

**COMPARAÇÃO DE ESTIRPES FRACAS E SEVERAS DO *PAPAYA*  
*RINGSPOT VIRUS* COM BASE NA CAPA PROTÉICA**

**MARILIA GABRIELA SALVETI DELLA VECCHIA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Dezembro – 2001

**COMPARAÇÃO DE ESTIRPES FRACAS E SEVERAS DO *PAPAYA*  
*RINGSPOT VIRUS* COM BASE NA CAPA PROTÉICA**

**MARILIA GABRIELA SALVETI DELLA VECCHIA**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

**PIRACICABA**

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro – 2001

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Della Vecchia, Marília Gabriela Salveti  
Comparação de estirpes fracas e severas do *Papaya ringspot virus* com base na capa protéica / Marília Gabriela Salveti Della Vecchia. - - Piracicaba, 2001.  
46 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.  
Bibliografia.

1. Cucurbitacea 2. Imunização 3. Potyvirus 4. Sequência de nucleotídeo 5. Serologia 6. Vírus fitopatogênico I.  
Título

CDD 635.62

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

“Nós existimos em primeiro lugar, para as pessoas queridas de cujo bem-estar e sorrisos depende a sua e a nossa felicidade, depois, para todos os seres, nossos semelhantes, que não conhecemos pessoalmente, mas os quais estamos ligados pelos laços de simpatia e fraternidade humana”

Albert Einstein

Às minhas avós Ana e Alice

DEDICO

Aos meus pais João Manoel e Maria Helena e irmãos

João Vinicius, Ana Carolina e Sabrina

OFEREÇO

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida, pela minha família, pela oportunidade de crescimento e evolução;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação profissional;  
Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola por toda a estrutura e assistência necessárias à realização desse trabalho;

Ao Professor Jorge Alberto Marques Rezende por tudo;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

A todos os professores e aos funcionários do Setor de Fitopatologia;  
Ao professor Luis Eduardo Aranha Camargo por toda a cooperação;  
Ao Dr. Ivan de Godoy Maia, a Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello, ao Dr. Gustavo Astua-Monge e a Dra. Juliana Freitas-Astua pela atenção dispensada na análise dos resultados;

Aos companheiros do laboratório de Virologia Vegetal: Edivaldo, Ricardo, Quelmo, Davi, Luis, Danilo, José Segundo, Louise e Zayame pelos bons momentos compartilhados;

As queridas amigas que tornaram tão agradáveis os momentos vividos no decorrer desses anos: Daniela, Mariana, Jaqueline, Ana Carolina e Malu;

Aos colegas do curso e a todos que ajudaram de alguma forma meus sinceros agradecimentos

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Plantas-teste.....	10
3.2 Estirpes do PRSV-W.....	10
3.3 Inoculação.....	11
3.4 Monitoramento da infecção com as estirpes do PRSV-W.....	11
3.5 Purificação do vírus.....	12
3.6 Isolamento do RNA viral.....	13
3.7 Extração da proteína do capsídeo.....	14
3.8 Análise da proteína em gel SDS-PAGE.....	14
3.9 Reação serológica de “Western blot”.....	15
3.10 Síntese de DNA complementar por RT-PCR.....	16
3.11 Construção da biblioteca do gene do capsídeo.....	17
3.11.1 Ligação dos fragmentos do produto do RT-PCR ao vetor.....	17
3.11.2 Preparo de células competentes para transformação.....	17
3.11.3 Transformação de <i>E. coli</i> com os produtos de ligação.....	18

3.11.4 Extração de DNA plasmidial da biblioteca do gene do capsídio.....	19
3.12 Seqüenciamento do gene da capa protéica.....	20
3.12.1 Amplificação do DNA recombinante.....	20
3.12.2 Seqüenciamento.....	22
3.12.3 Análise dos resultados.....	22
4 RESULTADOS. ....	24
4.1 Mobilidade da proteína do capsídio em SDS-PAGE.....	24
4.2 Seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos da capa protéica das estirpes fracas e comuns do PRSV-W.....	26
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	37
ANEXO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## **COMPARAÇÃO DE ESTIRPES FRACAS E SEVERAS DO *PAPAYA RINGSPOT VIRUS* COM BASE NA CAPA PROTÉICA**

Autora: MARILIA GABRIELA SALVETI DELLA VECCHIA

Orientador: Prof. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

### **RESUMO**

O *Papaya ringspot virus* (PRSV) é uma espécie do gênero *Potyvirus*, sendo que a maioria dos isolados pertence a duas estirpes distintas: “papaya” (P) e “watermelon” (W). O *Papaya ringspot virus* - estirpe W (PRSV-W) tem sido considerado um dos vírus mais importantes no cultivo de cucurbitáceas pela predominância e pelos prejuízos significativos que causa no Brasil. O controle do mosaico da abobrinha-de-moita, causado pelo PRSV-W, tem sido obtido de forma satisfatória através da premunização com as três estirpes fracas, designadas PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3. O principal objetivo desse estudo foi comparar essas estirpes fracas com estirpes severas PRSV-W-C, PRSV-W-PR e PRSV-W-PE, com base na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína da capa protéica e na mobilidade dessa proteína em SDS-PAGE. A seqüência de nucleotídeos da capa protéica das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 apresentou 100 % de homologia. Quando comparadas com a estirpe fraca PRSV-W-3, a homologia foi de 98 %. As estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 apresentaram 95 % de homologia com as estirpes



severas PRSV-W-C e PRSV-W-PE. Essas duas estirpes severas, por sua vez, apresentaram respectivamente, 93 e 95 % de homologia com a estirpe fraca PRSV-W-3. O alinhamento das seqüências de nucleotídeos entre as estirpes fracas e as severas evidenciou a inserção de 6 nucleotídeos na região conservada desse gene nas estirpes fracas. Essa inserção refletiu na adição de dois amino ácidos (Asn e Asp) na seqüência de amino ácidos deduzidos dessa proteína. A mobilidade da capa protéica em SDS-PAGE foi semelhante para todas as estirpes estudadas.

