com a transmissão do vírus pelos afídeos vetores [4, 29, 30]. A partir do terceiro aminoácido após o bloco triplo DAG, observaram-se trechos de repetições de ácido glutâmico e lisina conhecidos como “região EK” [29], os quais foram mais variáveis em todos os isolados analisados.

A análise de *pairwise* entre as sequências de aminoácidos revelou valores de distância genética similares aos observados entre as sequências de nucleotídeos (Fig. 1). Neste caso, a distância entre todas as sequências (n=56) variou de 0 a 0,114. Quando analisadas as sequências dos isolados sequenciados neste trabalho (n=28), observou-se uma diversidade menor com distâncias

genéticas entre 0 e 0,111, tendo os menores valores sido observados entre isolados de mesmos estados no Brasil (BrMG-1 e BrMG-2, BrES-1 e BrES-3), e as maiores distâncias entre isolados dos dois países, com o valor mais elevado entre CbVC-1 e BrPR-1, o que pode ser justificado por se tratarem de isolados de dois países diferentes. Quando os isolados do Brasil (n=21) foram analisados, foi observada menor diversidade. Neste caso, as distâncias genéticas variaram entre 0 e 0,091, tendo os maiores valores sido encontrados entre os isolados BrBA-1 e BrSP-1 e também entre o isolado do Amazonas (BrAM-1) e os demais isolados, com variação entre 0,06 e 0,087. Entre os isolados cubanos (n=7), as distâncias variaram entre 0,01 e 0,09. Neste caso, os menores valores foram observados entre isolados da mesma região e os maiores, entre regiões distantes.

Corroborando os resultados anteriores, as identidades entre aminoácidos foram maiores que entre nucleotídeos. A menor identidade, de 88%, ocorreu quando todas as sequências foram comparadas (n=56) entre isolados da América e da Ásia, embora seja importante destacar a baixa identidade (88%) entre BrSP-1 e Ve-Trujillo-5, ambos da América do Sul e que também mostraram distâncias elevadas pelo método de *pairwise*. Entre os isolados sequenciados neste trabalho (n=28), as identidades variaram de 89% (entre CbVC-1 e BrBA-1, BrBA-2, BrSP-1, BrSP-4 e BrPR-1) a 94% (entre CbGR-1 e BrMG-1, BrMG-2, BrRJ-1, BrES-1, BrES-3, BrPA-1; CbMT-1 e BrSP-2, BrMA-7, BrMA-8, BrPA-1; CbMT-2 e BrPA-1), Já entre os isolados do Brasil (n=21), houve variação de 90% (entre o isolado do Amazonas BrAM-1 e BrBA-1, BrBA-2, BrSP-1) a 100% (entre BrMG-1 e BrMG-2; BrMG-3 e BrMG-4; entre os dois isolados do Espírito Santo e entre os do Maranhão) e, entre os cubanos, as identidades foram de 91% (entre isolados de regiões diferentes, CbVC-1 e CbGR-2, CbHG-1) a 99% (CbMY-1 e CbMT-2).

A análise das sequências dos isolados estudados neste trabalho revelou que as sequências de nucleotídeos mostraram valores de distâncias genéticas

discretamente menores que as sequências de aminoácidos, o que sugere que as sequências de aminoácidos da CP é afetada pelas variações nas sequências de nucleotídeos, concordando com os resultados obtidos por Silva-Rosales et al. [30]. Estes autores, quando compararam as sequências da CP de sete isolados asiáticos com as de três isolados mexicanos, inferiram maiores graus de identidade entre os nucleotídeos, que entre os aminoácidos. No entanto, Jain et al. [14] detectaram maiores graus de identidade nas sequências de aminoácidos que na de nucleotídeos, quando compararam a CP de dois isolados indianos do PRSV-P. Entretanto, este fato pode ter ocorrido por se tratar de apenas dois isolados de um mesmo país.

Na árvore filogenética (Fig. 2A), os diferentes isolados, com base na sequência de nucleotídeos da CP, foram agrupados em dois grandes *clusters*, sendo um maior (I), contendo os isolados da América, um de Taiwan e dois da Índia, e os isolados brasileiros ficaram em um *cluster* menor (Ia), agrupando-se, de modo geral, de acordo com a região geográfica, com o isolado do Amazonas mais distante do resto, o que coincide com o observado nas análises de *pairwise*. Ainda no primeiro *cluster* (I), pode-se observar a formação de outro *cluster* ainda menor (Ib), formado pelos isolados da região centro-ocidental de Cuba (CbMT-2, CbVC-1, CbMY-1 e CbMT-1) (Ib₁), os isolados da Venezuela (Ib₂), os da região oriental de Cuba (CbGr-1, CbGR-2 e CbHG-1) (Ib₃) e o isolado de Taiwan (Ta-PRSV-1) com os dos Estados Unidos e México (Mex-VrPo) (Ib₄). Finalmente, ainda analisando este primeiro *cluster*, ficaram bem mais distantes os isolados da Índia (In-PRSV-DEL e In-PRSV) (Ic). No segundo maior *cluster* (II) ficaram agrupados os isolados restantes da Ásia, que incluem China, Tailândia, Taiwan, Coreia do Sul e Malásia.

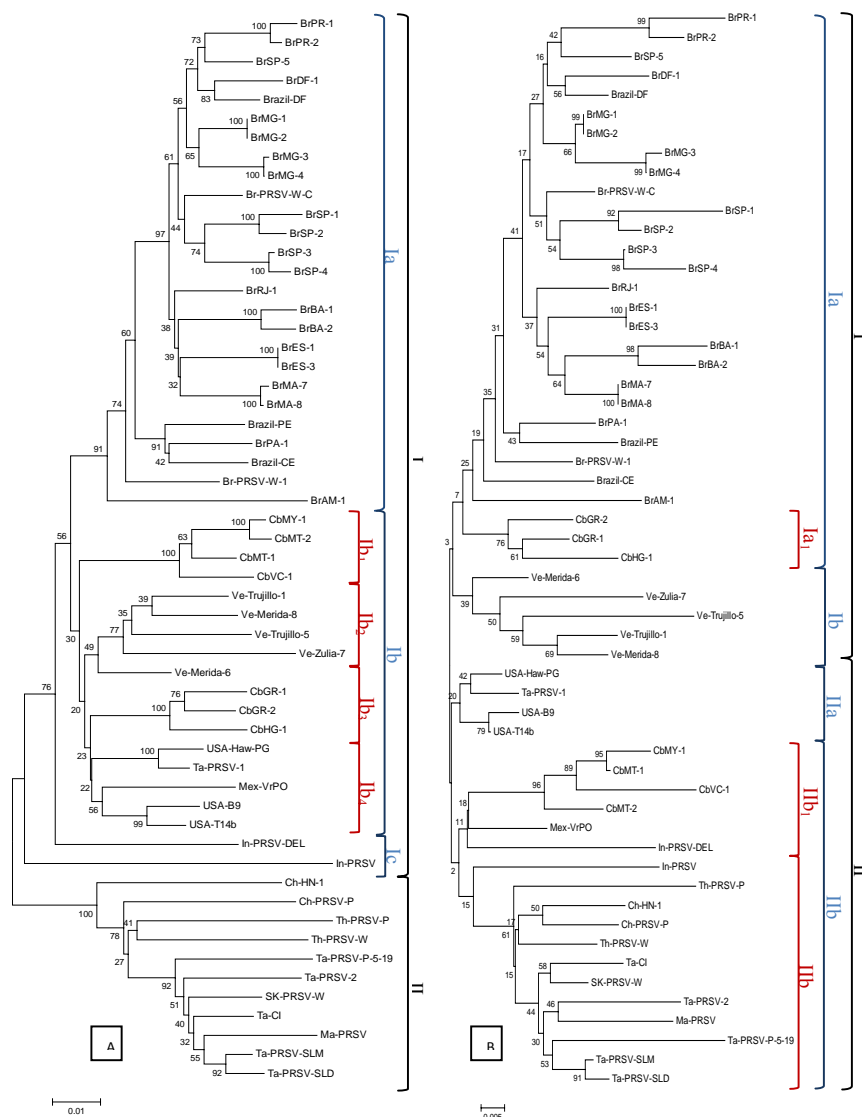


Figura 2 Análises filogenéticas derivadas das sequências de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) do gene da capa proteica de isolados de PRSV procedentes do Brasil e de Cuba, e outras regiões do mundo, disponíveis no *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA5, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com 2,000 repetições. Coincidência em números romanos, letras e/ou subíndices indicam agrupamentos comuns

A árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos da CP (Fig. 2B) mostrou um agrupamento diferente daquele observado na árvore construída com base nas sequências de nucleotídeos. Nesse caso, foram observados dois grandes *clusters*: o primeiro (I) agrupou os isolados do Brasil e os da região oriental de Cuba (Ia) e Venezuela (Ib), subagrupados por país, tendo o isolado brasileiro do Amazonas (BrAM-1) se agrupado mais distante dos demais isolados do Brasil, assim como observado na árvore dos nucleotídeos. O segundo *cluster* (II) agrupou o restante dos isolados, tendo os isolados dos Estados Unidos se agrupado, formando um *cluster* menor (IIa) e os da região ocidental de Cuba, México (Mex-VrPo) e Índia (In-PRSV-DEL) (IIb₁) separados dos demais isolados da Ásia (IIb₂).

O fato de os isolados brasileiros ficarem em um mesmo *cluster* foi observado também por Lima et al. [18] e Inoue-Nagata et al. [12], com algumas diferenças entre eles, as quais poderiam ser devido ao uso de isolados de outros estados brasileiros que não foram estudados por esses autores. Os resultados baseados nas sequências de nucleotídeos da CP mostraram que os isolados apresentam grupos diferentes, de acordo com a região de origem. Nesse sentido, Chin et al. [7] detectaram alta variabilidade genética entre isolados de PRSV da Venezuela, quando comparados aos isolados da Jamaica. Essas diferenças poderiam estar relacionadas, entre outros fatores, com o isolamento geográfico [23].

Os grupos filogenéticos obtidos, quando comparadas as sequências dos isolados com as sequências disponíveis no *GenBank*, coincidem com aqueles observados em estudos realizados por Fernández-Rodríguez et al. [10]. Estes autores obtiveram um grupo formado por isolados do México, Estados Unidos, Cuba, Porto Rico, Brasil e Austrália, a exemplo do que foi relatado por vários outros autores, com grupos de isolados América-Austrália, [2, 18, 12, 23, 34].

As relações filogenéticas existentes entre os isolados da Índia e os demais também foram observadas por Silva Rosales et al. [30], Lu et al. [19] e Mangrauthia et al. [20, 21]. Esses autores também notaram uma relação filogenética entre os isolados da Índia e da América, mas sempre com certa distância genética entre eles, fortalecendo a hipótese de que o PRSV pode ter sido dispersado desde a Índia até a América através do Brasil, Venezuela ou México [21, 23].

Os isolados da região oriental e centro-ocidental de Cuba se comportaram de maneira interessante, permanecendo em *clusters* separados, tanto na árvore de nucleotídeos quanto na de aminoácidos, o que coincide com estudos de sequências parciais do gene cp feitos por Aroca et al. [3], que encontraram o isolado da região central separado dos da região oriental. Esse fato poderia sugerir origens diferentes para esses grupos de isolados em Cuba.

Outro fato a ser destacado neste trabalho é que não existiram diferenças nos agrupamentos contendo as estirpes PRSV-P e PRSV-W. Esses resultados foram observados por outros autores, quando avaliaram a sequência da CP de isolados dessas duas estirpes, provenientes de diferentes regiões do mundo [12, 19, 20]. Além de indicar possíveis eventos de recombinação entre as duas estirpes, sugere que o PRSV-P surgiu do PRSV-W ou o inverso [21, 23].

Intensidade de sintomas e gama de hospedeiros

O período de incubação do PRSV-P nas plantas de mamoeiro foi variável entre os diferentes isolados e época de experimento (Tabela 3) e, no inverno, as plantas demoraram mais tempo para mostrar os primeiros sintomas (período de incubação de 10 a 38 dias), quando comparadas ao aparecimento dos sintomas no verão (5 a 26 dias), fato que sugere que as temperaturas de verão (19,8 °C e 34 °C) favorecem a multiplicação viral e o desenvolvimento da doença. Quando foram comparados os diferentes isolados, observou-se que

BrRJ-1 e BrMA-8 foram os que mais demoraram a induzir sintomas nas duas condições experimentais, sugerindo que são menos agressivos que o restante dos isolados avaliados.

As plantas inoculadas com o isolado BrMG-4 apresentaram sintomas mais tardiamente no inverno, entretanto, as plantas inoculadas com os isolados BrES-1 e CbGR-1 mostraram os sintomas mais tardiamente no verão. Esse comportamento diferencial sugere que a agressividade desses isolados poderia ser influenciada pelas condições ambientais, especificamente a temperatura, assim como sugerem Silva-Rosales et al. [30] e coincide com o relatado por Mangrahutia et al. [21], que acharam máxima acumulação viral e expressão de sintomas a temperaturas entre 26 °C e 31 °C, as quais coincidiram com o experimento de verão feito neste trabalho.

