

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DO AMARELO LETAL DO MAMOEIRO (Papaya lethal yellowing virus - PLYV)

Cleidiane Borges Daltro¹; Adriana Fiuzza dos Santos¹; Karinna Vieira Chiacchio Velame³; Jose Evando Aguiar Beserra Jr.³; Jose Albersio Araújo⁴, Eduardo Chumbinho de Andrade⁵

¹Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;

¹Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;

²Bolsista ITEC -2 FAPESB

³Prof. Adjunto UESPI, Picos/PI;

⁴Dep. Fitotecnia, Lab. Virologia Vegetal, UFC, Fortaleza/CE;

⁵Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical; (eandrade@cnpmf.embrapa.br)

Introdução

A fruticultura no Brasil tem apresentado crescimento acima de outras culturas agrícolas nos últimos anos, principalmente na região Nordeste, grande responsável pela produção de diferentes tipos de frutas, entre estas, o mamão (*Carica papaya* L.). O país é o maior produtor mundial, e a região Nordeste responde por mais de 60% da produção nacional (IBGE, 2008). Certamente, os principais fatores que afetam a expansão da cultura são os problemas fitossanitários, principalmente as viroses. Dentre as espécies de vírus que infectam o mamoeiro no Brasil o vírus do amarelo letal (Papaya lethal yellowing virus, PLYV)(Loreto *et al.*, 1983) ocasionou relevante impacto nos cultivos do Ceará e Rio Grande do Norte nos últimos anos (Teixeira, 1997), atingindo uma incidência de 40% em regiões produtoras do RN. Os sintomas iniciam nas folhas do terço superior da copa que progressivamente amarelecem, murcham levando a planta à morte. Estudos biológicos, sorológicos e moleculares classificaram o PLYV como um Sobemovírus (Silva *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 1994), entretanto até o momento pouca informação com relação ao sua variabilidade genética foram obtidas. Diante disto o presente trabalho visou estudar a variabilidade genética existente na população viral presente nas diferentes regiões produtoras de mamão do estado do Ceará.

Metodologia

Amostras de mamoeiro com sintomas de infecção pelo PLYV foram coletadas em diferentes regiões produtoras de mamão do Ceará. As amostras coletadas foram avaliadas para a presença do PLYV pelo teste de ELISA utilizando anti-soro policlonal para o vírus.

Para o estudo de variabilidade genética, um fragmento do genoma viral foi amplificado por RT-PCR, clonado e sequenciado. Para isto foram utilizados os oligonucleotídeos PLYV 3F e PLYV 4R (Silva, 1996) que possibilitam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1Kb compreendendo parte do gene que codifica a RNA polimerase viral (RdRp) e parte do gene que codifica a capa proteica (CP).

O procedimento para a detecção foi iniciado pela extração do RNA total de tecido foliar utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a síntese do cDNA foram adicionados em um microtubo 5µg de RNA total, 2pmoles do oligonucleotídeo reverso, 4µL do tampão da reação, 1µL de dNTPs a 10mM, 2µL de DTT 0,1M e 200u da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen), e volume completado para 20µL com água. Na reação de PCR foi utilizado 2,5µL do cDNA, 5µL do tampão da PCR, 3µL de MgCl₂ 25mM, 1µL dos dNTPs (2,5mM), 0,8pmol de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA polimerase, e o volume completado para 50µL com água. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os fragmentos amplificados foram clonados utilizando o Kit “pGEMT-easy” (Promega) e inseridos em células competentes de *E. coli* DH5α pelo método do choque térmico. A clonagem foi confirmada por meio de extração dos plasmídeos, clivagem com a enzima *Eco*RI e análise dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1%.

As sequências obtidas foram comparadas com as presentes no banco de dados de sequência - GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparadas e alinhadas entre si utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw) para a obtenção do grau de variabilidade existente e as árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007).

Resultados e Discussão

Os levantamentos de coleta do material vegetal com sintomas típicos de infecção pelo PLYV resultaram na obtenção de amostras de 24 foliares, das quais 18 se mostraram infectadas pelo PLYV após a realização do teste de ELISA, e a partir deste momento cada uma destas amostras foi considerada como um isolado viral. Até o momento foram clonados e sequenciados dez isolados que estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Localidades onde foram coletados os isolados.

Isolado	Local de coleta
1	Paraipaba
3	Paraipaba
7	Distrito de Itatinga -Quixeré
8	Distrito de Itatinga -Quixeré
9	Distrito de Boa Esperança – Quixeré
11	Distrito de Boa Esperança – Quixeré
14	Distrito de Oiticica dos Mirandas – Quixeré
19	Perímetro Irrigado (C136/3C2)- Baixo Acaraú
20	Perímetro Irrigado (C136/3C2)- Baixo Acaraú
21	Baixo Acaraú

No primeiro momento, as sequências obtidas foram comparadas as depositadas no banco mundial de sequências (GeneBank), todas apresentando maior homologia com outras espécies do gênero sobemovírus.

