

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAOLLA MENDES DO VALE DE ABREU

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Papaya meleira*
virus EM MAMOEIROS**

VITÓRIA

2011

PAOLLA MENDES DO VALE DE ABREU

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Papaya meleira*
virus EM MAMOEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

VITÓRIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

A162i Abreu, Paolla Mendes do Vale de, 1985-
Indução de resistência ao Papaya meleira virus em mamoeiros / Paolla Mendes do Vale de Abreu. – 2011.
92 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-Orientador: José Aires Ventura.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Fitopatologia. 2. Papaya meleira virus. 3. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Ventura, José Aires, 1954-. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

PAOLLA MENDES DO VALE DE ABREU

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO *Papaya meleira*
virus EM MAMOEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 04 de março de 2011.

Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Prof. Dr. José Aires Ventura

**Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e
Extensão Rural**

Co-orientador

Prof. Dr. Marcelo Ehlers Loureiro

Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nádía e Henrique, exemplos de dedicação,
de amor e sinceridade.

Ao meu irmão, Paulo Henrique, sempre cuidadoso comigo.

Ao meu esposo, Thiago, meu amigo, meu companheiro, meu
incentivador a todo tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Senhor Jesus, pelo alento, por me conceder paciência e confiança nos momentos de ansiedade e por guardar o meu coração e a minha mente, suprindo-me em todas as minhas necessidades.

À Prof. Dra. Patricia M. B. Fernandes pela dedicação, atenção e pelo exemplo de determinação.

À Prof. Dra. Adriana Silva Hemerly pelo auxílio, permitindo o uso do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da UFRJ.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio – todos vocês me fizeram crescer (Adriana, Carol, Diego, Érika, Fernanda, Glória, Helber, João Gilberto, Lucas, Renan, Ricardo, Silas, Thaiz, Vitor, Walkiria). Especialmente ao Silas, pelo apoio, e claro, ao João, companheiro de bancada.

Ao meu marido, meu companheiro e amigo pelo incentivo e, principalmente, pelos vários “puxões de orelha” e pela paciência, que me ajudaram a prosseguir nos diversos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo amor e compreensão, por toda a dedicação. Sem vocês seria muito difícil. Só não digo impossível, porque “nada é impossível para Deus” (Lc 18:27).

À Tia Lú, ao “Cabeça”, à Camila e ao Danilo, pela paciência, pela ajuda e pelas várias comunhões que me fizeram permanecer.

Aos amados irmãos em Cristo pelas orações e pelo amor fraternal.

Às agências de apoio e financiamento: CNPq, FAPES, CAPES, FINEP e Banco do Nordeste.

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e o mamão uma das frutas mais consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O Brasil é o maior produtor mundial de mamão e os estados do Espírito Santo e da Bahia são responsáveis por mais de 70% da área brasileira produtora deste fruto. As doenças, no entanto, constituem os principais fatores limitantes da produção. A meleira do mamoeiro, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV), de genoma de RNA fita-dupla (dsRNA), é uma das que ainda não possui uma cultivar resistente. Uma via de resistência às viroses em plantas é ativada por moléculas de dsRNA. Após perceber a presença do dsRNA, a célula inicia uma rota de degradação de moléculas de RNA, que podem ser virais, impedindo, assim, o progresso da infecção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a indução de resistência ao PMeV em mudas de mamoeiro utilizando moléculas de dsRNA extraídas do genoma viral. Quatro diferentes tratamentos foram avaliados qualitativa e quantitativamente por meio do diagnóstico molecular do vírus por RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real, respectivamente, em amostras de folha. As mudas de mamoeiro inoculadas apenas com PMeV mostraram intensa infecção pelo vírus logo nos primeiros dias pós-inoculação, enquanto as mudas inoculadas simultaneamente com PMeV e dsRNA do mesmo vírus mostraram uma infecção viral mais atenuada, o que sugere uma redução no sucesso infeccioso pelo vírus causador da meleira. A inoculação combinada em mudas de mamoeiro do PMeV com o dsRNA viral reduziu o progresso da infecção.

Palavras-chave: Fitopatologia. *Papaya meleira virus*. Reação em cadeia da polimerase via Transcriptase Reversa.

ABSTRACT

Carica papaya L. is one of the most cultivated and consumed fruits in tropical and subtropical regions of the world. Brazil is the world's largest producer of papaya and the states of Espírito Santo and Bahia are responsible for more than 70% of the Brazilian production of this fruit. Diseases of fruit trees are the main limiting factors. Papaya meleira disease, caused by the *Papaya meleira virus* (PMeV), is one disease that does not have a resistant cultivar. However, the PMeV genome is a double-stranded RNA (dsRNA) and it has been shown that virus resistance in plants can be activated by dsRNA molecules. After detecting the presence of dsRNA, the cell initiates a process of degradation of RNA molecules, which may be viral, thus preventing the progress of the infection. This study aimed to induce resistance to PMeV in papaya seedlings using dsRNA molecules extracted from the viral genome. Four different treatments were evaluated qualitatively and quantitatively by means of molecular diagnosis of the virus in leaf samples by RT-PCR and qRT-PCR (real-time PCR), respectively. The papaya seedlings inoculated only with high load PMeV showed severe infection in the first days post-inoculation, while the seedlings inoculated with high viral load and additional dsRNA showed a milder viral infection, suggesting a reduction in infection by the virus that causes meleira. The combined inoculation of papaya seedlings with PMeV and viral dsRNA reduced the progress of the infection.

Key words: Phytopathology. *Papaya meleira virus*. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do estado do Espírito Santo, com destaque, em laranja, para os municípios produtores de mamão do Norte do estado	16
Figura 2 - Modelo para a formação de vesículas virais na membrana do RE	25
Figura 3 - Estrutura básica de um plasmodesmo entre células adjacentes formado na citocinese	28
Figura 4 - Esquema do floema com seus elementos condutores	29
Figura 5 - Modelo de modificação do PD por MP	31
Figura 6 - Modelos de reconhecimento planta-patógeno	35
Figura 7 - Esquema de imunidade antiviral baseada no RNA desencadeada por moléculas de dsRNA virais	38
Figura 8 - Principais sintomas da meleira do mamoeiro	18
Figura 9 - Ácidos nucléicos extraídos de látex de mamoeiros adultos com sintomas da meleira	19
Figura 10 - Mudanças de mamoeiro, aos 4 meses pós-germinação, separadas em quatro grupos distintos de três plantas cada.....	46
Figura 11 - Parte da sequência do PMeV e a região de anelamento dos iniciadores	54
Figura 12 - Ácidos nucléicos extraídos de látex de mamoeiro adulto	60
Figura 13 - Amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de mudas de mamoeiro inoculadas	64
Figura 14 - Amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de mudas de mamoeiro inoculadas e tratadas com DNase I	67

Figura 15 - Amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de mudas inoculadas submetidas à análise por RT-PCR convencional	69
Figura 16 - Amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de plantas adultas submetidas à análise por RT-PCR convencional	70
Figura 17 - RT-PCR convencional de amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de folha de mudas de mamoeiro	73
Figura 18 - Especificidade na amplificação por RT-PCR em tempo real para o PMeV	76
Figura 19 - Quantidade relativa de PMeV nas mudas inoculadas	79

LISTA DE SIGLAS

AGO	Argonauta
cDNA	DNA complementar (do inglês <i>Complementary DNA</i>)
CP	Proteína do capsídeo viral (do inglês <i>Coat protein</i>)
Ct	Limite do ciclo (do inglês <i>Cycle threshold</i>)
DM	Desmotúbulo
dsDNA	DNA dupla-fita (do inglês <i>Double-strand DNA</i>)
dsRNA	RNA dupla-fita (do inglês <i>Double-strand RNA</i>)
ETI	Imunidade desencadeada pelo elicitor (do inglês <i>Effector-triggered immunity</i>)
ETS	Susceptibilidade desencadeada pelo elicitor (do inglês <i>Effector-triggered susceptibility</i>)
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
HR	Resposta de hipersensibilidade (do inglês <i>hypersensitive response</i>)
MAMP	Padrões moleculares associados ao microorganismo (do inglês <i>Microbe-associated molecular patterns</i>)
ME	Microscopia eletrônica
MIMP	Padrões moleculares induzidos por microorganismo (do inglês <i>Microbe-induced molecular patterns</i>)
MP	Proteína de movimento viral (do inglês <i>Movement protein</i>)
NBS-LRR	Sítio de ligação ao nucleotídeo rico em repetições de leucina (<i>Nucleotide-binding site-leucine-rich repeat</i>)

NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
PDLP	Proteínas localizadas no plasmodesmo (do inglês <i>Plasmodesmata-localized proteins</i>)
PDR	Resistência derivada do patógeno (do inglês <i>Pathogen-derived resistance</i>)
PRR	Receptores de reconhecimento (<i>Patterns recognition receptors</i>)
PTGS	Silenciamento pós-transcricional do gene (do inglês <i>Post-transcriptional gene silencing</i>)
PTI	Imunidade desencadeada por PAMP (do inglês <i>PAMP-triggered immunity</i>)
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>)
Rn	Repórter normalizado
RNA _m	RNA mensageiro
RNP	Ribonucleoproteína
RQ	Quantidade relativa (do inglês <i>Relative quantification</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Reverse transcription-Polymerase chain reaction</i>)

SAR	Resposta sistêmica adquirida (do inglês <i>Systemic acquired resistance</i>)
SEL	Tamanho limite de exclusão (do inglês <i>Size exclusion limit</i>)
siRNA	Pequeno RNA de interferência (do inglês <i>Small-interfering RNA</i>)
ssDNA	DNA fita simples (do inglês <i>Single-strand DNA</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Papaya meleira virus (PMeV): um vírus de dsRNA que afeta a cultura do mamoeiro no Brasil.....</i>	15
1.2	Replicação dos vírus na planta.....	22
1.3	Movimento dos vírus nas plantas.....	26
1.4	Defesa natural das plantas contra patógenos	32
1.4.1	<i>Modelos moleculares para o reconhecimento do patógeno.....</i>	33
1.5	Defesa natural das plantas contra viroses	37
1.6	Supressores virais do silenciamento do RNA.....	39
1.7	Indução de resistência contra viroses	40
1.7.1	<i>Resistência mediada por proteína (PMR)</i>	40
1.7.2	<i>Resistência mediada por RNA.....</i>	41
1.8	Plantas transgênicas resistentes a vírus	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	METODOLOGIA.....	45
3.1	Cultivo de mudas de mamoeiro	45
3.2	Inoculação das mudas.....	45
3.3	Diagnóstico molecular do PMeV.....	47
3.3.1	<i>Extração de ácidos nucléicos a partir de látex</i>	47
3.3.1.1	<i>Eletroforese dos ácidos nucléicos extraídos a partir de látex.....</i>	48
3.3.1.2	<i>Detecção do PMeV por RT-PCR convencional.....</i>	48

3.3.1.2.1	Determinação da concentração e pureza dos ácidos nucleicos....	48
3.3.1.2.2	Tratamento com DNase I	49
3.3.1.2.3	Iniciador.....	49
3.3.1.2.4	RT-PCR convencional.....	50
3.3.1.2.5	Eletroforese dos fragmentos de PCR.....	50
3.3.2	<i>Extração de ácidos nucleicos a partir de folha.....</i>	51
3.3.2.1	<i>Determinação da concentração e pureza dos ácidos nucleicos.....</i>	<i>52</i>
3.3.2.2	<i>Tratamento com DNase I</i>	<i>52</i>
3.3.2.3	<i>Iniciadores.....</i>	<i>52</i>
3.3.2.4	<i>Detecção do PMeV por RT-PCR convencional.....</i>	<i>54</i>
3.3.2.5	<i>Eletroforese dos fragmentos de PCR.....</i>	<i>55</i>
3.3.2.6	<i>Detecção do PMeV por RT-PCR em tempo real.....</i>	<i>56</i>
3.3.2.7	<i>Quantificação relativa do dsRNA viral por RT-PCR em tempo real....</i>	<i>57</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Cultivo das mudas de mamoeiro	58
4.2	Inoculação das mudas.....	59
4.2.1	<i>Avaliação da presença de PMeV no látex inoculado nas mudas</i>	59
4.2.2	<i>Determinação da concentração do dsRNA viral inoculado nas mudas</i>	61
4.2.3	<i>Eficiência da inoculação nas mudas</i>	61
4.3	Diagnóstico molecular do PMeV nas mudas inoculadas	63
4.3.1	<i>Diagnóstico molecular do PMeV em amostras de látex.....</i>	63
4.3.1.1	<i>Eletroforese dos ácidos nucleicos.....</i>	<i>63</i>
4.3.1.2	<i>RT-PCR convencional.....</i>	<i>66</i>
4.3.2	<i>Diagnóstico molecular do PMeV em amostras de folha</i>	71

4.3.2.1	<i>RT-PCR convencional</i>	71
4.3.2.2	<i>RT-PCR em tempo real</i>	74
4.3.2.3	<i>Quantificação relativa (RQ) do vírus por RT-PCR em tempo real</i>	77
5	CONCLUSÕES	80
6	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Papaya meleira virus* (PMeV): um vírus de dsRNA que afeta a cultura do mamoeiro no Brasil

O Brasil, por sua extensão e geografia, permite o cultivo de praticamente todas as fruteiras de climas quente e úmido, temperado, temperado-frio e semi-árido, o que o torna um dos poucos países a ter condições potenciais para atender ao crescimento da demanda externa por frutas e derivados. Uma das fruteiras mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo é o mamoeiro.

O Brasil ocupa o primeiro lugar na produção de mamão, com cerca de 1,57 milhões de toneladas (t) produzidas em 2006, sendo considerado o maior produtor mundial desta fruta (FAO, 2010). Os Estados do Espírito Santo e da Bahia são responsáveis por mais de 70% da área brasileira produtora (RUGGIERO et al., 2003).

No Espírito Santo, a área cultivada com mamoeiro chegou a ultrapassar 10 mil hectares, concentrando-se principalmente nos municípios da Região Norte (Figura 1). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), o Espírito Santo exportou em 2007 um total de aproximadamente 16 mil toneladas de mamão, o que trouxe para o Estado uma renda de mais de US\$ 18 milhões.

A cultura, entretanto, é bastante suscetível às viroses, um dos principais fatores limitantes da produção. Algumas das consequências importantes do ataque de vírus em plantas são o menor rendimento da produção e a má qualidade dos produtos (HABIBE; NASCIMENTO, 2005). As viroses constituem o principal grupo de microorganismos que causam doenças no mamoeiro, ocasionando grandes perdas na produção, podendo chegar à destruição total das plantações infectadas, provocando a mudança constante de zonas produtoras, e afastando-as cada vez mais dos mercados consumidores (REZENDE; FANCELLI, 1997).

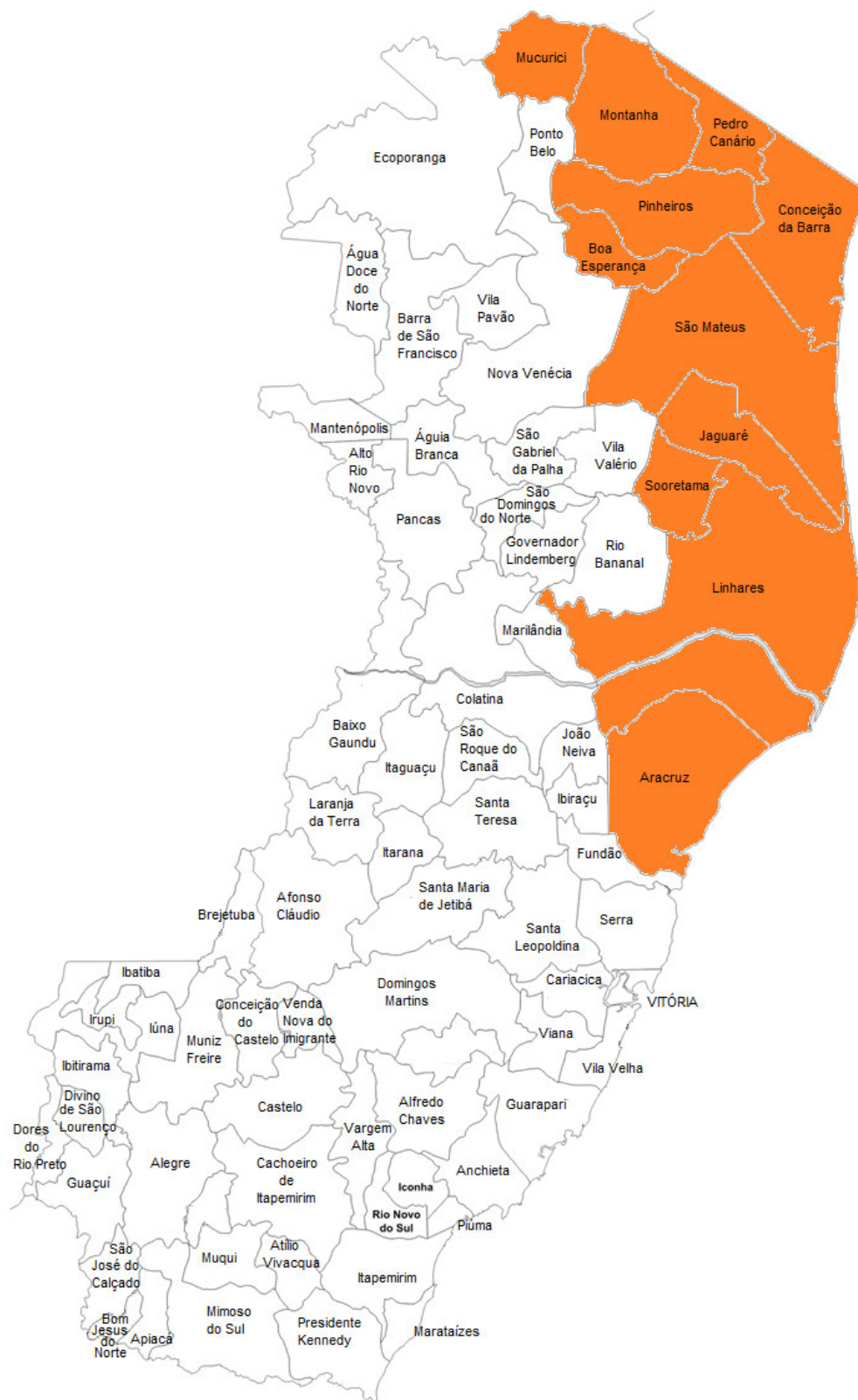


Figura 1: Principais municípios produtores de mamão do estado do Espírito Santo, localizados no norte do estado. Fonte: < http://www.nofate-es.kit.net/espírito_santo.htm>. Acesso em 10. jan. 2011.

O vírus da meleira, *Papaya meleira virus* (PMeV), cujo genoma é um RNA dupla-fita (dsRNA), é um dos principais que infectam o mamoeiro no Brasil. Esse vírus é responsável por causar uma doença conhecida como “meleira do mamoeiro”, um importante problema fitossanitário na produção de mamão.

Depois dos primeiros relatos de sua ocorrência no Espírito Santo e na Bahia, a doença foi reportada em outras regiões do Brasil, onde até 100% das plantas em algumas lavouras foram afetadas (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). Hoje, essa doença representa um dos principais fatores limitantes para a cultura do mamão. A floração de plantas infectadas é seguida pela exsudação de látex aquoso e fluido de frutos e folhas (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). A exsudação de látex ocorre naturalmente no mamão após a incisão, já que todos os tecidos da planta possuem laticíferos, que formam um complexo conjunto de células capazes de produzir látex. Normalmente, essas células estão sob alta pressão de turgência, e o látex produzido tem uma consistência leitosa. A exsudação de látex de plantas saudáveis ocorre normalmente por meio de lesões no tecido, enquanto em plantas com a doença isso ocorre espontaneamente (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). Uma vez exposto à atmosfera, o látex é oxidado levando a pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens (Figura 2B) e à coloração escura e “melada” no fruto (Figura 2A) (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). Essa última característica junto com manchas na polpa e a mancha zonada no fruto (Figura 2C), observadas em um estágio avançado da doença, comprometem comercialmente o fruto.

Diferentes mecanismos foram propostos na tentativa de explicar a etiologia da meleira. Após uma análise por microscopia eletrônica (KITAJIMA et al., 1993), a detecção da ocorrência de partículas parecidas com vírus de aproximadamente 50 nm de diâmetro em látex e laticíferos de plantas doentes e o isolamento de moléculas de dsRNA de aproximadamente 12000 pb de tecidos infectados reforçaram a possível etiologia viral da meleira do mamoeiro. Ao contrário da maioria dos vírus de RNA de plantas, em que moléculas de dsRNA são formadas em passos específicos durante a replicação do genoma viral, partículas virais isoladas a partir de plantas com a meleira do mamoeiro apresentam o dsRNA como um genoma permanente (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003). O vírus foi chamado

de *Papaya meleira virus* (ZAMBOLIM et al., 2003). Seu genoma incomum e sua ocorrência limitada aos laticíferos do mamoeiro o distinguem de muitos outros vírus de plantas.