Tabela 3 Período de incubação e intensidade de sintomas induzidos por isolados de PRSV-P em *Carica papaya* L. cv. Solo, 45 dias após inoculação

Isolado	P. incubação (dias)		Sintomas foliares			Manchas no caule
	Exp. 1	Exp. 2	Mosaico	Bolhas	Distorção	
BrMG-1	15-37	9-17	++	++	+	++
BrMG-2	13-17	9-18	+++	++	-	++
BrMG-3	14-22	7-14	+++	++	++	++
BrMG-4	23-35	8-15	++	++	+	+
BrBA-1	14-17	7-10	+++	++	+++	+++
BrBA-2	11-16	6-11	+++	+++	+++	++
BrSP-1	15-27	8-23	+++	++	+	++
BrSP-2	12-35	9-15	++	+	++	++
BrSP-3	11-15	7-10	++	+	++	++
BrSP-4	11-15	7-10	+++	+	++	++
BrSP-5	11-38	11-24	++	+	+	+
BrRJ-1	21-32	13-24	++	+	++	+
BrPR-1	12-14	7-13	++	++	++	-
BrPR-2	10-15	5-17	+++	++	+++	++
BrAM-1	13-32	7-12	++	+	+	+++
BrES-1	11-32	19-26	++	++	+	++
BrES-3	15-19	9-13	+++	++	+++	++
BrMA-7	15-30	10-21	++	+	+	+
BrMA-8	18-20	13-23	++	+	+	+
BrPA-1	10-16	7-10	++	++	++	+
BrDF-1	11-16	8-16	+++	++	++	++
CbMY-1	11-19	12-22	++	++	+	+
CbMT-1	15-21	11-17	+	+	++	+
CbMT-2	16-31	9-15	++	++	++	++
CbVC-1	16-35	10-20	+++	++	++	+
CbGR-1	14-20	13-21	++	+	+	+
CbGR-2	15-17	8-21	+++	++	+++	+
CbHG-1	11-22	8-14	++	++	++	+

- ausência de sintoma, + sintoma leve, ++ sintoma moderado e +++ sintoma severo

Na maioria dos isolados, os primeiros sintomas observados em mamoeiro foram clareamento das nervuras e mosaico fraco (Fig. 3A). Entretanto, os isolados BrMG-2, BrMG-3, BrSP-1, BrSP-3, BrSP-4, BrPR-1, BrPR-2 e CbMY-1 também induziram sintomas de folhas encarquilhadas com nervuras espessas (Fig. 3B) e BrMG-3, BrMG-4 e BrRJ, manchas oleosas no caule (Fig. 3C). Os sintomas se intensificaram com o tempo e, aos 45 dias após

inoculação, observaram-se, além dos sintomas descritos anteriormente de forma moderada e severa (Fig. 3D, E), bolhas (Fig. 3F) e distorção foliar, com forte espessamento das nervuras (Fig. 3G).

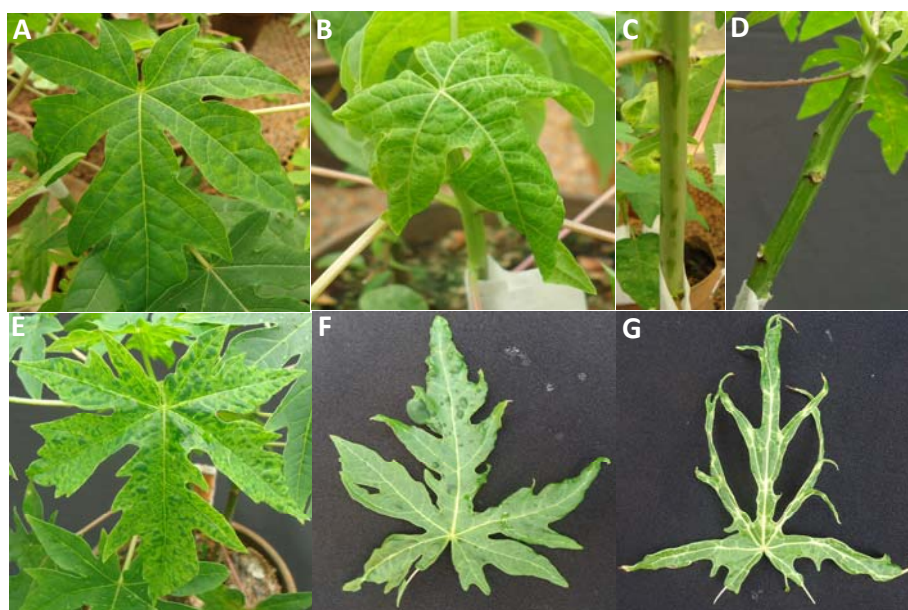


Figura 3 Sintomas iniciais de clareamento de nervuras e mosaico fraco (A), encarquilhamento (B) e manchas fracas no caule (C), e sintomas severos, após 45 dias da inoculação de plantas de *Carica papaya* L. cv. Solo inoculadas com isolados de PRSV-P. Manchas oleosas no caule (D), mosaico forte (E), embolhamento (F) e distorção foliar (G)

O tipo e a intensidade dos sintomas aos 45 dias após a inoculação variaram entre os isolados estudados (Tabela 3), tendo os isolados BrBA-1, BrBA-2, BrPR-2, BrES-3 e CbGR-2 induzido sintomas severos; BrSP-5, BrMA-7, BrMA-8, CbMT-1 e CbGR-1, sintomas leves e os isolados restantes, sintomas moderados. Um fato a ser destacado é que os isolados menos agressivos induziram sintomas de leves a moderados e nenhum deles induziu sintomas severos, sugerindo a possível existência de relação entre agressividade e

severidade dos isolados. No entanto, recomenda-se avaliar a intensidade dos sintomas produzidos por esses isolados em outras cultivares de interesse comercial para ambos os países. Rodríguez et al. [27] também observaram variabilidade na intensidade de sintomas em diferentes genótipos de mamoeiros inoculados com o mesmo isolado de PRSV-P.

As plantas de abóbora desenvolveram pontos cloróticos espalhados nas superfícies das folhas (Fig. 4A) e clareamento das nervuras com manchas cloróticas maiores (Fig. 4D), mas nem todas as folhas das plantas mostraram esses sintomas. Este fato sugere que, embora a infecção seja sistêmica, as plantas oferecem certa resistência ao movimento do vírus. As plantas de *C. quinoa* e *C. amaranticolor* não mostraram nenhum tipo de sintoma, indicando que não foram infectadas por esses isolados de PRSV-P, embora testes de detecção viral não tenham sido feitos para confirmação.

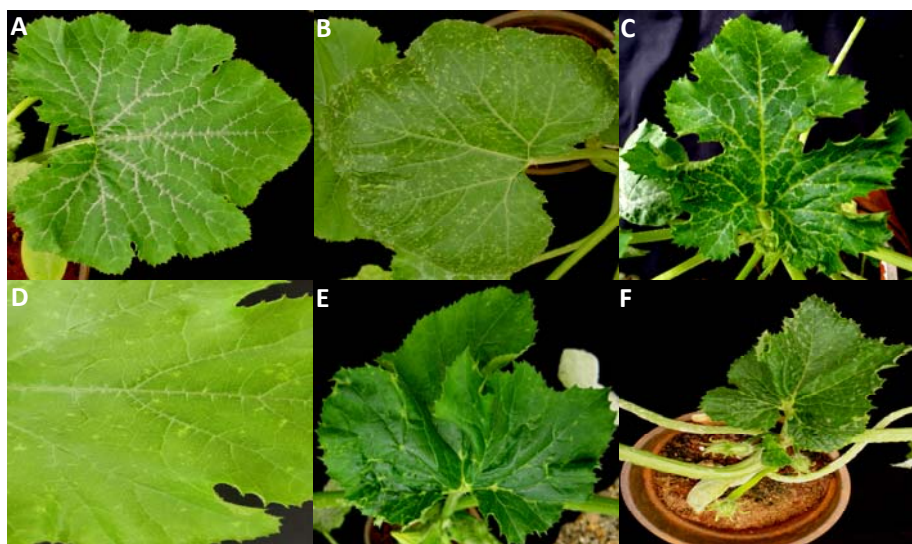


Figura 4 Sintomas induzidos por PRSV-P em folhas de *Cucurbita pepo* L. cv. Caserta, aos 21 da inoculação. Planta sadia (A), pontos cloróticos espalhados pela superfície foliar (B), amarelecimento das nervuras (C), manchas cloróticas (D), deformação e encarquilhamento (E) e redução do crescimento da planta (F)

No caso da abóbora, os sintomas iniciais foram observados a partir dos sete dias após a inoculação. A maioria dos isolados induziu sintomas de pontos cloróticos como descrito anteriormente, mas os isolados BrES-1 e BrES-3, ambos do estado brasileiro do Espírito Santo, BrDF-1, BrMG-4 e o cubano CbVC-1 provocaram sintomas de deformação foliar e encarquilhamento severo (Fig. 4E), que impediram o crescimento normal das plantas (Fig. 4F), além de amarelecimento das nervuras (Fig. 4C), sendo esse último sintoma observado também para o isolado BrSP-5.

De forma similar aos resultados observados neste trabalho, Silva-Rosales et al. [30] relataram sintomas de virose apenas em plantas de mamoeiro e *Cucumis metuliferus*, dentre 13 espécies inoculadas com isolados de PRSV-P, que incluíram *C. quinoa* e *C. amaranticolor*. Esses resultados confirmam que os

isolados de PRSV-P têm uma gama de hospedeiro muito restrita e com alta especificidade para *C. papaya* e algumas espécies de cucurbitáceas [5, 25, 37].

Esses resultados baseados na sequências da CP de isolados de diferentes regiões do Brasil e de Cuba e nos sintomas induzidos em plântulas de mamoeiro e de abóbora auxiliam o entendimento sobre a diversidade genética do PRSV-P e oferecem informações valiosas para as estratégias de manejo da mancha anelar do mamoeiro nos dois países, do ponto de vista da proteção cruzada e da transgenia. Contudo, recomenda-se que estudos biológicos sejam desenvolvidos com outras cultivares de importância para a cultura do mamoeiro, em ambos os países.

Agradecimentos: Ao Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e o financiamento deste projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio no financiamento de reagentes e recursos para o projeto, e aos colegas Aurivan Soares (UFLA), Cristiane de Jesús Barbosa (Embrapa), Emí Lorenzetti (UFLA), Hermes Peixoto (Embrapa), João Eduardo de Melo (UFLA), Justo González (UNICA), Luis Gasparotto (Embrapa), Flávio H. R. Moraes (CEUMA), Enilton Santana (INCAPER), Daniel Schurt (Embrapa), Keize Junqueira (Embrapa) e Maita Ávila (UNICA), por terem fornecido parte dos isolados avaliados neste trabalho.

Referências

1. AFGC: ARABIDOPSIS FUNCTIONAL GENOMICS CONSORTIUM. Total RNA isolation (2002). Disponível em: <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>. Acesso em: 09 set 2010.
2. Abdalla OA, Ali A (2012) Genetic diversity in the 3'-terminal region of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) isolates from watermelon in Oklahoma. Arch Virol 157(3):405-12.
3. Arocha Y, Piñol B, Acosta K, Almeida R, Devonshire J, Van de Meene A, Boa E, Lucas J (2009) Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in

- papaya (*Carica papaya* L.) affected with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) in eastern Cuba. *Crop Protection* 28(8):640-646.
4. Atreya CD, Raccach B, Pirone TP (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178:161-165.
 5. Bateson M, Henderson J, Chaleeprom W, Gibbs A, Dale J (1994) Papaya ringspot potyvirus: Isolate variability and origin of PRSV type P (Australia). *Journal of General Virology* 75:3547-3553.
 6. Bateson MF, Lines RE, Revill P, Chaleeprom W, Ha CV, Gibbs AJ, Dale JL (2002) On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. *J Gen Virol* 83:2575-2585.
 7. Chin M, Rojas Y, Moret J, Fermin G, Tennant P, Gonsalves D (2007) Varying genetic diversity of *Papaya ringspot virus* isolates from two time-separated outbreaks in Jamaica and Venezuela. *Arch Virol* 152:2101-2106.
 8. FAO (2010) Faostat (classic): production/crops primary. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/2010>. Access: 14 December 2011.
 9. Fermin G, Castro LT, Tennant PF (2010) CP-transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges. *Transgenic Plant J* 4: 1-15
 10. Fernández-Rodríguez T, Rubio L, Carballo O, Marys E (2008) Genetic variation of *Papaya ringspot virus* in Venezuela. *Arch Virol* 153:343-349
 11. Gonsalves D (1998) Control of *Papaya ringspot virus* in papaya: A case study. Pages 415-537 in: *Annu Rev Phytopathol*. R K Webster, G Shaner, NK Van Alfen, eds. Annual Reviews, Palo Alto, CA.
 12. Inoue-Nagata AK, Franco CM, Martin DP, Rezende JAM, Ferreira GB, Dutra LS, Nagata T (2007) Genome analysis of a severe and a mild isolate of *Papaya ringspot virus*-type W found in Brazil. *Virus Genes* 35:119-127.
 13. IPS-Inter Press Service in Cuba (2009) Frutales en ascenso. Disponível em <http://www.ipscuba.net/>. Accessed 26 June 2009.
 14. Jain RK, Pappu HR, Pappu SS, Varma A, Ram RD (1998) Molecular characterization of *Papaya ringspot potyvirus* isolates from India. *Annals of Applied Biology* 132:413-425.
 15. Jain RK, Sharma J, Sivakumar AS, Sharma, PK, Byadgi AS, Verma AK, Varma A (2004) Variability in the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* isolates from multiple locations in India. *Arch Virol* 149:2435-2442.
 16. Kalleshwaraswamy CM, Krishna Kumar NK (2008) Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. *Phytopathology* 98(5):541-546.
 17. Lima RCA, Lima JAA, Souza Jr MT, Pio-Ribeiro G, Andrade GP (2001) Etiologia e estratégias de controle de viroses do maoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 26:689-702.

