



PAPAYA MELEIRA VIRUS (PMeV) E A MELEIRA DO MAMOEIRO: ESTUDOS REALIZADOS NO NÚCLEO DE BIOTECNOLOGIA DA UFES

Silas Pessini Rodrigues¹; João Gilberto Zanotelli Piccin¹; Paolla Mendes Vale¹; José Aires Ventura^{1,2}; Patricia Machado Bueno Fernandes¹

¹Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES; ²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e Extensão Rural, INCAPER.

biotecnologia.ufes@gmail.com

INTRODUÇÃO

A meleira do mamoeiro representa uma das principais doenças de pré-colheita para a cultura do mamão, sendo causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV) (VENTURA et al., 2003). O PMeV foi observado inicialmente através de técnicas de microscopia eletrônica, ocorrendo no látex de plantas doentes, do qual foram extraídas moléculas de RNA em dupla-fita (dsRNA) de 12 kbp (KITAJIMA et al., 1993). Desde então, nosso grupo tem trabalhado ativamente na compreensão do pato-sistema PmeV-mamoeiro e em métodos de diagnóstico e prevenção da doença por técnicas de biologia molecular.

Iniciamos nossos estudos estabelecendo uma metodologia eficaz de coleta do látex no campo, armazenamento e detecção do genoma do vírus em látex e em tecidos de mamoeiro (RODRIGUES et al., 2005, RODRIGUES et al, 2009a). Foram também realizados estudos direcionados à compreensão dos mecanismos de transmissão da doença no campo (RODRIGUES et al, 2009b) e descrevemos um perfil de distribuição do PMeV em diferentes órgãos da planta em etapas distintas de infecção. Utilizando microscopia ótica e eletrônica descrevemos o efeito do PMeV na estrutura e na composição do látex de mamoeiros infectados (RODRIGUES et al, 2009c). Mais recentemente tem-se pesquisado o padrão proteômico de laticíferos de plantas contaminadas com PMeV quando comparadas as plantas saudáveis (RODRIGUES et al,



2009d) e centralizado esforços em metodologias de controle da doença baseado na tecnologia do RNA de interferência (RODRIGUES et al, 2009e)

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com mudas de mamoeiro com 4 meses de idade ou com plantas adultas mantidas em condições de campo. As plantas foram inoculadas através da injeção de látex infectado diluído em tampão fosfato pH 7,0 (1:1 v/v) ou manifestaram os sintomas da meleira naturalmente. Amostras de látex (100µL) ou de tecido foram coletadas a partir de cortes nas folhas ou frutos. A ocorrência do PMeV nas amostras tanto de látex quanto de tecidos foi determinada através da detecção do dsRNA por extração com fenol:clorofórmio ou por RT-PCR e separação por eletroforese em gel de agarose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se proceder ao diagnóstico da meleira em mamoeiros no campo, avaliou-se diferentes tampões e temperatura de armazenamento. As análises de dsRNA presente em amostras de látex indicou que o PMeV se distribui, inicialmente, nos órgãos próximos ao sítio de inoculação e ao longo de quase toda a planta, nos estágios mais avançados da infecção. Aparentemente, o vírus se concentra nos órgãos ricos em laticíferos, como caule, folhas e frutos, cujo látex apresentou bandas de dsRNA bastante intensas.

Estudos com a mosca branca *Trialeurodes variabilis* demonstraram que apesar deste inseto receber o vírus de plantas infectadas, ele não é capaz de transmiti-lo (Fig.1).

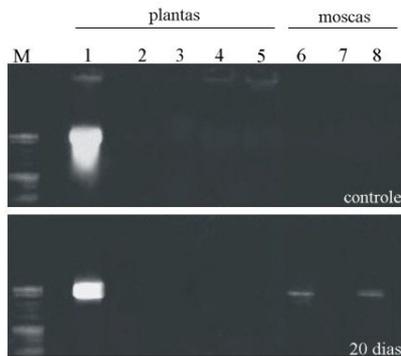


FIGURA 1 - Detecção molecular do PMeV em folha de mamoeiro contaminado (1), e sadio sem contato (2-5 controle) e após 20 dias de contato com o inseto (2-5 20 dias) e de inseto *Trialeurodes variabilis* (6-8). Os ácidos nucleicos foram separados por eletroforese, utilizando-se um marcador de peso molecular de 1 Kbp (M).

Além da análise do látex das plantas, os tecidos de mamoeiros com meleira foram analisados quanto a presença do dsRNA do PMeV. Para tal, têm sido utilizados primers e sua amplificação por RT-PCR. A figura 1 apresenta um gel de agarose a 1,5% após eletroforese horizontal, em que se observa uma banda nítida em tecido de planta com meleira.

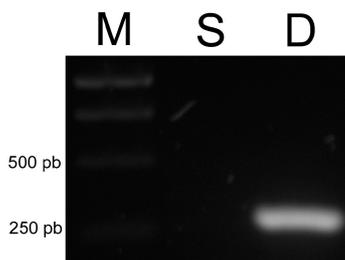


FIGURA 2 - Detecção molecular do PMeV em folhas de mamão. Produto de PCR de folha de mamoeiro sadio (S) e de folha de mamoeiro doente (D). Os ácidos nucleicos foram separados por eletroforese, utilizando-se um marcador de peso molecular de 1 Kbp (M).