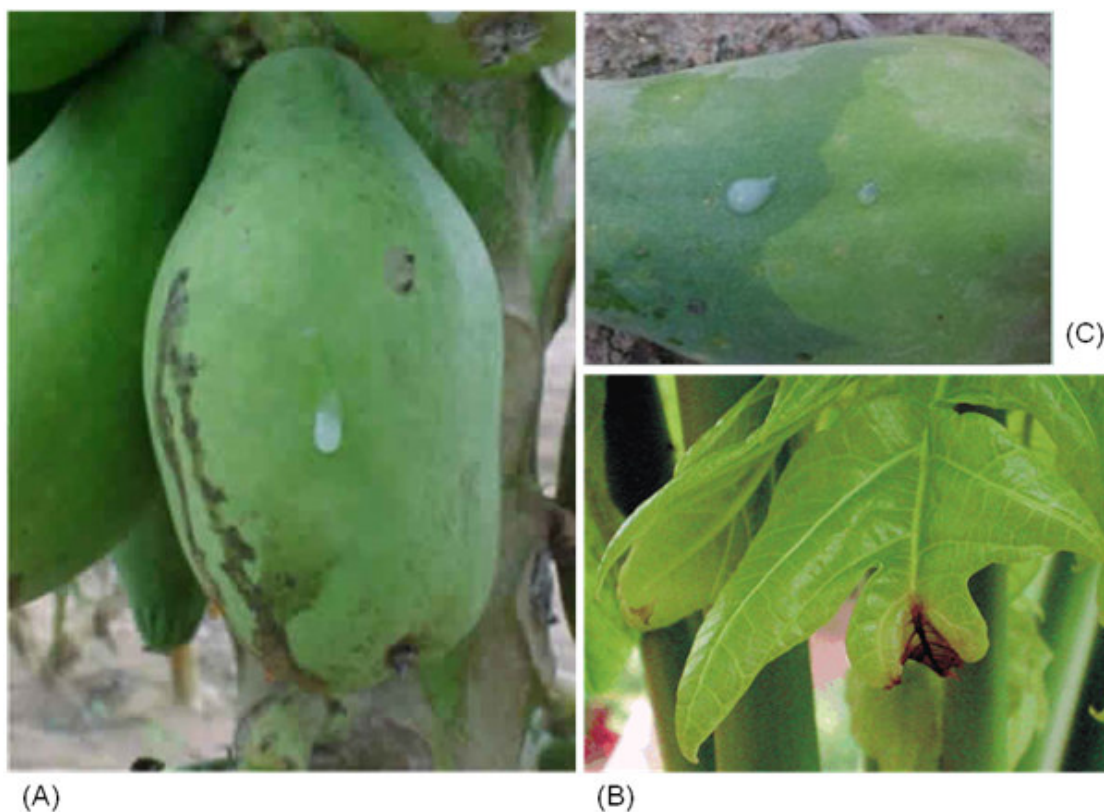


Figura 2: Frutos e folha de mamão com os principais sintomas da meleira do mamoeiro. (A) Exsudação espontânea de látex aquoso na superfície dos frutos. Note o látex oxidado, ao lado esquerdo do fruto, com um aspecto “melado”. (B) Queima na ponta das folhas jovens. (C) Manchas zonadas superficiais de cor verde-clara. Fonte: VENTURA, et al., 2004.

Dados recentes de microscopia eletrônica e dados moleculares indicam que as partículas virais estão fortemente ligadas aos polímeros presentes no látex, possivelmente como um mecanismo de proteção ou para auxiliar o transporte viral (RODRIGUES et al., 2005). Curiosamente, a morfologia dos polímeros e a fisiologia dos laticíferos são alteradas pelo vírus. Ácidos nucleicos extraídos de látex de mamoeiros com sintomas característicos da meleira apresentaram a banda característica de 12 kbp do PMeV (Figura 3).

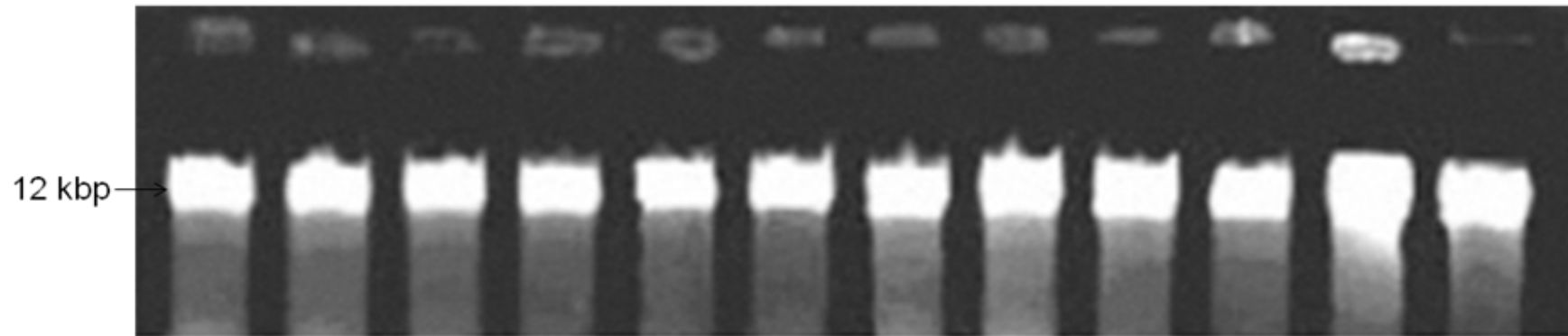


Figura 3: Separação por eletroforese em gel de agarose 1% dos ácidos nucléicos extraídos de látex de mamoeiros adultos com sintomas da meleira. Após corrida, a banda de dsRNA de 12 kbp correspondente ao genoma do PMeV aparece em todas as amostras de látex, guardadas a -20°C diluídas em tampão citrato pH 5,0 (1:1). Fonte: RODRIGUES et al., 2009.

Várias outras espécies de plantas foram testadas quanto à sua susceptibilidade ao PMeV. O dsRNA viral pôde ser apenas extraído de *Brachiaria decumbens* embora essas plantas permanecessem livres de sintomas (ZAMBOLIM et al., 2003).

Ao mapear mamoeiros doentes no campo mensalmente, Ventura e colaboradores observaram que a disseminação da doença ocorre ao longo das linhas da plantação, sugerindo que a propagação do PMeV é induzida por tratos culturais, embora outros estudos epidemiológicos fortemente indiquem também o envolvimento de vetores. Ambos os insetos, *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes variabilis*, foram considerados pragas para a cultura do mamão no Brasil (CULIK et al., 2003). Assim, a exposição de plantas de mamão saudáveis a *B. tabaci* infectados com o dsRNA do PMeV resultou na presença de ambos, dsRNA e sintomas da meleira no mamoeiro (VIDAL et al., 2000). Inversamente, *T. variabilis* não foi capaz de transmitir o PMeV para mamoeiros sadios em plantações no estado do Espírito Santo sob condições controladas, mesmo quando a ocorrência da doença era acompanhada de grandes populações dos insetos (ANDRADE et al., 2003). Assim, testes adicionais poderiam mostrar a descoberta de outros vetores potenciais para a transmissão do PMeV.

Os danos causados aos tecidos do mamoeiro durante o manejo da cultura podem favorecer a transmissão do PMeV para plantas sadias vizinhas, já que o vírus possui uma vasta distribuição na planta (RODRIGUES; FERNANDES; VENTURA, 2003; RODRIGUES et al., 2005). Simulando tal situação, foram avaliados diferentes métodos de transmissão tais como por meio de cortes nas folhas e pecíolos e por meio da fricção do caule induzindo feridas que seriam trazidas pela abrasão. Curiosamente, a infecção somente ocorreu quando látex infectado foi diretamente injetado dentro do tecido do caule. Esses resultados mostram que as ferramentas de trabalho ou o movimento de tratores ao longo da plantação, não transmitem o PMeV, sendo a proteção provavelmente feita pela polimerização do látex na planta que rapidamente obstrui a superfície ferida (MOUTIM et al., 1999). Condições análogas ocorrem com a grande maioria dos vírus de planta, suportando a idéia do envolvimento de vetores, especialmente daqueles vetores que possuem um aparelho bucal de sucção.

A fácil identificação dos sintomas da doença e a subsequente erradicação das plantas doentes é uma estratégia para controlar a meleira do mamoeiro (VENTURA;

COSTA; TATAGIBA, 2003). Entretanto, os sintomas são disparados somente após a floração e, portanto, plantas infectadas livres dos sintomas são capazes de transmitir o PMeV (VENTURA et al., 2004). Um método de diagnóstico molecular foi então estabelecido usando moléculas de dsRNA como alvo (RODRIGUES et al., 2005). Esse método, baseado na ocorrência de vírus em tecidos ricos em laticíferos (RODRIGUES; VENTURA; FERNANDES, 2003) e sua íntima relação com os polímeros do látex (RODRIGUES et al., 2005), é aplicável para ambos, tecido (folha) e látex, de plantas assintomáticas, com o vírus detectado quinze dias após a inoculação.

Apesar de diferentes genótipos serem avaliados em programas de reprodução no Brasil, ainda não existe uma cultivar¹ resistente ao PMeV. Atualmente, tem-se avaliado a indução geral de resistência ao patógeno usando moléculas de elicitores de natureza química ou biológica. Resultados interessantes têm sido obtidos usando óxido nítrico (NO) como um elicitador químico. Mudas de duas diferentes cultivares de mamão tratados com NO mostraram acúmulo de compostos usados para defesa, principalmente açúcares e fenóis, bem como a modificação dos padrões de transcrição de genes de defesa e uma alta atividade de enzimas de detoxificação (SANTOS; FERNANDES; VENTURA, 2005). O NO é uma molécula sinalizadora em vários processos, tais como no desenvolvimento de plantas, na indução de genes que codificam hormônios e de proteínas relacionadas à defesa (SOOSAAR; BURCH-SMITH; DINESH-KUMAR, 2005). Assim, o aumento da expressão do gene da peroxidase (PRO) e da atividade da PRO foram observados, provavelmente para permitir que a planta reforce a estrutura da parede celular e para ativar vias regulatórias de defesa (SOOSAAR; BURCH-SMITH; DINESH-KUMAR, 2005). Resultados similares foram obtidos usando extratos de levedura, indicando que os elicitores nesse extrato poderiam também aumentar a resposta de defesa do mamoeiro.

Moléculas de dsRNA de origem viral podem ser usadas como elicitores biológicos. Ao serem introduzidas artificialmente nas plantas, elas desencadeiam uma resposta de defesa induzida por RNA (TENLLADO et al., 2003). Assim, como o dsRNA do

¹Cultivar é a designação dada a uma planta cultivada, correspondendo a um determinado genótipo que foi seleccionado e recebeu um nome único e devidamente registado com base nas suas características produtivas, decorativas ou outras que o tornem interessante para cultivo.

PMeV está presente no látex de plantas infectadas em alta concentração, pode ser facilmente extraído (RODRIGUES et al 2005). Dessa forma, essas moléculas de dsRNA podem ser usadas como elicitores biológicos. Sendo artificialmente introduzidas em mudas ou em mamoeiros adultos, podem representar uma alternativa potencial para desafiar plantas de mamão a responderem à infecção do PMeV. Esse processo, portanto, seria uma alternativa ao uso de agroquímicos e ao desenvolvimento de plantas transgênicas.

1.2 Replicação dos vírus na planta

Os vírus são partículas pequenas cujo material genético pode ser DNA ou RNA. A grande maioria das viroses de plantas possui genoma de RNA senso, embora também existam genoma de RNA antisenso e RNA dupla-fita (dsRNA). Outras viroses de planta tem DNA como genoma, que pode ser fita simples (ssDNA) ou fita dupla (dsDNA). Eles dependem inteiramente da célula hospedeira para se replicar e produzir novas partículas infecciosas, uma vez que possuem um grupo limitado de genes que codificam informação principalmente para replicação, encapsidação e movimento intercelular, sendo conhecidos como parasitas intracelulares obrigatórios.

Devido à sua alta taxa de replicação e por serem propensos a erros de replicação do genoma, causando mutações espontâneas (DOMINGO; HOLLAND, 1997; NIEHL; HEINLEIN, 2009), os vírus são capazes de formar populações com uma grande diversidade de genótipos, o que contribui para a adaptação às mudanças que ocorrem na célula hospedeira (NIEHL; HEINLEIN, 2009).

Em plantas, a infecção viral, muitas vezes, está associada ao aparecimento de diversos sintomas, como amarelecimento e necrose nas superfícies foliares. Alguns vírus, no entanto, replicam-se sem provocar sintomas aparentes, enquanto outros podem produzir diferentes sintomas numa mesma planta, os quais ainda podem variar dependendo do cultivar e das condições ambientais. Muito provavelmente o aparecimento de sintomas está associado à interação dos componentes virais com

os fatores do hospedeiro, o que afeta a fisiologia e o desenvolvimento da planta (LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010).

Um modelo do processo de replicação existe para vírus cujo genoma é de RNA senso, que por definição, pode ser traduzido pela maquinaria da célula. Uma ou mais poliproteínas virais são traduzidas e posteriormente clivadas por proteases celulares ou virais em proteínas. Após isso, um complexo de replicação formado pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), proteínas não estruturais, RNA viral e fatores do hospedeiro é montado para sintetizar o RNA viral (ORTÍN; PARRA, 2006; MILLER; KRIJNSE-LOCKER, 2008; LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010).

Embora já tenha sido proposto um paralelo entre os complexos de replicação de vírus com genoma de RNA senso e retrovírus, não é simples formular um único modelo que explique como o processo de replicação acontece para todos os vírus de planta. Mesmo para vírus cujo genoma é de RNA senso, que possuem um modelo do processo de replicação mais bem entendido, não é possível abordar todos os aspectos relacionados à replicação viral.

As etapas do ciclo de vida do vírus podem ocorrer associadas a alterações em certas estruturas celulares, como na membrana de diferentes compartimentos celulares (mitocôndria, retículo endoplasmático, etc.) e no cloroplasto (MILLER; KRIJNSE-LOCKER, 2008; LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010), que são usados para formar estruturas, conhecidas, em plantas, como virosomas ou viroplasmas, para abrigar o processo de replicação viral (NETHERTON et al., 2007; NOVOA et al., 2005). As primeiras observações de que os vírus causam alterações na membrana da célula infectada foi feita por Microscopia Eletrônica (ME).

As modificações na estrutura da membrana de células vegetais geralmente envolvem a formação de esferas e vesículas, que inicialmente estão ligadas à dupla camada da membrana. Acredita-se que essas alterações aumentam a concentração local dos componentes necessários à replicação, fornecem a base para ancorar o complexo de replicação, confinam o processo de replicação em um local específico do citoplasma, ajudam a prevenir a ativação de certos mecanismos de defesa que podem ser disparados pela formação de dsRNA durante o processo de replicação, além de fornecer certos lipídios que são necessários para a síntese do genoma

(McCARTNEY et al., 2005; COTTON et al., 2009; LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010). As membranas do retículo endoplasmático (RE) e das mitocôndrias fornecem uma fonte abundante de membrana que podem facilmente expandir e se rearranjar, o que pode justificar o fato de elas serem preferencialmente usadas (MILLER; KRIJNSE-LOCKER, 2008).

Proteínas de origem viral individualmente são capazes de induzir alterações nas estruturas de membrana. Estudos mostram que a expressão de proteínas virais em cultura de células induz alterações que são similares àquelas observadas em células infectadas. Uma vez que essas membranas são de origem celular, existem provavelmente, fatores celulares que também exercem um importante papel no processo de replicação viral. Existem, por exemplo, proteínas celulares que, por diferentes mecanismos, levam à deformação, à curvatura da membrana (MILLER; KRIJNSE-LOCKER, 2008).

Um modelo para explicar o processo de replicação viral (Figura 4) mostra que após a liberação do RNA genômico viral no citoplasma da célula hospedeira, a maquinaria celular usada para a síntese de proteínas é usurpada para sintetizar proteínas virais. Essa síntese ocorre, muito provavelmente, em ribossomos associados ao retículo endoplasmático. Após vários processos de tradução, muitas proteínas virais que se ligam à membrana acumulam na membrana externa do RE, o que dá início à sua curvatura (LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010). Para processos de replicação que não acontecem no RE, existe um tipo de sistema de transporte ou de sinalização entre este e as organelas alvo (TABAK et al., 2003) para que as proteínas virais sintetizadas sejam translocadas para o seu destino final (LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010). As proteínas iniciam, então, a montagem do complexo de replicação e à medida que componentes de replicação acumulam, aumenta a curvatura da membrana. Isso leva à formação de esferas e vesículas com uma única membrana, dentro do lúmen da organela (Figura 4), que podem ou não ter conexão com o exterior.

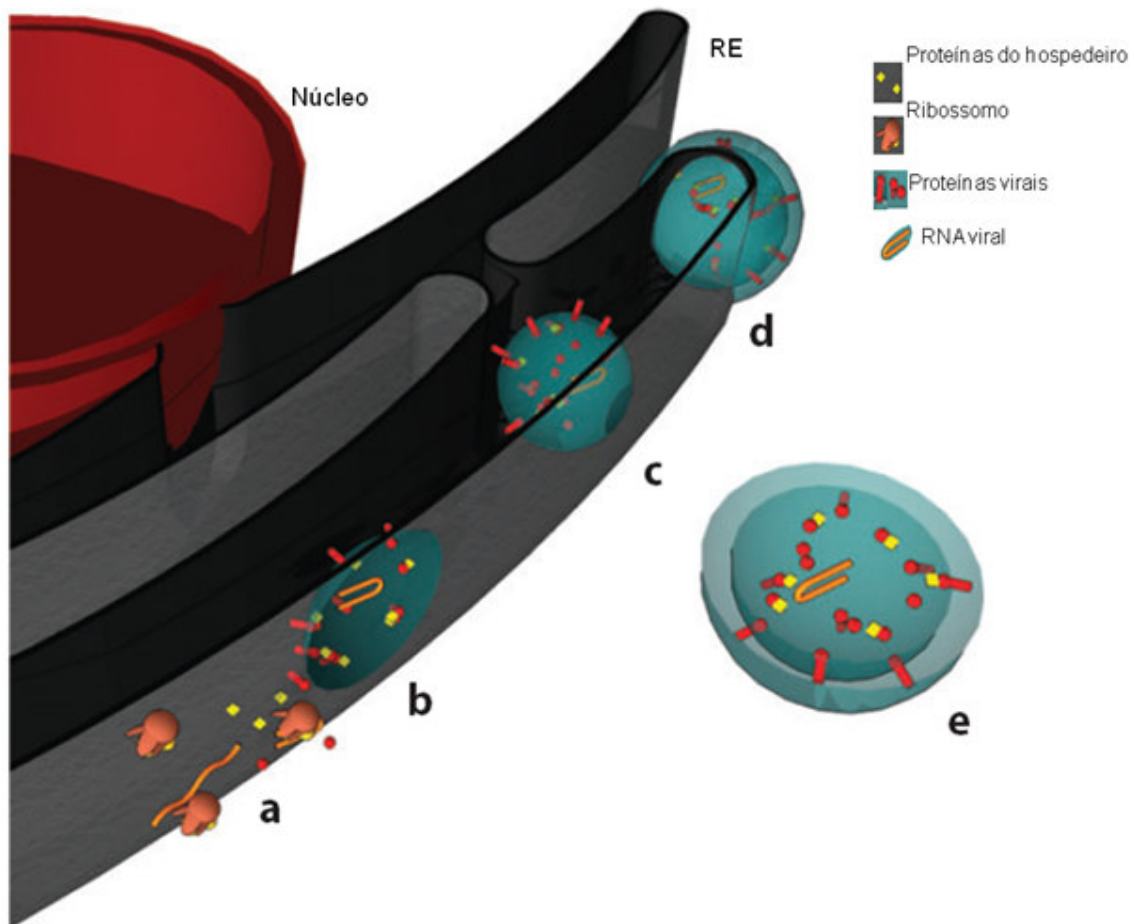


Figura 4: Modelo para a formação de vesículas virais na membrana do RE. (a) Após a liberação do RNA genômico viral no citoplasma, a produção de proteínas virais é realizada nos ribossomos associados ao RE. (b) Durante a tradução do RNA viral, proteínas virais que se associam à membrana acumulam na membrana do RE e iniciam a sua curvatura. (c) A curvatura da membrana aumenta com o acúmulo dos componentes de replicação, o que leva à formação de uma vesícula com uma única membrana dentro do lúmen da organela, que pode ou não ter conexão com o exterior. (d) Para algumas viroses, a vesícula produzida sofre um segundo evento de formação, adquirindo uma segunda membrana. (e) A vesícula se destaca do RE como uma vesícula com dupla camada de membrana. Fonte: LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010.