18. Lima RCA, Souza Jr MT, Pio-Ribeiro G, Lima JAA (2002) Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27:174-180.
19. Lu YW, Shen WT, Zhou P, Tang QJ, Niu YM, Peng M, Xiong, Z (2008) Complete genomic sequence of a Papaya ringspot virus isolate from Hainan Island, China. *Arch Virol* 153:991-993.
20. Mangrauthia SK, Parameswari, Jain RK, Praveen S (2008) Role of Genetic Recombination in the Molecular Architecture of *Papaya ringspot virus*. *Biochem Genet* 46:835-846.
21. Mangrauthia SK, Singh Shayka VP, Jain RK, Praveen S (2009) Ambient temperature perception in papaya for *Papaya ringspot virus* interaction. *Virus Genes* 38:429-434.
22. Martins DS, Ventura JA (2007) Vetores de doenças do mamoeiro: monitoramento e controle. *Papaya Brasil* 2007:115-128.
23. Olarte Castillo XA, Fermin G, Tabima J, Rojas Y, Tennant PF, Fuchs M, Sierra F, Bernal AJ, Restrepo S (2011) Phylogeography and molecular epidemiology of *Papaya ringspot virus*. *Virus Research* 169(2):132-149.
24. Portal O, Cabrera D, Sánchez A, Darias AL, González JE, Gómez R (2006) Molecular characterization of two Cuban isolates of *Papaya ringspot virus* by means of coat proteins analysis. *Commun Agric Appl Biol Sci* 71:1203-1205.
25. Purcifull DE, Edwardson JR, Hiebert E, Gonsalves D (1984) *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. Description of plant viruses, 292. 8p.
26. Rezende JAM, Muller GW (1995) Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 3:185-226.
27. Rodríguez D, Tornet Y, Alonso M, Valero L, Peña I, Figueira AR, Ramos R (2011) Severidade da mancha anelar do mamoeiro em diferentes genótipos do grupo Solo introduzidos em Cuba. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2(4):28-36.
28. Serrano LAL, Cattaneo LF (2010). O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Rev Bras Frutic* [online]. 32(3):0-0.
29. Shukla DD, Ward CW (1989) Structure of Potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv Virus Res* 36:273-314.
30. Silva-Rosales L, Becerra-Leor N, Ruiz-Castro S, Teliz-Ortiz D, Noa-Carranza JC (2000) Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of *Papaya ringspot virus* with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Arch Virol* 145:835-843.
31. Souza MT (1999) Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against *Papaya ringspot potyvirus*, partial characterization of the PRSV.

- Brazil. Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. PhD These, Cornell University.
32. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using *Maximum likelihood*, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* <http://mbe.oxfordjournals.org/>
 33. Tennant P, Fermin G, Fitch M, Manshardt R, Slightom J, Gonsalves D (2001) *Papaya ringspot virus* resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur J Plant Pathol* 107:645-653.
 34. Tennant PF, Fermin G, Roye M (2007) Viruses infecting papaya (*Carica papaya* L.): etiology, pathogenesis and molecular biology. *Plant Viruses* 1:178-188.
 35. Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D (2008) *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Mol Plant Pathol* 9:269-280.
 36. Wang HL, Yeh SD, Chiu RJ, Gonsalves D (1987) effectiveness of cross-protection by mild mutants of *Papaya ringspot virus* for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Disease* 71:491-497.
 37. Yeh SD, Gonsalves D (1984) Evaluation of induced mutants of *Papaya ringspot virus* for control by cross protection. *Phytopathology* 74:1086-1091.
 38. Yeh SD, Jan FJ, Chiang CH, Doong TJ, Chen MC, Chung PH, Bau HJ (1992) Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Papaya ringspot virus* RNA. *J Gen Virol* 73:2531-2541.

ARTIGO 2

**Análise dos genes P1 e HC-Pro de isolados do *Papaya ringspot virus*
coletados em regiões do Brasil e de Cuba**

Resumo Devido às conhecidas funções atribuídas à proteína *help* (HC-Pro) do *Papaya ringspot virus* (PRSV), o gene que a codifica tem sido objeto de intensivos estudos, com a finalidade de se desenvolver alternativas de controle para a mancha anelar do mamoeiro, evitando assim as grandes perdas de produção causadas por essa doença. Neste trabalho foram amplificados e sequenciados o gene HC-Pro de 21 isolados brasileiros e 5 cubanos e também o gene da proteína P1 de dois isolados brasileiros e de quatro cubanos. As sequências obtidas foram comparadas entre si e com outras disponíveis no *GenBank*, com o auxílio dos programas CLUSTALW, MEGA blast e MEGA5. Adicionalmente, foram feitas análises de possíveis sítios de recombinação com o programa RDP3. Os resultados mostraram menores distâncias e maiores identidades de nucleotídeos e aminoácidos entre os isolados provenientes de mesmas regiões, quando comparados com aqueles de regiões distantes. Nas árvores filogenéticas, os isolados também se agruparam de acordo com a região geográfica, quando foram consideradas as sequências de nucleotídeos de ambos os genes, HC-Pro e P1, com os isolados cubanos do ocidente sempre distantes dos do oriente, indicando possíveis origens diferentes para eles. As análises de recombinação indicaram um evento de recombinação no isolado cubano CbMY-1 com parentais provenientes de Cuba e do Brasil.

Palavras-chave: PRSV-P. P1. HC-Pro. Distância gênica. Identidade. Filogenia. Recombinação.

Analyses of P1 and HC-Pro genes of *Papaya ringspot virus* collected in Brazil and Cuba regions

Abstract Considering the role of the gene encoding the helper component proteinase (HC-Pro) of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in the disease spread and development, it has been intensively studied, aiming to create alternative control measures against ringspot disease, to avoid the huge yield losses that it causes in papaya plantation. In this work the HC-Pro gene from 21 Brazilian and 5 Cuban PRSV-P isolates and also the P1 gene of two Brazilian and four Cuban isolates of this virus were amplified, sequenced and compared among themselves and with other virus isolates from GenBank, using CLUSTALW, MEGA blast and MEGA5 programs. Besides that, were made analyses to search for possible recombination events, using the RDP3 program. Smaller distances and higher nucleotide and amino acid identities were observed among isolates collected in the same geographical regions, when compared to those from more distant regions. In the phylogenetic tree based on nucleotide sequence of both genes, HC-Pro and P1, the isolates also grouped according to different geographical regions. The Cuban PRSV-P isolates were always grouped into two distant groups, from east and west regions, indicating possible difference in geographical origin. The recombination analyses showed one recombination event in the Cuban isolated CbMY-1, involving parents from Cuba and Brazil.

Keywords: PRSV-P. P1. HC-Pro. Genetic distance. Identity. Phylogeny. Recombination.

Introdução

Os *Potyvirus* constituem um grande grupo de fitovírus que compreendem 30% das espécies de vírus conhecidas e infectam mais de 100 espécies de plantas, incluindo várias culturas economicamente importantes. *Papaya ringspot virus* (PRSV), é um *Potyvirus* que infecta mamoeiro (*Carica papaya* L.) e cucurbitáceas, sendo um dos fatores mais limitantes da produção no mundo. O virion do PRSV consiste em uma partícula alongada e flexuosa de 760-800 nm x 12 nm, que contém uma fita simples de RNA, senso positivo, de 10,317 a 10,335 nucleotídeos (nts) (NCBI acessos EF017707 e EU475877), com uma única ORF que codifica uma poliproteína de 3,342 a 3,344 aminoácidos que, posteriormente, é clivada gerando nove proteínas: estrutural (capa proteica – CP (35K)), P1 (63 K), HC-Pro (52 K), P₃ (46 K), CI (72 K), 6 K, VPg (21K), NIaPro (27K) e NIb (59 K) [26]. A maioria dos produtos gênicos está envolvida em múltiplos processos da replicação viral, movimento e patogênese [18, 27, 29].

A proteína HC-Pro (*helper component proteinase*) é uma das proteínas que têm sido intensivamente estudadas [8, 12, 13, 29]. Ela é codificada pelo segundo *cistron* do genoma e tem atividade protease que lhe permite separar-se da proteína P3, localizada na sua extremidade carboxila. Adicionalmente, possui os domínios conservados KITC e PTK, que estão envolvidos na interação do virion com o interior do estilete dos afídeos vetores no processo de transmissão não persistente [29]. Estudos realizados por diversos autores têm demonstrado o envolvimento da proteína HC-Pro nos processos de replicação viral, movimento célula a célula e a longa distância, e na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Mas, a sua verdadeira função ainda não tem sido bem definida [13, 17, 27, 29]. Assim sendo, estudos do gene HC-Pro poderiam contribuir para esclarecer questões filogeográficas que envolvem o PRSV,

contribuindo para o seu melhor conhecimento e facilitando o desenvolvimento de estratégias de controle envolvendo proteção cruzada e uso de plantas transgênicas.

Plantas infectadas por PRSV apresentam sintomas que vão desde mosaico, clorose e distorção foliar, até manchas anelares nos frutos, além de estrias e manchas de aspecto oleoso no caule e pecíolos [18]. O controle do vírus inclui uso de práticas culturais, tais como *roguing* de plantas infectadas, uso de barreiras naturais, rotação de culturas, entre outras práticas modernas, como a proteção cruzada e a transformação genética de plantas, na procura de plantas resistentes [2]. A proteção cruzada usando estirpes atenuadas do vírus tem sido testada no Havaí [30], em Taiwan [28, 31] e no Brasil [19, 20], mas essa medida tem mostrado sucesso limitado na proteção das plantas, quando infectadas por outras estirpes de PRSV. Essa limitação no sucesso da proteção deve-se, entre outros motivos, ao nível de similaridade da sequência de nts entre o vírus protetor e o vírus desafiante [5, 25, 26]. Adicionalmente, os estudos sobre a obtenção das plantas resistentes via transgenia, que têm sido usada com sucesso para controlar o PRSV-P no Havaí [3, 4, 10], têm demonstrado que um dos fatores importantes para o sucesso dessa técnica é a similaridade entre as sequências dos nts do trans-gene e o vírus desafiante [26], entre outros fatores [24].

Desse modo, é evidente que informações sobre a variabilidade genética entre isolados virais de diferentes regiões geográficas são necessárias para desenvolver estratégias de controle eficientes e duráveis contra PRSV, baseadas na proteção cruzada e na transformação genética de plantas. Neste trabalho, foram sequenciados e analisados os genes da HC-Pro de 21 isolados de PRSV coletados em diferentes regiões geográficas do Brasil, e cinco isolados coletados em Cuba, e os genes P1 de seis desses isolados, visando conhecer sua variabilidade e filogenia.

Material e Métodos

Coleta e manutenção de isolados

Durante os anos de 2010 e 2011, foram coletados 21 isolados de PRSV, em dez estados do Brasil e cinco em quatro províncias de Cuba, por meio da coleta e da análise de folhas de mamoeiro com sintomas de mancha anelar. Esses isolados foram inoculados mecanicamente em plântulas de mamoeiro, armazenados, *in natura*, a -80 °C ou dessecados e armazenados, a -20 °C, para inoculação e multiplicação em hospedeiras suscetíveis, sempre que necessário. Detalhes das origens dos isolados coletados e das sequências de 24 isolados do PRSV disponíveis no *GenBank* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 Origem e denominação dos isolados de *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) e isolados registrados no *GenBank*, utilizados no estudo

Estudados neste trabalho				Disponíveis no <i>GenBank</i>		
País	Isolado	Estado/Prov.	Município	País	Isolado	Acesso No.
Brasil	BrMG-1	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Br-PRSV-W-1	DQ374153
Brasil	BrMG-2	Minas Gerais	Lavras	Brasil	Br-PRSV-W-C	DQ374152
Brasil	BrMG-3	Minas Gerais	Lavras	México	Mx-VrPro	AY231130
Brasil	BrMG-4	Minas Gerais	Lavras	USA	USA-Haw-PG	EU126128
Brasil	BrBA-1	Bahia	Cruz das Almas	Colômbia	Co-VC29	HQ328803
Brasil	BrBA-2	Bahia	Cruz das Almas	Colômbia	Co-T-SRM	GU797470
Brasil	BrSP-1	São Paulo	Itapira	Venezuela	Ve-M-Tovar	GU797471
Brasil	BrSP-2	São Paulo	Itapira	Venezuela	Ve-M-Mucuy	GU797472
Brasil	BrSP-3	São Paulo	Itapira	Venezuela	Ve-T-RioPoco	GU797473
Brasil	BrSP-4	São Paulo	Itapira	Venezuela	Ve-M-Chiguara	GU797474
Brasil	BrSP-5	São Paulo	Mococa	Venezuela	Ve-M-Lagunillas	GU797475
Brasil	BrRJ-1	Paraná	Maringá	Índia	In-PRSV	EU475877
Brasil	BrPR-1	Paraná	Maringá	Índia	In-PRSV-DEL	EF017707
Brasil	BrPR-2	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	China	Ch-HN-1	HQ424465
Brasil	BrAM-1	Amazonas	Manaus	China	Ch-PRSV-P	EF183499
Brasil	BrES-1	Espírito Santo	Linhares	Taiwan	Ta-CI	AY027810
Brasil	BrES-3	Espírito Santo	Linhares	Taiwan	Ta-PRSV-2	X97251
Brasil	BrMA-7	Maranhão	São Luís	Taiwan	Ta-PRSV-SLD	DQ340769
Brasil	BrMA-8	Maranhão	São Luís	Taiwan	Ta-PRSV-P-5-19	EU882728
Brasil	BrPA-1	Paraíba	Pombal	Taiwan	Ta-HA	X67673
Brasil	BrDF-1	D. Federal	DF	Taiwan	Ta-PRSV-SLM	DQ340771
Cuba	CbMY-1	Mayabeque	Nueva Paz	Sul Coreia	SK-PRSV-W	AB369277
Cuba	CbMT-1	Matanzas	Colón	Tailândia	Th-PRSV-P	AY162218
Cuba	CbMT-2	Matanzas	Jagüey Grande	Tailândia	Th-PRSV-W	AY010722
Cuba	CbGR-1	Granma	Jiguani			
Cuba	CbHG-1	Holguín	Holguín			

Extração de RNA, RT-PCR, purificação e sequenciamento

O RNA total foi extraído a partir de folhas jovens de mamoeiros infectadas, pelo método de Trizol [1]. A partir das sequências de bases de PRSV disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foi desenhado um par de *primers*, PRSV1593-F (5'-TYAARCCRAARTTYGCGY-3') e PRSV3079-R (5'-CATTTCATCTCGAGYGG-3'), que amplificam um fragmento de, aproximadamente, 1,487 pb contendo o gene HC-Pro. Esses *primers* foram utilizados para todos os isolados, exceto BrPR-2, BrAM-1, CbMT-1, CbMT-2, CbVC-1 e CbGR-1, para os quais foram utilizados os *primers* FHCP-566 (5'-AATGACGTGGCTGAAAAATTCTGGC-3') e RHCP-

566 (5'-GCCGACAATGTAGTGCT TCATTTCA-3') [16], devido ao não funcionamento dos *primers* anteriores.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total extraído, utilizando-se os *primers* PRSV3079-R e RHCP-566, e a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega, Corp. Madison/WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi feita a amplificação por PCR com a enzima GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Corp. Madison/WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e com ambos os pares de *primers*, utilizando-se uma desnaturação inicial a 95 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 50 °C, por 1 minuto (para os *primers* PRSV1593-F e PRSV3079-R) e 56°C (para FHCP-566 e RHCP-566); 72 °C por 1,5 minutos e extensão final, a 72 °C, por 5 minutos.