# **COMPARISON OF MILD AND SEVERE STRAINS OF *PAPAYA RINGSPOT VIRUS* BASED ON THEIR COAT PROTEIN**

Author: MARILIA GABRIELA SALVETI DELLA VECCHIA

Adviser: Prof. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

## **SUMMARY**

*Papaya ringspot virus* (PRSV), a species of the genus *Potyvirus*, is classified into two strains: “papaya” (P) and “watermelon” (W). *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) has been considered one of the most important viruses infecting cucurbits in Brazil due to its predominance and significant damage caused on the crops. The control of the disease caused by this virus has been efficiently achieved by means of cross protection with three mild strains, namely PRSV-W-1, PRSV-W-2, and PRSV-W-3. The main purpose of the present study was to compare these mild strains with the severe strains PRSV-W-C, PRSV-W-PR, and PRSV-W-PE, based on the nucleotide sequence of the coat protein gene and on the mobility of the capsid protein in SDS-PAGE. The nucleotide sequence of the coat protein gene of the mild strains PRSV-W-1 and PRSV-W-2 showed 100 % of homology. When compared with the coat protein gene of the mild strain PRSV-W-3, the homology was 98 %. The mild strains PRSV-W-1 and PRSV-W-2 showed 95 % of homology with the severe strains PRSV-W-C and PRSV-W-PE. These two severe strains, otherwise,

showed respectively, 93 and 95 % of homology with the mild strain PRSV-W-3. The alignment of the nucleotide sequences of the mild and the severe strains indicated an insertion of 6 nucleotides in the conserved region of the coat protein gene of the mild strains. This insertion reflected on the addition of two amino acids (Asn e Asp) in the amino acid deduced sequence of this protein. The mobility of the coat protein in SDS-PAGE was similar for all the strains studied.

## 1 INTRODUÇÃO

As cucurbitáceas são cultivadas em praticamente todo o mundo e estão sujeitas a muitos problemas fitossanitários, dentre os quais se destacam as doenças causadas por vírus, cujas características de ocorrência e severidade são bastante diferenciadas, em função da espécie de vírus e suas estirpes, espécie vegetal e cultivar plantada, proximidade da fonte de inóculo e população de vetores (Lima & Vieira, 1992).

Na natureza, já foram encontrados mais de 20 vírus diferentes infectando cucurbitáceas (Lovisoló, 1980). Desses, oito foram encontrados no Brasil até o final de 1995, sendo que o *Papaya ringspot virus* – estirpe W (PRSV-W) tem sido considerado um dos mais importantes, pela sua predominância em diversas regiões produtoras de cucurbitáceas e pelos prejuízos significativos que causa à produção (Albuquerque et al., 1972; Dahal et al., 1997; Jawdah et al., 2000; Lima et al., 1980; Pavan et al., 1989; Yuki et al., 1991; Yuki et al., 2000 e Stangarlin et al., 2001).

Além do sintoma de mosaico foliar, as plantas afetadas pelo PRSV-W também mostram redução drástica no limbo foliar, no desenvolvimento e na produção quantitativa e qualitativa de frutos. As perdas na produção são variáveis, podendo em muitos casos chegar a 100 %, devido a rápida disseminação do vírus nas áreas onde ele ocorre (Greber, 1978).

A redução na produção parece estar, em alguns casos, diretamente relacionada com a época de infecção das plantas (Yuki et al., 1991). Esses autores verificaram que as plantas de abobrinha-de-moita “Caserta” (*Cucurbita pepo* L.) inoculadas aos 10 dias de idade tiveram uma redução de 99,7 %, tanto

em número como em peso dos frutos. Quando inoculadas aos 25 dias, a redução em número e em peso de frutos foi de 80,6 % e 86,9 %, respectivamente.

A ausência de resistência ou tolerância em *C. pepo* (Kuabara et al., 1987 e Provvidenti et al., 1978), aliada à dificuldade de controle dessa doença por meio do combate aos vetores ou através de práticas culturais (Pinese et al., 1994; Summers et al., 1995 e Yuki, 1990) que minimizem a incidência do vírus, fazem com que outras alternativas de controle sejam investigadas. Nesse contexto, o uso da premunização das plantas com estirpes fracas do vírus, que não afetam o desenvolvimento e a produção e protegem-nas contra os efeitos das estirpes severas em campo, é uma alternativa de controle da doença que tem se mostrado bastante promissora (Rezende, 1996; Rezende & Pacheco, 1998).

Estudos para o controle do mosaico da abobrinha-de-moita (PRSV-W) por premunização foram iniciados em São Paulo em 1991, quando Rezende et al. (1994) selecionaram 18 estirpes fracas do vírus a partir de bolhas em folhas com mosaico e verificaram que algumas delas protegeram plantas de “Caserta” contra a infecção com uma estirpe severa do vírus. Trabalhos subsequentes mostraram que duas dessas estirpes, denominadas PRSV-W-1 e PRSV-W-2, apresentaram boa estabilidade (Rezende & Pacheco, 1997) e protegeram eficientemente plantas de abobrinha-de-moita (Rezende & Pacheco, 1998); de abóbora (*C. moschata* Duch. Ex Poir. cv. “Menina Brasileira”) (Rezende et al., 1999) e de abóbora híbrida (*C. moschata* x *C. máxima* Duch. ex Lam. cv. “Takayama”) (Dias & Rezende, 2000) em testes de casa de vegetação e de campo, proporcionando ganhos significativos na produção.

Este trabalho teve por objetivo estudar as características moleculares das estirpes fracas do PRSV-W, tais como seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína da capa protéica e o peso molecular dessa, de tal sorte que possam permitir diferenciá-las das estirpes severas do vírus. Esse

conhecimento poderá auxiliar o trabalho de monitoramento da estabilidade das estirpes fracas no processo de manutenção e possíveis estudos de mecanismos de proteção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O *Papaya ringspot virus* (PRSV) é uma espécie do gênero potyvirus, com partículas flexuosas de 780 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro e um genoma constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva. O terminal 5' do RNA é protegido pela proteína VPg, enquanto o terminal 3' possui uma cauda poli (A) (Van Regenmortel et al., 2000). O RNA do PRSV contém 10.326 nucleotídeos, excluindo a cauda 3' poli (A), sendo o mais longo encontrado entre as seqüências de potyvirus (Chiang & Yeh, 1997). A organização genética proposta para o RNA do PRSV encontra-se ilustrada na Figura 1, juntamente com as diferentes proteínas, os respectivos pesos moleculares e funções (Yeh et al., 1992 e Zerbini & Zambolim, 1999).

O ácido nucléico é envolto pela capa protéica que é formada por subunidades idênticas de uma proteína de peso molecular de aproximadamente 36 k Da (Bateson & Dale, 1992). O PRSV induz a formação de inclusões cilíndricas (cataventos) e amorfas no citoplasma das células hospedeiras (Purcifull et al., 1984).

A replicação envolve a produção de uma única poliproteína que é clivada em produtos individuais (Bateson & Dale, 1992), via três proteinases codificadas pelo genoma viral: P1, HC-PRO, NIa (Chiang & Yeh, 1997).