Para algumas viroses, as vesículas formadas permanecem dentro da organela alvo e o processo de formação de novas partículas virais pararia neste momento. Para muitas outras viroses, grandes grupos de vesículas aparecem no citoplasma, onde teriam uma dupla camada de membrana. Existem dois mecanismos que poderiam explicar a formação da dupla camada de membrana das vesículas virais. Em um dos modelos as vesículas produzidas após a primeira formação dentro do lúmen da organela alvo, sofreriam um segundo evento de formação, adquirindo uma segunda membrana e se destacando do RE. Em um modelo alternativo, a membrana do RE

sofreria uma protusão e se destacaria originando vesículas com dupla camada. Vale ressaltar que muitas viroses formam uma rede de vesículas conectadas à membrana, onde outros processos virais, além da replicação, acontecem. No entanto, independente das características únicas de cada virose, tais processos de montagem da partícula viral fornecem uma impressionante estrutura biológica com ambientes favoráveis para a sua reprodução (LALIBERTÉ; SANFAÇON, 2010).

Os vírus de dsRNA, como observado para outros vírus, possuem uma capa protéica, chamada capsídeo, que atua, principalmente, protegendo o genoma viral (REINISCH, 2002). A interação entre as proteínas capsidiais e a associação do genoma do vírus com estas proteínas estabiliza fortemente a estrutura do capsídeo. Durante todo o ciclo replicativo dos vírus de dsRNA, o seu genoma permanece dentro do capsídeo, que é formado por algumas camadas de proteínas, sendo que a mais interna delas atua como um núcleo em miniatura. Este núcleo possui uma enzima polimerase, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que produz novos dsRNAs durante as replicações do vírus. As RdRps também integram um complexo de transcrição responsável pela síntese e processamento dos RNAs mensageiros, que comandam a produção de proteínas virais no citoplasma das células hospedeiras (REINISCH, 2002; HULL, 2004).

1.3 Movimento dos vírus nas plantas

Após o processo de replicação, as novas partículas virais sintetizadas podem se movimentar na planta hospedeira. As viroses de plantas se movimentam no hospedeiro usando várias vias, sendo as mais comuns o movimento célula-célula por meio dos plasmodesmos (PD), única organela intercelular do reino das plantas (OPARKA, 2004), e o movimento entre órgãos por meio do sistema vascular, mais especificamente pelo elemento do tubo crivado do floema (LUCAS et al., 2001; OPARKA; SANTA CRUZ, 2000; VAN BEL, 2003). Alguns vírus ainda podem se movimentar utilizando os vasos do xilema (HULL, 2004; KEHR; BUTZ, 2008).

Enquanto o movimento sistêmico depende da habilidade do vírus para se mover em diferentes tipos celulares, incluindo mesófilo, parênquima, células companheiras e elementos crivados, o movimento célula-célula envolve somente células da epiderme e do mesófilo (NIEHL; HEINLEIN, 2011).

Plasmodesmos são canais de comunicação que permitem o tráfego de macromoléculas entre células adjacentes (Figura 5). Eles são responsáveis pela conexão citoplasmática entre células vizinhas, possibilitando a troca de moléculas de informação, funcionais e estruturais durante o crescimento e o desenvolvimento da planta. Substâncias podem se mover entre as células com velocidade muito superior à observada no transporte através de membranas.

O floema (Figura 6) é um tecido responsável pelo transporte de nutrientes orgânicos, especialmente açúcares produzidos pela fotossíntese. Esse tecido é capaz de translocar uma grande quantidade de material muito rapidamente. Os elementos crivados, que são as células crivadas e elementos do tubo crivado, são os elementos condutores do floema. As células crivadas apresentam as chamadas áreas crivadas, isto é, áreas que apresentam poros através dos quais se interconectam os protoplastos² de elementos crivados contíguos, tanto no sentido vertical como lateral.

² Protoplasto é o conteúdo vivo de uma célula, basicamente constituído das organelas celulares e outras estruturas que sejam ativas no metabolismo celular.

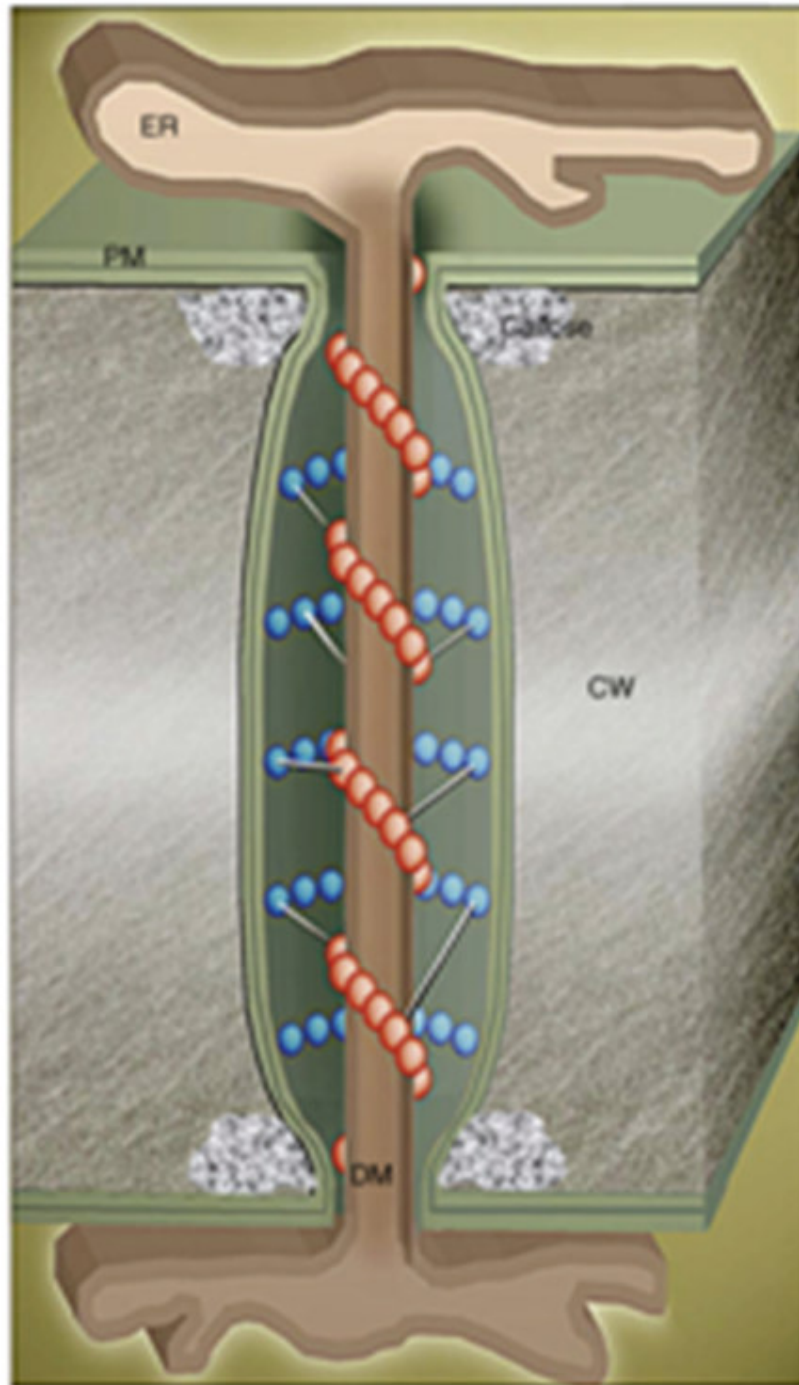


Figura 5: Estrutura básica de um plasmodesmo entre células adjacentes formado na citocinese. Cada plasmodesmo é constituído de um desmotúbulo (DM) envolto pela membrana plasmática (PM), contínua entre as células adjacentes. O DM é uma porção do retículo Endoplasmático (ER), que se estreita no canalículo que atravessa a parede celular (CW) de cada uma das células adjacentes, formando uma ligação entre os seus citoplasmas. Fonte: MAULE, A. J., 2008.

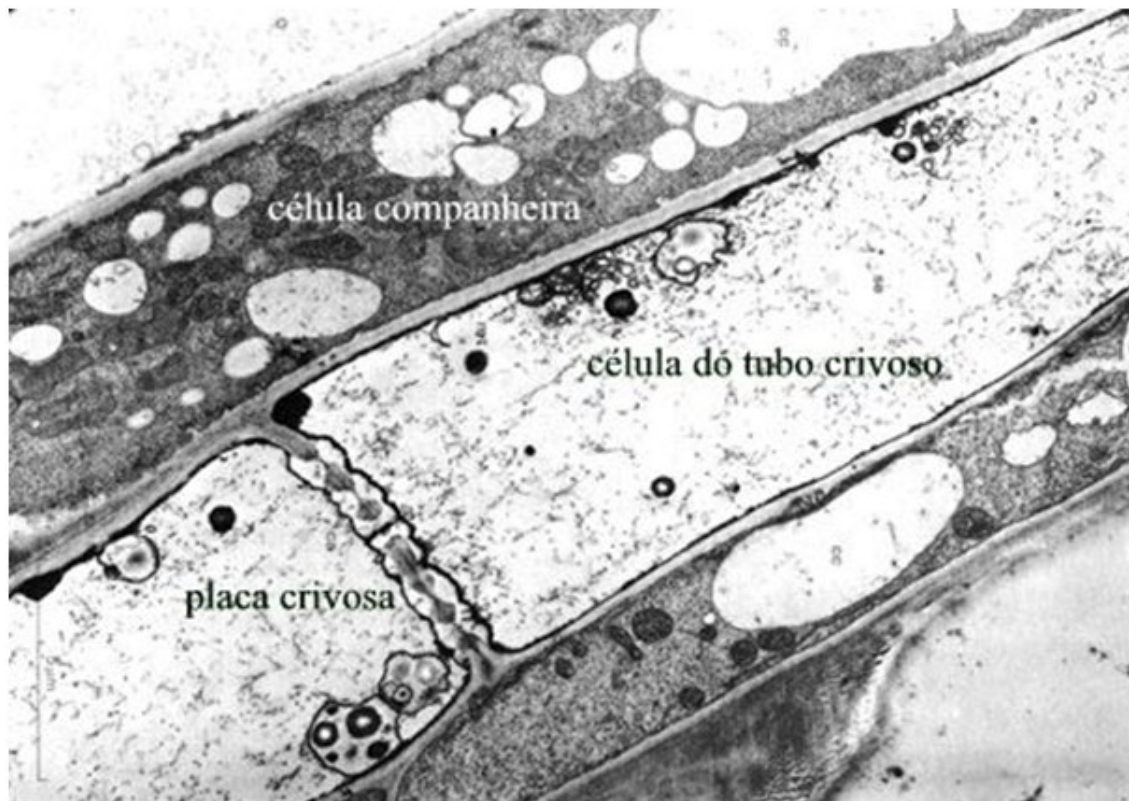


Figura 6: Floema em corte longitudinal, mostrando os elementos do tubo crivado e as células companheiras. Os poros presentes na placa crivada permitem a comunicação entre protoplastos de elementos do tubo crivado contínuos, que se enfileiram formando o tubo crivado, promovendo a condução de substâncias. Fonte: <<http://curlygirl.no.sapo.pt/tecidopl.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

Para se mover por meio de PD, os vírus possuem diferentes mecanismos. Os dois mecanismos mais bem caracterizados são os movimentos guiados por túbulo e os movimentos não guiados por túbulo (NIEHL; HEINLEIN, 2011). O transporte guiado por túbulo envolve a modificação estrutural do PD pela inserção de um túbulo sintetizado com o auxílio de proteínas de movimento viral (MP) interagindo com proteínas localizadas no plasmodesmo (PDL) (KASTEEL et al., 1996; WELLINK et al., 1993) (Figura 7b). Nesse caso, o desmotúbulo está ausente e em vários casos o diâmetro do poro foi dilatado (KORMELINK et al., 1994; VAN DER WEL et al., 1998). Já o mecanismo de movimento não guiado por túbulo não envolve maiores mudanças na estrutura do plasmodesmo. Na presença de MP, 1,3- β -glucanase degrada uma calose presente no PD, o que provoca a dilatação do poro. Adicionalmente, fluxo de íons na membrana plasmática ativa enzimas relacionadas à modificação da parede celular, que reduzem a rigidez da mesma. A quebra da actina por MP resulta em um distanciamento dos componentes protéicos no desmotúbulo

do PD e o relaxamento da membrana plasmática. Complexos de ribonucleoproteínas virais se movem então pelo PD por difusão ao longo do desmotúbulo (NIEHL; HEINLEIN, 2011) (Figura 7c).

Pelo modelo descrito, percebe-se que para acelerar o movimento célula-célula do vírus, MPs aumentam o tamanho limite de exclusão (SEL) do PD. Entretanto, os mecanismos utilizados por essas proteínas virais para regular o aumento do SEL é pouco conhecido. Vários modelos já foram propostos para explicá-los. Dentre eles, sugere-se a participação de componentes do citoesqueleto (CHEN et al., 2010).

Já foi relatado que filamentos de actina podem estar envolvidos na regulação do transporte por meio de PD pelo controle da permeabilidade do mesmo. Assim, Chen e colaboradores (2010) investigaram se a actina do citoesqueleto participa no aumento do SEL do PD induzido por MP de *Cucumber mosaic virus* (CMV). Os resultados mostram que os filamentos de actina estão, de fato, envolvidos e que a sua despolimerização é também necessária para essa atividade.

Quando a infecção se inicia em células da epiderme, o vírus segue para o mesófilo e floema (parênquima e células companheiras) utilizando os PDs de células adjacentes. A partir das células companheiras, os vírus chegam até os vasos do floema, onde ocorre o movimento em longa-distância para os diferentes órgãos da planta, seguindo o fluxo de fotoassimilados. Novamente, através do movimento célula-célula, os vírus são liberados do floema, resultando em infecção sistêmica. O mecanismo de movimento através do floema é diferente daquele do movimento célula-célula. Ainda não se sabe se as MPs estão também envolvidas no movimento dependente do floema (SAREILA et al., 2004).

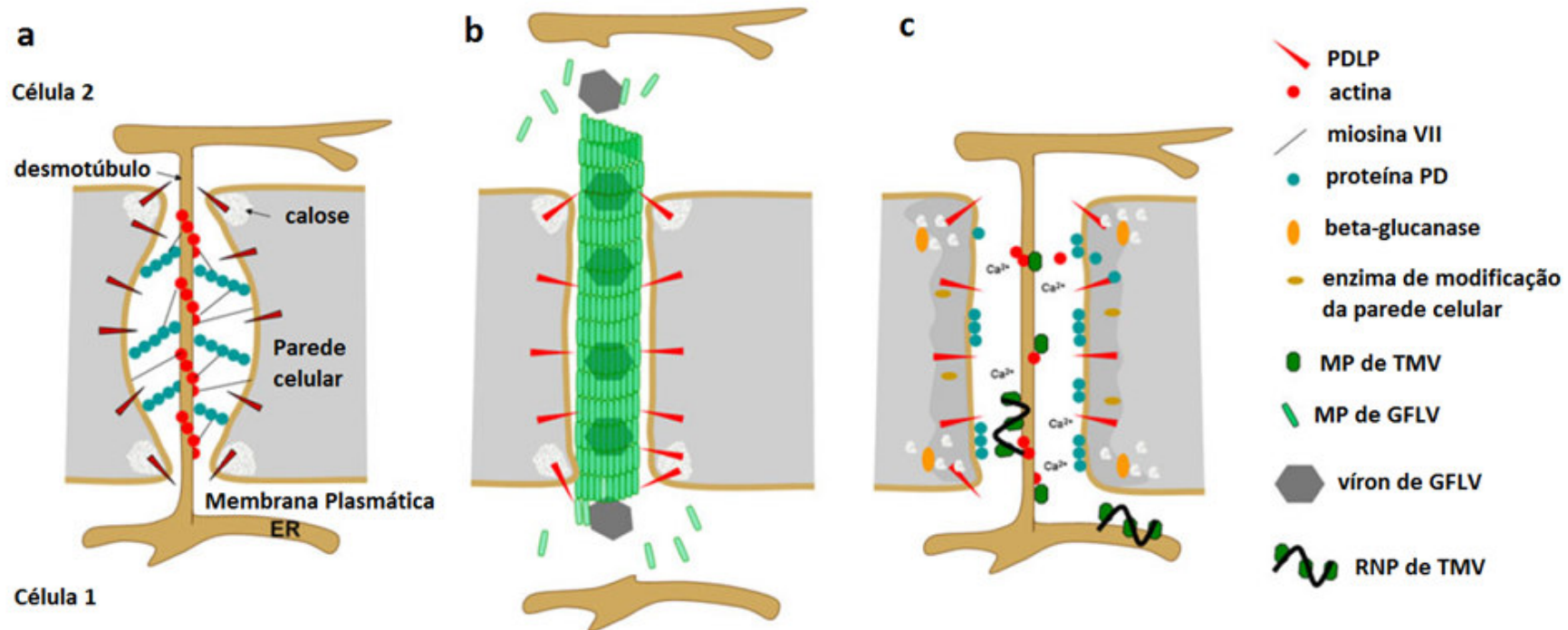


Figura 7: Modelo de modificação do PD por MP. (a) Estrutura de PD não-modificado. (b) Modificação do PD por MP de *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). A formação do túbulo ocorre pela interação de MP com PDLP. O túbulo substitui o desmotúbulo dentro do PD. (c) Modificação do plasmodesmo por *Tobacco mosaic virus* (TMV), permitindo o movimento de ribonucleoproteínas (RNP) por difusão ao longo do desmotúbulo. Fonte: NIEHL; HEINLEIN, 2011.

A movimentação de alguns vírus, no entanto, ainda é pouco compreendida, como é o caso do *Papaya meleira virus* (PMeV), que causa a meleira do mamoeiro. Apesar disso, acredita-se que o PMeV se movimenta, possivelmente, através dos vários laticíferos do mamoeiro, cujas células estão distribuídas em praticamente todos os órgãos e tecidos da planta (RODRIGUES et al., 2009). Após a análise de tecidos de folhas e frutos de mamoeiros com meleira, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que o PMeV está presente apenas nos laticíferos das plantas (KITAJIMA et al., 1993). Além disso, a ocorrência do vírus em diferentes órgãos do mamoeiro foi determinada em flores, folhas, caule e frutos verdes indicando que o vírus se concentra nos órgãos que exsudam látex em abundância, quando incisados (RODRIGUES et al., 2009).

1.4 Defesa natural das plantas contra patógenos

Para que as células da planta possam responder prontamente à invasão de microorganismos, elas precisam ter a habilidade, primeiramente, de detectar a presença de patógenos. De acordo com o modelo mais aceito, o reconhecimento do patógeno ocorre graças a dois grupos importantes de receptores (GŁOWACKI et al., 2010). O primeiro grupo, receptores de reconhecimento (PRRs), compreende os receptores especializados no reconhecimento de moléculas associadas ao patógeno (PAMPs), como lipopolissacarídeos, mureína, flagelina ou quitina, que são conservadas nos microorganismos, mas estão ausentes nas células hospedeiras. PRRs são usualmente proteínas transmembrana localizadas na superfície celular, que ao reconhecerem PAMPs derivados de microorganismos, permitem a ativação da cascata de sinalização MAP kinase pela planta, o que resulta na indução de uma resposta de defesa primária ou basal que inibe a invasão do patógeno (RAFIQI et al., 2009). A resistência à patógenos fornecida por esses receptores são chamadas de imunidade desencadeada por PAMP (PTI) (UEMATSU; ARIKA, 2006; ALTENBACH; ROBATZEK, 2007; IRITI; FAORO, 2007; ZIPFEL, 2008).

O outro grupo compreende principalmente receptores intracelulares chamados de proteínas de resistência (proteínas R). Muitas dessas proteínas já identificadas pertencem à família de proteínas de ligação a nucleotídeo com ricas repetições de leucina (NBS-LRR). Esses receptores detectam elicitores do patógeno introduzidos nas células hospedeiras (GŁOWACKI et al., 2010).

Se o hospedeiro não possui receptores apropriados, elicitores patogênicos (fatores de virulência) induzem a supressão dos mecanismos de defesa, o que resulta na susceptibilidade desencadeada pelo elicitador (ETS). Por outro lado, se o hospedeiro tem receptores disponíveis, os elicitores patogênicos (que nesse caso funcionam como fatores de avirulência na célula-alvo) permitem o início de uma relevante resposta de defesa, geralmente conhecida como imunidade desencadeada pelo elicitador (ETI).

De acordo com o modelo zig-zag, o desenvolvimento de uma resposta ETI pelo hospedeiro leva a uma pressão seletiva, que resulta na produção de novos elicitores pelo patógeno, não reconhecidos pelos receptores da planta. Conseqüentemente, esses novos elicitores exercem pressão no hospedeiro de forma que este produza novos receptores. Este ciclo pode acontecer infinitamente (JONES; DANGL, 2006; HEIN et al, 2009).