Adicionalmente, para os isolados BrMG-4, BrSP-3, CbMY-1, Cb-MT-2, CbGR-1 e CbHG-1, foram amplificados fragmentos do gene P1 com combinações dos *primers* PRSV8-F (5'-ACATCTCAACACAAC-3')/PRSV963-R (5'-RTGYAAYTCAAGRCTARC-3') e PRSV713-F (5'-ACRATACAGATTGGGG-3')/ PRSV1824-R (5'-GTAACRTCCATRTCAGAYGTGC-3'), desenhados com base em sequências desse gene disponíveis no *GenBank*. Para as RT-PCR seguiram-se os mesmos ciclos descritos, variando a temperatura de anelamento entre 44,7 °C e 46 °C, para ambos pares de *primers*, respectivamente.

Os produtos obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, purificados com o auxílio do kit de purificação da Quiagen, seguindo as recomendações do fabricante (Quiagen, São Paulo, SP, Brasil).

Todos os produtos purificados foram enviados diretamente para sequenciamento, exceto os produtos do gene HC-Pro dos isolados BrPR-2, BrAM-1, CbMT-1, CbMT-2, BrDF-1 e CbGR-1, cujos fragmentos obtidos por

PCR e purificados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega Corp. Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

A confirmação dos recombinantes que continham o fragmento de interesse foi feita por PCR com os mesmos *primers* utilizados na amplificação e posterior análise em gel de agarose 0,7%. Os plasmídeos contendo os fragmentos genômicos de interesse foram enviados para sequenciamento. Todos os sequenciamentos foram feitos na empresa *Genewiz* (South Plainfield, NJ, USA).

Alinhamento e análise das sequências

Os contigs, baseados nas sequências obtidas, foram construídos utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler v2 (www.dnabaser.com). Depois, eles foram analisados por intermédio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível *online* no *website* do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nts e aminoácidos obtidos neste trabalho e outros disponíveis no *GenBank* (Tabela 1) foram realizados utilizando-se o programa ClustalW incluso no MEGA5 [23]. Foram feitas comparações das distâncias (pelo método de *pairwise* incluso no MEGA5) e identidades entre nucleotídeos e aminoácidos e árvores filogenéticas pelo método de *Neighbor Joining*, com bootstrap, considerando-se valores superiores a 2,000 repetições.

Com o objetivo de analisar possíveis sítios de recombinação nas proteínas P1 e HC-Pro, foram feitas análises com o auxílio do programa *Recombination Detection Program* v.3.44 (RDP3) [14], com os parâmetros padrões para os programas implementados RDP, GENCONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScam e 3Seq.

Resultados e Discussão

A distância gênica entre todas as sequências de nucleotídeos usada no estudo (n=50) mostrou valores entre 0 e 0,174 (Fig. 1), tendo as maiores distâncias ocorrido entre isolados da América e da Ásia. Considerando-se apenas os isolados sequenciados neste trabalho (n=26), observaram-se menores distâncias, o que já era esperado, por serem isolados de apenas dois países da América. Os valores obtidos foram de 0 a 0,108, tendo os menores ocorrido entre isolados de cada país e os maiores entre isolados de Cuba e o Brasil. Entre os isolados brasileiros (n=21), observaram-se menores distâncias (0 a 0,1), indicando menor variabilidade entre eles, tendo os isolados BrBA-2, BrAM-1 e BrPA-1 mostrado as maiores distâncias, quando comparados aos restantes, exceto entre BrBA-2 e BrBA-1, ambos da Bahia. Entre os isolados cubanos (n=5), as distâncias observadas foram de 0,012 a 0,089, tendo os menores valores sido observados entre os isolados das mesmas regiões e os maiores entre aqueles que foram coletados em áreas mais distantes, como o CbGR-1 e o CbMT-2, que apresentaram o maior valor.

As porcentagens das identidades entre sequências de nucleotídeos (valores não mostrados) corroboraram as análises de *pairwise*, com maiores porcentagens de identidades entre isolados das mesmas regiões, tanto quando foram incluídas todas as sequências (n=50), que apresentaram identidades entre 81,4% e 100%, como quando foram comparadas apenas as sequências deste trabalho (n=26), cujas identidades foram maiores (88,7%-100%). As identidades entre isolados brasileiros foram de 89,6%-100%, com os menores valores observados entre BrBA-2, BrPA-1 e BrAM-1, com os restantes isolados brasileiros, do mesmo modo que o observado na análise de *pairwise*. Neste caso, 100% de identidade foi observado entre os isolados do Espírito Santo, BrES-1 e BrES-3. Entre os isolados cubanos, as identidades foram menos

variáveis, com valores entre 90,38% e 98,8%, igualmente com maiores identidades entre isolados das mesmas regiões que entre regiões distantes.

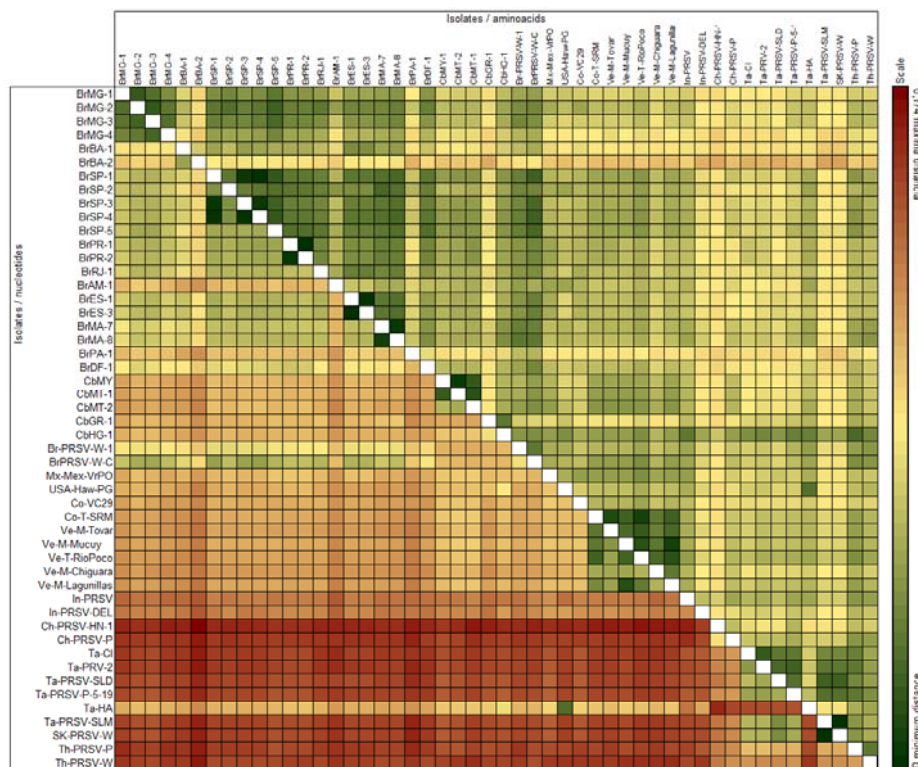


Figura 1 Distâncias genéticas estimadas (análise de *pairwise* mediante deleção de *gaps*) entre sequências de nucleotídeos e entre sequências de aminoácidos do gene HC-Pro de isolados de PRSV procedentes do Brasil e de Cuba, e de outras regiões do mundo disponíveis no *GenBank*. Alinhamentos múltiplos de sequências e análises evolutivas foram realizados pelo programa MEGA5

Quando analisadas as sequências de aminoácidos pelo método de *pairwise* (Fig. 1), observou-se que as distâncias foram menores, quando comparadas com as sequências de nts, indicando que as substituições de nucleotídeos foram sinônimas. Como observado para as sequências de nts, as

distâncias entre isolados da América e da Ásia foram maiores, com valores que variaram entre 0 e 0,09. Por outro lado, entre os isolados sequenciados neste trabalho (n=26), as distâncias ficaram entre 0 e 0,086, com maiores valores entre os isolados dos dois países, como, por exemplo, 0,086 entre BrBA-2 e CbGR-1. Entre os isolados brasileiros (n=21), os valores variaram entre 0 e 0,081, tendo o BrBA-2 sido o mais distante do resto. Entre isolados cubanos (n=5), as distâncias foram menores, com valores entre 0,002 e 0,059. O mesmo foi observado entre as sequências de nucleotídeos, que apresentaram menores distâncias entre os isolados das mesmas regiões.

As análises de identidade entre sequências de aminoácidos (dados não mostrados) confirmaram os resultados de *pairwise*, com similaridades entre 91% e 100%, quando analisadas todas as sequências (n=50), ou quando foram analisadas apenas as sequências dos isolados coletados e estudados neste trabalho (n=26). Estas mostraram valores entre 91% e 100%, sendo maiores entre as sequências dentro do mesmo país (Brasil: 93%-100%; Cuba: 94%-100%) e entre isolados de regiões mais próximas. Um fato a destacar é que existiu 100% de similaridade entre as sequências dos aminoácidos dos isolados BrSP-1 e BrSP-4, BrPR-1 e BrPR-2, e BrES-1 e BrES-3, todos dos mesmos municípios.

Em todos os casos analisados, observaram-se menores distâncias e, portanto, menor variabilidade entre os isolados provenientes de uma mesma região do que entre regiões distantes geograficamente, o que coincide com os resultados obtidos para as sequências da CP destes mesmos isolados estudados pelos autores (dados não mostrados) e com os obtidos por outros autores [9, 22].

A árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos indicou dois grandes agrupamentos dos isolados (Fig. 2A), sendo um primeiro *cluster* (I) constituído pelos isolados da América com dois da Índia e um do Taiwan, e um segundo *cluster* (II), que agrupou os demais isolados da Ásia. O primeiro *cluster*

(I) foi dividido também em três menores, sendo o primeiro deles (Ia) constituído pelos isolados brasileiros agrupados por regiões geográficas e BrPA-1 e BrAM-1 mais distantes do resto, coincidindo com as análises de *pairwise* e identidades gênicas. O segundo (Ib) foi formado pelos restantes isolados da América que incluem Cuba, Estados Unidos, México, Colômbia e Venezuela com um isolado de Taiwan, e finalmente, o terceiro *cluster*, menor (Ic), com dois isolados da Índia. Por sua vez, o *cluster* Ib agrupou os isolados da região oriental de Cuba, com o isolado de Havaí e de Taiwan (Ib₁), separadamente daqueles da região ocidental cubana que ficaram agrupados com os de México, Colômbia e Venezuela (Ib₂).

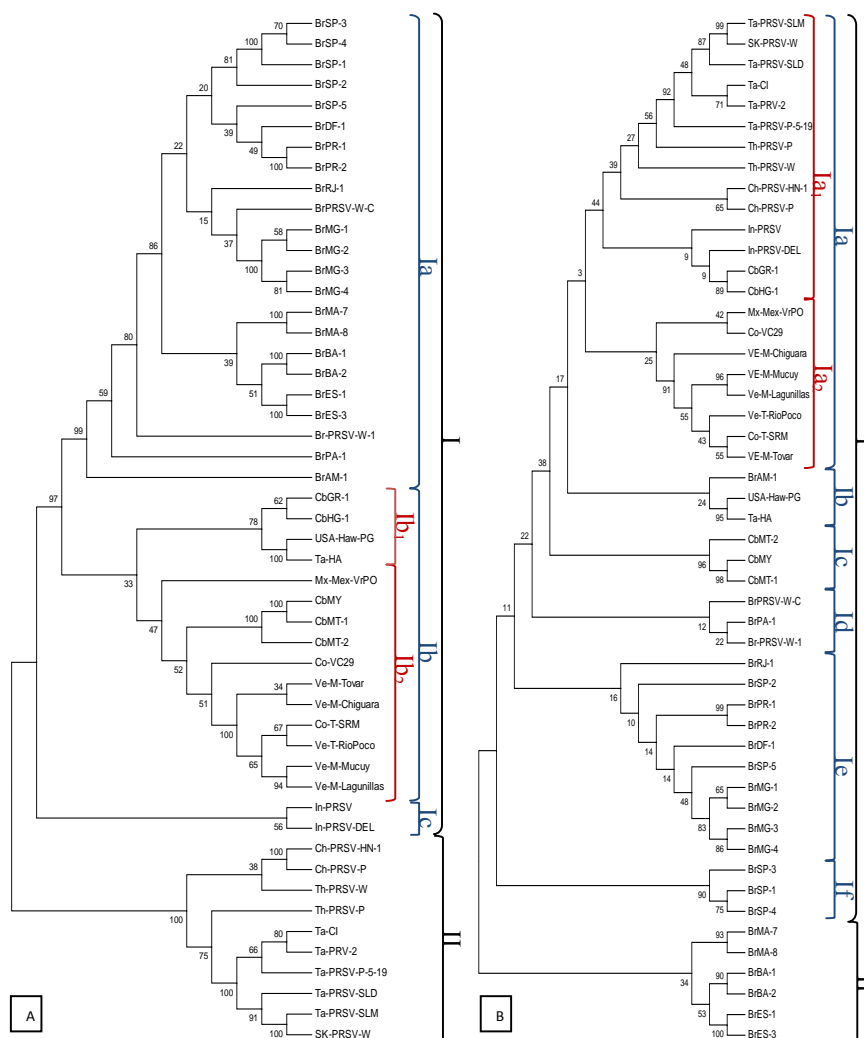


Figura 2 Análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) do gene HC-Pro de isolados de PRSV procedentes do Brasil e de Cuba, e outras regiões do mundo, disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos pelo programa MEGA5, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com 2,000 repetições. Coincidência em números romanos, letras e/ou subíndices indicam agrupamentos comuns

Quando as sequências de aminoácidos foram analisadas, observou-se que todos os isolados tinham os domínios conservados KITC e PTK (dados não mostrados) que, segundo alguns relatos, estão envolvidos nas interações do vírion com a estrutura do estilete dos afídeos vetores durante o processo de transmissão não persistente [29].