Figura 1 - Organização do genoma do PRSV

VPg – proteína ligada covalentemente a extremidade 5' do RNA; P1 – proteinase, fator auxiliar na replicação do RNA viral; HC-PRO – transmissão por afídeos, proteinase, fator auxiliar na replicação do RNA viral, movimento célula a célula e a longa distância, transmissão por semente, inibição da resposta de defesa da planta; P3 – fator auxiliar na replicação do RNA viral; CI – replicação (RNA helicase); Nla – proteinase; Nlb – RNA polimerase dependente de RNA; 6K – sugestão que seja responsável pela associação do complexo replicativo à membranas; CP – formação do capsídeo, transmissão por afídeos, movimento célula a célula e a longa distância, fator auxiliar na replicação do RNA viral; UTR – região não traduzida e An - cauda poli-A na extremidade 3' do RNA (K=kDa).

A maioria dos isolados do PRSV pertence a duas estirpes distintas: “papaya” (P) e “watermelon” (W). A estirpe P infecta plantas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) e causa doença limitante ao cultivo dessa espécie nas regiões tropical e subtropical do mundo. Pode infectar sistemicamente cucurbitáceas, enquanto algumas estirpes também podem causar lesões locais em *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn. e *C. quinoa* Willd. A estirpe W, previamente descrita como *Watermelon mosaic virus* - 1, é economicamente importante em cucurbitáceas, mas não infecta plantas de mamoeiro. Alguns isolados induzem lesões locais em *C. amaranticolor* e *C. quinoa*. Esses dois patótipos são serologicamente indistinguíveis quando testados com antissoros heterólogos contra a proteína da capa protéica. Ambos são transmitidos de maneira não-persistente por várias espécies de afídeos (Purcifull et al., 1984).

Do ponto de vista molecular, tem sido constatado um alto grau de identidade entre isolados das estirpes P e W de diferentes origens (Austrália, Ásia, Estados Unidos), principalmente entre isolados de um mesmo continente (Bateson et al., 1994 e Jain et al., 1998). Essa identidade é geralmente baseada na seqüência de nucleotídeos da região do terminal 3', que representa aproximadamente um quinto do genoma viral, envolvendo parte do gene que



codifica a proteína NIb, o gene que codifica a proteína da capa protéica (CP) e a região não traduzida (UTR). De acordo com o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (ICTV), homologias na seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica de potyvirus, na faixa de 85-100 %, caracterizam estirpes de um mesmo vírus (Van Regenmortel et al., 2000).

Estudos comparativos da seqüência de nucleotídeos foram úteis para verificar diferenças existentes entre uma estirpe comum do PRSV-P do Havai, denominada PRSV HA, e uma estirpe fraca PRSV HA 5-1, obtida pelo tratamento da estirpe comum com ácido nitroso (Yeh & Gonsalves, 1984) para aplicação no controle do mosaico do mamoeiro por premunização (Yeh et al., 1988). A seqüência de 2.235 nucleotídeos da região terminal 3' dessas estirpes mostrou 99,4 % de identidade. As diferenças foram encontradas nos genes da capa protéica (2 nucleotídeos) e no gene da proteína NIb (10 nucleotídeos) (Wang & Yeh, 1992). Essas diferenças, entretanto, não permitiram aos autores proporem qualquer relação com a virulência das estirpes, uma vez que o fator de virulência pode estar associado a outro(s) gene(s) do vírus. Além disso, estudos das seqüências completas, associados com recombinação *in vitro* e testes biológicos são necessários para localizar o(s) gene(s) envolvido(s) com a virulência.

A proteína HC-PRO, que auxilia a transmissão por afídeos, entre outras funções, parece ser de importância na regulação da virulência em algumas espécies de potyvirus (Atreya et al., 1992 e Atreya & Pirone, 1993). Essa proteína possui uma seqüência de quatro amino ácidos, Phe-Arg-Asn-Lys (FRNK) que é conservada em 18 espécies de potyvirus, entre elas a espécie PRSV (Gal-On, 2000).

Atreya et al. (1992), trabalhando com a hipótese de que mutações em amino ácidos específicos na região terminal da HC-PRO do *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), entre as posições 257-713, poderiam resultar em perda da atividade de transmissão por afídeos, acabaram notando que mutações nas

posições 307, 283/284 e 368/369 também reduziram drasticamente a acumulação do vírus nos tecidos e atenuaram os sintomas em plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv “Kentucky 14”, quando comparados com a estirpe selvagem.

Klein et al. (1994), trabalhando com o mesmo patossistema, notaram que plantas *N. tabacum* L. cv “Kentucky 14” inoculadas com um mutante no gene da proteína P1, denominado P1-801, e dois mutantes para o gene HC-PRO, denominados HC-1937 e HC-1937 $\Delta$ 15, cada qual contendo uma inserção de 12 nucleotídeos na região N terminal, mostraram alterações acentuadas no desenvolvimento dos sintomas da doença. De uma maneira geral, a expressão dos sintomas foi cíclica, progredindo de fraco para severo, conforme as plantas se desenvolveram e repetindo essa alteração à medida que emergiam folhas novas.

Gal-On (2000) demonstrou de maneira precisa, que a substituição do amino ácido Ile por Arg, na posição 180 da região conservada (FRNK) da proteína HC-PRO de uma estirpe do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), originou um mutante que causou sintomas fracos em aboboreira e ausência de sintomas em plantas de pepino, de melão e de melancia. Ainda mais, esse mutante foi estável e protegeu plantas de abobrinha-de-moita contra a infecção com a estirpe severa do ZYMV, em testes em casa de vegetação e em campo. A mutação não afetou a replicação e a concentração do mutante nos tecidos das plantas.

Wisler et al. (1995) compararam diferentes isolados do ZYMV, entre os quais um isolado fraco (MD) e um severo (SV) originários da Flórida, USA, com base na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína P1 e na mobilidade dessa proteína em SDS-PAGE. A similaridade na seqüência de nucleotídeos dos isolados MD e SV foi de 95 %. A principal diferença entre esses isolados foi a inserção de dezoito nucleotídeos, logo após o código de iniciação, do gene P1 do isolado MD. Tanto o isolado SV, como outros isolados

comuns do ZYMV estudados, apresentaram a mesma deleção nessa posição do gene P1.

Uma outra ferramenta utilizada para a possível diferenciação entre estirpes de vírus é a migração diferencial em eletroforese da proteína do capsídeo e a subsequente confirmação da sua presença através de anticorpo policlonal, em reação serológica de “Western blot”.

Duas estirpes do *Plum pox virus* (PPV) que causam sintomas distintos em *Nicotiana benthamiana*, foram caracterizadas por Manoussopoulos et al. (2000) através da mobilidade da proteína da capa protéica em eletroforese da partícula viral combinada com detecção serológica por “Western blot”. A diferença na mobilidade eletroforética permitiu distinguir as estirpes em plantas infectadas com cada uma delas separadamente, bem como naquelas infectadas com a mistura de ambas.

A inserção de dezoito nucleotídeos e conseqüente adição de 6 amino ácidos na proteína P1 do isolado MD do ZYMV permitiu separá-lo do isolado SV através da mobilidade em SDS-PAGE e posterior marcação da proteína em “Western blot”, usando antissoro específico contra a P1 (Wisler et al., 1995).

