DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS DA MELEIRA DO MAMOEIRO EM TECIDOS DE PLANTAS INFECTADAS

Silas Pessini Rodrigues[1], José Aires Ventura[2], Patrícia Machado Bueno Fernandes[1]

[1]Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, pat@npd.ufes.br,
[2]Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, C.P. 391, CEP. 29001-970, Vitória, ES, ventura@incaper.es.gov.br.

INTRODUÇÃO

Dentre os fatores limitantes da produção brasileira de mamão (*Carica papaya* L.) destaca-se a meleira do mamoeiro. A doença é causada por um vírus de genoma de RNA dupla fita (dsRNA), de aproximadamente 12 Kb. Plantas com meleira apresentam uma exudação de látex intensa e aparentemente espontânea a partir dos frutos. O látex exudado mostra-se mais fluido e aquoso que aquele observado em plantas sadias. Em contato com a atmosfera, o látex sofre oxidação, o que confere um caráter escurecido aos frutos. Necrose nas margens de folhas jovens pode ser observada em algumas, mas não em todas as plantas infectadas (SOUZA et al., 2002; VENTURA et al., 2001).

A natureza de dupla fita do RNA foi confirmada após tratamento diferencial com DNase e RNase (KITAJIMA et al., 1993). Esses resultados estão de acordo com aqueles verificados em outros trabalhos relacionados à doença (BARBOSA et al., 1999; ZAMBOLIM et al., 2003).

A presença de partículas isométricas com genoma de dsRNA foi verificada, por microscopia eletrônica, nos laticíferos, mas não em outros tipos celulares (epiderme, parênquima e vasos do xilema e floema) de frutos e folhas (KITAJIMA et al., 1993). Da mesma forma, em látex proveniente da raiz, do caule, do fruto e da folha, após armazenamento em tampão citrato pH 5.0 e extração com solventes orgânicos, verificou-se a presença de uma banda de aproximadamente 12 Kb, correspondente ao genoma viral (RODRIGUES et al., 2003; ZAMBOLIM et al., 2003).

A carência de um método precoce de diagnóstico da doença e a escassez de estudos acerca do ciclo de vida do vírus impossibilitam a implementação de métodos efetivos de manejo da cultura, atualmente baseados na erradicação de pomares doentes, na desinfestação das ferramentas agrícolas e na utilização de mudas certificadas (BRASIL, 1997).

Determinar a localização do vírus nos diferentes tecidos da planta é um passo fundamental para a compreensão de seu ciclo de vida. Nesse aspecto, este trabalho objetivou determinar a distribuição do vírus da meleira do mamoeiro nos diferentes tecidos da planta infectada.

MATERIAL E MÉTODOS

Tecidos de plantas infectadas provenientes dos experimentos do Incaper, localizados no norte do estado do Espírito Santo, foram desinfestados, e seccionados com o auxílio de lâmina de aço estéril. Dos frutos foram retiradas camadas finas correspondentes à casca e ao mesocarpo. Das folhas foram retirados o limbo e as nervuras primária e secundária. O caule foi dividido em ápice caulinar, caule de frutificação e caule médio. Dos

dois primeiros foram retiradas camadas finas externas e camadas internas. O caule médio foi subdividido em cinco camadas, de acordo com aquelas observadas visualmente em corte transversal. Elas foram numeradas (C1-C5) obedecendo à ordem do centro para a periferia. Também foram utilizadas porções completas de flores, pecíolos e raízes.

A extração de dsRNA baseou-se no método descrito por Dodds et al. (1983), com modificações. Resumidamente, a extração foi feita com fenol:clorofórmio (2:1 V/V) em tampão ácido, seguida de tratamento enzimático com DNase I (Pharmacia). Os ácidos nucléicos foram separados em gel de agarose a 1%, posteriormente corado com brometo de etídeo e observado à luz UV-320 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após extração dos ácidos nucléicos totais de diferentes tecidos da planta, seguida de tratamento com DNase I, uma banda de RNA de aproximadamente 12 Kb foi verificada nas amostras provenientes da flor, do limbo foliar, fruto (casca e mesocarpo), pecíolo, caule de frutificação externo e caule médio (C2 e C3) (Figura 1). As amostras provenientes das nervuras foliares (primárias e secundárias), ápice caulinar (interno e externo), caule de frutificação interno e caule médio (C1, C4 e C5) não apresentaram esse resultado.

Plantas da família *Caricaceae* (*C. papaya* L.) apresentam articulações entre as células laticíferas, e também prolongamentos a partir dessas células (anastomoses). Esses prolongamentos permitem que uma única célula seja capaz de formar um sistema de tubos. Geralmente os laticíferos estão distribuídos por toda a planta, freqüentemente associados ao floema e xilema (ESAU, 1976). No nível do organismo, a infecção viral sistêmica envolve diversos tipos celulares e tecidos (CARRINGTON et al., 1996). Células associadas ao floema (parênquima vascular e células companheiras) são importantes para a movimentação viral a longa distância, por facilitarem a entrada de alguns vírus para o interior dos elementos de vasos ao longo dos quais o vírus se move rapidamente para os tecidos carentes em fotoassimilados (LEISNER e TURGEON, 1993).