Nas árvores baseadas na sequência de aminoácidos, construídas pelo método de *Neighbor Joining*, os isolados se agruparam de modo diferente ao das sequências de nucleotídeos. Neste caso, formaram-se dois *clusters* maiores, sendo um que agrupou a maioria dos isolados (I) e outro que agrupou só os isolados brasileiros dos estados do Maranhão, Bahia e Espírito Santo. O outro *cluster* maior se subdividiu em vários grupos, tendo um deles (Ia) agrupado os isolados da Ásia e os da região oriental de Cuba (Ia₁) com os de México, Colômbia e Venezuela (Ia₂). Dentro desse primeiro cluster maior (I), também se formaram grupos pequenos com isolados de diferentes países: Brasil (BrMA-1) com Havá e Tailândia (Ib); os da região ocidental de Cuba (Ic); um brasileiro, da Paraíba, com dois de São Paulo e o do Distrito Federal disponível no *GenBank* (Id) e os restantes do Brasil (Ie e If).

O agrupamento diferente baseado nas sequências de nucleotídeos, quando comparado com as sequências de aminoácidos, mostrou que estas têm variado mais para cada região geográfica, permitindo uma melhor distinção dos isolados por região. Por outro lado, as sequências de aminoácidos apresentaram menor variabilidade, mantendo as distâncias entre isolados de diferentes regiões menores. Essa maior conservação da proteína HC-Pro poderia estar relacionada com a necessidade de manutenção das suas diversas funções. Como já ressaltado por Olarte-Castillo et al. [16], esses resultados contribuem para esclarecer algumas questões relacionadas à distribuição ou à movimentação do PRSV.

Quando foram analisados os isolados que tiveram também o gene P1 sequenciado, a árvore filogenética, construída com base na sequência de

nucleotídeos dos genes P1 e HC-Pro (Fig. 3), mostrou três grupos. Um deles (I) agrupou os isolados da América com um de Taiwan; o segundo (II) agrupou os isolados da Índia que, por sua vez, ficaram mais próximos dos americanos que dos restantes asiáticos, os quais ficaram separados em outro *cluster* (III), do mesmo modo que o ocorrido quando analisadas as sequências de nucleotídeos de HC-Pro e da CP (dados não mostrados). Curiosamente, os isolados da região ocidental de Cuba ficaram mais próximos dos brasileiros (Ia) em relação àqueles da região oriental, que ficaram perto dos isolados de México, Havaí e Taiwan (Ib), confirmando a hipótese de possíveis origens diferentes para os isolados de PRSV presentes em Cuba.

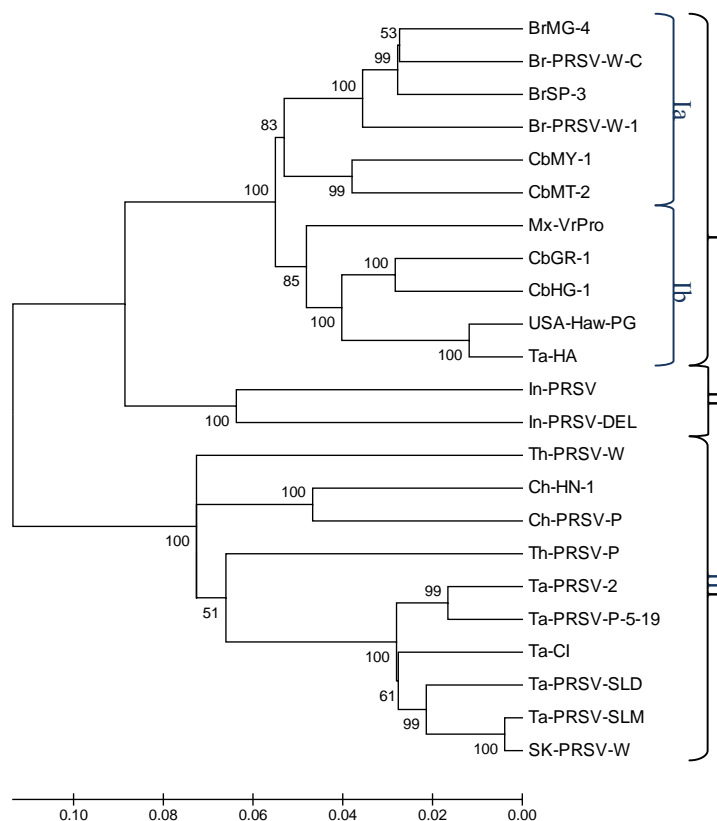


Figura 3 Análises filogenéticas derivadas das sequências de nucleotídeos dos genes P1 e HC-Pro de alguns isolados de PRSV procedentes do Brasil e de Cuba, e outras regiões do mundo, disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos pelo programa MEGA5, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com 2,000 repetições. Coincidência em números romanos e letras indicam agrupamentos comuns

Os grupos filogenéticos obtidos para as sequências de nucleotídeos neste estudo coincidem com o tipo de agrupamento obtido por outros autores, quando analisaram a HC-Pro e o genoma completo do PRSV [7, 11, 13, 15, 16].

A análise de recombinação realizada permitiu encontrar um evento de recombinação no isolado cubano CbMY-1, suportado pelos programas RDP

(Av. P-val= 4.580×10^{-37}), GENECONV (Av. P-val= 5.278×10^{-29}), BootScan (Av. P-val= 1.8780×10^{-37}), MaxChi (Av. P-val= 3.247×10^{-19}), Chimarea (Av. P-val= 1.121×10^{-27}), SiScan (Av. P-val= 3.105×10^{-25}) e 3Seq (Av. P-val= 1.505×10^{-30}). Neste recombinante são propostos, como maior e menor parentais, os isolados CbMT-2 (95,2%) e BrSP-3 (99,8%), respectivamente. Existem evidências de algum ponto de recombinação na região 5'-UTR, antes da P1, que não foi sequenciado neste trabalho, até o nucleotídeo 836, tendo, nesta região, sido observada a sequência do isolado BrSP-3. A partir deste ponto, a sequência foi substituída pela do isolado CbMT-2 (Fig. 4).

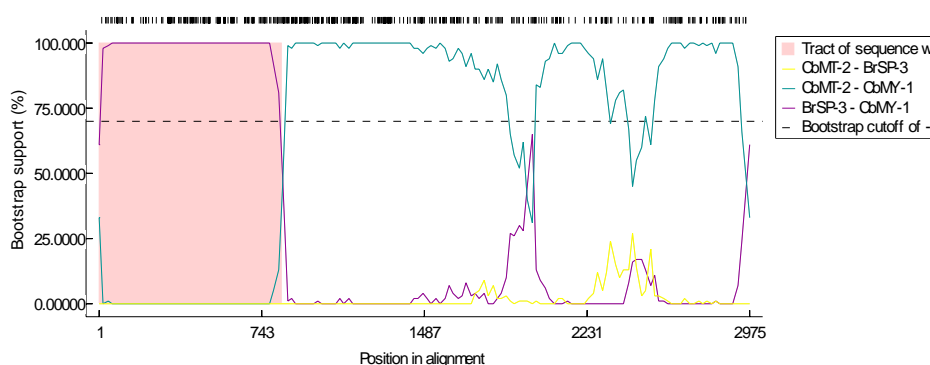


Figura 4 Gráfico de recombinação gerado a partir do programa RDP3, utilizando os parâmetros padrões para *Bootscan*, mostrando as possíveis regiões recombinantes entre os isolados CbMT-2 de Cuba e BrSP-3 do Brasil

É interessante a evidência de um possível evento de recombinação entre um isolado cubano e outro brasileiro, baseado apenas nas sequências dos genes P1 e HC-Pro. Esse fato poderia sugerir possíveis movimentos do PRSV-P entre Cuba e Brasil, que também é sustentado pela proximidade filogenética existente entre isolados brasileiros e os da região ocidental de Cuba (Fig. 3).

Outras evidências de recombinação têm sido relatadas. Mangrauthia et al. [13], quando sequenciaram o genoma completo do isolado PRSV-P-Indian e

o compararam com outros 14 isolados do resto do mundo, encontraram sítios de recombinação em todo o genoma, exceto no gene 6K. Esses autores detectaram uma proporção de pontos de recombinação significativa no gene P1, seguido pelos genes P3, CI e HC-Pro, sendo menor nos restantes genes. Do mesmo modo, Noa-Carrazana et al. [15], estudando o genoma do isolado mexicano Mx-VrPro e comparando-o com outros cinco isolados de Taiwan e Tailândia, acharam evidências de 13 possíveis sítios de recombinação em todos os genes, incluindo as regiões não traduzíveis (UTR), exceto 6 K. Nesse estudo os autores encontraram a maior quantidade de sítios de recombinação no gene P1, seguido pelos genes P3, NIa, NIB e HC-Pro, tendo, nas demais regiões, sido encontrado apenas um sítio.

Os resultados obtidos neste trabalho denotam a importância de serem desenvolvidos outros estudos, com maior número de genes sequenciados, para isolados de cada região. Isso permitirá um maior conhecimento da diversidade genética de PRSV-P nos dois países. De qualquer modo, este trabalho disponibiliza uma ampla quantidade de isolados com o gene HC-Pro sequenciado, para diferentes regiões do Brasil, onde as informações têm sido escassas para este gene, e para cinco isolados de Cuba, onde estas são as primeiras sequências deste gene e de P1 disponíveis para o PRSV-P. Essas informações certamente contribuirão para o melhor entendimento da diversidade genética deste vírus nos dois países, além de oferecer ferramentas úteis para as estratégias de manejo da mancha anelar de mamoeiros nesses locais.

Agradecimentos Ao Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e o financiamento deste projeto; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio no financiamento de reagentes e recursos para o projeto, e aos colegas Aurivan Soares (UFLA), Cristiane de Jesús Barbosa (Embrapa), Emí Lorenzetti (UFLA),

Hermes Peixoto (Embrapa), João Eduardo de Melo (UFLA), Justo González (UNICA), Luis Gasparotto (Embrapa), Flávio H. R. Moraes (CEUMA), Enilton Santana (INCAPER), Daniel Schurt (Embrapa), Keize Junqueira (Embrapa) e Maita Ávila (UNICA), por terem fornecido parte dos isolados avaliados neste trabalho.

Referencias

1. AFGC: ARABIDOPSIS FUNCTIONAL GENOMICS CONSORTIUM. Total RNA isolation (2002). Disponível em: <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>. Acesso em: 09 set 2010.
2. Fermin G, Castro LT, Tennant PF (2010) CP-transgenic and non-transgenic approaches for the control of papaya ringspot: current situation and challenges. *Transgenic Plant J* 4: 1–15.
3. Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. *BioTechnology* 10:1466-1472.
4. Fuchs M, Gonsalves D (2007) Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol* 45:173-202.
5. Gonsalves D (1998) Control of *Papaya ringspot virus* in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* 36:415-437.
6. Hanahan DJ (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(2):558-580.
7. Inoue-Nagata AK, Franco CM, Martin DP, Rezende JAM, Ferreira GB, Dutra LS, Nagata T (2007) Genome analysis of a severe and a mild isolate of *Papaya ringspot virus*-type W found in Brazil. *Virus Genes* 35:119-127.
8. Kasschau KD, CARRINGTON JC (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285(1):71-81.
9. Lima RCA, Souza Jr MT, Pio-Ribeiro G, Lima JAA (2002) Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27:174-180.
10. Lius S, Manshardt RM, Fitch MMM, Slightom JL, Sanford JC, Gonsalves D (1997) Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against *Papaya ringspot virus*. *Mol Breeding* 3:161-168.
11. Lu YW, Shen WT, Zhou P, Tang QJ, Niu YM, Peng M, Xiong, Z (2008) Complete genomic sequence of a Papaya ringspot virus isolate from Hainan Island, China. *Arch Virol* 153:991-993.