Uma estirpe do *Hibiscus chlorotic ringspot virus* (HCRSV) foi inoculada em três hospedeiros diferentes e a proteína do capsídeo oriunda de cada espécie vegetal infectada foi analisada em SDS-PAGE. O perfil resultante, entretanto, não permitiu distingui-las. Quando o purificado viral oriundo separadamente desses hospedeiros foi submetido à eletroforese em gel de agarose, verificou-se a presença de um perfil capaz de distingui-los (Hurt, 1987).

Li et al. (1999) detectaram diferenças significativas no peso molecular da proteína da capa protéica de seis isolados biologicamente distintos do *Dasheen mosaic virus* (DsMV), obtidos de diferentes hospedeiros, sendo que a variação observada no tamanho desta foi de 37 a 48 kDa. Quando esses

isolados foram inoculados em *Philodendron selloum*, dois causaram sintomas fracos e os demais causaram severo mosaico foliar, porém não houve correlação entre a severidade dos sintomas e o tamanho da proteína da capa protéica. Os autores sugeriram que as diferenças no peso molecular da capa protéica refletem diferenças no genoma viral, que podem ser utilizadas para rápida identificação e diferenciação dos isolados. Nesse mesmo estudo os autores incluíram dois isolados do PRSV-W para fins comparativos, mas não encontraram diferença no tamanho da proteína da capa protéica deles.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Plantas-teste**

Nesse estudo foram utilizadas plantas de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L. cv. "Caserta"). As sementes foram feitas em bandejas de isopor com 128 células preenchidas com substrato, recebendo cada uma delas uma semente. As plântulas foram transplantadas para vasos de alumínio de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, cheios de terra misturada com areia e composto de matéria orgânica. Cada vaso conteve duas plântulas que foram freqüentemente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

#### **3.2 Estirpes do PRSV-W**

Foram utilizadas três estirpes severas do PRSV-W, obtidas em Campinas-SP (PRSV-W-C), Curitiba-PR (PRSV-W-PR) e Petrolina-PE (PRSV-W-PE), duas estirpes fracas (PRSV-W-1 e PRSV-W-2) selecionadas por Rezende et al. (1994) e uma terceira estirpe fraca (PRSV-W-3) selecionada a partir de bolhas de folhas de melancia com mosaico, coletadas na região de Tupã-SP (dados não publicados). Essas estirpes foram mantidas separadamente em plantas de abobrinha-de-moita em casa de vegetação.

### 3.3 Inoculação

As plantas-teste foram inoculadas mecanicamente com cada uma das estirpes separadamente. Os inóculos foram preparados macerando-se folhas de plantas infectadas em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio até atingir a mesma molaridade. As inoculações foram feitas nas folhas cotiledonares das plantas-teste, previamente polvilhadas com carborundum, friccionando-as com o indicador umedecido no inóculo. Em seguida as folhas foram lavadas para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo.

### 3.4 Monitoramento da infecção com as estirpes do PRSV-W

A confirmação da infecção das plantas-teste com as estirpes severas do vírus foi feita com base na observação dos sintomas descritos para esta doença. No caso das plantas inoculadas com as estirpes fracas, que não causam sintomas, a confirmação da infecção foi feita através da indexação para a presença do PRSV-W, através do teste serológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (Mowat & Dawson, 1987), com algumas modificações, utilizando antissoro policlonal contra o PRSV-W existente no laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP.

Amostras individuais de tecido vegetal foram maceradas em almofariz na presença de tampão carbonato (0,015 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,035 M  $\text{Na}_3\text{HCO}_3$ , pH 9,6). Cada amostra foi distribuída em dois pocinhos de uma placa de ELISA, colocando-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato em cada um. A placa foi incubada por uma hora e meia a 37 °C, seguida de 3 lavagens consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,14 M NaCl, 0,004 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,003 M KCl, pH 7,4, adicionado de 0,5 mL de Tween 20 por litro). Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  do antissoro

específico, diluído 1:1.000 em tampão Tris-HCl (0,2 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2) foram adicionados a cada pocinho e a placa de ELISA foi novamente incubada a 37 °C por uma hora e meia, seguida de três lavagens consecutivas com PBS-Tween. Na etapa seguinte, 100 µL de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em tampão Tris-HCl, pH 7,2 foram adicionados em cada pocinho. A placa foi mais uma vez incubada por uma hora e meia a 37 °C e posteriormente submetida a três lavagens consecutivas com PBS-Tween. Finalmente, 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA N-9389), diluído em tampão de dietanolamina (0,6 mgmL<sup>-1</sup>), foram adicionados por pocinho. A placa foi mantida a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A reação foi avaliada com base nos valores de absorbância mensurados pelo leitor de ELISA da marca Metertech Σ 960, no comprimento de onda de 405 nm. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor de absorbância foi igual ou superior a 3 vezes o valor de absorbância de extratos de plantas sadias. Extrato de planta infectada com a estirpe comum do vírus foi utilizado como controle positivo.

### **3.5 Purificação do vírus**

A purificação de cada uma das estirpes do vírus foi realizada separadamente a partir de folhas frescas, colhidas entre 14 e 21 dias após a inoculação das plantas de abobrinha-de-moita. As folhas foram trituradas em liquidificador na presença de tampão fosfato 0,25 M, pH 7,5 contendo 0,01 M de Na-EDTA e 0,1 % de ácido tioglicólico, na proporção de 1:2 (p/v). O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado por 10 minutos a 1.500 g. O sobrenadante foi transferido para um béquer, acrescido de 1 % de Triton X-100, 4 % de polietilenoglicol (PEG), 0,1 M NaCl e agitado por duas horas e meia a 4 °C. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 13.200 g. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,25 M pH 7,5, contendo 0,01 M de MgCl<sub>2</sub> e centrifugado por 10 minutos a 13.200 g. O sobrenadante coletado foi

centrifugado por uma hora e meia a 100.000 g. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 e centrifugado por 10 minutos a 13.200 g. O sobrenadante resultante foi coletado e centrifugado por 16 horas a 150.000 g em um gradiente isopícnico de cloreto de céσιο (CsCl) a 15 %, colocado sobre um colchão, também de CsCl a 53 % (p/v), dissolvido em tampão fosfato 0,01 M. A banda viral visível foi coletada e dialisada 3 vezes em tampão fosfato 0,001 M, pH 7,0 e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A concentração de cada estirpe purificada do PRSV-W foi estimada com base nos valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm e considerando-se o valor de 2,4 para o coeficiente de extinção.

A integridade da partícula viral e a pureza do purificado foram examinadas em um microscópio de transmissão Zeiss EM 900, do núcleo de microscopia eletrônica da ESALQ, pela técnica de imersão foliar rápida (“leaf dip”).