A detecção da presença viral em tecidos da flor, limbo foliar, pecíolo, fruto e caule de plantas contaminadas pode estar associada à maior concentração de laticíferos nesses órgãos, uma vez que a presença viral nessas células (KITAJIMA et al., 1993) e no látex de plantas doentes (BARBOSA et al., 1999; RODRIGUES et al., 2003), já foi estabelecida. A observação de bandas definidas na parte externa do caule de frutificação e nas camadas centrais do caule abaixo da região de frutificação (coluna de frutos) reflete a estreita associação entre os laticíferos e tecidos do xilema e floema, já que nessas amostras predominavam tecidos vasculares da planta.

A grande concentração de ácidos nucléicos de peso molecular inferior a 12 Kb observada na maioria das amostras está relacionada com a integridade do tecido utilizado para a extração. Esses tecidos foram submetidos à extração poucas horas após sua coleta em campo. Grande parte desses ácidos nucléicos correspondem a moléculas RNA da planta. O resgate do RNA total nas amostras de tecidos analisados é favorecido pelo baixo pH presente no tampão de extração, que confere maior estabilidade a moléculas de ácido ribonucléico (FARRELL JÚNIOR, 1998).

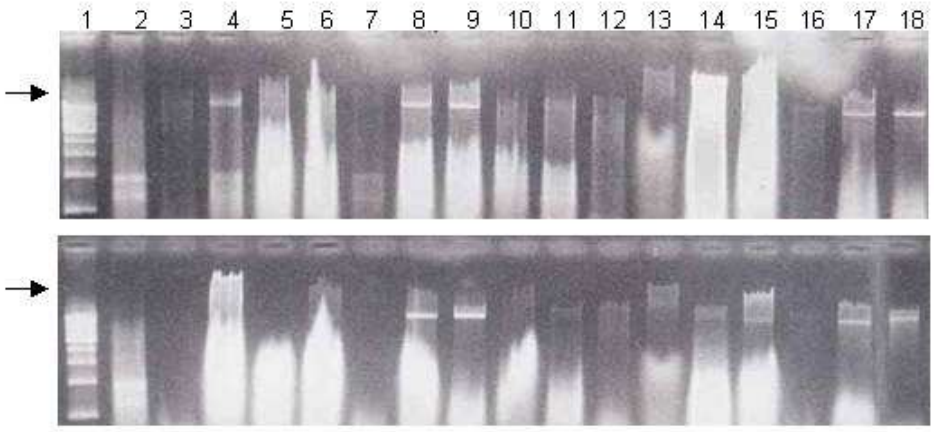

FIGURA 1 – Tecidos de diferentes órgãos de mamoeiro infectados e submetidos à extração total de ácido nucléicos seguida de tratamento com DNase I. Pente superior com produto da extração total e pente inferior, amostras correspondentes, submetidas a tratamento enzimático. (1) 1 Kb DNA Step Ladder (Promega); (2) raiz; caule de frutificação (3) interno e (4) externo; ápice caulinar (5) interno e (6) externo; caule médio C1 (7), C2 (8), C3 (9), C4 (10) e C5 (11); nervuras (12) primárias e (13) secundárias; (14) limbo foliar; (15) flor; (16) pecíolo; (17) casca e (18) mesocarpo do fruto. Mostrando uma banda bem definida, de aproximadamente 12 Kb nas amostras 4, 8, 9, 14, 15, 16, 17 e 18.

CONCLUSÃO

O vírus da meleira do mamoeiro foi encontrado em tecidos do caule, do fruto, da folha, do pecíolo e da flor, provavelmente associado à maior concentração de laticíferos nestes órgãos, que podem ser importantes para a movimentação viral a longa distância para as diferentes partes da planta.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, C.J.B.; MEISSNER Filho, P.E.; HABIBE, C.T.; VILARINHOS, A. D.; MATRANGOLO, R. J. W. Distribuição de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro afetadas pela meleira. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v.21, n.3, p. 356-358, 1999.

BRASIL. Portaria, nº 134 de 17 de novembro de 1997. Estabelece responsabilidades e iniciativas a serem tomadas por produtores de mamão e órgãos públicos após detecção de plantas com meleira. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.73, 21 nov. 1997.

CARRINGTON, C.J.; KASSCHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K.; SCHAAD, M. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1669-1681. 1996.

DODDS, J. A.; BAR-JOSEPH, M. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. **Phytopathology**, n. 73, p. 419-423. 1983.

ESAU, K. **Anatomía Vegetal**. 3. ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1976.

FARRELL JÚNIOR, R.E. **RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, C.; SILVEIRA, J.; ALVES, F.; VENTURA, J.A.; ARAGÃO, F.J.L.; OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("sticky disease") of papaya (*Carica papaya* L.). **Fitopatologia Brasileira,** n. 8, p. 118-122, 1993.

RODRIGUES, S.P.; GALVÃO, O.P.; COMARÚ, M.W.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Diagnose of papaya sticky virus in different tissues of the plant. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 32, Caxambú, SBBBM, 2003. **Programa e Resumos...** Caxambú: SBBBM, 2003. p.60.

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