12. Maia IG, Haenni AL, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of Genetic Virology* 77:1335-1341.
13. Mangrauthia SK, Singh P, Praveen S (2010) Genomics of Helper Component Proteinase Reveals Effective Strategy for Papaya ringspot virus Resistance. *Mol Biotechnol* 44: 22-29
14. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinforma* 26:2462–2463. doi:10.1093/bioinformatics/btq467.
15. Noa-Carrazana JC, González de León D, Silva Rosales L (2007) Molecular characterization of a severe isolate of *Papaya ringspot virus* in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes* 35(1):109-117.
16. Olarte Castillo XA, Fermin G, Tabima J, Rojas Y, Tennant PF, Fuchs M, Sierra F, Bernal AJ, Restrepo S (2011) Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus. *Virus Research* 169(2): 132-149.
17. Pirone TP, Blanc S (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34: 227-247.
18. Purcifull DE, Edwardson JR, Hiebert E, Gonsalves D (1984) *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. Description of plant viruses, 292. 8p.
19. Rezende JAM, Pacheco DA (1998) Control of *Papaya ringspot virus*-type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. *Plant Dis* 82:171–175
20. Rezende JAM, Yuki VA, Vega J, Scagliusi SMM, Borba, LF, Costa AS (1994) Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. *Fitopatol Bras* 19:55–61.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory v.3, 253p.
22. Silva-Rosales L, Becerra-Leor N, Ruiz-Castro S, Teliz-Ortiz D, Noa-Carrazana JC (2000) Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of *Papaya ringspot virus* with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Arch Virol* 145:835-843
23. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using *Maximum likelihood*, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* <http://mbe.oxfordjournals.org/>
24. Tennant P, Fermin G, Fitch M, Manshardt R, Slightom J, Gonsalves D (2001) *Papaya ringspot virus* resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur J Plant Pathol* 107:645-653.
25. Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch MMM, Manshardt RM, Slightom JL, Gonsalves D (1994) Differential protection against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross protected papaya. *Phytopathology* 84:1359-1366.

26. Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D (2008) *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Mol Plant Pathol* 9:269-280.
27. Urcuqui-Inchima S, Hainni AL, Bernardi F (2001) *Virus Res.* 74, 157. doi:10.1016/S0168-1702(01)00220-9.
28. Wang HL, Yeh SD, Chiu RJ, Gonsalves D (1987) effectiveness of cross-protection by mild mutants of *Papaya ringspot virus* for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Disease* 71:491-497.
29. Yap YK, Duangjit J, Panyim S (2009) N-terminal of Papaya ringspot virus type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes* 38:461-467.
30. Yeh SD, Gonsalves D (1984) Evaluation of induced mutants of *Papaya ringspot virus* for control by cross protection. *Phytopathology* 74:1086-1091.
31. Yeh SD, Gonsalves D, Wang HL, Namba R, Chiu RJ (1988) Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. *Plant Disease* 72:375-380.

ARTIGO 3

Detecção e Caracterização de um isolado do *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) infectando abóbora em Cuba

Resumo As abóboras, conhecidas desde tempos remotos nas Américas, constituem importante fonte de alimento para a população, em todos os países onde são cultivadas, incluindo Cuba, onde a sua cultura tem aumentado nos últimos anos. Dentre as doenças que afetam essas plantas, o mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV) tem sido considerado uma das mais importantes viroses, embora não tenha ainda sido relatado anteriormente em Cuba. Neste trabalho, um isolado procedente de plantas de abóbora com sintomas severos de mosaico e deformação foliar, coletado em Cuba, foi analisado utilizando-se plantas indicadoras, microscopia eletrônica e análise filogenética. Quando inoculado mecanicamente em abóbora cv. Caserta, esse isolado induziu sintomas de mosaico, embolhamento e distorção foliar, entretanto não foi capaz de infectar mamoeiro cv. Solo. Observações ao microscópio eletrônico de transmissão mostraram partículas alongadas e flexuosas de aproximadamente 780-800 x 12nm, em preparações leaf dip. Foram amplificados e sequenciados os fragmentos genômicos contendo os genes da capa proteica e HC-Pro, empregando-se *primers* específicos para essas regiões do PRSV, e esses foram analisados e comparados a outros isolados disponíveis no GenBank. A identidade de nucleotídeos e a de aminoácidos foram superiores a 94%, quando comparados com outros isolados de PRSV-W da América. Na árvore filogenética, o isolado agrupou-se com outros isolados de América, Austrália e Índia e ficou mais distante dos isolados asiáticos. Em conjunto, as análises permitiram concluir que se trata da estirpe W do PRSV, sendo esta a sua primeira detecção em Cuba.

Palavras-chave: Mosaico. Distorção foliar. Capa proteica. HC-Pro. Sequenciamento. Filogenia.

Detection and Characterization of one isolate of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) infecting squash in Cuba

Abstract The squash (*Cucurbita pepo* L.), known since ancient times in the Americas, are an important source of food for the population in every country where they are cultivated. In Cuba, its culture has increased in recent years. Among the several diseases that affect squash, the mosaic caused by *Papaya ringspot virus* (PRSV) is considered one of the most important viral diseases of this crop, but has not yet been previously reported in Cuba. In this work, an isolate collected in squash plants with severe symptoms of mosaic and leaf deformation, grown in Cuba, was analyzed using indicator plants, electron microscopy and phylogenetic analysis. The squash cv. Caserta-inoculated plants, showed symptoms of mosaic, leaf distortion and blistering, but papaya-inoculated plants were not infected by this virus isolate. Transmission electron microscopic examination of leaf dip preparations made from infected squash leaves revealed the presence of elongated and flexuous particles with approximately 780-800 x 12nm. Genomic fragments containing the coat protein and HC-Pro genes were amplified with the PRSV-specific primers, and sequenced. The nucleotide and amino acid identities of both genes were higher than 94% when compared to other PRSV-W isolates from America. In the phylogenetic tree, this isolate grouped with other isolates from America, Australia and India and was more distant from the Asian isolates. Taken together, the analyses allow concluding that it is a W strain of the PRSV, detected in Cuba by the first time.

Keywords: Mosaic. Leaf distortion. Coat protein. HC-Pro. Phylogeny.

Introdução

Para atender à alta demanda de alimentos por parte da população, em Cuba, nos últimos anos, têm se incrementado notavelmente as áreas agrícolas dedicadas a cultivos, tanto em campo aberto quanto em casas de vegetação. Dentre essas culturas, as cucurbitáceas destacam-se devido à sua boa aceitação por parte da população. Dentro delas estão agrupadas diversas espécies de plantas de grande interesse econômico, sendo as mais populares o pepino (*Cucumis sativus* L.), a melancia (*Citrullus vulgaris* S.), o melão (*Cucumis melo* L.) e a abóbora (*Cucurbita pepo* L.) (12).

Dentre as abóboras do gênero *Cucurbita*, as espécies *Cucurbita moschata* P., *Cucurbita maxima* L. e *C. pepo* L., são as mais cultivadas nas Américas (9). Os frutos e as sementes da abóbora têm valor comercial já conhecido e são vendidos em forma de doces e petiscos, em mercados e feiras. Por outro lado, as folhas têm despertado grande interesse de pesquisadores na caracterização de seus compostos nutricionais, para averiguação de seu possível consumo e também como ingrediente inserido em alguns alimentos industrializados e/ou em receitas caseiras (7,14,21).

Como todos os vegetais, as cucurbitáceas podem ser afetadas por diversas doenças, entre as quais as de etiologia viral ocupam lugar de destaque e são conhecidas pelo seu difícil controle. Na natureza já foram encontrados 46 vírus e um viroide infectando plantas da família das cucurbitáceas (18), dentre os quais os mais importantes são: *Papaya ringspot virus* (PRSV): estirpe W (PRSV-W) e estirpe P (PRSV-P), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Squash mosaic virus* (SqMV) (6,20,23,25).

Considerando-se os diferentes gêneros de vírus que infectam essas plantas, as espécies do gênero *Potyvirus* se destacam por serem considerados

fatores limitantes nas principais regiões produtoras do mundo, afetando a qualidade dos frutos e reduzindo a produtividade (16,23). Isso ocorre devido ao elevado número de afídeos vetores e ao grande número de espécies hospedeiras dos vírus, dentro da família *Cucurbitaceae* (4,32).

Um dos vírus de grande importância para essa cultura é o PRSV, que pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, e tem uma partícula alongada e flexuosa, com 780-800 x 12 nm, constituída por RNA fita simples senso positivo (26). Esse vírus é transmitido de forma não persistente por mais de dez espécies de afídeos para diferentes espécies das famílias *Caricaceae* e *Cucurbitaceae*, dificultando seu controle. Os sintomas em abóbora se caracterizam pela aparição de mosaico intenso e redução drástica do limbo foliar e do desenvolvimento vegetativo, além de redução na produção e na qualidade dos frutos, que resultam em prejuízos de até 100%, dependendo da idade na qual as plantas são infectadas e da disseminação do vírus nas áreas onde ele ocorre. Os frutos também podem se apresentar deformados e com mudanças na coloração (11,13).

Não existem, até o momento, muitos estudos envolvendo a caracterização de PRSV em Cuba. Apenas dois isolados do PRSV-P tiveram o gene da CP parcialmente sequenciado e analisado (24). Neste trabalho, um isolado de PRSV-W foi identificado e caracterizado, pela primeira vez nesse país, em uma amostra abóbora com sintomas de mosaico e distorção foliar, coletada em uma área produtora localizada na província de Pinar del Río. Além do estudo dos sintomas induzidos por esse vírus em plantas de abóbora cv. Caserta, os genes da CP e HCPro foram sequenciados e analisados.

Material e Métodos

A amostra de folhas de abóbora foi coletada no município Los Palacios, na província Pinar del Río, onde as plantas apresentavam sintomas de mosaico

severo, distorção foliar e pouco desenvolvimento vegetativo. As folhas foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos, identificadas e mantidas dessecadas, a -20 °C e *in natura*, a -80 °C. Neste estudo, o isolado foi identificado como Cuba-PR.

Identificação Biológica

O extrato das folhas infectadas foi obtido por maceração em almofariz de porcelana, na presença de tampão fosfato 0.01 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1:10 (peso/volume). Este foi inoculado mecanicamente com o abrasivo carbureto de silício no primeiro par de folhas definidas, no estágio de dois terços de sua expansão, em seis plantas de cada uma das seguintes plantas: abobrinha cv. Caserta (*C. moschata*), mamoeiro cv. Sunrise Solo (*Carica papaya* L.), *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn e *Chenopodium quinoa* W. Essas plantas foram obtidas por meio da semeadura em vasos plásticos com capacidade de 2 kg, contendo o substrato adequado e mantidas em condições de casa de vegetação durante todo o experimento. Posteriormente, as plantas foram inspecionadas diariamente para avaliação dos sintomas típicos de vírus.

Microscopia eletrônica

O experimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. A técnica *Leaf dip* para visualização de partículas virais foi realizada a partir de folhas de abóbora coletadas com sintomas de mosaico e distorção foliar, e folhas saudáveis. O tecido vegetal foi cortado em pequenos fragmentos na presença de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade. O extrato obtido foi colocado em tela de cobre com 300 mesh recoberta com Formvar (0,25g de Formvar + 50 ml de clorofórmio), durante 5

minutos, e contrastada com acetato de uranila (2%), por 3 minutos. As observações foram feitas após 72 horas, ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 12,000 x.

Extração de RNA, RT-PCR, purificação e sequenciamento

O RNA total foi extraído a partir de folhas sintomáticas, pelo método de Trizol (2). A partir desse RNA foram feitas análises por RT-PCR com *primers* específicos para SqMV e ZYMV, seguindo a metodologia utilizada por Alencar (3). A partir de sequências de bases de PRSV disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foram desenhados dois pares de *primers*, PRSV9016-F (5'-CTTGARCARGCTCCATTC-3') e PRSV10253-R (5'-CTAAAAGCACGGAGG-3'), para o gene da capa proteica (CP), e PRSV1593-F (5'-TYAARCCRAARTTYGCGY-3') e PRSV3079-R (5'-CATTTCACTATCGAGYGG-3'), para o gene da proteína HC-Pro. O DNA complementar (cDNA) para cada um desses genes foi sintetizado utilizando-se o respectivo *primer* antissenso e M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corp. Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Em seguida, foi feita a amplificação por PCR com a enzima GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Corp. Madison/WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a PCR, utilizou-se uma desnaturação inicial, a 95 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 50 °C (HC-Pro) ou 42 °C (CP), por 1 minuto; 72 °C, por 1,5 minutos (HC-Pro) ou 1 minuto (CP) e extensão final, a 72 °C, por 5 minutos. O produto obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, purificado, com o auxílio do kit de purificação da Quiagen, seguindo as recomendações do fabricante (Quiagen, São Paulo, SP, Brasil), e enviado para sequenciamento na empresa norte americana *Genewiz* (South Plainfield, NJ, USA).

Alinhamento e análise das sequências

Os contigs, baseados nas sequências obtidas, foram construídos utilizando-se o programa DNA Baser Sequence Assembler v.2 (www.dnabaser.com). Depois, foram analisados por intermédio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível online no website do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos das sequências estudadas com outras disponíveis no *GenBank* (Tabela 1) foram realizados utilizando-se o programa ClustalW incluso no MEGA5 (29). Distâncias genéticas e árvores filogenéticas pelo método de agrupamento de *Neighbor Joining* foram geradas utilizando-se também o programa MEGA5 (29), com bootstrap, considerando valores superiores a 2,000 repetições.