### **3.6 Isolamento do RNA viral**

O isolamento do RNA foi realizado a partir de 200  $\mu\text{L}$  do vírus purificado, acrescido de SDS a 1 % (v/v) de acordo com protocolo proposto por Berger & Shiel (1998). Essa mistura foi incubada em banho-maria a  $55^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se volume igual de fenol equilibrado com Tris, pré-aquecido a  $55^{\circ}\text{C}$ , agitando-se vigorosamente e centrifugando por 2 minutos a 10.000 g.

A fase aquosa foi removida para um novo tubo e adicionado um volume igual de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitando vigorosamente e centrifugando por 1 minuto a 10.000 g. Removeu-se a fase aquosa e adicionou-se 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto, deixando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por



25 minutos, a 4 °C. O precipitado foi salvo, sendo a este adicionado 1 volume de etanol 70 % e imediatamente centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O precipitado resultante foi dissolvido em um pequeno volume de água destilada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e esterilizada.

A quantificação do RNA viral foi estimada com base nos valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, considerando-se que 1 OD<sub>260</sub> equivale a 40 µgmL<sup>-1</sup> de RNA de fita simples (Sambrook et al., 1989). O produto resultante foi armazenado a -20 °C.

### **3.7 Extração da proteína do capsídio**

Cem microlitros de suspensão viral do purificado de cada uma das estirpes foram misturados com um volume igual de tampão de dissociação (0,5 M TRIS, pH 6,8; SDS 3,8 %; 2-mercaptoetanol 10 %; azul de bromofenol 0,1 %; glicerol 19 %). A desnaturação da proteína do capsídio foi realizada pela incubação das amostras em água fervente, por 5 minutos.

A análise da proteína do capsídio foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. A identidade da proteína foi feita através da reação serológica, em teste de “Western blot”, após transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Conci, 1999).

### **3.8 Análise da proteína em gel SDS-PAGE**

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se um aparelho “Bio Rad Mini Protean II”. O gel de separação foi composto por acrilamida 12,5 %; água destilada 32 %; 1,5 M TRIS 25 %, pH 8,8; SDS 0,1 %; APS 0,1 % e TEMED 0,05 % e o gel de empilhamento composto por acrilamida 4 %; água destilada 72 %; 1,0 M TRIS 12,5 %, pH 6,8; SDS 0,1 %; APS 0,1 % e TEMED

0,076 %. Cada canaleta do gel recebeu 10  $\mu$ L da amostra a ser analisada. Uma das canaletas recebeu 8  $\mu$ L do marcador de proteínas Full Range Rainbow, com peso molecular na faixa de 10 a 250 kDa (Amersham Life Science). Foi efetuada a eletroforese por 20 minutos a 95 v, até que a linha frontal do azul de bromofenol atingisse o gel separador. Em seguida a voltagem foi elevada para 125 v. A corrida foi interrompida quando as amostras alcançaram o final do gel. Dois géis com as mesmas amostras foram analisados concomitantemente.

Um dos géis foi retirado do aparelho e colocado em uma solução fixadora (metanol 45 %, ácido acético 10 %, em água destilada) por 15 minutos seguido da incubação em corante comassie (commassie brilliant blue R 0,25 %, metanol:água (1:1) 90 %, ácido acético glacial 9,75 %) também por 15 minutos. Após a retirada do corante, o gel permaneceu durante a noite em solução de descoloração (metanol 22 %, ácido acético 7 %, em água destilada) para visualização das bandas da proteína do capsídio.

### **3.9 Reação serológica de “Western blot”**

As proteínas separadas no segundo gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, empregando-se tampão de transferência (TRIS 0,3 %; glicine 1,5 %; metanol 20 %). A transferência foi feita em um aparelho “Bio Rad Mini Trans-blot Cell”, por 90 minutos a 0,25 mA. A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação serológica, com antissoro contra a proteína da capa protéica do PRSV-W. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 minutos com TBS (0,002 M TRIS, pH 7,4, 0,15 M NaCl)/Tween 20 (0,05 %). Em seguida foi incubada em TBS-Tween contendo 7,5 % de leite em pó desnatado, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A membrana foi transferida para uma suspensão de anticorpo policlonal específico contra o vírus testado, diluído 1:1.000 em TBS-Tween, contendo leite em pó desnatado 7,5 %, e incubada sob agitação constante, durante 3 a 4 horas, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada

por 2 a 3 minutos, 3 vezes consecutivas, com TBS-Tween. A seguir foi incubada por 2 a 3 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em TBS-Tween + leite em pó desnatado 7,5 %. Depois desse período a membrana foi lavada 2 a 3 vezes em TBS-Tween, durante 2 a 3 minutos cada vez. Finalmente foi adicionado o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitro blue tetrazolium, pH 9,5 (NBT/BCIP - SIGMA B-5655).

### **3.10 Síntese de DNA complementar por RT-PCR**

A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA extraído da suspensão das partículas virais purificadas das diferentes estirpes do PRSV-W. Cinquenta a duzentos e cinquenta ng de RNA viral foram misturados a 40 pmoles de um primer complementar a extremidade 3' do RNA (AGCTAACCATGGGCGAGTATTTCAGTTGCGC) (Souza Jr., 1999), num volume final de 15  $\mu$ L em água destilada previamente tratada com dietil pirocarbonato. Essa solução foi aquecida a 70 °C por 5 minutos e posteriormente mantida em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 4  $\mu$ L do tampão 5X da enzima transcriptase reversa; 2  $\mu$ L de 0,1 M DTT; 1  $\mu$ L de mistura de dNTP's 10 mM, 200 unidades da enzima Superscrit II Transcriptase Reversa (Invitrogen), 20 unidades de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), misturados num volume final de 50  $\mu$ L. Essa solução foi incubada por 90 minutos a 37 °C. Em seguida foi aquecida a 70 °C por 5 minutos para a degradação da enzima.

O cDNA foi em seguida usado em uma reação de PCR. Para isso, 5  $\mu$ L do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 5  $\mu$ L de tampão 10X de PCR; 3  $\mu$ L de 25 mM MgCL<sub>2</sub>; 20 pmoles do primer para o terminal 3'; 40 pmoles do primer que se anela ao terminal 5'

(ATCATTCCATGGGCGTGTTCATGAATCAA) (Souza Jr., 1999), 1  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTP's 10 mM; 2,5 unidades de *Taq* DNA Polymerase (Promega), completando o volume para 50  $\mu\text{L}$  com água destilada.

O regime do termociclador (MJ Research PTC 200) foi de 94 °C por 3 minutos, 40 °C por 1 minuto, 72 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 92 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e 30 segundos, finalizando com 72 °C por 7 minutos. O produto do RT-PCR foi visualizado em gel de agarose a 1 %, contendo 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de brometo de etídeo. O marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega) foi utilizado.