1.4.1 Modelos moleculares para o reconhecimento do patógeno

No modelo gene-a-gene ocorre um reconhecimento específico direto do elicitador patogênico pelo receptor do hospedeiro (FLOR, 1971) (Figura 8a). Embora tenham sido identificados receptores envolvidos nesse tipo de interação, em muitos casos, outras proteínas do hospedeiro cooperam para que a resposta de resistência seja iniciada. Esse fenômeno pode ser explicado pelo modelo conhecido como “modelo guarda”, em que a proteína que pode ser alvo do elicitador patogênico é “guardada” por uma proteína-guarda, um receptor NBS-LRR, que se liga ao elicitador patogênico. Dessa forma, não ocorre uma detecção direta da molécula elicitadora do patógeno

(Figura 8b). Nesse caso, o que pode ser observado são alterações funcionais e/ou estruturais na célula hospedeira (JONES; DANGL, 2006; DE WIT, 2007; TAMELING; BAULCOMBE, 2007).

Um novo modelo de interação planta-patógeno é o modelo *decoy*, uma modificação do “modelo guarda”. De acordo com este modelo, proteínas específicas, que são similares àquelas que podem ser alvos de elicitores patogênicos, são produzidas pela planta em algumas interações planta-patógeno. A função dessas proteínas *decoy* é se ligar aos elicitores e mediar as interações dos mesmos com proteínas R. Elas não têm nenhuma função na célula quando as proteínas R estão ausentes (Figura 8c).

No entanto, já foi apresentado um novo conceito de classificação de receptores e elicitores envolvidos na imunidade da planta (MACKEY; McFALL, 2006). Esse conceito sugeriu que fatores de microorganismos reconhecidos por interações diretas com os receptores do hospedeiro deveriam ser classificados como padrões moleculares associados ao microorganismo (MAMPs), enquanto fatores reconhecidos por outros receptores deveriam ser classificados como padrões moleculares induzidos por microorganismos (MIMPs). Nesse modelo, então, as proteínas receptoras classificadas como MAMP podem interagir diretamente com elicitores específicos e as proteínas receptoras MIMP detectam as interações entre os elicitores patogênicos e suas proteínas alvo.

A percepção de MAMPs ou MIMPs pelas proteínas receptoras R leva à resposta de hipersensibilidade (HR), que é uma forma de morte celular programada no local da infecção. Embora isso não previna a invasão do hospedeiro pelo patógeno, essa resposta pode limitar a dispersão do patógeno para outros órgãos da planta.

Embora na planta existam diferentes receptores celulares, como já descritos, que ativam diferentes vias de sinalização, acredita-se que PTI e ETI estão interconectados para parar a infecção do patógeno (PANSTRUGA et al., 2009; TRUMAN et al., 2006).

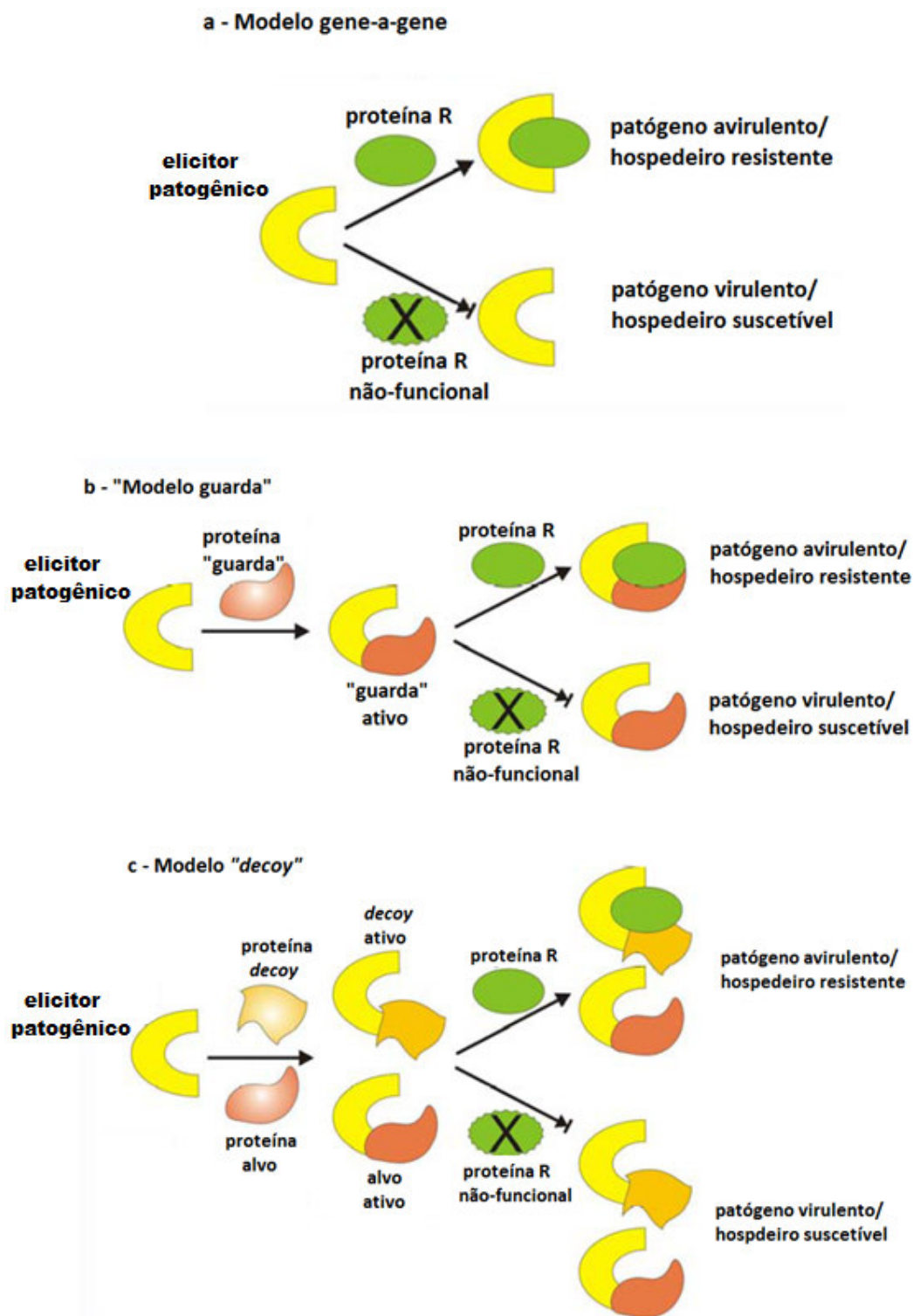


Figura 8: Modelos de reconhecimento planta-patógeno. (a) Modelo de reconhecimento gene-a-gene, um reconhecimento específico direto do elicitor patogênico pelo receptor do hospedeiro desencadeando um processo de resistência. (b) Modelo de reconhecimento "guarda", em que uma proteína guarda coopera para que a resposta de resistência seja iniciada se ligando ao elicitor patogênico. (c) Modelo de reconhecimento "decoy". Uma proteína similar à proteína alvo do elicitor patogênico se liga ao mesmo e media sua interação com proteínas R. Fonte: GLOWACKI, S.; MACIOSZEK, V.; KONONOWICZ, A. K., 2010.

As respostas de defesa da planta podem também ser ativadas em órgãos não colonizados pelo patógeno. A resposta sistêmica adquirida (SAR) é um exemplo de mecanismo de defesa que é ativado em órgãos distantes em resposta a uma infecção local. SAR confere uma resistência aumentada contra um ataque subsequente de patógenos.

A capacidade de expressar a defesa sistemicamente permite que as plantas contenham a habilidade dos microorganismos de se deslocarem dos órgãos infectados e causarem danos em órgãos adicionais. A comunicação entre o órgão infectado e o restante da planta é essencial para a ativação da defesa sistêmica. Essa comunicação precisa de um “sinal sistêmico” móvel e de um condutor deste sinal, que é o sistema vascular, um excelente canal para o transporte e a distribuição dos sinais sistêmicos.

Já foram identificados vários metabólitos que provavelmente funcionam como sinais sistêmicos na defesa da planta contra patógenos. Dentre eles encontram-se metil salicilato, jasmonatos, ácido azelaico e terpenóides (SHAH, 2009).

Pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA) também estão envolvidas na sinalização celular. Acredita-se que siRNAs derivados de vírus sejam responsáveis pela resposta de defesa antiviral sistêmica da planta. O pequeno tamanho desses siRNAs facilita o transporte tanto por meio do PD como do floema (FAGARD; VAUCHERET, 2000). Entretanto, o transporte através do floema não é passivo, sendo necessárias proteínas transportadoras (KEHR; BUHTZ, 2008). Assim, siRNA pode ser transportado e agir sistemicamente a longas distâncias para mediar a proteção antiviral em células não infectadas (SIDAHMED; WILKIE, 2010).

1.5 Defesa natural das plantas contra viroses

Um fenômeno conhecido como silenciamento do RNA ocorre em muitos organismos vivos, como em fungos ou mesmo em mamíferos. Em plantas esse fenômeno é conhecido como silenciamento pós-transcricional do gene (PTGS).

Um exemplo de PTGS ocorre durante a infecção viral, em que moléculas de dsRNA ou de RNA em sua estrutura secundária são produzidas (SIDAHMED; WILKIE, 2010; PURKAYASTHA; DASGUPTA, 2009). A célula reconhece essas moléculas como PAMP e inicia a degradação das mesmas em pequenas moléculas conhecidas como siRNA por uma nuclease conhecida como Dicer (DING, 2010). Essas moléculas de siRNA virais, então, guiam uma imunidade antiviral específica, uma vez que elas selecionam e destroem um RNAm alvo por pareamento de bases após se ligar a uma proteína Argonauta (AGO) em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). A proteína AGO, guiada pelo siRNA, faz a clivagem endorribonucléica do RNAm alvo no meio do duplex siRNA-RNAm (Figura 9). Portanto, as moléculas de siRNA determinam a especificidade do silenciamento mediado pela AGO (DING, 2010).

Além disso, o silenciamento do RNA em plantas pode ser amplificado. Um fenômeno conhecido como transitividade aumenta o quantidade inicial de siRNAs pela produção de novos siRNAs. Tang e colaboradores (2003) sugeriram que fragmentos de RNA gerados pela clivagem mediada por RISC podem ser convertidos em dsRNA pela atividade de RdRp. Isso, então, desencadearia a produção de novos siRNAs e conseqüentemente o fenômeno de transitividade. Em plantas, esse mecanismo pode ser estável por vários meses (VOINNET et al., 1998).

Durante o silenciamento do RNA também pode ocorrer a metilação do DNA, apesar de este processo estar usualmente associado ao silenciamento transcricional do gene. Isso sugere que moléculas de RNA são capazes de interagir com o DNA e induzir uma metilação sequência-específica (WASSENEGGER et al., 1994; JONES et al., 1998; METTE et al., 1999). Esse processo foi detectado em plantas de tabaco contendo várias cópias de *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (WASSENEGGER, 2000).

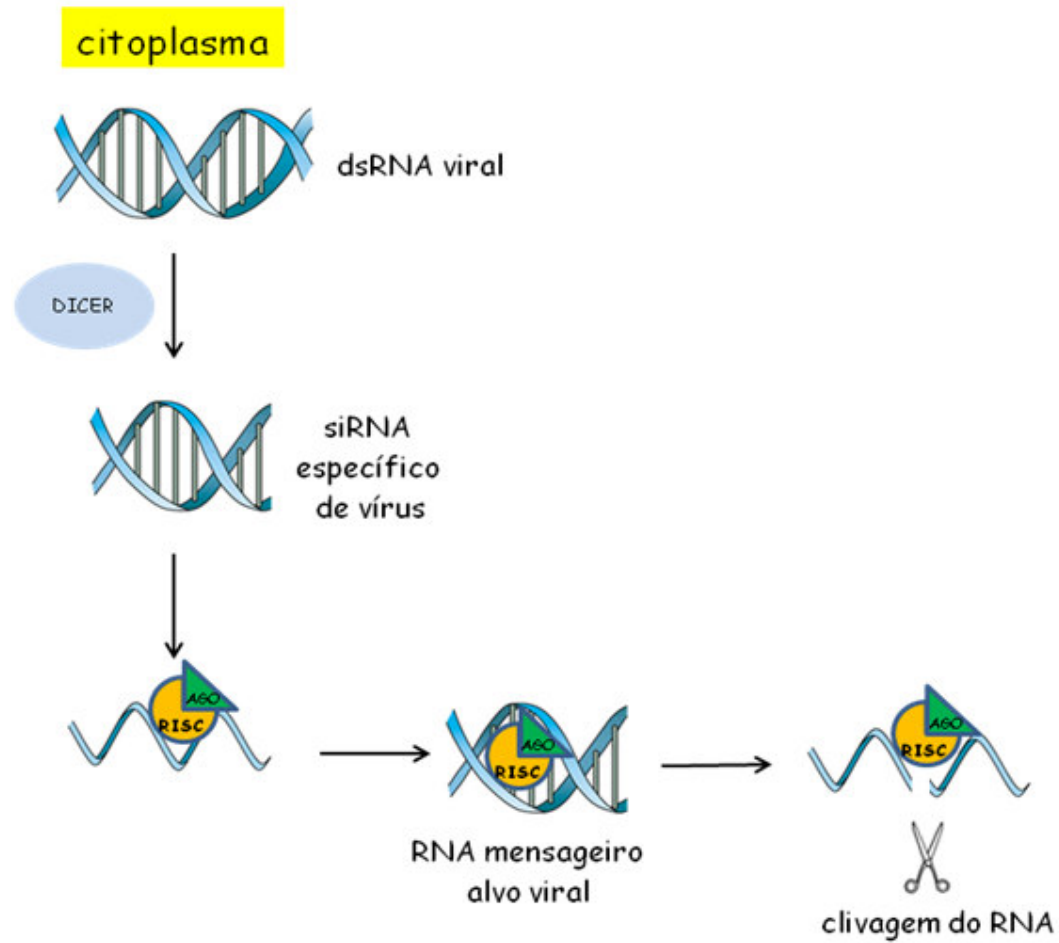


Figura 9: Esquema de imunidade antiviral baseada no RNA desencadeada por moléculas de dsRNA virais. No citoplasma, as moléculas de dsRNA virais são processadas pela enzima DICER em moléculas de siRNA. Uma das fitas do siRNA é guiada pela RISC, em associação com a proteína AGO, a uma molécula de RNAm alvo viral sequência-específica. A proteína AGO, então, cliva o RNAm, promovendo o seu silenciamento e impedindo o progresso da infecção viral.

1.6 Supressores virais do silenciamento do RNA

Viroses de plantas codificam proteínas específicas que funcionam como supressoras do silenciamento do RNA. Muitas dessas proteínas são conhecidas como “fatores de patogenicidade”, que estão envolvidos no desenvolvimento de sintomas durante a infecção (VOINNET et al., 1999). Em geral, os supressores virais interferem em uma ou mais etapas da via de silenciamento para causar a doença.

Alguns supressores virais funcionam antes da formação de siRNAs, o que previne a percepção dos sinais de silenciamento pela planta. Algumas viroses, como *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), por exemplo, inibem a produção de dsRNA dirigida pelo hospedeiro. Um proteína conhecida como V2 se liga à SGS3, necessária para o funcionamento da RNA polimerase, inibindo a atividade da mesma (GLICK et al, 2008). Ainda, estudos com *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), mostram que a proteína P6 impede o processamento do dsRNA em siRNAs (HAAS et al, 2008).

Outro grupo de supressores virais previne o transporte dos sinais de silenciamento ou inibem a ação destes sinais. Um exemplo é a proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* (GUO; DING, 2002). Várias viroses também impedem a metilação de siRNAs, necessárias para manter a sua estabilidade, mediada pela proteína HEN1. A replicase de *Tobacco mosaic virus* é capaz de impedir esse processo (LOZSA, 2008). Outras viroses são capazes de sequestrar as moléculas de siRNAs (VARGASON, 2003).

Proteínas supressoras virais também podem prevenir a formação do sinal de silenciamento. A proteína 25 (P25) de *Potato virus X* (PVX) é o único membro deste grupo (VOINNET et al., 2000). Ainda há as proteínas virais capazes de suprimir o silenciamento local ou sistêmico possivelmente por interferir na função da DICER (QU et al., 2003).

Vale ressaltar, no entanto, que nem todas as viroses de planta codificam proteínas supressoras do silenciamento do RNA (VOINNET, 2001).

1.7 Indução de resistência contra viroses

A transgenia gerou a grande possibilidade de produzir plantas transgênicas que são resistentes a vírus. Isso otimizou a resistência conseguida por genética clássica, uma vez que esta, devido à grande plasticidade viral, não é durável no campo. A resistência a viroses pode ser dividida em uma proteção mediada por proteína ou por RNA.

1.7.1 Resistência mediada por proteína (PMR)

O primeiro relato sobre PMR usou a expressão do gene para a proteína do capsídeo viral (CP) de *Tobacco mosaic virus* para produzir resistência em plantas de tabaco (POWEL et al., 1986). Desde então, um grande número de estudos tem utilizado PMR para conferir resistência e controlar viroses em plantas (FITCHEN; BEACHY, 1993; TEPFER, 2002). No entanto, a resistência mediada pela proteína do capsídeo viral pode fornecer tanto uma proteção ampla quanto limitada (TEPFER, 2002). Plantas transgênicas de batata expressando o gene CP da cepa N605 de *Potato mosaic virus*, por exemplo, são resistentes a esta cepa e também à cepa 0803 (MALNOE et al., 1994). Por outro lado, mamão (*Carica papaya*) expressando o gene CP da cepa HA de *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) conferiu resistência apenas a esta cepa (TENNANT; GONSALVES; LING, 1994).

Acredita-se que a resistência mediada por CP está baseada no bloqueio da remontagem do vírus invasor devido à presença do gene CP transgenicamente expresso (FUCHS; GONSALVES, 2007).

Dentre as proteínas virais usadas para o PMR estão ainda as replicases, proteínas de movimento e proteases, mas, na grande maioria das vezes, são usadas proteínas do capsídeo viral (TEPFER, 2002; TAKAHASHI et al., 2003).

1.7.2 Resistência mediada por RNA

O processo de PTGS, também conhecido como silenciamento do RNA, se refere a processos relacionados ao controle pós-transcricional da expressão do gene, e em plantas ele funciona como um mecanismo de defesa antiviral. O PTGS foi primeiramente descrito em plantas de petúnia, em que o transgene para a chalcone sintetase e o gene endógeno para a mesma enzima foram co-suprimidos (VAN DER KROL et al., 1990; NAPOLI et al., 1990)

Moléculas de siRNA específicas, resultantes de um segmento de dsRNA, que corresponde a uma ou mais sequências virais, podem ser introduzidas nas células. Isso pode ocorrer com auxílio de moléculas lipídicas (SIOUD; SORENSEN, 2003; ZHANG et al., 2004) ou o siRNA pode ser parte de um vetor de expressão em que ele está sob o controle de um promotor (FUTAMI, et al., 2002; MATSUKURA et al., 2003).

A célula transformada, ao entrar em contato com o vírus cujo genoma possui sequências homólogas ao transgene (siRNA), dispara uma rota de degradação de moléculas de RNA virais, impedindo assim, o progresso da infecção (FIRE et al., 1998; TENLLADO et al., 2003; PRUSS et al., 2004).

Desde a descoberta da via de silenciamento do RNA, a degradação de moléculas específicas de RNA é um potencial mecanismo para produzir plantas transgênicas resistentes a viroses específicas (RITZENTHALER, 2005).

1.8 Plantas transgênicas resistentes a vírus

A resistência é o processo mais efetivo para controlar viroses de plantas. Várias abordagens da resistência derivada do patógeno (PDR) são interessantes para conferir um fenótipo resistente. Uma delas é que a resistência ao vírus pode ser

incorporada na planta sem alterar as suas propriedades fenotípicas intrínsecas, processo que seria praticamente impossível de ser conseguido por cruzamento convencional. Outro ponto é que o mesmo gene de resistência pode ser usado em diferentes gêneros e espécies de plantas que são afetados por um determinado vírus. Ainda, a resistência pode ser incorporada em plantas propagadas vegetativamente.

A transgenia é um método potencial para produzir plantas resistentes. No entanto, existem alguns riscos relacionados às plantas geneticamente modificadas que devem ser considerados, como a heteroencapsidação, a recombinação, o fluxo gênico, o efeito em organismos não-alvos e a segurança alimentar em termos de alergenicidade (DeZOETEN, 1991; HAMMOND; LECOQ; RACCAH, 1999; MARTELLI, 2001; TEPFER, 2002; ROBINSON, 1996).

A heteroencapsidação se refere à encapsidação do genoma de um vírus pela proteína do capsídeo de outro vírus, como ocorre algumas vezes em plantas infectadas por mais de um vírus. Esse processo também pode resultar de subunidades de CP expressas em plantas transgênicas. Uma vez que CP pode carregar determinantes para patogenicidade e especificidade, entre outras características (CALLAWAY et al., 2001), as propriedades das viroses podem mudar em plantas transgênicas. Consequentemente, é teoricamente possível o surgimento de novos vírus infecciosos.