Posteriormente foi realizada uma análise comparativa entre as sequências de nucleotídeos dos isolados, que demonstrou uma conservação acima de 97% entre eles. Visando verificar se a conservação se mantinha na sequência das proteínas virais, foram obtidas as sequências parciais de aminoácidos deduzidos das proteínas RdRp e CP. A análise comparativa demonstrou uma elevada conservação entre os isolados em ambas as proteínas, entretanto a homologia entre as sequências das proteínas foi menor ao observado para a sequência do RNA viral. A menor homologia entre as proteínas RdRp foi de 94% e as proteínas CP foi de 89%, ambas entre os isolados 19 e 20 (Tabela 2).

Tabela 2: Homologia entre as sequências de aminoácidos das proteínas RdRp (valores acima da diagonal) e CP (valores abaixo da diagonal) dos dez isolados do PLYV coletados em diferentes localidades do estado do Ceará.

Isolados	1	3	7	8	9	11	14	19	20	21
1		100	100	100	99	100	99	98	95	95
3	99		100	100	99	100	99	98	95	95
7	99	100		100	99	100	99	98	95	95
8	100	99	99		99	100	99	98	95	95
9	99	98	98	99		99	99	98	95	95
11	100	99	99	100	99		99	98	95	95
14	99	98	98	99	100	99		98	95	95
19	92	91	91	92	91	92	91		94	94
20	97	96	96	97	96	97	96	89		100
21	97	96	96	97	96	97	96	89	100	

As sequências de aminoácidos da RdRp e CP dos isolados foram alinhadas para possibilitar a geração de árvores filogenéticas. As árvores geradas com base nos alinhamentos apresentaram uma topologia similar para ambas proteínas, com os isolados se mantendo nos mesmos ramos e formando os mesmos grupos, de forma que apenas a árvore gerada com a sequência da RdRp está representada na Figura 1.

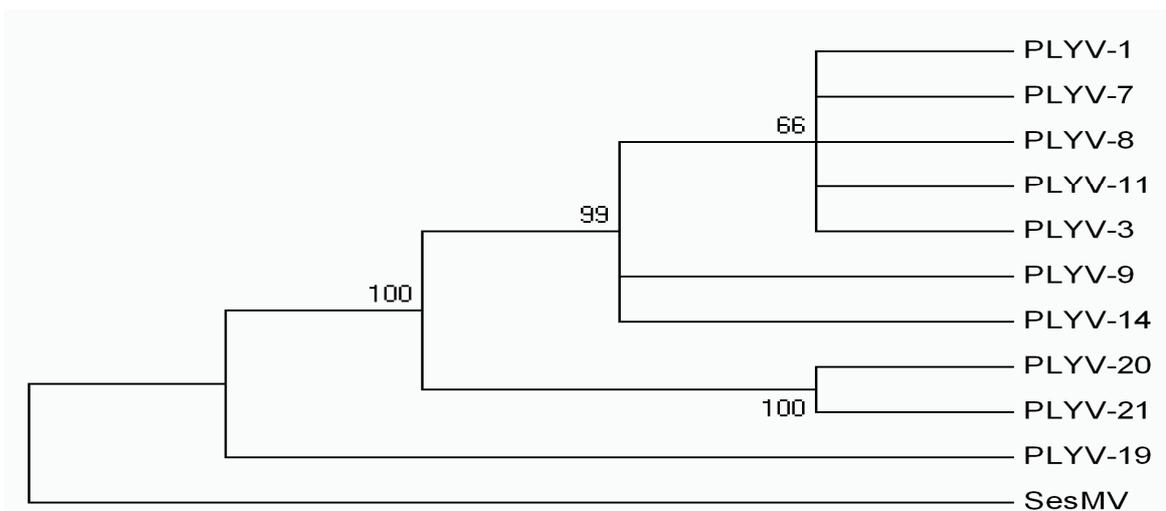


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína RdRp dos isolados de Papaya lethal yellow virus (PLYV). Foi utilizado o método “UPGMA” e bootstrap com 500 repetições. SesMV, *Sesbania mosaic virus* (GeneBank nº. NP066393.2).

Conclusões

As análises das sequências geradas corroboram com dados já obtidos por Silva (2000) que indicam que o PLYV pertence ao gênero *Sobemovirus*, e que as sequências analisadas são altamente conservadas entre os isolados indicando que esta região do genoma viral codifica partes importantes das proteínas RdRp e CP, podendo ser útil no desenvolvimento de estratégias de resistência baseada na geração de plantas transgênicas.

Agradecimentos

A Embrapa pela bolsa de Iniciação Científica e Adagri pelo apoio na coleta das amostras.

Referências

- IBGE, 2005. <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acessado em 29/08/2007.
- LIMA, J.A.A.; LIMA, A.R.T. & MARQUES, M.A.L. Purificação e caracterização sorológica de um isolado do vírus do amarelo letal do mamoeiro ‘solo’ obtido no Ceará. *Fitopatologia Brasileira* 19:437-441. 1994.
- LORETO, T.J.G.; VITAL, A.F.; REZENDE, J.A.M. Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. *O Biológico* 49:275-279. 1983.
- SILVA, A.M.R., KITAJIMA, E.W. & RESENDE, R.O Nucleotide and amino acid Analysis of the polymerase and the coat protein genes of the papaya lethal yellowing virus. *Virus Review and Research* 11:196.2000 (Abstract).
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.