### **3.11 Construção da biblioteca do gene do capsídio**

#### **3.11.1 Ligação dos fragmentos do produto do RT-PCR ao vetor**

O cDNA produzido na reação de RT-PCR foi ligado ao vetor pGem® pelo uso do kit pGem® T Easy Vector Systems (Promega). Para a reação de ligação foram utilizados 3  $\mu\text{L}$  do produto do RT-PCR, 5  $\mu\text{L}$  do tampão 2x de ligação rápida, 1  $\mu\text{L}$  do vetor pGEM®-T, 1 $\mu\text{L}$  da enzima  $T_4$  DNA ligase. Essa reação foi delicadamente misturada e incubada a 4 °C por no mínimo 12 horas, sendo armazenada posteriormente a - 20 °C.

#### **3.11.2 Preparo de células competentes para transformação**

Células competentes foram preparadas a partir de uma colônia isolada de células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$ . Estas foram inicialmente inoculadas em 15 mL de meio SOB (anexo 1) contendo 10 mM de Mg e incubadas a 37 °C por 16 horas, sob constante rotação a 220 rpm. Um mililitro desse pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio SOB e este enriquecido

com 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  1 M e 1 mL de  $\text{MgCl}_2$  1 M. Esse meio foi incubado nas mesmas condições de temperatura e rotação até atingir valores de O.D. da ordem de 0,45-0,55, no comprimento de onda de 550 nm.

Essa cultura foi transferida para dois tubos de 50 mL e deixada no gelo por 10 minutos. Posteriormente foi centrifugada a 3.500 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi dissolvido em 15 mL de tampão RF1 (anexo 1) e deixado no gelo por 30 minutos.

Logo em seguida essa suspensão foi centrifugada a 3.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 8 mL de tampão RF2 (anexo 1) e deixado no gelo por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram distribuídas em tubos de 1,5 mL previamente resfriados. Esses tubos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a - 70 °C até o momento de uso.

### **3.11.3 Transformação de *E. coli* com os produtos de ligação**

A transformação dos produtos de ligação com células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$  foi realizada de acordo com protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Duzentos microlitros de células competentes foram misturados com um volume variável de 2 a 8  $\mu\text{L}$  do produto de ligação em tubos de 1,5 mL. Essa mistura permaneceu no gelo por 30 minutos, sofrendo logo em seguida choque térmico a 42 °C por 90 segundos, quando os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo. Em ambiente asséptico, cada tubo recebeu 800  $\mu\text{L}$  de meio SOC (anexo 1). A mistura permaneceu a 37 °C por 1 hora, sob agitação de 220 rpm. Em seguida foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 g para concentração das células. Cerca de 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante foram descartados e as células suspensas no volume restante com auxílio de pipeta. Aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foram distribuídos

em placas de Petri descartáveis contendo meio LB (anexo 1) acrescido de ampicilina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , IPTG  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  e X-Gal  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , para a avaliação da atividade de  $\beta$ -galactosidase nos transformantes e seleção destes. Essas placas foram incubadas a  $37^\circ \text{C}$  por 12-14 horas.

As colônias que conservaram a atividade, de cor azul, foram consideradas portadoras do vetor sem inserto, enquanto as que perderam a atividade e permaneceram claras, foram selecionadas como clones portadores de DNA recombinante. Estas colônias foram inoculadas em 3 mL de meio TB (anexo 1) acrescido de ampicilina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 4 mL de tampão fosfato (1,15 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,27 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  em volume final de 10 mL) e incubadas por 12-14 horas sob rotação de 220 rpm, a  $37^\circ \text{C}$ .

Para a preservação de cada um dos clones obtidos, cerca de  $100 \mu\text{L}$  de meio inoculado foram misturados com  $100 \mu\text{L}$  de glicerol 50 %, sendo armazenados a  $-70^\circ \text{C}$ .

#### **3.11.4 Extração de DNA plasmidial da biblioteca do gene do capsídio**

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994). Colônias crescidas no meio TB foram centrifugadas em tubos de 1,5 mL a  $13.000 \text{ g}$  por 5 minutos, descartando o sobrenadante. O precipitado resultante foi dissolvido sob agitação vigorosa em  $100 \mu\text{L}$  de solução I (anexo 1) gelada e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos; quando foram adicionados  $200 \mu\text{L}$  da solução II (anexo 1). Após misturar delicadamente, as células foram deixadas em gelo por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados  $150 \mu\text{L}$  da solução III (anexo 1) que foi delicadamente misturada, sendo em seguida centrifugada a  $13.000 \text{ g}$  por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foram adicionados  $400 \mu\text{L}$  de clorofórmio saturado com acetato de sódio ou potássio. Após agitação vigorosa a suspensão foi centrifugada a  $13.000 \text{ g}$  por 5 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e a este foram adicionados 400 $\mu$ L de fenol equilibrado com Tris. Depois de agitado vigorosamente, a suspensão foi novamente centrifugada a 13.000 g por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e acrescentado 1 mL de etanol absoluto a - 20 °C. Os tubos foram invertidos delicadamente para misturar o conteúdo e deixados a - 20 °C por 10 minutos quando foram centrifugados a 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado seco ao ar. O precipitado foi dissolvido em 100  $\mu$ L de água Milli Q e adicionado 1 mL de etanol absoluto a - 20 °C. A suspensão foi incubada por 10 minutos a - 20 °C. Em seguida foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi seco ao ar e dissolvido em um volume (20-40  $\mu$ L) de água estéril.

O DNA plasmidial extraído foi tratado com RNase1A (Pharmacia) e em seguida submetido a uma eletroforese em gel de agarose para quantificação.

### **3.12 Seqüenciamento do gene da capa protéica**

#### **3.12.1 Amplificação do DNA recombinante**

Para proceder o seqüenciamento do gene da capa protéica viral, o DNA plasmidial extraído de cada um dos clones foi amplificado com o primer M13 (“reverse” e “forward”) e os kits Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) e Dyenamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) no laboratório de Genética Molecular, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ.

Quando se utilizou o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) a reação de amplificação foi realizada

com 400-500 ng de DNA plasmidial; 3,2 pmol de primer M 13; 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão 2,5X; 2,0  $\mu\text{L}$  de Big Dye num total de 10  $\mu\text{L}$  em água estéril. O regime do termociclador para esse kit foi de 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos, finalizando com 2 minutos a 4 °C. Para o kit Dyynamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech), a reação de amplificação foi realizada com 400-500 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol de primer M 13, 2,0  $\mu\text{L}$  de Dyynamic num total de 10  $\mu\text{L}$  em água estéril. O regime do termociclador foi de 30 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, finalizando com 5 minutos a 4 °C.