Tabela 1 Sequências do *Papaya ringspot virus* disponíveis no *GenBank*, utilizadas no estudo

País	Isolado	Estirpe	Estado/Província	Acesso no <i>GenBank</i>	Sequência usada
Cuba	IBP-SDo	P	Villa Clara	AY841757	CP
Cuba	Boyeros	P	Havana	DQ089482	CP
Brasil	PRSV-W-1	W	Distrito Federal	DQ374153	CP e HC-Pro
Brasil	PRSV-W-2	W	São Paulo	AF530088	CP
Brasil	PRSV-W-3	W	São Paulo	AY094986	CP
Brasil	PRSV-W-C	W	São Paulo	DQ374152	CP e HC-Pro
USA	T14b	W	Oklahoma	JN132470	CP
USA	T2	W	Oklahoma	JN132456	CP
USA	B9	W	Oklahoma	JN132432	CP
USA	F1	W	Flórida	D00594	CP
Taiwan	CI	W	Chiayi	AY027810	CP
Taiwan	PT	W	Pintung	AY027811	CP
Thailândia	PRSVth	W	NI	AY010722	CP e HC-Pro
China	Ch99/113	W	Henan	DQ868880	CP
China	BN	W	NI	DQ449533	CP
Índia	IND	W	Delhi	EU475877	CP e HC-Pro
Índia	New Delhi	W	Nova Delhi	EU556733	HC-Pro
Israel	Israel	W	NI	JF737858	HC-Pro
Austrália	GAT	W	Gatton	U14739	CP
Austrália	NT	W	Região Norte	U14744	CP

NI não informado, CP capa proteica, HC-Pro *helper component proteinase*

Resultados e discussão

Dezesseis dias após a inoculação das plantas de abóbora cv. Caserta com o isolado Cuba-PR, os primeiros sintomas de mosaico leve surgiram, evoluindo para sintomas fortes nas folhas jovens, caracterizados por redução e deformação do limbo foliar (Fig. 1A e B), tal como descrito por Greber et al. (13) e Gonçalves et al. (11) em plantas de cucurbitáceas infectadas com PRSV-W. No caso das plantas de mamoeiro, mesmo após cinco repetições nos experimentos de inoculação mecânica, as plantas não foram infectadas. Tentativas de recuperação do vírus da planta de mamão deram resultado negativo, de modo que, caso a doença fosse causada pelo PRSV, provavelmente essa seria a estirpe W, uma vez que ela somente é capaz de infectar cucurbitáceas (26).

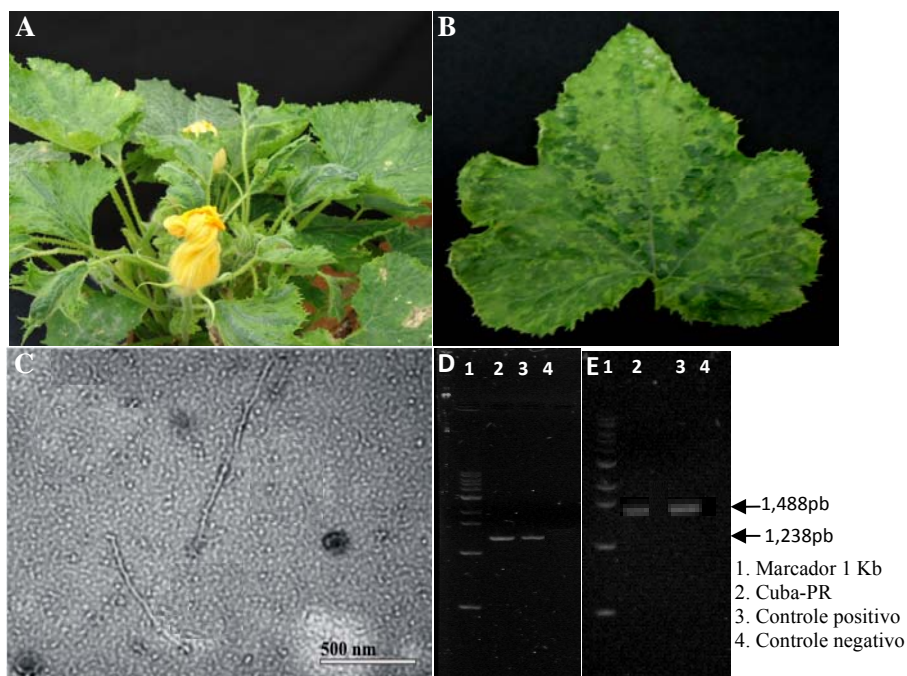


Figura 1 A e B Sintomas de mosaico, embolhamento e distorção foliar observados em plantas de abóbora cv. Caserta, inoculadas com PRSV-W; C. eletromicrografia das partículas virais; D.E. resultados da RT-PCR em géis de agarose (0,7%) para os genes CP e HC-Pro, respectivamente

Pelo método *Leaf dip* foi possível observar, no extrato das folhas sintomáticas, a presença de partículas virais alongadas e flexuosas de aproximadamente 780-800 x 12 nm (Fig. 1C), sugerindo que esse vírus é uma espécie do gênero *Potyvirus*. Partículas de tamanho semelhante foram descritas por Purcifull et al. (26) e Yeh et al. (31) para o PRSV.

Com os *primers* utilizados para a CP foi amplificado um fragmento de 1.238 pb (Fig. 1E), correspondente à posição 9016-10253 do genoma de PRSV, contendo o gene da CP, com 924 nt, que se encontra na posição 9,284-10,210 do genoma do isolado PRSV-W-C de PRSV-W, sequenciado por Inoue-Nagata

et al. (15) (acesso no *GenBank* DQ374152). Para as análises de identidade e filogenia, utilizou-se apenas parte do gene da CP, ou seja, um fragmento de 837 nucleotídeos da posição 9,284-10120 do PRSV-W-C, para ser possível comparar esta com outras sequências do *GenBank*, que são, na sua maioria, parciais. Quando comparado o fragmento de 837 nucleotídeos do isolado em estudo com 18 sequências da CP disponíveis no *GenBank* (Tabela 1), observou-se que esse foi similar a 10 dos 18 isolados empregados para comparação: AY841757, de Cuba; JN132470, JN132456, JN132432 e D00594, dos Estados Unidos; DQ374152, do Brasil; AY027811, do Taiwan; DQ449533, da China e os isolados U14739 e U14744, da Austrália.

Por outro lado, a comparação feita com os isolados PRSVth (tailandês) e IBP-SDo (cubano) mostrou que estes possuem três e seis nucleotídeos a menos em relação ao isolado estudado, respectivamente. Os demais isolados brasileiros, chineses e tailandeses incluídos nessa análise evidenciaram a presença, em seus genomas, de 6 nucleotídeos a mais que o isolado analisado neste trabalho.

Essas diferenças nos tamanhos dos fragmentos da CP correspondem à inserção de dois aminoácidos nos genomas dos isolados brasileiros PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3, já relatadas previamente por Inoue Nagata et al. (15), e à deleção de dois aminoácidos no isolado cubano IBP-SDo (24). Inserções e deleções nessa região inicial da CP sugerem que esta região é mais variável e sujeita a deleções e a inserções de nucleotídeos (17).

Outro fato que merece destaque é que, no isolado estudado, assim como nos isolados do *GenBank*, observa-se a presença das regiões repetitivas EK e os domínios conservados WCIEN e QMKAAA, que têm sido relatados por diversos autores, os quais os associam a funções relacionadas com a transmissão do vírus pelos afídeos vetores (3,27,28). Comparando-se o isolado aqui estudado (Cuba-PR) com os dois outros isolados disponíveis no *GenBank*, observa-se que, nessa região, este é idêntico ao Boyeros-Cuba, que é um PRSV-P, mas diferente

IBP-SDo-Cuba, que tem um aminoácido a menos na primeira posição, um L no lugar do E na quinta posição e um E no lugar do Q na nona posição (Fig. 2).

```

Cuba-PR          . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
Boyeros-Cuba    . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
IBP-SDo-Cuba    . . -NEKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PRSV-W-C-Brasil . . EKRKEKGNQKEKEEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PRSV-W-3-Brasil . . DKLKEKEKQKEKEKDKQKEKEKG . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PRSV-W-2-Brasil . . DKLKEKEKQKEKEKDKQKEKEKG . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PRSV-W-1-Brasil . . DKLKEKEKQKEKEKDKQKEKEKG . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
T14b-USA        . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
T2-USA          . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
B9-USA          . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
NT-Austrália    . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
FL-USA          . . EKFKKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
Gatton-Austrália . . EKLKEKEKQKEKEKEKQKEKEKD . . VVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
CI-Taiwan       . . LKEKEKEKQKEKEKDEQKDKDND . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
Ch99/113-China . . LKEKEKQKEKEKEKQKQKDEKND . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PRSVth-Thailandia . . FKEKEKQKE---EKDKQDKNND . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
PT-Taiwan       . . EKLKEKEKQKEKEKDKQKDKDND . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
BN-China        . . EKLKEKEKLKEKEKEKQKEKDND . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .
IND-India       . . DKLKEKEKSKKEKEKEKQKEKEKD . . MVWCIENGT . . HMQKAAALRN . .

```

Figura 2 Regiões repetitivas EK e domínios WCIEN e QMKA AA conservados na proteína do capsídeo do PRSV

O múltiplo alinhamento das sequências de nucleotídeos da CP mostraram que as porcentagens de idêntidades entre o isolado Cuba-PR e os restantes variaram entre 89,1% (com o isolado PRSVth da Tailândia) e 97,6% (com o PRSV-W-3 do Brasil). A identidade de aminoácidos, por outro lado, variou entre 93,9% (com IBPSDo de Cuba) e 98,2%, com os três isolados americanos já referidos. Observa-se, portanto, que o isolado estudado apresentou maior identidade com os provenientes da América, região geograficamente mais próxima que os da Ásia, com os quais a identidade foi menor. Exceção foi observada com o isolado IBP-SDo de Cuba que, apesar de não ter apresentado a menor identidade de nucleotídeos, teve a menor identidade de aminoácidos, mostrando que as substituições ocorridas foram do tipo não sinônimas, resultando em mudança nos aminoácidos. Entretanto, isso pode ser devido ao

fato de que os isolados de Cuba, ao contrário dos demais, são da estirpe PRSV-P.

Tabela 2 Porcentagens de identidades entre sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da capa proteica do isolado Cuba-PR com outros de *Papaya ringspot virus* disponíveis no *GenBank*

	Cuba-PR	
	nucleotídeos	aminoácidos
IBP-SDo	93,4%	93,1%
Boyerros	93,7%	94,9%
PRSV-W-1	94,3%	95,7%
PRSV-W-2	95,7%	96,4%
PRSV-W-3	97,6%	97,8%
PRSV-W-C	95,7%	96,4%
T14b	95,1%	98,2%
T2	95,2%	98,2%
B9	95,2%	98,2%
Fl	94,7%	97,5%
CI	91,7%	94,9%
PT	91,9%	95,3%
PRSVth	89,1%	94,9%
Ch99/113	91,4%	94,9%
BN	91,6%	96,7%
IND	91,1%	96,0%
GAT	95,1%	97,1%
NT	95,3%	97,1%

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos encontrados por Inoue-Nagata et al. (15), que relataram porcentagens de identidade entre sequências de nucleotídeos da CP de isolados americanos e asiáticos entre 90 e 95%. Entretanto, Abdalla e Ali (1) reportaram valores maiores tanto para sequências de nucleotídeos (95,2%-100%) quanto de aminoácidos (97,1%-100%), só que esses maiores valores, provavelmente, devem-se ao fato de terem sido comparados somente isolados de PRSV-W de diferentes áreas dentro do estado de Oklahoma, nos Estados Unidos.

Na árvore filogenética construída com base nas sequências de nucleotídeos (Fig. 3A) observaram-se três *clusters* principais formados pelos isolados de PRSV, sendo um maior, constituído pelos isolados americanos e australianos; um composto apenas pelo isolado da Índia e outro *cluster* menor, constituído por isolados asiáticos. Nota-se que os isolados cubanos da estirpe PRSV-P ficaram mais próximos dos isolados PRSV-W dos Estados Unidos e da Austrália. Entretanto, o isolado Cuba-PR agrupou-se com os isolados PRSV-W brasileiros, provavelmente porque eles pertencem à estirpe W, ao contrário dos outros dois cubanos, que pertencem à estirpe P. Outra possibilidade é a de que eles poderiam ser originários de diferentes regiões geográficas.

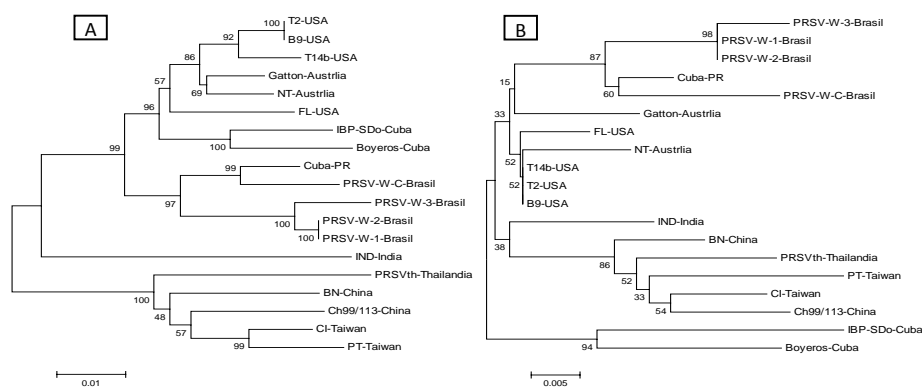


Figura 3 Árvores filogenéticas derivadas das sequências de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) do gene da capa proteica de um isolado de PRSV-W detectado em Cuba com outros disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos pelo programa MEGA5, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com 2,000 repetições

Na árvore baseada nas sequências de aminoácidos (Fig. 3B), pode-se observar que o agrupamento foi um pouco diferente. Neste caso, os isolados cubanos de PRSV-P ficaram em um pequeno *cluster* separado dos restantes. Como foi observado para sequências de nucleotídeos, os isolados americanos se

agruparam com o da Austrália, tendo Cuba-PR continuado mais perto dos brasileiros. Entretanto, o isolado da Índia ficou mais próximo dos asiáticos que, nessa árvore, se agruparam separadamente dos restantes.