Ainda não se encontra disponível uma cultivar de mamoeiro resistente à meleira. Uma via conhecida como RNA de interferência (RNAi) é desencadeada por moléculas de RNA em dupla fita (dsRNA) que inicia uma rota de degradação resultando na destruição de moléculas de RNA mensageiro específicas. O uso de moléculas de



dsRNA em pequena concentração, mas com atuação específica contra um determinado vírus, representa uma possibilidade de controle mais efetivo de algumas viroses. Dessa forma, moléculas de dsRNA genômicas purificadas a partir do *Papaya meleira virus* (PMeV) podem funcionar como indutoras de resistência a este mesmo vírus em mamoeiros. Para testar essa possibilidade, mudas de mamoeiro cultivadas em casa de vegetação foram divididas em quatro grupos e inoculadas respectivamente com PMeV em baixa concentração, PMeV em alta concentração, dsRNA purificado e dsRNA purificado em conjunto com PMeV. Amostras de látex foram coletadas de cada uma delas semanalmente. Após 10 semanas de experimento, todas as plantas foram diagnosticadas molecularmente quanto à presença do PMeV. Os resultados, apresentados resumidamente na Tabela 1, indicaram que a inoculação conjunta do PMeV com dsRNA prolonga o período de incubação do vírus na planta nos primeiros 50 dias pós-inoculação, possivelmente induzindo as células a um estado de resistência mais elevado ao PMeV. Tais resultados indicam que o dsRNA do PMeV purificado é capaz de induzir um estado de resistência no mamoeiro, possivelmente ativando a via do RNAi nesta planta.

TABELA 1: Estabelecimento da infecção pelo PMeV inoculado em alta e baixa concentração viral em mudas de mamoeiro (*Carica papaya*) e aumento do estado de resistência dessas plantas nos primeiros 50 dias após a inoculação do dsRNA purificado.

Tratamentos	Dias pós-inoculação								
	15	22	29	36	43	50	57	64	71
Alta carga de PMeV	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++ ++
	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	-	+	++	+++ ++	+++ ++	+++ ++	+++	+++	+++
Baixa carga de PMeV	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
	-	-	-	+	+	+++ ++	+++	+++	+++
	-	-	+	++	++	++	+++ ++	+++	+++



Alta carga PMeV + dsRNA	-	-	-	-	-	-	+	+	++
	-	-	-	-	-	-	++	++	++
	-	-	-	-	+	++	++	++	++
Baixa carga PMeV + dsRNA	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	++	+	+
	-	-	-	-	-	-	++	++	++

CONCLUSÃO

O PMeV encontra-se, principalmente, na parte aérea de mamoeiros infectados, concentrando-se nos órgãos ricos em laticíferos, como folhas e frutos mais jovens. A mosca branca *Trialeurodes variabilis* não é o vetor, assim como as práticas agrícolas normais também não são processos eficientes de transmissão do vírus. Observamos que a melhor forma de coleta de látex para posterior transporte ao laboratório sem degradação é em tampão citrato pH 5, mantido a aproximadamente 4 °C (temperatura de geladeira). A metodologia por RT-PCR é eficaz no diagnóstico viral e os estudos tem demonstrado uma correlação positiva no uso do RNAi para controle do PmeV.

AGRADECIMENTOS

A FINEP, CNPq, BNB-FUNDECI e FAPES, pelo suporte financeiro para execução dos trabalhos.

REFERÊNCIAS

KITAGIMA, E.W.; RODRÍGUES, C.H.; SILVEIRA, J.A.; ALVES, F.L.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric particles, restricted to laticifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.118-122, 1993.



RODRIGUES, S.P.; GALVÃO, O.P.; ANDRADE, J.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Método de diagnóstico molecular simples para a detecção do vírus da meleira do mamoeiro em látex e tecidos de plantas infectadas. **Summa Phytopathologica** v.31, p.273-275, 2005.

RODRIGUES, S.P.; ANDRADE, J.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. New approach for papaya latex storage without virus degradation **Brazilian Journal of Microbiology** 40:1-3, 2009a.

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

RODRIGUES, S.P.; DA CUNHA, M.; ANDRADE, J.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Rep** 28:861–871, 2009c.

RODRIGUES, S.P.; VENTURA, J.A.; ZINGALI, R.; FERNANDES, P.M.B. Evaluation of sample preparation methods for the analysis of papaya leaf proteins through two-dimensional gel electrophoresis. **Phytochem. Anal.** 2009d.

RODRIGUES, S.P.; LINDSEY G.G.; FERNANDES, P.M.B. Biotechnological Approaches for Plant Viruses Resistance: From General to the Modern RNA Silencing Pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology** Vol.52, n. 4: pp.795-808, 2009e.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S.; ANDRADE, J.S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomatologia e controle. In: MARTINS D. Dos S. (ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. p.267-276, 2003.