A recombinação se refere à troca de material genético entre duas diferentes moléculas de RNA durante a replicação viral. Ela pode ocorrer, portanto, entre transcritos do transgene viral e o genoma de outro vírus durante a replicação na célula de uma planta transgênica. Já que a recombinação altera o genoma viral, novas propriedades podem ser transmitidas para a progênie viral. Essas propriedades podem afetar negativamente o ambiente já que pode ocorrer, por exemplo, aumento da patogenicidade (FUCHS; GONSALVES, 2007).

O fluxo gênico entre plantas cultivadas e selvagens é uma grande questão ambiental. Plantas selvagens podem receber genes e/ou transgenes de plantas transgênicas por meio do pólen e, então, sua progênie poderia expressar transgenes virais e resistir às viroses correspondentes. Esse processo poderia aumentar o

desempenho dessas novas plantas tornando-as mais competitivas se o gene transferido conferir vantagem seletiva (ELLSTRAND; PRENTICE; HANCOCK, 1999; SNOW; PALMA, 1997; STEWART; HALFHILL; WARWICK, 2003).

Muitos estudos têm sido, portanto, conduzidos para tentar resolver as questões de segurança envolvendo plantas transgênicas resistentes a vírus, principalmente àqueles relacionados à heteroemcapsidação e à recombinação (FUCHS; GONSALVES, 2007). O problema, na verdade, não está na ocorrência, mas sim nas conseqüências, que são fundamentais para avaliar o impacto das plantas transgênicas resistentes a vírus, já que os riscos não são fundamentalmente diferentes das culturas convencionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a indução de resistência ao *Papaya meleira vírus* em mudas de mamoeiro usando o genoma viral, de dsRNA, como elicitor biológico.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar plântulas de mamoeiro de forma a conseguir grande concentração de látex;
- Inocular diferentes grupos de mudas de mamoeiro;
- Coletar amostras de látex e de folha em intervalos determinados de tempo e proceder com a extração de ácidos nucleicos;
- Avaliar o progresso da infecção viral, respectivamente, por extração do genoma total do PMeV, por RT-PCR convencional e por RT-PCR em tempo real.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo de mudas de mamoeiro

Plântulas de mamoeiro, cultivar *Golden*, fornecidas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), foram cultivadas em tubetes de plástico contendo terra adubada e areia branca na proporção 3:1, respectivamente, em telado no Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Após 30 dias, 12 plântulas foram transferidas para vasos de 8 Kg também contendo terra adubada e areia branca na proporção já citada acima, onde foram cultivadas por um período de três a quatro meses, sendo irrigadas e adubadas à base de nitrogênio, fósforo e potássio, além de uréia durante todo o experimento.

3.2 Inoculação das mudas

As mudas foram divididas em quatro grupos de três plantas cada (Figura 10):

Grupo 1: plantas inoculadas com tampão fosfato pH 7,0 (1:1 v/v) – controle negativo;

Grupo 2: plantas inoculadas com látex infectado pelo PMeV, diluído em tampão fosfato pH 7,0 (1:1 v/v) (20 µl) – controle positivo;

Grupo 3: plantas inoculadas apenas com dsRNA, extraído a partir de látex infectado com PMeV, diluído em 20 µl de água ultra-pura;

Grupo 4: plantas inoculadas simultaneamente com látex infectado pelo PMeV, diluído em tampão fosfato pH 7,0 (1:1 v/v) (20 µl) e dsRNA, extraído a partir de látex infectado com PMeV, diluído em 20 µl de água ultra-pura.



Figura 10: Mudanças de mamoeiro, aos 4 meses pós-germinação, separadas em quatro grupos distintos de três plantas cada. (1) Controle negativo. Mudanças inoculadas com tampão. (2) Controle positivo. Mudanças inoculadas com látex infectado pelo P_{MeV}. (3) Mudanças inoculadas apenas com dsRNA viral. (4) Mudanças inoculadas simultaneamente com látex infectado pelo P_{MeV} e dsRNA viral.

A inoculação foi feita com uma seringa estéril, como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2006b). Alíquotas de látex e de folha foram coletadas em intervalos de, no máximo, sete dias, por um período de 71 dias.

As alíquotas de látex foram coletadas, após incisões no ápice caulinar utilizando uma lâmina estéril, e diluídas em tubos resfriados contendo tampão citrato de sódio pH 5,0 (1:1 v/v), como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2009), onde permaneceram armazenadas a -20 °C até serem avaliadas.

As amostras de folhas foram coletadas em microtubos resfriados onde permaneceram armazenadas a -80 °C até serem avaliadas.

Ao final de 71 dias, procedeu-se com a extração de ácidos nucleicos a partir de ambas as amostras.

3.3 Diagnóstico molecular do PMeV

3.3.1 Extração de ácidos nucleicos a partir de látex

O diagnóstico molecular do PMeV em látex foi desenvolvido de acordo com a metodologia previamente descrita (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006b), que permite avaliar a presença do dsRNA do PMeV.

Às amostras de látex foram adicionados 150 µl de fenol pH 4,3/clorofórmio (2:1 v/v). Os tubos foram agitados e centrifugados por 15 min a 12000 rpm a 4 °C. A solução sobrenadante foi novamente submetida à extração com fenol pH 4,3/clorofórmio (2:1 v/v), como descrito anteriormente, e posteriormente transferida para outros microtubos, onde fez-se uma extração apenas com 150 µl de clorofórmio, sempre mantendo as condições de agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante descritas acima. Após isso, todo o sobrenadante foi transferido para tubos contendo 50 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 500 µl de etanol absoluto gelado.

Até que todas as extrações fossem realizadas, as amostras permaneceram armazenadas a -20 °C. Após serem realizadas as extrações, as amostras, então, foram centrifugadas por 50 minutos e, posteriormente, colocadas para secar ao ar, quando puderam ser ressuspensas em 15 µl de água ultra-pura e, então, avaliadas quanto à presença ou ausência do PMeV, após eletroforese horizontal em gel de agarose 1%.

As amostras também foram dosadas em espectrofotômetro e foram avaliadas quanto à quantidade e à pureza do ácido nucléico extraído para, então, serem usadas para o diagnóstico do vírus por RT-PCR convencional.

3.3.1.1 Eletroforese dos ácidos nucléicos extraídos a partir de látex

As amostras de ácidos nucléicos extraídos de látex foram submetidas à eletroforese em gel de agarose horizontal 1%, diluído em TBE 1X (Tris 0,089 M; EDTA 2 mM; ácido bórico 0,089 M), durante 1 hora e 30 minutos em uma voltagem de 80 V. O gel foi corado com brometo de etídeo, adicionado antes da polimerização, em uma concentração final de 15 ng/mL. Em cada poço do gel foram aplicados, 10 µl de amostra diluída em 1 µl de *5X Green GoTaq® Flexi Buffer* (PROMEGA). A dosagem foi realizada em espectrofotômetro.

Os géis foram visualizados no sistema de captura de imagem *L-Pix-HE* com o *Software L-Pix IMAGE®*, ambos da Locus Biotecnologia.

3.3.1.2 Detecção do PMeV por RT-PCR convencional

3.3.1.2.1 Determinação da concentração e pureza dos ácidos nucléicos

A determinação da concentração e a relação de pureza dos ácidos nucléicos foram realizadas no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer*. Uma alíquota de 2 µl de ácidos nucléicos foi submetida às leituras nos comprimentos de

onda de 260 nm e varredura de 220 nm a 350 nm. Os resultados foram avaliados no programa *NanoDrop*[®] ND-1000 v 3.5.

3.3.1.2.2 Tratamento com DNase I

Dois microgramas (2 µg) de ácido nucléico extraído de cada amostra foi tratado com a enzima DNase I (PROMEGA). Cada amostra foi diluída para um volume final de 16 µl em água ultra-pura onde foram adicionados 2 µl de tampão para DNase e 2 µl da enzima. Cada amostra, então, foi incubada a 37°C por 30 minutos. Passado esse tempo, adicionou-se 2 µL de uma solução de EDTA 20mM e as amostras foram novamente incubadas a 65°C por 10 minutos para a inativação da enzima.

3.3.1.2.3 Iniciador

O iniciador utilizado para essa análise é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüência, utilização e referência do iniciador utilizado para análise de amostras de látex.

Nome	Gene	Seqüência	Utilização	Referência
C05-3'	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)	5' ACCACAATGGGTATTTAAAG 3'	Detecção do PMeV em amostras de látex por RT-PCR convencional	ARAÚJO, et al., 2007.

3.3.1.2.4 RT-PCR convencional

Uma alíquota contendo 1 µg de RNA tratado com DNase I foi diluída em 10 µl de solução com água DEPC 0,1%. Essas amostras foram aquecidas a 96 °C durante 3 minutos para desnaturação do dsRNA do PMeV (ZAMBOLIM et al., 2003) e rapidamente depositados em gelo visando evitar o re-anelamento. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se uma mistura de reação contendo: 5 µl de tampão 5X para a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (RT) (PROMEGA), 0,5 µl de uma mistura de dNTP 25 mM, 4 µl da solução do iniciador C05-3' (125ng/µl), 1 µl de uma solução contendo a enzima RT e água DEPC, em um volume total de 15 µl. A mistura de reação junto com o RNA foi incubada a 37°C por 1 hora e a transcriptase reversa foi inativada a 90°C por 10 minutos.

O cDNA gerado foi submetido à reação de PCR utilizando-se o iniciador C05-3' e a enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (PROMEGA). Para cada amostra utilizou-se uma mistura contendo: 4 µl de tampão 5X para a enzima, 1,5 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 0,2 µl de uma mistura de dNTPs 25 mM, 1,6 µl do iniciador (125 ng/µl), solução de cDNA (0,1 µg de RNA tratado com DNase I), 0,1 µl de enzima (5 u/µl) e água DEPC 0,1%, totalizando 20 µl. As amostras foram submetidas, em seqüência, aos ciclos: 1 ciclo a 94 °C por 3 min, 30 ciclos à 94°C por 1 min, 57°C por 2 min e 72°C por 2 min e 1 ciclo a 72 °C por 7 min (ARAÚJO et al., 2007), no Termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf). Manteve-se as amostras a 4 °C para análise posterior.

3.3.1.2.5 Eletroforese dos fragmentos de PCR

Os fragmentos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose horizontal 1,5%, diluído em TBE 1X (Tris 0,089 M; EDTA 2 mM; ácido bórico 0,089 M), durante 1 hora e 30 minutos em uma voltagem de 65 V. O gel foi corado com

brometo de etídeo, adicionado antes da polimerização, em uma concentração final de 15 ng/mL. Em cada poço do gel foram aplicados 10 µl de amostra diluída em 1 µl de *5X Green GoTaq® Flexi Buffer*.

Os géis foram visualizados no sistema de captura de imagem *L-Pix-HE®* com o *Software L-Pix IMAGE®*, ambos da Loccus Biotecnologia.

3.3.2 Extração de ácidos nucléicos a partir de folha

Cem miligramas (100 mg) de folha, de cada amostra coletada, foi submetida ao tratamento de lise celular com nitrogênio líquido. A cada amostra foram adicionados 1 ml de tampão de extração composto de 1 % de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 µl de uma solução 1 M de tris-HCl pH 6,8 e 1% de β- mercaptoetanol. O tampão ainda foi suplementado com 1,5 % de PVP em microtubos de 1,5 ml. Procedeu-se com breve agitação e com centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e submetido a duas extrações com 500 µl de fenol pH 4,3/clorofórmio/álcool isoamílico (24:12:1) e uma extração com 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) sempre mantendo as condições de agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante já descritas. Após a última extração, o sobrenadante final foi precipitado em 600 µl de álcool absoluto gelado e 60 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2.

As amostras foram armazenadas a -20°C e, quando usadas para análise, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 50 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado resultante foi lavado com 500 µl de etanol 70 % e centrifugado por 5 minutos. O álcool foi descartado e o precipitado foi seco ao ar por aproximadamente 1 hora e depois ressuscitado em 20 µl de água ultra-pura.

As amostras foram dosadas em espectrofotômetro e foram avaliadas quanto à quantidade e à pureza do ácido nucléico extraído para, então, serem usadas para o diagnóstico do vírus por RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real.

3.3.2.1 Determinação da concentração e pureza dos ácidos nucléicos

A determinação da concentração e a relação de pureza dos ácidos nucléicos foram realizadas da mesma maneira como descrito para análise em amostras de látex.

3.3.2.2 Tratamento com DNase I

Para o tratamento com DNase I as amostras de folhas passaram pelos mesmos processos descritos para esse tratamento em amostras de látex.

3.3.2.3 Iniciadores

Os iniciadores utilizados para essa análise são apresentados na Tabela 2. O tamanho do fragmento esperado de amplificação do PMeV é de 303 pb para a RT-PCR convencional e de 71 pb para a RT-PCR em tempo real (Figura 11).

Tabela 2 - Sequência, utilização e referência dos iniciadores utilizados para análise de amostras de folha.

Nome	Gene	Sequências	Utilização	Referência
28S	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)	Direto 5' GCG AAG CCA GAG GAA ACT 3' Indireto 5' GAC GAA CGA TTT GCA CGT C 3'	Controle interno	ROJAS, et al., 2009
PMeVreal	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)	Direto 5' GTG GGT TTC CTG GAG CTA AA 3' Indireto 5' TAA GGC TCC CCT TTT GTT CA 3'	Detecção do PMeV por RT-PCR em tempo real	PICCIN, et al., 2010
PMeVconv	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)	Direto 5' AAT TGG TCT GCC GAT GAA AG 3' Indireto 5' TAA ATC AGC ATT CGC TGT CG 3'	Detecção do PMeV por RT-PCR convencional	PICCIN, et al., 2010

mistura de dNTP 25 mM, 4 µl da solução do iniciador indireto (125ng/µl), 1 µl de uma solução contendo a enzima RT e água DEPC 0,1%, em um volume total de 15 µl. A mistura de reação junto com o RNA foi incubada a 37°C por 1 hora e a transcriptase reversa foi inativada a 90°C por 10 minutos.

O cDNA gerado foi submetido à reação de PCR utilizando-se os iniciadores PMeVconv direto e indireto e a enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (PROMEGA). Para cada amostra utilizou-se uma mistura contendo: 4 µl de tampão para a enzima, 1,5 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 0,2 µl de uma mistura de dNTPs 25 mM, 0,8 µl de cada um dos iniciadores, direto e indireto (125 ng/µl), solução de cDNA (0,1 µg de RNA tratado com DNase I), 0,1 µl da enzima (5 u/µl) e água DEPC 0,1%, totalizando 20 µl. As amostras foram submetidas, em seqüência, aos ciclos: 1 ciclo a 94 °C por 3 min, 32 ciclos a 94°C por 1 min, 61°C por 1 min e 72°C por 1 min e 1 ciclo a 72 °C por 7 min, no Termociclador *Mastercycler personal®* (Eppendorf). Manteve-se as amostras a 4 °C para análise posterior.

3.3.2.5 Eletroforese dos fragmentos de PCR

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose horizontal 1,5%, diluído em TBE 1X (Tris 0,089 M; EDTA 2 mM; ácido bórico 0,089 M), durante 1 hora e 30 minutos em uma voltagem de 65 V. O gel foi corado com brometo de etídeo, adicionado antes da polimerização, em uma concentração final de 15 ng/mL. Em cada poço do gel foram aplicados 10 µl de amostra diluída em 1 µl de *5X Green GoTaq® Flexi Buffer*.

Os géis foram visualizados no sistema de captura de imagem *L-Pix-HE* com o *Software L-Pix IMAGE®*, ambos da Loccus Biotecnologia.

3.3.2.6 Detecção do PMeV por RT-PCR em tempo real

Após o tratamento com a DNase I, 600 ng de RNA foram diluídos em água DEPC 0,1% para um volume final de 9 µl e a essa amostra foram adicionados 2 µl de uma solução de hexâmeros randômicos 50 µM e 1 µl de dNTP mix 10 mM. A solução foi submetida à temperatura de 96 °C por 3 minutos e rapidamente colocadas no gelo. O kit *Super Script III*[®] (INVITROGEN) foi utilizado para a produção da fita de cDNA em um volume de reação de 20 µl.

Para a detecção do PMeV por PCR em tempo real utilizou-se o equipamento da *Applied Biosystems 7500 real time PCR Systems*. O volume total de reação de 20 µl foi composto de: alíquota de cDNA (0,1 µg do RNA tratado com DNase I) diluído em água DEPC 0,1% em um volume final de 5 µl, 10 µl do Kit *SYBR Green*[®] *PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 5 µl de uma solução de mistura dos iniciadores a 3,6 µM. Utilizou-se o par de iniciadores PMeVreal direto e indireto para a detecção do PMeV e o par de iniciadores do gene ribossômico 28 S como gene de referência para o controle interno da reação. Submeteram-se as amostras a um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando-se por um ciclo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

O número de ciclos requeridos para o sinal de fluorescência ultrapassar o limiar, Ct, bem como a curva de dissociação (do inglês *melting curve*) para a verificação da especificidade da reação foram analisados pelo programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems versão 2.0.1).

3.3.2.7 *Quantificação relativa do dsRNA viral por RT-PCR em tempo real*

A quantidade relativa de dsRNA do PMeV presente nas mudas de mamoeiro foi avaliada com o auxílio do *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems versão 2.0.1).

O gene de referência, utilizado para normalização das amostras (BUSTIN et al., 2009), foi o gene ribossômico 28S.

A amostra de referência (BUSTIN et al., 2009), utilizada para a quantificação relativa de dsRNA viral nas mudas, foi aquela de plantas inoculadas com látex infectado pelo PMeV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo das mudas de mamoeiro

Para exsudação e coleta do látex, foram feitos cortes com lâmina estéril no ápice do caule. Tais cortes deixam cicatrizes evidentes, mas não retardam o desenvolvimento da planta quando há o suprimento adequado de água e nutrientes. As mudas com déficit nutricional, mesmo que pequeno, não são capazes de exsudar látex. Uma observação importante é que a fluidez do látex é diferente nas mudas inoculadas com o látex infectado pelo PMeV e nas mudas inoculadas simultaneamente com o dsRNA e o látex com PMeV. Esses tratamentos proporcionam a exsudação de látex bem mais fluido e mais claro, quando comparados ao látex exsudado pelas plantas dos demais tratamentos. Além disso, a exsudação das plantas de todos os tratamentos é maior nas três primeiras semanas de coleta do látex. Foi também facilmente percebido que a exsudação das plantas inoculadas com vírus e das plantas inoculadas simultaneamente com vírus e dsRNA (grupos 2 e 4, respectivamente), especialmente do grupo 2, perdura por mais tempo quando é feito basicamente o mesmo corte em todas as plantas. Outro fato importante é que o látex sofre um processo de polimerização quando exsudado a partir da planta (MOUTIN et al, 1999), o que dificulta a sua manipulação se as amostras não forem imediatamente diluídas, nesse caso, em tampão citrato pH 5,0 (1:1 v/v) (RODRIGUES et al, 2009).

Nesse trabalho, portanto, foi utilizada uma abordagem *in vivo*. A reduzida taxa de crescimento por vezes observada nas mudas pode estar associada à elevada temperatura a qual elas estiveram expostas. Isso explica a grande necessidade de se administrar água frequentemente, a fim de evitar tanto o aparecimento de folhas murchas quanto a dificuldade no processo de exsudação de látex. Sabe-se que o processo de exsudação está diretamente relacionado com a pressão de turgência

dentro dos laticíferos (MOUTIN et al, 1999), que por sua vez é influenciada pelos componentes do látex, como íons, compostos orgânicos e água (HUNTER, 1994).

Segundo Tolley-Henry e Raper (1986), a dificuldade na absorção de nitrogênio provoca sintomas característicos de deficiência nutricional, como folhas amareladas. Conforme Santana e colaboradores (2003), as diferentes concentrações de nutrientes podem ser obtidas mediante adubações e de acordo com Cruz e colaboradores (2003), a deficiência de nitrogênio reduz o crescimento das plantas. Dessa forma, o problema de amarelecimento das folhas mais velhas pôde ser contornado pela administração de adubo à base de nitrogênio, fósforo e potássio semanalmente e de matéria orgânica ao solo de cultivo das plantas. A adubação, então, permitiu o melhor desenvolvimento das mudas e ainda contribuiu para elevar a eficiência da exsudação de látex e do experimento como um todo.

4.2 Inoculação das mudas

4.2.1 Avaliação da presença de PMeV no látex inoculado nas mudas

Amostras de látex de plantas adultas infectadas com PMeV foram utilizadas para inoculação (20 µl) das mudas dos grupos 2 e 4. Dessa forma, o primeiro passo foi certificar a presença de vírus nessas amostras, provenientes de plantas da Fazenda Experimental de Sooretama, do INCAPER.