Ao conteúdo desses tubos, cujos clones foram amplificados pelo kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água estéril e 30  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100%. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 13.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O precipitado foi dissolvido em 250  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %. O tubo foi agitado e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco por 1 minuto a 90 °C, sendo em seguida dissolvido em 3  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento. Antes das amostras serem aplicadas no gel de poliacrilamida para o seqüenciamento, estas foram desnaturadas por 3 minutos a 90 °C.

Ao conteúdo dos tubos cujos clones foram amplificados pelo kit Dyynamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) foram acrescentados 1  $\mu\text{L}$  de solução de acetato de sódio/EDTA e 40  $\mu\text{L}$  de etanol 95 %. A mistura foi colocada no escuro por 20 minutos e em seguida centrifugada a 13.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O precipitado foi dissolvido em 250  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi



descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37 °C por alguns minutos, sendo posteriormente dissolvido em 3 µL de tampão de carregamento antes de ser levado ao aparelho para sequenciar.

### **3.12.2 Seqüenciamento**

O seqüenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ de acordo com o protocolo descrito nos kits utilizados.

Vários clones de cada estirpe foram seqüenciados. Quando não foi possível a sobreposição de seqüências estendidas em direções opostas ou quando estas apresentaram alta variabilidade de bases, o seqüenciamento unidirecional foi repetido inúmeras vezes, bem como as regiões internas dos clones foram seqüenciadas utilizando-se primers sintetizados a partir de seqüências parciais obtidas inicialmente (para o terminal 5' TGCAACTTTCCTGTTCC e para o terminal 3' GCAATGTATGCTTCTGCC), com o propósito de esclarecer as ambigüidades encontradas.

### **3.12.3 Análise dos resultados**

As seqüências de nucleotídeos dos eletroferogramas foram alinhadas pelo programa Sequencher 3.1 (Gene Codes Corporation) de onde foi extraída a seqüência consenso final para cada estirpe. O alinhamento das seqüências consenso foi realizado pelo programa Multalin (INRA) no endereço <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. A procura no “GenBank” de outros isolados do PRSV (Tabela 2) para comparação de identidade com as estirpes do PRSV-W desse estudo foi realizada pelo programa Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

A seqüência de amino ácidos deduzidos da proteína do capsídio foi realizada pelo programa Translate disponível no endereço <http://ca.expasy.org/tools/dna.html> e a comparação desta com aquelas disponíveis no “GenBank” foi realizada pelo programa Blast, disponibilizado no endereço do NCBI.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Mobilidade da proteína do capsídio em SDS-PAGE**

A proteína da capa protéica das diferentes estirpes do PRSV-W foi extraída da suspensão resultante do purificado de cada uma delas. Após separação eletroforética em gel de poliacrilamida (Figura 2) e transferência para membrana de nitrocelulose, as proteínas foram marcadas com antissoro policlonal contra o PRSV-W, em teste de “Western blot” (Figura 3). O peso molecular da proteína da capa protéica resultante das estirpes analisadas, com exceção da estirpe fraca PRSV-W-3, foi de aproximadamente 35 kDa apresentando, portanto a mesma mobilidade em SDS-PAGE.

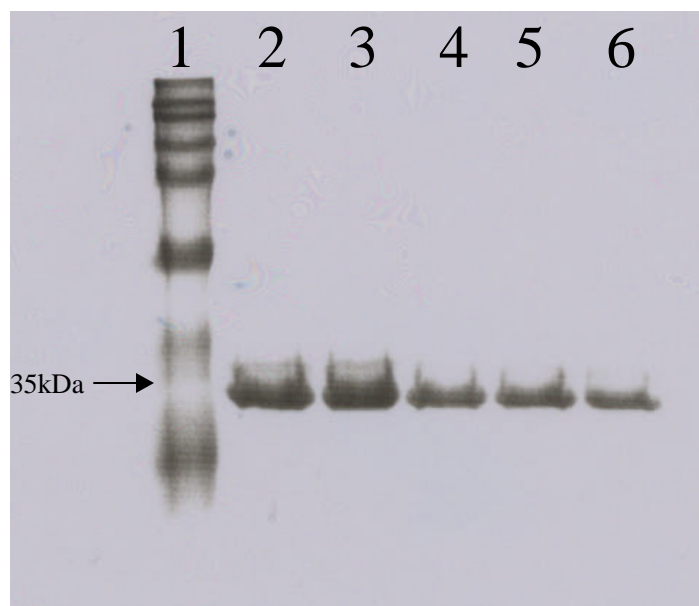


Figura 2 - Perfil eletroforético da proteína do capsídeo em gel de poliacrilamida 12,5 % corado com commassie blue. Linha 1: marcador Rainbow (Amersham Life Science); Linha 2: estirpe severa PRSV-W-C; Linha 3: estirpe severa PRSV-W-PR; Linha 4: estirpe severa PRSV-W-PE, Linha 5: estirpe fraca PRSV-W-1; Linha 6: estirpe fraca PRSV-W-2.

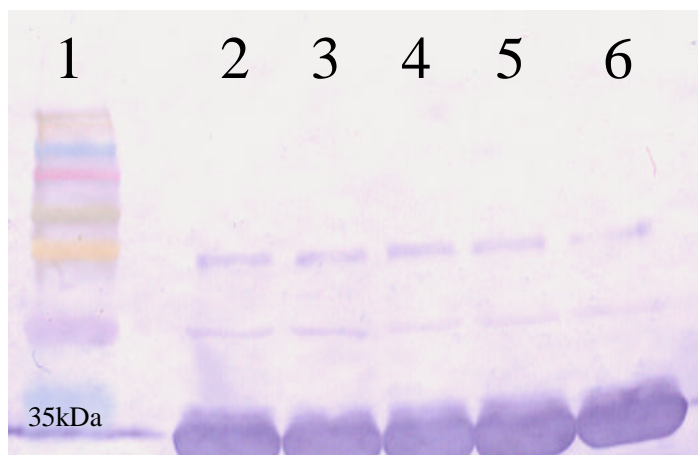


Figura 3 – Reação de “Western blot” com antissoro contra a capa protéica do *Papaya ringspot virus*. Linha 1: marcador Rainbow (Amersham Life Science); Linha 2: estirpe severa PRSV-W-C; Linha 3: estirpe severa PRSV-W-PR; Linha 4: estirpe severa PRSV-W-PE, Linha 5: estirpe fraca PRSV-W-1; Linha 6: estirpe fraca PRSV-W-2.

#### 4.2 Seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos da capa protéica das estirpes fracas e severas do PRSV-W

As seqüências consensos de nucleotídeos foram obtidas a partir de 4 clones seqüenciados em ambos os sentidos para a estirpe fraca PRSV-W-3 e de, pelo menos, 18 clones sequenciados em ambos os sentidos para as demais estirpes estudadas, com exceção da estirpe severa PRSV-W-PR, cujo sequenciamento obtido não foi satisfatório.