A distância no agrupamento filogenético, observada entre os isolados americanos e asiáticos, na árvore baseada na sequência de nucleotídeos, foi também relatada por Inoue-Nagata et al. (15) e por Abdalla e Ali (1), tendo esses últimos autores também encontrado proximidade entre os isolados americanos e australianos. Diversos outros autores têm encontrado a mesma proximidade entre os isolados asiáticos e os da América e da Austrália (8,16,17,19). Esses dados confirmam uma possível origem do PRSV na Índia e a sua dispersão até as Américas e daí para a Austrália (4,10,22).

Com os *primers* empregados para o gene HC-Pro, foi amplificado um fragmento de 1,488 pb (Fig. 1 E) e sequenciada a região correspondente à posição 1,727 a 3,060 do genoma do isolado PRSV-W-C (acesso no *GenBank* DQ374152) (15). A sequência desse fragmento foi analisada e comparada a apenas seis sequências da estirpe PRSV-W disponíveis no *GenBank* (Tabela 1). A identidade entre as sequências de nucleotídeos do Cuba-PR e os demais isolados (Tabela 3) variou de 70,6% a 98%, tendo o maior valor sido observado com o isolado brasileiro PRSV-W-C. Novamente, as menores identidades ocorreram com os isolados da Ásia, provavelmente devido à grande distância geográfica entre eles.

Tabela 3 Porcentagens de idêntidades entre seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos da HC-Pro do isolado Cuba-PR com outros de *Papaya ringspot virus* disponíveis no *GenBank*

	Cuba-PR	
	nucleotídeos	aminoácidos
PRSV-W-1	95%	98%
PRSV-W-C	98%	99,1%
PRSVth	84,8%	97,3%
IND	88,1%	96,8%
New Delhi	88,1%	96,8%
Israel	70,6%	96,8%

Quando as seqüências de aminoácidos foram analisadas, observou-se que o isolado Cuba-PR, assim como outros disponíveis no *GenBank*, apresentou os domínios conservados KITC e PTK (Fig. 4) que, segundo alguns relatos, estão envolvidos nas interações do vírion com o a estrutura do estilete dos afídeos vetores durante o processo de transmissão não persistente (30). Como observado para a CP, as idêntidades entre as seqüências de aminoácidos (Tabela 3) foram maiores que as idêntidades entre nucleotídeos, com valores que variaram entre 96,8% e 99,1%, e a maior identidade foi observada com o isolado PRSV-W-C do Brasil, mas, desta vez, o menor valor ocorreu com os isolados da Índia e Israel.

```

IND-Índia      ...FRCHKITCNCMSR...LKTPTKNHI
NewDelhi-Índia ...FRCHKITCNCMSR...LKTPTKNHI
Israel         ...FPCHKITCNCMSK...LKTPTKNHI
Cuba-PR        ...FPCHKITCNCMSK...LKTPTKNHI
PRSV-W-C-Brasil ...FPCHKITCNCMSK...LKTPTKNHI
PRSV-W-1-Brasil ...FPCHKITCNCMSE...LKTPTKNHI
PRSVth-Thailandia...FPCHKITCNCMNK...LKTPTKNHI

```

Figura 4 Domínios KITC e PTK conservados na proteína HC-Pro do PRSV

Nas árvores filogenéticas baseadas tanto de nucleotídeos (Fig. 5A) quanto de aminoácidos (Fig. 5B), o isolado Cuba-PR agrupou-se com os dois isolados brasileiros (PRSV-W-C e PRSV-W-1). Na árvore baseada nas

sequências de nucleotídeos, os isolados da Índia ficaram mais próximos dos isolados da América, entretanto, os isolados da Tailândia e Israel ficaram separados em dois *clusters* distintos. Na árvore referente às sequências de aminoácidos, os isolados da Índia ficaram em um *cluster* bem distante dos americanos.

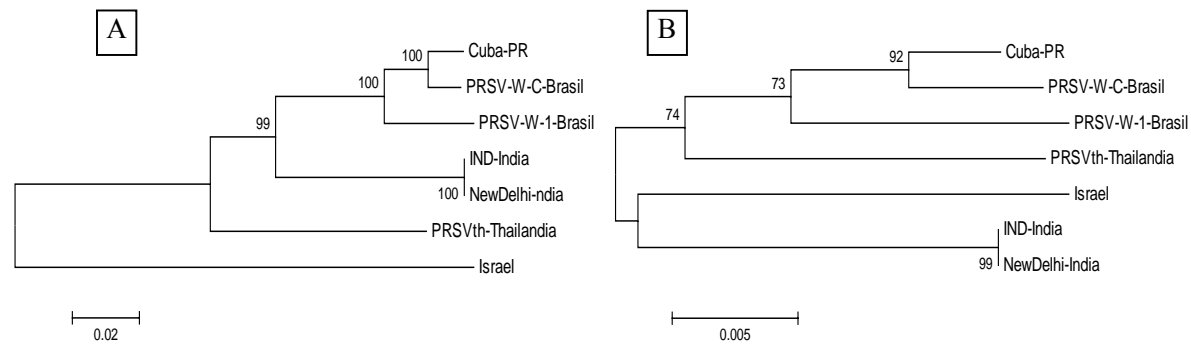


Figura 5 Árvores filogenéticas derivadas das sequências de nucleotídeos (A) e aminoácidos (B) do gene HC-Pro de isolados de um isolado de PRSV-W detectado em Cuba com outros disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos pelo programa MEGA5, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com 2,000 repetições

As árvores filogenéticas baseadas tanto nas sequências da HC-Pro como nas da CP mostraram agrupamentos dos isolados de acordo a região geográfica, ficando o Cuba-PR mais próximo aos isolados da América e da Índia. Nas árvores referentes à CP, os isolados americanos se agruparam próximo aos da Austrália, o que não pode ser observado no caso de HC-Pro porque não havia nenhuma sequência disponível desse país no *GenBank*. Esses agrupamentos regionais têm sido reportados por outros autores ao estudarem esses genes (8,15,16,17,19,22). Um fato curioso é que, para ambos os genes, os isolados da Índia agruparam-se mais próximos dos americanos apenas nas árvores de nucleotídeos, diferentemente do observado para as de aminoácidos.

As sequências de nucleotídeos foram mais conservadas para o gene cp que para HC-Pro, entretanto, as sequências de aminoácidos foram mais conservadas para a proteína HC-Pro que para CP, sugerindo que a proteína HC-Pro é muito mais conservada que a CP, o que, possivelmente, poderia estar relacionado com suas respectivas funções. Seria interessante incluir os mesmos isolados do *GenBank* nas duas análises (CP e HCPro), entretanto, elas não se encontravam disponíveis.

Os resultados obtidos neste trabalho auxiliam o entendimento sobre a diversidade genética do PRSV-W infectando cucurbitáceas e sugerem a necessidade de se incluir este vírus nos programas de vigilância e manejo fitossanitário da cultura da abóbora e de outras cucurbitáceas em Cuba, além dos programas de melhoramento genético, contribuindo com a elevação das produções para suprir a demanda de alimentos do país.

Agradecimentos Ao Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e o financiamento deste projeto; como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio no financiamento de reagentes e recursos para o projeto.

Bibliografia

1. Abdalla, O. A., Ali, A. 2012. Genetic diversity in the 3'-terminal region of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) isolates from watermelon in Oklahoma. *Archives of Virology* 157(3):405-12.
2. AFGC: ARABIDOPSIS FUNCTIONAL GENOMICS CONSORTIUM. Total RNA isolation, 2002. Disponível em: <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>>. Acesso em: 09 set 2010.
3. Alencar, N. E., Figueira, A. R., Melo, J. E., Lucas, M. A., Santos, L. B., Nascimento, I. R. 2012. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. *J. Biotec. Biodivers.* 3(1):32-37.
4. Atreya, C. D., Raccach, B., and Pirone, T. P. 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178:161-165.
5. Bateson, M. F., Lines, R. E., Revill, P., Chaleeprom, W., Ha, C. V., Gibbs, A. J., and Dale, J. L. 2002. On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. *Journal of General Virology* 83:2575-2585.
6. Beserra, J. E. A., Maluf, W. R., Figueira, A. R., and Barguil, B. M. 2006. Herança da resistência ao *Watermelon mosaic vírus* em melancia (*Citrullus lanatus*. L.). *Fitopatologia Brasileira* 31:302-305.
7. Bezerra, I. C., Resende, R. O., Pozzer, L., Nagata, T., Kormelink, R., and Avila, A. C. 1999. Increase of tospovirus diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89(9):823-830.
8. El-Soukkary, F. A. H. Evaluation of pumpkin seed products for bread Fortification. 2001. *Plant Foods for Human Nutrition* 56:365-384.
9. Fernández-Rodríguez, T., Rubio, L., Carballo, O., and Marys, E. 2008. Genetic variation of *Papaya ringspot virus* in Venezuela. *Archives of Virology* 153:343-349.
10. Ferreira, M. A. J. F. 2007. Abóboras, morangas e abobrinhas: estratégias para coleta, conservação e uso. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília, Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/kw_storage>. Acesso em: 06 abril 2012.
11. Gibbs, A. J., Ohshima, K., Phillips, M. J., and Gibbs, M. J. 2008. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLOS One* 3(6):2523.
12. Gonsalves, D., Tripathi, S., Carr, J. B., and Suzuki, J. Y. 2010. *Papaya ringspot virus*. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01.

13. Gonzalez Morejon, N., Martinez Coca, B., and Infante Martinez, D. 2010. Mildiu polvoriento en las cucurbitáceas. *Protección Vegetal* 25(1):44-50.
14. Greber, R. S., Perley, D. M., and Herrington, M. E. 1988. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Australian Journal of Agricultural Research* 39(6):1085-1094.
15. Grupta, S., Lakshmi, A. J., Manjunath, M. N., and Prakash, J. 2004. Analysis of nutrient and anti-nutrient content of underutilized green leafy vegetables. *Food Science and Technology* 38:339-345.
16. Inoue-Nagata, A. K., Franco, C. M., Martin, D. P., Rezende, J. A. M., Ferreira, G.B., Dutra, L. S., and Nagata, T. 2007. Genome analysis of a severe and a mild isolate of *Papaya ringspot virus*-type W found in Brazil. *Virus Genes* 35:119-127.
17. Lima, R. C. A., Souza, M. T., Pio-Ribeiro, G., Lima, J. A. A. 2002. Sequences of the coat protein gene from brazilian isolates of *Papaya ringspot virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27(2):174-180.
18. Lu, Y. W., Shen, W. T., Zhou, P., Tang, Q.J., Niu, Y. M., Peng, M., and Xiong, Z. 2008. Complete genomic sequence of a *Papaya ringspot virus* isolate from Hainan Island, China. *Arch. Virol.* 153:991-993.
19. Mallor, C. G. Comportamiento de material vegetal me melón (*Cucumis Melo* L.) frente a virus. caracterización de la respuesta del cv. 'Doublon' al virus de las manchas necróticas del melón (MNSV). 2003. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular e Celular). UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, 2007.
20. Mangrauthia, S. K., Singh, P., and Praveen, S. 2010. Genomics of Helper Component Proteinase Reveals Effective Strategy for *Papaya ringspot virus* Resistance. *Molecular Biotechnology* 44(1):22-29.
21. Moura, M. C. C. L., Lima, J. A. A., Oliveira, V. B., and Gonçalves, M. F. B. 2001. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 26:90-92.
22. NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas Em Alimentação. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 2ed., v.2, Campinas: NEPA-UNICAMP. 2006. Disponível em:< <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. Acesso em: 06 abr. 2012.
23. Olarte Castillo, X. A., Fermin, G., Tabima, J., Rojas, Y., Tennant, P. F., Fuchs, M., Sierra, F., Bernal, A. J., and Restrepo, S. 2011. Phylogeography and molecular epidemiology of *Papaya ringspot virus*. *Virus Research* 169(2):132-149.
24. Oliveira, V. B., LIMA, J. A. A., Vale, C. C., and PAIVA, W. O. 2000. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Fiopatologia Brasileira* 25:628-636.

25. Portal, O., Cabrera, D., Sánchez, A., Darías, A. L., González, J. E., and Gómez, R. 2006. Molecular characterization of two Cuban isolates of *Papaya ringspot virus* by means of coat proteins analysis. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 71:1203-1205.
26. Pozzer, L., Resende, R. O., Bezerra, M. I., Nagata, T., Lima, M. I., Kitajima, E. W., Avila, A. C. 1996. *Zucchini lethal chlorotic virus (ZLCV)*, a proposed new species in *Tospovirus* genus. *Fitopatologia Brasileira* 21:432. Resumo.
27. Purcifull, D. E., Edwardson, J. R., Hiebert, E., and Gonsalves, D. 1984. *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. Description of plant viruses, 292. 8p
28. Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virology* 36:273-314.
29. Silva-Rosales, L., Becerra-Leor, N., Ruiz-Castro, S., Teliz-Ortiz, D., and Noa-Carrazana, J. C. 2000. Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of *Papaya ringspot virus* with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Arch. Virol.* 145:835-843.
30. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using *Maximum likelihood*, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* <http://mbe.oxfordjournals.org/>
31. Yap, Y. K., Duangjit, J., and Panyim, S. 2009. N-Terminal of *Papaya ringspot virus* type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes* 38:461-467.
32. Yeh, S. D., Jan, F. J., Chiang, C. H., Doong, T. J., Chen, M. C., Chung, P. H., Bau, H. J. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of *Papaya ringspot virus* RNA. *J. Gen. Virol.* 73:2531-2541.
33. Zerbini, F. M., Maciel-Zambolim, E. 1999. A família Potyviridae: parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7:1-66.