Após a extração, 10 µl dos ácidos nucleicos, diluídos em água DEPC 0,1%, foram submetidos à eletroforese horizontal e separados em gel de agarose 1%. A banda de 12 kbp, correspondente ao genoma viral, pôde ser visualizada, confirmando, portanto a infecção (Figura 12).

Látex de plantas sabidamente sadias foi utilizado como controle negativo (Figura 12).

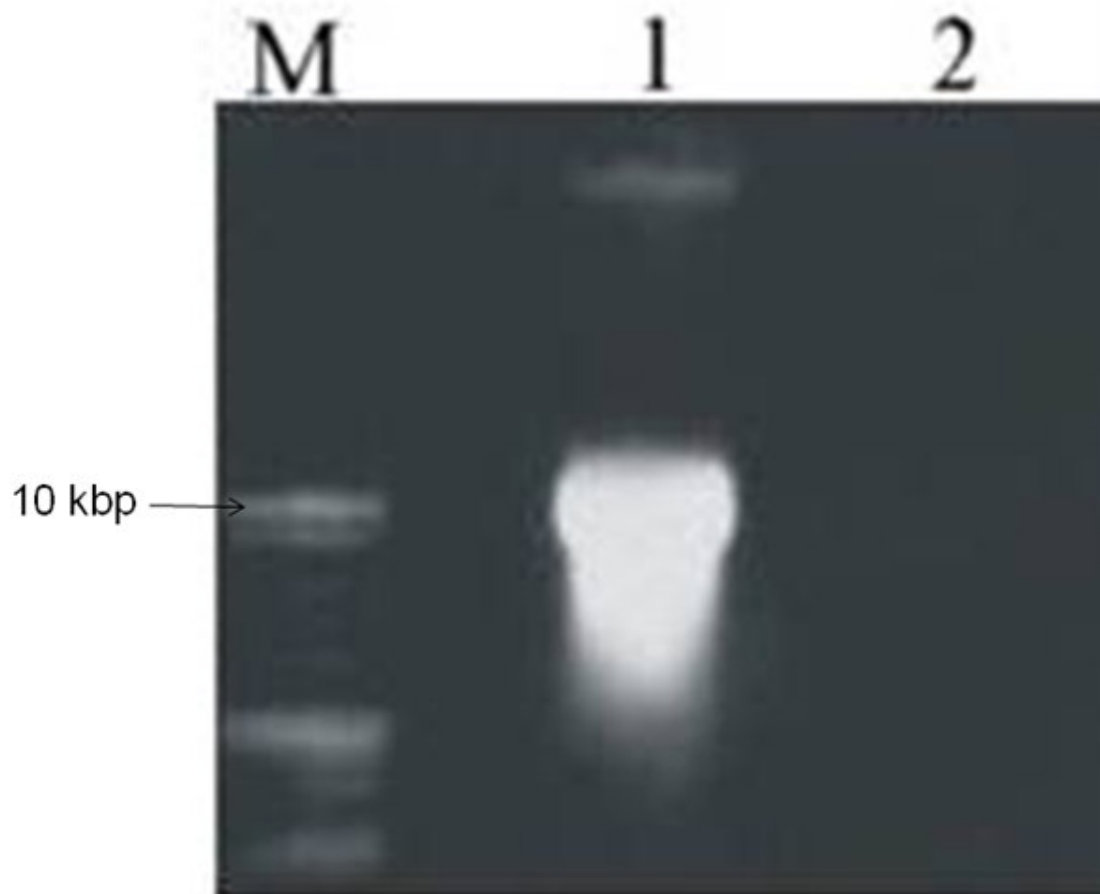


Figura 12: Alíquota de 10 μ l de ácidos nucleicos extraídos de látex de mamoeiro adulto diluídos em água ultra-pura, separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V. Ácidos nucleicos extraídos de látex de mamoeiros adultos com sintomas da meleira (1) e de mamoeiros sadios (2). (M) Marcador de peso molecular de 1 kb. A banda de 12 kbp correspondente ao genoma do PMeV aparece apenas nas amostras extraídas a partir de látex de plantas com sintomas da meleira (1). Essa banda, no entanto, não é observada em amostras de ácidos nucleicos extraídos de látex de mamoeiro sadio (2).

4.2.2 Determinação da concentração do dsRNA viral inoculado nas mudas

Das mesmas amostras de látex da seção anterior, provenientes da Fazenda Experimental de Sooretama e confirmadas para a infecção com PMeV, foram extraídos ácidos nucléicos a serem inoculados nas mudas dos grupos 3 e 4, a saber mudas inoculadas com dsRNA viral e mudas inoculadas simultaneamente com PMeV e dsRNA viral, respectivamente.

Os ácidos nucléicos foram ressuspensos e diluídos em água ultra-pura para a uma concentração de 0,19 µg/µl. A dosagem foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*, no comprimento de onda de 260nm. Nessa concentração, os ácidos nucléicos, contendo o dsRNA viral, foram inoculados nas mudas dos grupos citados em um volume de 20 µl.

Para avaliar a concentração real de dsRNA inoculado nessas plantas, 20 µl de amostra foram tratados com DNase I (PROMEGA) conforme especificações do fabricante. Após esse tratamento, procedeu-se com a dosagem em espectrofotômetro, já descrito, para determinar a concentração de RNA total. Então, essa amostra foi submetida a um tratamento com RNase A. Essa enzima foi adicionada à amostra de modo a se obter uma concentração final de 0,1 µg/µl da mesma. O tratamento, que é capaz de clivar moléculas de RNA fita simples, foi realizado a 37 °C por 20 minutos, permanecendo na amostra apenas moléculas de dsRNA. Após dosagem em espectrofotômetro, verificou-se que a concentração de dsRNA inoculado nas plantas foi de 91,7 ng/µl.

4.2.3 Eficiência da inoculação nas mudas

Mesmo utilizando-se um protocolo de inoculação descrito especificamente para o PMeV em mamoeiro (RODRIGUES et al, 2006b), algumas dificuldades foram

encontradas. A exsudação do látex ocorre imediatamente após o rompimento da barreira física do caule pela seringa e é seguida por um processo muito rápido de polimerização. Isso dificulta ou mesmo impede a inoculação na planta.

Esse problema, no entanto, foi contornado através de modificações na injeção. Além de ser feita no ápice do caule, passou-se a fazer também no pecíolo das folhas. Observou-se que a inoculação no pecíolo é mais fácil e permite a injeção de um maior volume da solução desejada.

A eficiência da injeção do látex infectado como um método de inoculação do PMeV foi confirmada após observar que os ácidos nucléicos extraídos a partir do látex e das folhas das mudas formaram uma banda no gel de eletroforese de 12 kbp, correspondente ao dsRNA viral.

Semelhantemente à injeção, outros procedimentos simples são capazes de causar lesões moderadas em tecidos vegetais. Redinbaugh e colaboradores (2001) demonstraram, por exemplo, que vírus que infectam milho (*Zea mays* L.) podem ser inoculados utilizando-se uma ferramenta de joalheiro, capaz de formar abertura parcial na parede e na membrana celular. Ao contrário disso, grande parte das estratégias de inoculação utilizadas em virologia vegetal precisa de tecnologia e de conhecimento técnico avançados. Comparado a isto, o procedimento de injeção de látex infectado e dsRNA se apresenta como um método simples, de baixo custo e eficiente para a inoculação do PMeV em mamoeiros, características que facilitam trabalhos futuros sobre meleira.

4.3 Diagnóstico molecular do PMeV nas mudas inoculadas

4.3.1 *Diagnóstico molecular do PMeV em amostras de látex*

4.3.1.1 *Eletroforese dos ácidos nucléicos*

Kitajima e colaboradores (1993) verificaram que o PMeV está presente apenas nos laticíferos do mamoeiro. Este resultado serviu de base para a hipótese de que o PMeV infecta, especificamente, os laticíferos (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003). Estes, no entanto, não parecem propícios à colonização por microorganismos em diferentes espécies. Dentre os vírus de planta já descritos, o PMeV parece ser um dos poucos vírus de planta que é observado nos laticíferos (RODRIGUES et al., 2009).

Conforme descrito por RODRIGUES e colaboradores (2005; 2006), observou-se em gel de eletroforese uma banda com peso molecular aproximado de 12 kbp, semelhante ao observado para o PMeV (KITAJIMA et al, 1993; ZAMBOLIM et al, 2003), quando ácidos nucléicos foram extraídos a partir do látex das mudas inoculadas com látex infectado com vírus (Figura 13).

As amostras de látex das plantas inoculadas com dsRNA viral, após serem submetidas à eletroforese, não apresentaram a banda citada acima, mostrando, portanto, a ausência de infecção pelo PMeV (Figura 13).

As amostras extraídas das plantas inoculadas simultaneamente com dsRNA do PMeV e látex infectado com vírus apresentaram as bandas características do PMeV apenas 43 dias após a inoculação (Figura 13), o que indica uma provável resposta de defesa da planta ao PMeV quando ela é tratada com o dsRNA do vírus.

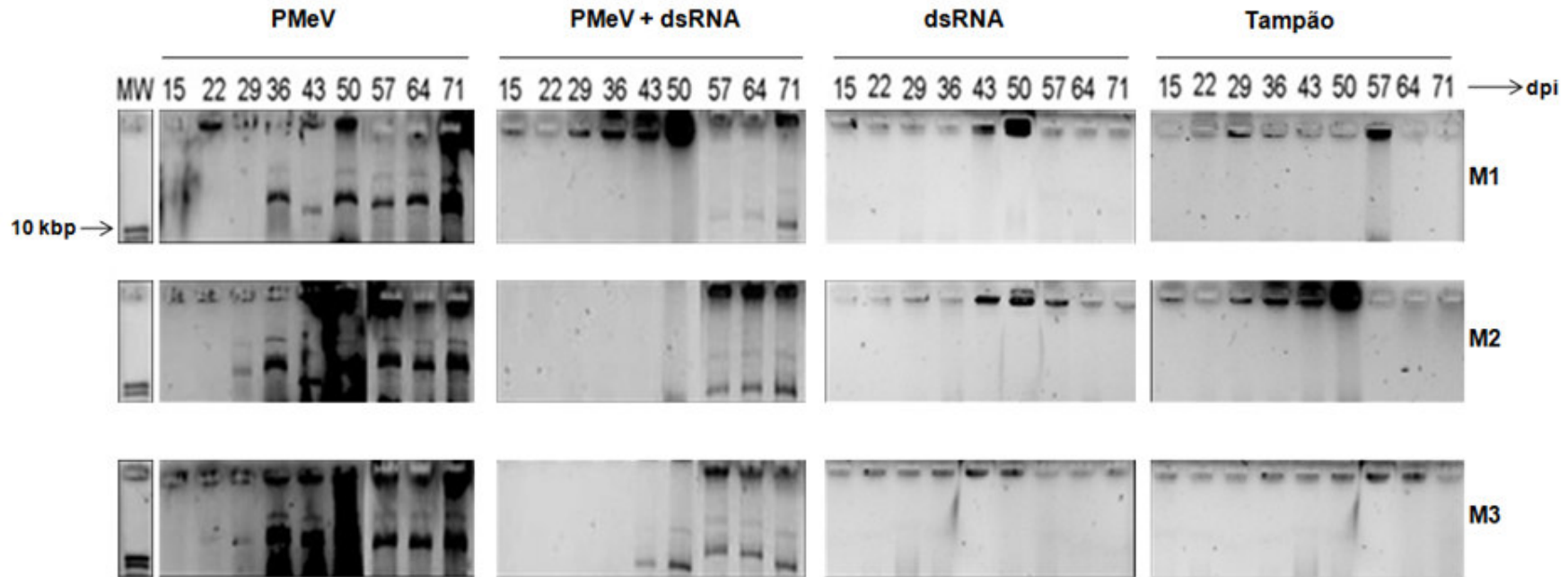


Figura 13: Alíquota de 10 μ l de ácidos nucleicos extraídos de látex de mudas de mamoeiro, diluídos em água ultra-pura, separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V. Para as três mudas (M1, M2, M3) inoculadas com látex infectado pelo PMeV observou-se a presença do dsRNA viral, mostrando o estabelecimento da infecção 29 dias pós-inoculação (dpi). As mudas de mamoeiro inoculadas com látex infectado pelo PMeV e tratadas com dsRNA viral apresentaram um aumento do estado de resistência nos primeiros 43 dias pós-inoculação (dpi). Ausência de infecção nas plantas inoculadas apenas com dsRNA ou com tampão.

O diagnóstico do PMeV utilizando a extração de ácidos nucleicos a partir de látex do mamoeiro seguida da aplicação direta em gel de eletroforese é um procedimento semelhante àquele proposto por Habibe e colaboradores (1999). Este procedimento forneceu uma arraste dos ácidos nucleicos, observado em algumas amostras infectadas pelo PMeV (Figura 13). A ocorrência do arraste indica que os ácidos nucleicos encontram-se ligados nos polímeros do látex. Algumas vezes, estes polímeros podem apresentar um tamanho maior que os poros do gel, retendo os ácidos nucleicos ainda no poço de aplicação (Figura 13).

Considerando que o látex do mamoeiro é composto principalmente por proteínas (MOUTIM et al., 1999), a utilização de solventes orgânicos (fenol e clorofórmio) permitiu a extração dos ácidos nucleicos presentes neste exsudado. O látex diluído em tampão citrato pH 5,0 fornece uma banda definida, composta de dsRNA. Este resultado pode estar relacionado com o pH ácido do tampão. Nessa condição, os grupos fosfato das moléculas de RNA encontram-se protonados, eliminando repulsões eletrostáticas internas, o que as torna mais estáveis e de fácil resgate (FARRELL JÚNIOR, 1998).

Além do dsRNA do PMeV, o DNA da planta foi também extraído, formando, muitas vezes, uma banda de aproximadamente 14 kbp no gel de eletroforese (Figura 13). Este resultado é semelhante ao observado por Tavares e colaboradores (2004). Entretanto, a banda de DNA foi observada somente em algumas amostras, indicando que a ocorrência de DNA no látex do mamoeiro não é um caráter permanente. Isto pode estar relacionado com as próprias características dos laticíferos (DATTA; IQBAL, 1994).

Durante o diagnóstico do PMeV, a extração de ácidos nucleicos presentes no látex que, após eletroforese, formem uma única banda no gel, pode resultar em falsos positivos para o vírus, considerando a proximidade entre o peso molecular do dsRNA do vírus (12kbp) e o do DNA da planta (14kbp). Portanto, para um diagnóstico mais seguro, a confirmação do peso molecular da banda atribuída ao vírus deve ser feita aplicando-se no gel um marcador de peso molecular de 1 kbp e uma amostra do dsRNA do PMeV previamente extraída (controle positivo). Devem ser considerados positivos para a infecção com o PMeV os mamoeiros cujos ácidos nucleicos extraídos formarem uma banda de peso molecular idêntico ao controle

positivo (12kbp), ou mamoeiros cujos ácidos nucléicos formarem duas bandas no gel, de 12 e 14 kbp (RODRIGUES et al., 2006).

4.3.1.2 *RT-PCR convencional*

Em outro momento, diferente daquele da seção anterior, o experimento de indução de resistência foi novamente montado da mesma maneira já descrita. Agora, o intuito foi novamente avaliar o progresso da infecção, mas por um método mais sensível, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

Araújo e colaboradores (2007) publicaram uma sequência (669 pares de bases) parcial do genoma do PMeV. No mesmo trabalho, os autores descrevem o protocolo para análise da presença do vírus a partir do látex das plantas por RT-PCR convencional. Sendo assim, toda a análise do progresso da infecção nas mudas inoculadas poderia ser realizada a partir de ácidos nucléicos extraídos diretamente do látex.

Inicialmente, 1 µg de ácido nucléico, extraído a partir do látex das mudas de mamoeiro, foi tratado com DNase I e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Os resultados mostram o estabelecimento e o progresso da infecção, no decorrer do tempo, nas mudas inoculadas com látex infectado pelo PMeV (Figura 14). As mudas inoculadas com látex infectado com PMeV e dsRNA viral mostraram infecção apenas 43 dias pós-inoculação, enquanto as mudas inoculadas apenas com dsRNA viral ou com tampão não apresentaram a banda de 12 kbp, correspondente ao genoma do PMeV (Figura 14).

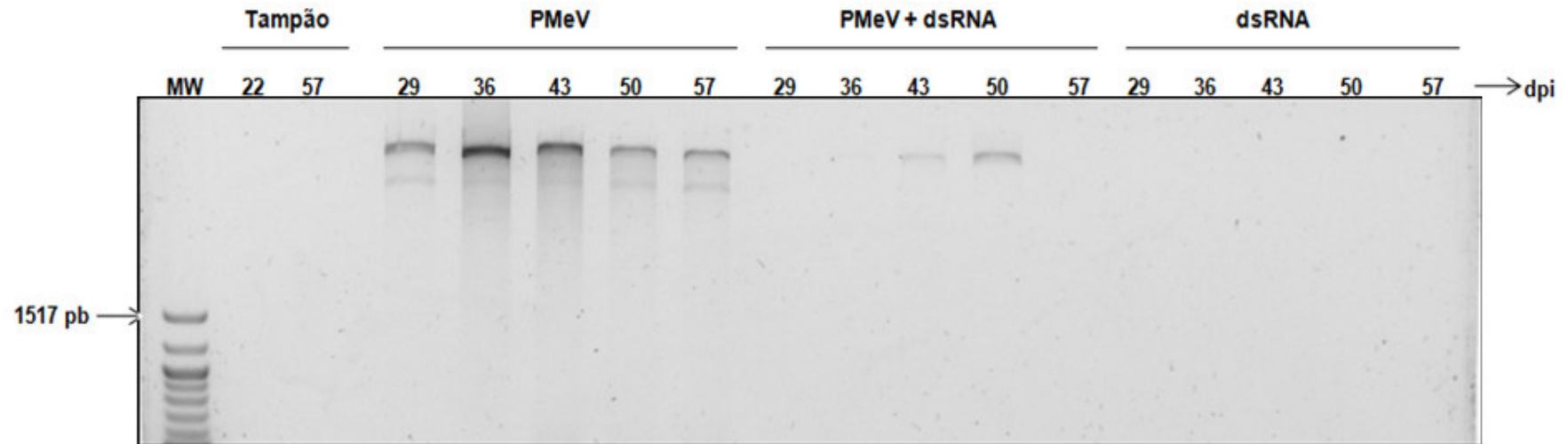


Figura 14: Ácidos nucléicos, extraídos a partir de látex de mudas de mamoeiros, tratados com DNase I e separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V. dsRNA viral presente nas mudas inoculadas com látex infectado pelo PMeV, mostrando o estabelecimento da infecção pelo vírus. Aumento do estado de resistência das mudas inoculadas com PMeV e tratadas com dsRNA viral nos primeiros 43 dias pós-inoculação (dpi). Nenhuma infecção parece ocorrer nas amostras inoculadas apenas com dsRNA viral ou nas amostras inoculadas com tampão.

Esses resultados são muito semelhantes ao observado na seção anterior, em que o dsRNA viral, quando inoculado mecanicamente em mudas infectadas com PMeV, parece promover uma indução de resistência a esse vírus nas mudas de mamoeiro.

No entanto, o que foi observado nesse trabalho é que essas mesmas amostras, após tratamento com DNase I, quando submetidas à análise por RT-PCR convencional, de acordo com o protocolo descrito por Araújo e colaboradores (2007), com algumas modificações (PICCIN et al., 2010), não apresentaram nenhuma banda correspondente ao vírus após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 15), sugerindo ausência de infecção em todos os tratamentos.

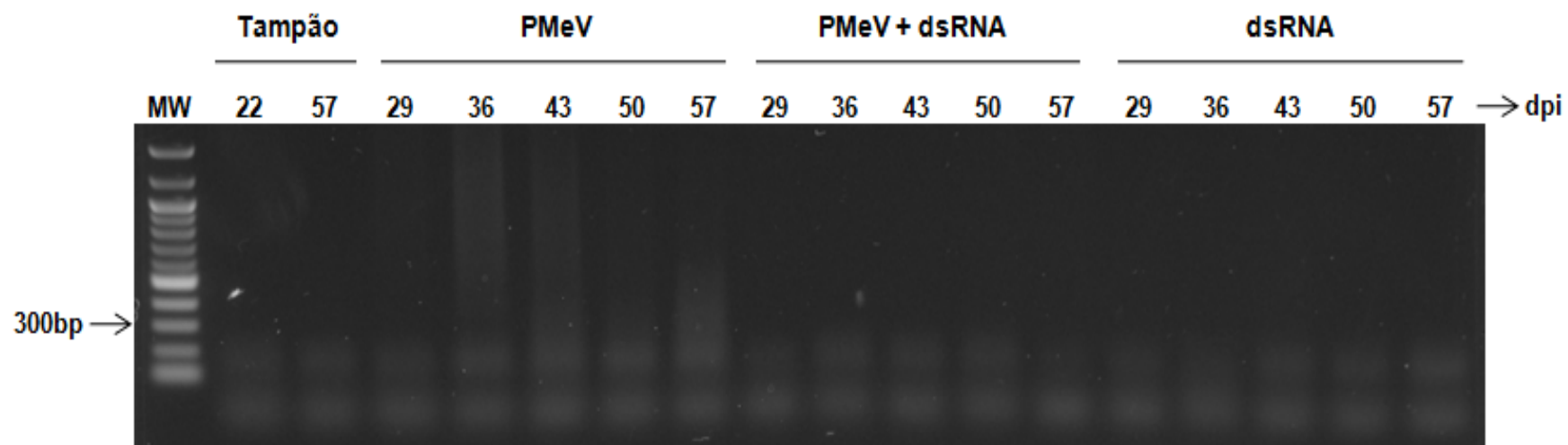


Figura 15: RT-PCR convencional realizada com o iniciador C05'-3 em amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de mudas de mamoeiro e tratados com DNase I. Após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 65 V, nenhuma infecção com PMeV é percebida em nenhum dos tratamentos no decorrer do tempo (dias pós-inoculação – dpi).

Alguns métodos de purificação do RNA podem co-extrair altos níveis de proteína. A co-extração de proteínas gera resultados com baixo rendimento na RT-PCR. RNA extraído considerado relativamente livre de proteína tem uma relação de absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm ($A_{260/280}$) maior ou igual a 2,0.

O látex possui uma alta concentração de proteínas (MOUTIM et al., 1999). Após os procedimentos de extração de ácidos nucléicos, a relação $A_{260/280}$, normalmente, não supera 1,5. Isso pode, portanto, ser uma justificativa para os resultados falsos-negativos na análise da presença do PMeV em amostras de látex das mudas por RT-PCR.

Ao contrário, quando ácidos nucléicos foram extraídos de látex de plantas adultas, com sintomas característicos da doença, e submetidos à mesma análise por RT-PCR convencional, a banda esperada, entre 200 e 300 pb, correspondente à parte da sequência do PMeV, é claramente vista após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 16).

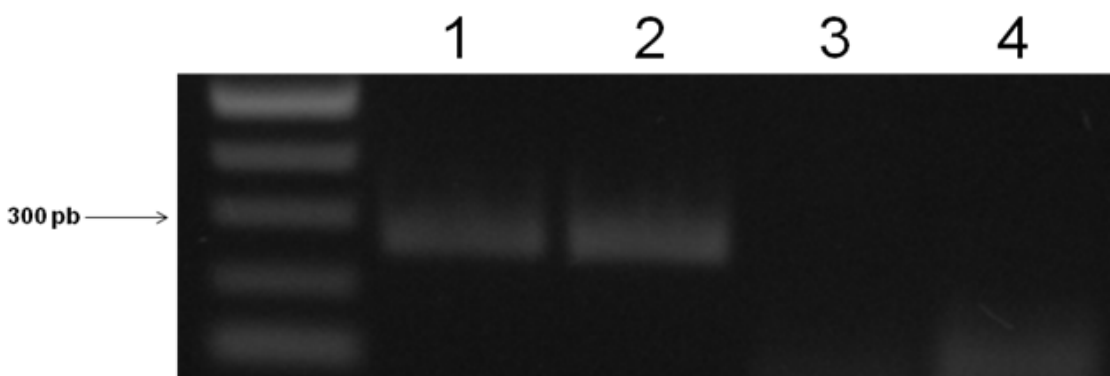


Figura 16: RT-PCR convencional realizada com o iniciador C05'-3 em amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de látex de mamoeiros adultos. Após separação por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 65 V, as plantas adultas com sintomas característicos da meleira apresentaram um fragmento esperado entre 200 e 300 pb (1) e (2). Amostras de plantas adultas saudáveis não apresentaram nenhum fragmento, sugerindo ausência de infecção pelo PMeV.

Portanto, o método de detecção do PMeV por RT-PCR convencional, proposto por Araújo e colaboradores (2007), não é adequado para o diagnóstico do PMeV em amostras de ácidos nucléicos provenientes de látex de mudas de mamoeiro. Ele só pode ser usado para diagnóstico desse vírus em amostras de plantas em que a

infecção viral é muito elevada, a ponto de os sintomas serem aparentes. Nesse caso, é provável que a grande quantidade de vírus supere o baixo rendimento da reação, resultado da presença de proteínas nas amostras, tornando possível a visualização de banda correspondente ao genoma viral em gel de agarose.

4.3.2 Diagnóstico molecular do PMeV em amostras de folha

4.3.2.1 RT-PCR convencional

Como a detecção do PMeV por RT-PCR convencional em amostras de látex de mudas não foi adequado, optou-se por realizar essa detecção em amostras de folha, provenientes dessas mesmas mudas.

Um método de detecção do PMeV por RT-PCR foi proposto Piccin e colaboradores (2010), que permite a análise em amostras pequenas de folha, disponível facilmente em mudas muito jovens ou mesmo em plântulas. O método usa cerca de 100 ng de RNA purificado, o qual funciona como molde para a enzima transcriptase reversa. As amostras de RNA de folha cujas plantas estão infectadas com PMeV apresentam amplificação de uma banda entre 200 e 400 pares de bases (PICCIN et al., 2010).

As amostras de folha coletadas das mudas foram tratadas com DNase I para a purificação do RNA e submetidas à RT-PCR convencional, usando para isso os iniciadores PMeVconv direto e indireto.

Das amostras coletadas, foram analisadas as amostras 29, 36, 50 e 57 dpi. As mudas inoculadas apenas com PMeV e aquelas inoculadas apenas com dsRNA mostraram infecção durante todo o período analisado. Ao contrário, mudas inoculadas simultaneamente com dsRNA e PMeV apresentaram infecção apenas 50

dpi (Figura 17). Além disso, comparando a intensidade dos fragmentos, percebe-se que aqueles resultantes deste último tratamento apresentam uma intensidade menor no mesmo tempo pós-inoculação quando comparados aos fragmentos de mudas inoculadas apenas com o vírus da meleira (Figura 17).

Esses resultados novamente sugerem ter havido uma indução de resistência ao PMeV, reduzindo o sucesso da infecção viral.

Uma observação importante é que o estado de resistência aumentado da planta é transitório, uma vez que mesmo as plantas inoculadas com o dsRNA do PMeV, apresentaram-se infectadas normalmente após os 43 ou 50 dias pós-inoculação (Figuras 13, 14 e 17).

Watson e colaboradores (2005) já haviam relatado que a introdução de dsRNA na célula poderia induzir um silenciamento transiente de genes alvos. A entrega de dsRNA na célula por biobalística ou por agroinfecção desencadeou um processo de silenciamento que não durava mais do que um determinado número de dias, de modo que esse método só foi utilizado para silenciar um pequeno número de genes endógenos.

Ainda, Tenllado e colaboradores (2003) mostraram que a inoculação mecânica de dsRNA transcrito *in vitro* derivado de sequências virais previne especificamente a infecção viral em plantas. Eles desenvolveram um sistema de expressão *in vivo* para produzir grandes quantidades de dsRNA derivados de vírus em bactéria com o objetivo de fornecer um método prático para o controle de viroses em plantas. Os dsRNAs purificados a partir da bactéria promoveram uma interferência específica com a infecção em plantas por duas viroses, dos grupos potyvirus e tobamovirus. Isso mostra que é possível fornecer uma alternativa à transformação genética de plantas.

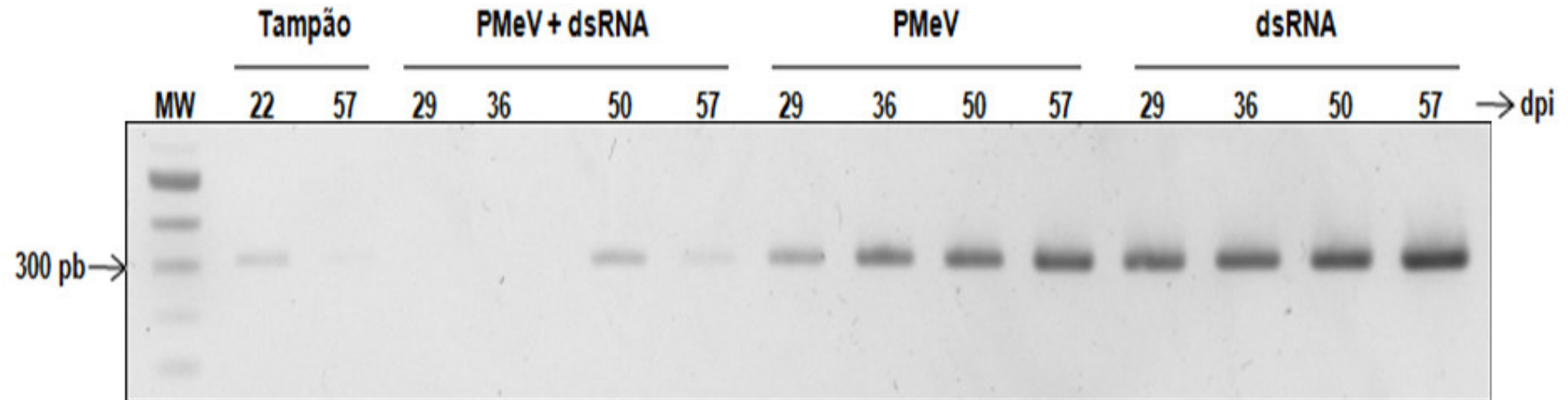


Figura 17: RT-PCR convencional, realizada com os iniciadores PMeVconv direto e indireto, de amostras de ácidos nucléicos extraídos a partir de folha de mudas de mamoeiro. As mudas inoculadas com látex infectado pelo PMeV apresentaram um fragmento esperado de aproximadamente 300 pb, mostrando o estabelecimento da infecção viral. As mudas inoculadas com PMeV e tratadas com dsRNA viral mostram um aumento do estado de resistência nos primeiros 50 dias pós-inoculação (dpi). As mudas inoculadas apenas com dsRNA mostram infecção durante todo o período analisado. Uma pequena infecção parece ocorrer nas amostras inoculadas com tampão.

As amostras das mudas inoculadas com o dsRNA do PMeV tiveram amplificação para o vírus da meleira, o que sugere que essas moléculas foram pouco degradadas ou mesmo não foram degradadas, no tempo em que se realizou o experimento, quando estavam sem o envoltório da partícula viral. No entanto, não foi possível avaliar se essa molécula é capaz de sozinha desencadear o aparecimento dos sintomas da meleira, uma vez que eles são notados somente após o florescimento (VENTURA et al., 2004).

As mudas usadas como controle, inoculadas com tampão, também apresentaram infecção no momento inicial e final do período analisado (Figura 17). Possivelmente, as plântulas recebidas estavam infectadas com o PMeV. Os métodos de detecção até o momento disponíveis, realizados apenas em amostras de látex, como visualização da banda do genoma viral de dsRNA de 12 kbp (KITAJIMA et al., 1993; ZAMBOLIM et al., 2003; RODRIGUES et al., 2006) e RT-PCR convencional (ARAÚJO et al., 2007) não permitiram, no entanto, a detecção do PMeV, sugerindo que as plântulas de mamão não se apresentavam infectadas por esse vírus.

Esses resultados mostram ainda que o método de diagnóstico do PMeV proposto por Piccin e colaboradores (2010) é confiável para avaliar a presença desse vírus em amostras de mudas de mamoeiro, diferente do que acontece quando essa avaliação é realizada pelo método proposto por Araújo e colaboradores (2007).

4.3.2.2 *RT-PCR em tempo real*

Existem duas abordagens gerais para a detecção do fragmento amplificado por PCR em tempo real: a utilização de repórteres químicos fluorescentes específicos e não específicos. Ambos apresentam níveis similares de sensibilidade (BUSTIN; NOLAN, 2004). No entanto, ensaios baseados em sondas específicas como a *TaqMan* podem resultar em falsos negativos, especialmente em viroses de RNA. Por outro lado, ensaios não específicos, como a utilização do corante intercalante de DNA

SYBR Green I, são mais confiáveis, simples e de menor custo (PAPIN; VAHRSON; DITTMER, 2004; VARGA; JAMES, 2005).

A detecção por PCR em tempo real é baseada na medida contínua do acúmulo ou redução dos sinais de fluorescência durante a reação de amplificação (WATZINGER; EBNER; LION, 2006). Essa medida é possível devido ao aumento de fluorescência do corante *SYBR Green* quando ligado a uma dupla fita de DNA (WITTWER et al., 1997). Durante as etapas de anelamento e extensão da PCR um aumento na união do corante a novas fitas de DNA sintetizadas levam a uma máxima emissão de fluorescência ao final da fase de alongação, mas na fase de desnaturação o corante é liberado e tal emissão diminui (WATZINGER; EBNER; LION, 2006). A fluorescência registrada a cada ciclo, no final da etapa de extensão, reflete o número de produtos de PCR gerados durante a amplificação (MORRISON; WEIS; WITTWER, 1998).

Segundo Piccin e colaboradores (2010), amostras de cDNA de folha de mamão sem o vírus da meleira não apresentam um aumento na fluorescência quando submetidas à amplificação por PCR em tempo real com os iniciadores do PMeV real direto e indireto, enquanto amostras contendo o cDNA do PMeV apresenta, tendo um crescimento exponencial até atingir o platô, próximo ao ciclo 38. Baseado nisso, amostras de folhas das mudas coletadas nos períodos de 29, 36, 50 e 57 dpi foram avaliadas quanto ao aumento de fluorescência.

A curva de fusão das amostras amplificadas para o PMeV foram analisadas para a confirmação da especificidade da amplificação. Essas apresentaram um único pico de perda de fluorescência (-Rn)³. A temperatura de fusão do fragmento gerado pela amplificação foi 75,52 °C para o vírus da meleira e 80,07 °C para o gene de referência 28S (Figura 18). Esses resultados mostram a amplificação específica dos produtos esperados.

³ -Rn: Perda de fluorescência do repórter normalizado. O repórter normalizado (Rn) é a divisão da intensidade da emissão da fluorescência do fluoróforo repórter, que fornece o sinal de fluorescência que indica amplificação específica, pela intensidade da emissão da fluorescência da referência passiva, que fornece uma referência de fluorescência interna. A normalização é necessária para a correção de flutuações de fluorescência causadas por mudanças na concentração, volume ou efeitos da amostra.

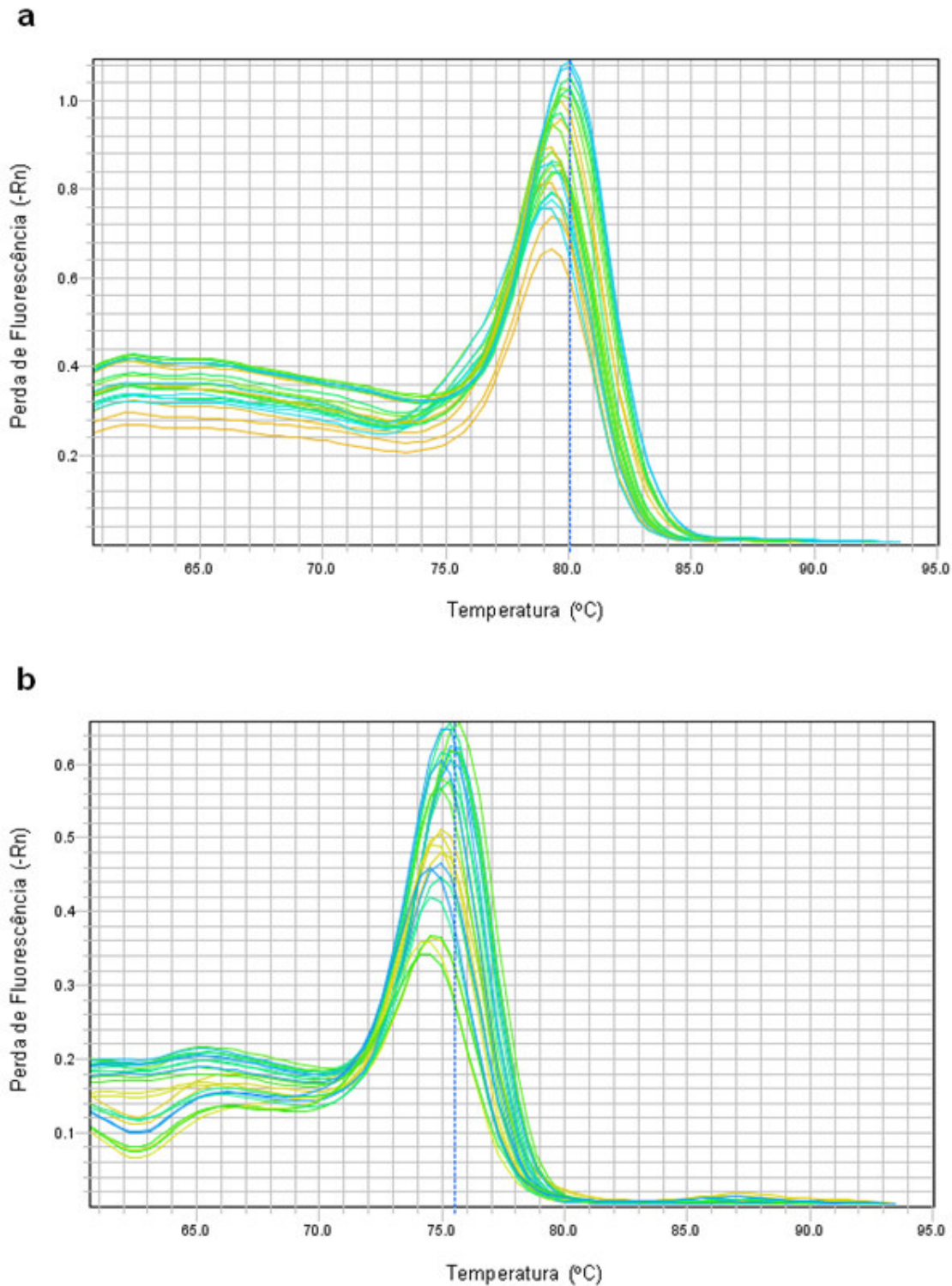


Figura 18: Especificidade na amplificação por RT-PCR em tempo real para o PMeV. Curva de fusão mostrando a temperatura em que há a diminuição da fluorescência (-Rn) dos fragmentos amplificados. (a) A temperatura de fusão (T_m) para o gene de referência 28S foi de 80,07 °C. (b) A temperatura de fusão (T_m) para o vírus da measles foi de 75,52 °C.

4.3.2.3 Quantificação relativa (RQ)⁴ do vírus por RT-PCR em tempo real

A quantificação relativa é um ensaio utilizado para avaliar mudanças na expressão gênica de grupos experimentais distintos. Os resultados dessa quantificação são expressos em ordem de grandeza e a análise é realizada através do Ct das amostras. Nesse método há a necessidade de normalização das amostras com genes de referência (BUSTIN et al., 2009), que nesse caso, foi o gene ribossômico 28S.

As análises de quantificação relativa geradas pelo *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems versão 2.0.1), tendo as amostras das mudas inoculadas com PMeV (29 dpi) como referência, mostram que nas mudas inoculadas somente com látex infectado pelo PMeV há aumento da infecção no decorrer do tempo (Figura 19).

O mesmo acontece com as mudas inoculadas simultaneamente com dsRNA e PMeV, que também mostram infecção durante o mesmo período, porém em uma escala bem menor (Figura 19).

Ao contrário, a análise dessas últimas amostras, por RT-PCR convencional, mostra que há infecção apenas 50 dpi (Figura 17), provavelmente porque antes disso o nível de dsRNA viral estava abaixo do limite de detecção desse método. Esses resultados mostram uma maior sensibilidade na detecção do PMeV por RT-PCR em tempo real. Kokkinos e colaboradores (2006) também relataram que o RT-PCR em tempo real mostrou maior sensibilidade na detecção e quantificação de viroses que infectam a batata-doce, por exemplo.

Os resultados de indução de resistência corroboram com o trabalho de Tenllado e colaboradores (2003), em que eles mostram que as mudas inoculadas com *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) acumularam RNA viral durante determinado tempo. Ao contrário, as mudas tratadas com uma sequência de dsRNA viral não apresentaram nenhum RNA de origem viral no decorrer do tempo ou a quantidade deste estava abaixo do limite de detecção do método utilizado. O mesmo é relatado no trabalho

⁴ RQ: Algoritmo de quantificação relativa (RQ) no *System SDS Software* da Applied Biosystems.

de Gan e colaboradores (2010), em que sequências de dsRNA de origem viral foram aplicadas nas plantas como *spray* e preveniram a infecção por *Sugarcane mosaic virus* (SCMV).

Apesar de as plantas inoculadas apenas com dsRNA serem positivas para infecção com PMeV, elas mostram uma infecção relativa muito reduzida (Figura 19). As mudas inoculadas com tampão também se apresentaram infectadas, fato justificado na seção anterior.

Todos esses resultados mostram que, possivelmente, as moléculas de dsRNA inoculadas desencadearam o processo de silenciamento do RNA nas plantas. A célula, ao reconhecer essas moléculas, pode ter iniciado o processo de degradação das mesmas em moléculas de siRNAs, as quais podem ter guiado a degradação de sequências específicas do PMeV, controlando o progresso da infecção viral.

Vale ressaltar ainda que é possível que esse controle tenha acontecido de forma sistêmica no mamoeiro, uma vez que o controle da infecção viral foi percebido em tecidos distantes do local da infecção.

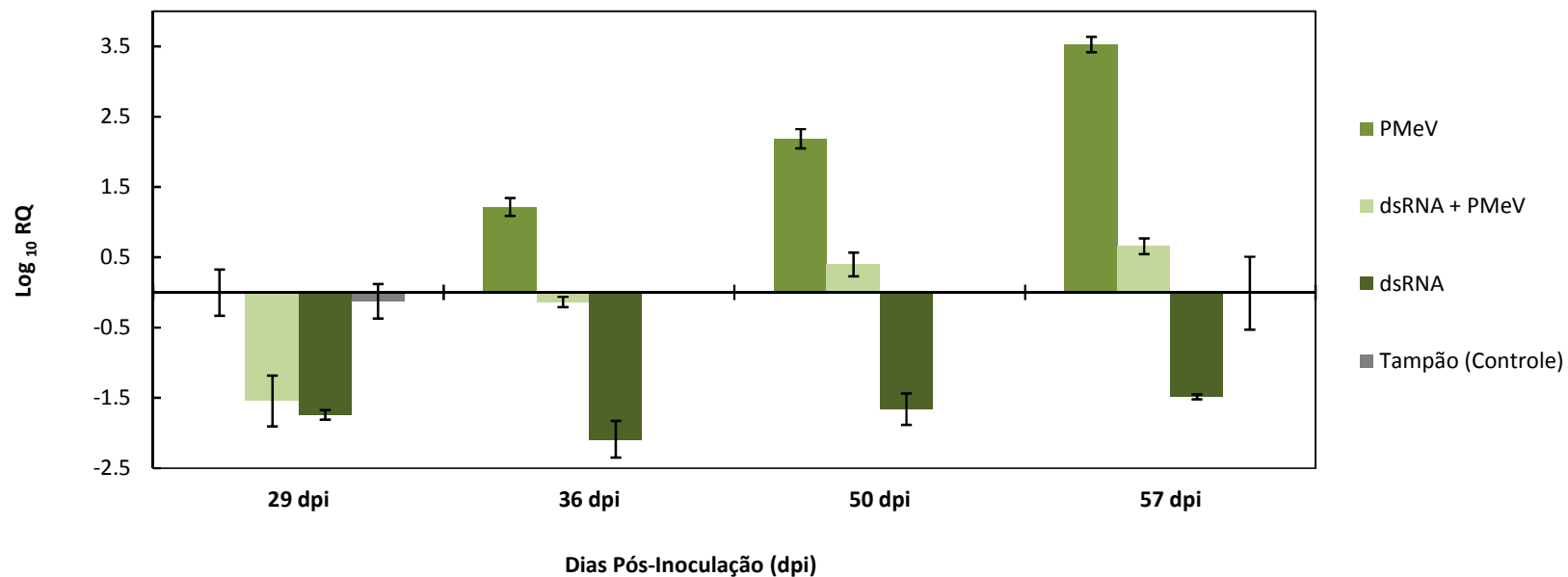


Figura 19: Quantidade relativa de PMeV nas mudas de mamoeiro. As mudas inoculadas com látex infectado pelo PMeV e tratadas com dsRNA apresentaram uma menor quantidade de vírus no decorrer do tempo (dpi) quando comparadas às mudas inoculadas apenas com PMeV. As mudas inoculadas apenas com o dsRNA viral apresentaram uma quantidade de vírus muito reduzida em relação aos demais tratamentos e nelas parece que não houve aumento da infecção viral no decorrer do tempo.

5 CONCLUSÕES

O tratamento das mudas de mamoeiro com dsRNA do PMeV resultou em uma indução de resistência a esse vírus. Tanto em amostras de látex como em amostras de folha foi observada uma redução no progresso da infecção viral.

A introdução artificial de moléculas de dsRNA do PMeV em mudas de mamoeiro representa uma alternativa potencial para desafiar essas plantas a responderem à infecção por esse vírus. Esse processo torna as medidas de controle viral existentes mais efetivas, além de ser uma alternativa ao uso de agroquímicos e ao desenvolvimento de plantas transgênicas.

O método proposto por Araújo e colaboradores (2007) mostrou-se inadequado para avaliar a presença do PMeV em mudas de mamoeiro. A reação de RT-PCR convencional ou ainda RT-PCR em tempo real, em amostras de folha, mostram confiabilidade e maior sensibilidade para a detecção desse vírus.

O método de inoculação utilizado resultou no estabelecimento da infecção pelo PMeV e na liberação das moléculas de dsRNA em células viáveis das mudas de mamoeiro, sendo um método simples, de baixo custo e eficiente.

Os resultados de RT-PCR convencional em amostras de folha confirmaram os resultados obtidos pela análise por eletroforese de ácidos nucleicos de látex, que já mostravam que as moléculas de dsRNA eram capazes de aumentar o período de incubação do PMeV.

Os resultados da PCR em tempo real permitiram relacionar a quantidade de PMeV entre os diferentes grupos de mudas. Essa quantificação relativa evidenciou uma quantidade muito reduzida de vírus no grupo de mudas inoculadas apenas com dsRNA viral.

A reação de RT-PCR em tempo real apresenta-se como um método de alta sensibilidade, podendo ser usado para detectar infecção com PMeV ainda em plântulas de mamoeiro, evitando assim a dispersão da doença para diversas lavouras de mamão.

6 REFERÊNCIAS

- ALTENBACH, D.; ROBATZEK, S. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 9, p. 1031-1039, 2007.
- AMARO, A. A.; CASER, D. V. Análise conjuntural do mercado de mamão aspectos econômicos da comercialização. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 35-53.
- ANDRADE, J. S. et al. Evidência da não-transmissão do vírus da meleira do mamoeiro por mosca-branca *Trialeurodes variabilis* (Quaintance, 1900). In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 605-608.
- ARAÚJO, M. M. M. et al. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 146, n. 1-2, p. 305-310, 2007.
- BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, EUA, v. 15, n. 3, p. 155-166, 2004.
- BUSTIN, S. A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CALLAWAY, A. et al. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 419-460, 2001.
- CHEN, C. et al. The actin cytoskeleton is involved in the regulation of the plasmodesmal size exclusion limit. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, n. 12, p. 1-3, 2010.
- COTTON, S. et al. *Turnip mosaic virus* RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. **Journal of virology**, v. 83, n. 20, p. 10460-10471, 2009.
- CRUZ, J.L. et al. Particionamento de carbono em plantas de mamoeiro em resposta à deficiência de nitrogênio. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 464-466.
- CULIK M. P. et al. Primeiro registro da mosca-branca, *Trialeurodes variabilis* (Quaintance, 1900) (hemiptera: aleyrodidae), no mamoeiro do estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 553-555.

- DATTA, S.K.; IQBAL, M. The laticiferous system in vascular plants. In: IQBAL, M. (org). **Growth patterns in vascular plants**. Portland, Oregon: Timber press, 1994. cap. 6, p. 137-164.
- DE WIT, P.J.G.M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.
- DeZOETEN, G. A. Risk assessment: Do we let history repeat itself? **Phytopathology**, v. 81, n. 6, p. 585-86, 1991.
- DIAS, G. B. et al. **O Efeito elicitor do Óxido Nítrico na Indução do Sistema de Defesa de Mamoeiro**. Vitória, 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.
- DING, S. W. RNA-based antiviral immunity. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p. 632-644, 2010.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v.51, n. 1, p. 151-178, 1997.
- ELLSTRAND, N.; PRENTICE, H. C; HANCOK, J. F. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 30, n. 1, p. 539-563, 1999.
- EL MOUSSAOUI, A. et al. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 4, p. 556-570, 2001.
- ESPÍRITO SANTO. Secretaria da agricultura, abastecimento, aquicultura e pesca. **Estado é o maior exportador de mamão**. Vitória, 2009. Disponível em: <<http://www.seag.es.gov.br/?p=2184>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. Systemic silencing signal(s). **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 2-3, p. 285-293, 2000.
- FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. **FAOSTAT: production crops (papayas) by countries and year**. Roma, 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 20 dez. 2010.
- FARREL JÚNIOR, R.E. **RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization**. 2ª edição. San Diego: Academic Press, 1998.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.
- FITCHEN, J. H.; BEACHY, R. N. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 739-763, 1993.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275-298, 1971.

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**, v. 45, n. 1, p. 173-202, 2007.

FUTAMI, T. et al. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. **Nucleic Acids Research Supplement**, v. 2, n. 1, p. 251-252, 2002.

GAN, D. et al. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 11, p. 1261-1268, 2010.

GLICK, E. et al. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by *tomato yellow leaf curl virus V2* protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, n. 1, p. 157-161, 2008.

GŁOWACKI, S.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 16, n. 1, p. 1-24, 2010.

GUO, H. S.; DING, S. W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 3, p. 398-407, 2002.

HAAS, G. et al. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 15, p. 2102-2112, 2008.

HABIBE, T. C.; BARBOSA, C. J.; NASCIMENTO, A. S. Metodologia simplificada para detecção de formas replicativas de vírus em mamoeiros afetados pela meleira. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22, 1999, Jaboticabal. **Programa e Resumos**. Jaboticabal: UNESP, 1999.

HABIBE, T. C.; NASCIMENTO, A. S. Melado sem valor. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, n.30, fev. 2005.

HAMMOND, J.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. **Advances in Virus Research**, v. 54, n. 1, p. 189-314, 1999.

HEIN, I.; GILROY, E.M.; ARMSTRONG, M.R.; BIRCH, P.R. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 4, p. 547-562, 2009.

HOFFMANN, K. et al. Mechanical transmission of poleroviruses. **Virology Methods**, v. 91, n. 2, p. 197-201, 2001.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4^a edição. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004.

HUNTER, J.R. Reconsidering the function of latex. **Trees**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1994.

IRITI, M.; FAORO, F. Review of innate and specific immunity in plants and animals. **Mycopathologia**, v. 164, n. 2, p. 57-64, 2007.

JONES, A. L.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J. Methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 21, p. 6385-6393, 1998.

JONES, J.D.G.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KASTEEL, D. T. J. et al. The movement proteins of *Cowpea mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* induce tubular structures in plant and insect cells. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 11, p. 2857-2864, 1996.

KEHR, J.; BUHTZ, A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 85-92, 2008.

KITAJIMA, E. W. et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 118-122, 1993.

KOKKINOS, C. D.; CLARK, C. A. Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 783-788, 2006.

KORMELINK, R. et al. Expression and subcellular location of the NSM protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, v. 200, n. 1, p. 56-65, 1994.

LALIBERTÉ, J. F.; SANFAÇON, H. Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 69-91, 2010.

LOZSA, R. et al. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virusinfected plants require spatial and temporal coexpression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 12, p. 4099-107, 2008.

LUCAS, E. J.; YOO, B. C.; KRAGLER, F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 849-857, 2001.

MACKEY, D.; McFALL, A.J. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1365-1371, 2006.

MALNOE, P. et al. Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with *Potato virus y*. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n. 6, p. 963-975, 1994.

MARTELLI, G. P. Transgenic resistance to plant pathogens: benefits and risks. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 37-46, 2001.

MARTINS, D. Dos S.; LANI, M. C. R. "Systems approach": evolução do programa de exportação do papaia brasileiro para os Estados Unidos. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 525-529.

MATSUKURA, S.; JONES, P.A.; TAKAI, D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. **Nucleic Acids Research Supplement**, v. 31, n. 15, p. 1-5, 2003.

MAULE, A. J. Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 6, p. 680-686, 2008.

McCARTNEY, A. W. et al. Localization of the Tomato Bushy Stunt Virus Replication Protein p33 Reveals a Peroxisome-to-Endoplasmic Reticulum Sorting Pathway. **The Plant Cell**, v. 17, n. 12, p. 3513-3531, 2005.

METTE, M. F. et al. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 1, p. 241-248, 1999.

MILLER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 363-374, 2008.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, Inglaterra, v. 24, n. 6, p. 954-962, 1998.

MOUTIM, V. et al. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Science**, v. 142, n. 2, p. 115-121, 1999.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NETHERTON, C. et al. A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. **Advances in Virus Research**, v. 70, p. 101-182, 2007.

NIEHL, A.; HEINLEIN, M. Impact of RNA Virus Infection on Plant Cell Function and Evolution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, n. 1, p. 120-128, 2009.

NIEHL, A.; HEINLEIN, M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. **Protoplasma**, v. 248, n. 1, p. 75-99, 2011.

NOVOA, R. R. et al. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 2, p. 147-172, 2005.

OPARKA, K. J. Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 33-41, 2004.

OPARKA, K. J.; SANTA CRUZ, S. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 1, p. 323-347, 2000.

ORTÍN, J.; PARRA, F. Structure and Function of RNA Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 305-326, 2006.

PANSTRUGA R.; PARKER, J. E.; SCHULZE-LEFERT, P. SnapShot: plant immune response pathways. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 978, 2009.

PAPIN, J. F.; VAHRSON, W.; DITTMER, D. P. SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False-Negative Results Due to Strain Variability. **Journal Of Clinical Microbiology**, EUA, v. 42, n. 4, p. 1511-1518, 2004.

PICCIN, J. G. Z.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. **Detecção do vírus da meleira do mamoeiro por PCR convencional e em tempo real e avaliação da transmissão por sementes**. Vitória, 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

POWELL, A. P. et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v. 232, n. 4751, p. 738-743, 1986.

PRUSS, G. J. et al. The potyviral suppressor of RNA silencing confers resistance to multiple pathogens. **Virology**, v. 320, n. 1, p. 107-120, 2004.

PURKAYASTHA, A.; DASGUPTA, I. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11-12, p. 967-976, 2009.

QU, F.; REN, T.; MORRIS, T. J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. **The Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 511-522, 2003.

RAFIQI, M. et al. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 9, p. 1017-1024, 2009.

REDINBAUGH, M.G. et al. Transmission of viral RNA and DNA to maize kernels by vascular puncture inoculation. **Journal of Virological Methods**, v. 98, n. 2, p. 135-143, 2001.

REINISCH, K. M. The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, n. 10, p. 714-716, 2002.

REZENDE, J. A. M.; FANCELI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: Kimati, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 486-496.

RITZENTHALER, C. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? **Current opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 118-122, 2005.

ROBINSON, D. J. Environmental risk assessment of releases of transgenic plants containing virus-derived inserts. **Transgenic Research**, v. 5, n. 5, p. 359-362, 1996.

RODRIGUES, S. P. et al. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 5, p. 861-871, 2009.

RODRIGUES, S. P. et al. Análise estrutural e histoquímica de compostos presentes no látex de plantas com meleira e sua relação com o *Papaya meleira virus* (PMeV). In: MARTINS, D. S. **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória-ES: Incaper, 2005. p. 430-433.

RODRIGUES, S. P. et al. 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, n. 3, p. 281-283, 2005.

RODRIGUES, S. P. et al. New approach for papaya latex storage without virus degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 122-124, 2009.

RODRIGUES, S. P.; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. **Interação entre o Papaya meleira vírus (PMeV) e mamoeiros infectados**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

RODRIGUES, S. P.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Distribuição do vírus da meleira do mamoeiro em tecidos de plantas infectadas. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 601-604.

ROJAS, C. A., et al. Overexpression of the *Arabidopsis* anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. **Plant Molecular Biology**, Holanda, v. 71, n. 3, p. 307-318, 2009.

RUGGIERO, C. et al. Panorama da produção do mamão no Brasil e no mundo: Situação atual e tendências. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 13-34.

SANTANA, J.G. et al. Avaliação do estado nutricional do mamoeiro (*Carica papaya* L., cv. SUNRISE SOLO), em Indiara, Goiás. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória-ES: Incaper, 2003. p. 445-447.

SANTOS, M. P.; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. Indução de resposta a estresse em mamoeiro após tratamento com levedura e óxido nítrico. In: MARTINS, D. dos S. (ed.) **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória-ES: Incaper, 2005. p. 231-234.

SANTOS, M. P.; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. **Indução de sistema de defesa do mamoeiro como resposta à elicitores químico (óxido nítrico) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae*)**. Vitória, 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.

SAREILA, O. et al. Role of viral movement and coat proteins and RNA in phloem-dependent movement and phloem unloading of tobamoviruses. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 11-12, p. 622-629, 2004.

SHAH, J. Plants under attack: systemic signals in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 459-464, 2009.

- SIDAHMED, A. M. E.; WILKIE, B. Endogenous Antiviral Mechanisms of RNA Interference: A Comparative Biology Perspective. **Methods in Molecular Biology**, v. 623, p. 1-19, 2010.
- SIOUD, M.; SORENSEN, D.R. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1220-1225, 2003.
- SNOW, A. A; PALMA, P. M. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. **BioScience**, v. 47, n. 2, p. 86-96, 1997.
- SOOSAAR, J. L. M.; BURCH-SMITH, T. M.; DINESH-KUMAR, S. Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 789-98, 2005.
- STEWART, C. N.; HALFHILL, M. D.; WARWICK, S. I. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 806-817, 2003.
- TABAK, H. F. et al. Peroxisomes Start Their Life in the Endoplasmic Reticulum. **The International Journal of Intracellular Transport**, v. 4, n. 8, p. 512-518, 2003.
- TAKAHASHI, A. et al. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11777-11782, 2003.
- TAMELING, W.I.L.; BAULCOMBE, D.C. Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to *potato virus X*. **Plant Cell**, v. 19, n. 5, p. 1682-1694, 2007.
- TANG, G. et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 49-63, 2003.
- TAVARES, E.T. et al. Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 5, p. 563-566, 2004.
- Tecidos vegetais.** Disponível em: <<http://curlygirl.no.sapo.pt/tecidopl.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2011.
- TENLLADO F. et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2003.
- TENNANT, P. F.; GONSALVES, C.; LING, K. S. Differential protection against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. **Phytopathology**, v. 84, n. 11, p. 1359-1366, 1994.
- TEPFER, M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 467-491, 2002.
- TOLLEY-HENRY L.; RAPER JUNIOR C. D. Utilization of ammonium as a nitrogen source. Effects of ambient acidity on growth and nitrogen accumulation by soybean. **Plant Physiology**, v. 82, p. 54-60, 1986.

TRUMAN, W.; DE ZABALA, M. T.; GRANT, M. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. **Plant Journal**, v. 46, n. 1, p. 14-33, 2006.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. PRRs in pathogen recognition. **Central European Journal of Biology**, v. 1, n. 3, p. 299-313, 2006.

VAN BEL, A. J. E. The phloem, a miracle of ingenuity. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 1, p. 125-149, 2003.

VAN DER KROL, A. R. et al. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 291-299, 1990.

VAN DER WEL, N. N.; GOLDBACH, R.; VAN LENT, J. The movement protein and coat protein of *Alfalfa mosaic virus* accumulate in structurally modified plasmodesmata. **Virology**, v. 244, n. 2, p. 322-329, 1998.

VARGA, A.; JAMES, D. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods**, Holanda, v. 123, n. 2, p. 213-220, 2005.

VARGASON, J. M. et al. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 799-811, 2003.

VENTURA, J. A. et al. 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, 2003. p. 267-276.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. D. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. M. H. (ed.). **Diseases of fruits and vegetables**: diagnosis and management. London: Klumer Academic Publishers, 2004. p. 201-268.

VIDAL, C. A. et al. In: **Abstract of XXI International Congress of Entomology**. Foz do Iguaçu-PR: SEB/EMBRAPA, 2000. p. 819.

VOINNET, O. et al. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 177-187, 1998.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends Genet**, v. 17, n. 8, p. 449-459, 2001.

VOINNET, O.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D. C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, v. 103, n. 1, p. 157-167, 2000.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 14147-14152, 1999.

WASSENEGGER, M. et al. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. **Cell**, v. 76, n. 3, p. 567-576, 1994.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 2-3, p. 203-220, 2000.

WATSON, J. M. et al. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5982-5987, 2005.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n. 2-3, p. 254-298, 2006.

WELLINK, J. The *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. **The Journal of Virology**, v. 67, n. 6, p. 3660-3664, 1993.

WITTWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, v. 22, p. 130-138, 1997.

ZAMBOLIM, E. M. et al. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389-394, 2003.

ZHANG, X. et al. Small Interfering RNA Targeting Heme Oxygenase-1 Enhances Ischemia-Reperfusion-induced Lung Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10677-10684, 2004.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 1, p. 10-16, 2008.