O alinhamento dessas seqüências realizado pelo programa Multalin (INRA), está apresentado na Figura 4. O primeiro nucleotídeo apresentado nessa figura corresponde ao número 9.197 do gene da capa protéica do genoma completo do PRSV, cujo número de acesso no “GenBank” é X67673. O último nucleotídeo da seqüência das diferentes estirpes alinha ao nucleotídeo 10.118 desse mesmo gene. O gene da capa protéica localiza-se entre os nucleotídeos 9.197 e 10.120 do genoma completo do PRSV.

As estirpes fracas premunizantes PRSV-W-1 e PRSV-W-2, quando comparadas com base na seqüência de nucleotídeos, apresentaram 100 % de identidade. Quando essas duas estirpes foram comparadas com a estirpe fraca originária de bolhas de folhas de melancia com mosaico (PRSV-W-3) a identidade foi de 98 %. As três estirpes fracas, entretanto apresentam uma inserção de seis nucleotídeos, entre as posições 200-207, quando comparadas com as estirpes severas de Campinas (PRSV-W-C), de Petrolina (PRSV-W-PE) e a estirpe tipo do PRSV do “GenBank” (Figura 4). A ausência desses seis nucleotídeos também foi observada quando o gene da capa protéica das três estirpes fracas foi alinhado com o mesmo gene de outras estirpes brasileiras e de outras regiões geográficas (dados não apresentados). A inserção de seis nucleotídeos no gene da capa protéica das estirpes fracas resultou na adição de dois amino ácidos (Asn e Asp) nas posições 67 e 68 da seqüência de amino ácidos deduzida da proteína (Figura 5). As seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidas da capa protéica das estirpes severas e fracas estudadas foram comparadas entre si e as porcentagens de identidade estão mostradas na Tabela 1.

As porcentagens de identidade das seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos do gene do capsídio do PRSV de alguns isolados depositadas no “GenBank” e que foram comparadas com as estirpes desse estudo, pelo programa Blast, estão listadas na Tabela 2. Essa tabela mostra porcentagens de identidade para a seqüência de nucleotídeos variando de 91 a 98% com as estirpes estudadas e de 93 a 97 % para a seqüência de amino ácidos deduzida.

Figura 4 - Alinhamento realizado pelo programa Multalin do INRA das seqüências de nucleotídeos do gene da capa protéica da estirpe tipo do PRSV/CP (X 67673) com a das estirpes severas PRSV-W-C e PRSV-W-PE e fracas PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3.

Figura 5 - Alinhamento das seqüências de amino ácidos deduzidos da capa protéica das estirpes PRSV-W-PE, PRSV-W-1, PRSV-W-2, PRSV-W-3 e PRSV-W-C realizado pelo programa Multalin do INRA



Tabela 1. Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (acima da diagonal) e de amino ácidos deduzidos (abaixo da diagonal) da capa protéica das estirpes fracas (PRSV-W-1, PRSV-W-2, PRSV-W-3) e severas (PRSV-W-C e PRSV-W-PE) do *Papaya ringspot virus*- estirpe W.

Estirpes	PRSV-W-1	PRSV-W-2	PRSV-W-3	PRSV-W-C	PRSV-W-PE
PRSV-W-1	-	100	98	95	95
PRSV-W-2	100	-	98	95	95
PRSV-W-3	99	99	-	93	96
PRSV-W-C	94	94	93	-	95
PRSV-W-PE	96	96	95	96	-

Tabela 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos da capa protéica de isolados do *Papaya ringspot virus*, estirpes P e W, de diferentes regiões geográficas, com aquelas das estirpes fracas (PRSV-W-1, PRSV-W-2, PRSV-W-3) e severas (PRSV-W-C e PRSV-W-PE).

ORIGEM DO ISOLADO	ESTIRPE	NUMERO DE ACESSO AO "GENBANK"	IDENTIDADE (%) NUCLEOTÍDEO/AMINO ÁCIDO				
			PRSV-W-1	PRSV-W-2	PRSV-W-3	PRSV-W-C	PRSV-W-PE
Genoma							
Completo	P	X 67673	93/94	93/94	92/93	94/95	94/96
Havaí-HA5-1	P	D 00595	93/94	93/94	92/93	94/95	94/96
Havaí-HA	P	S 46722	93/94	93/94	92/93	94/95	94/96
Austrália	P	U 14744	94/95	94/95	93/94	95/96	95/97
México	P	AF 319506	92/94	92/94	91/93	93/95	93/96
Brasil –DF	P	AF 344650	94/94	94/94	93/93	96/96	95/96
Brasil –SP	P	AF 344642	95/95	95/95	94/94	97/97	95/97
Austrália	W	S 89893	94/94	94/94	93/93	94/95	95/96
Brasil -DF	W	AF 344649	94/95	94/95	95/94	95/94	98/97
Brasil -CE	W	AF 344648	95/95	95/95	94/94	95/95	96/95

## 5 DISCUSSÃO

A alta incidência, predominância e redução de produção ocasionadas pela estirpe “W” do *Papaya ringspot virus* em cucurbitáceas, aliadas a dificuldade de controle dessa virose por resistência genética, práticas culturais e controle químico dos vetores, fazem da premunização uma alternativa viável, de baixo custo e de resultados satisfatórios para o controle dessa doença no cultivo de algumas espécies dessa família.

A seleção das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 ocorreu há dez anos e durante todo esse período elas têm se mostrado relativamente estáveis em condições de campo e vêm sendo aplicadas em pequena escala na premunização de cultivos comerciais de aboboreiras e de aboborinha-de-moita. A tentativa de premunizar plantas de melancia com essas estirpes, porém resultou em danos na produção além do desejável (Dias & Rezende, 2001). Esses autores sugeriram que essa redução mais acentuada na produção das plantas de melancia premunizadas poderia estar, entre outras causas, associada à origem das estirpes fracas, que foram selecionadas a partir de bolhas causadas em folhas de aboborinha-de-moita por um isolado do vírus obtido em Campinas-SP (Rezende et al., 1994). No intuito de melhor avaliar essa hipótese, foi selecionada uma terceira estirpe fraca, denominada PRSV-W-3, a partir de bolhas de folhas de melancia infectadas com um isolado do vírus de Tupã-SP. Essa estirpe tem se mostrado tão eficiente quanto aquelas citadas acima em testes de proteção em casa de vegetação, e, até o presente momento tem se mantido estável.

Apesar do conhecimento sobre as características biológicas dessas estirpes fracas e do efeito protetor em plantas de diferentes espécies de cucurbitáceas, não havia conhecimento sobre características moleculares que pudessem, eventualmente, adicionar mais um parâmetro para diferenciá-las das estirpes severas.

Análise comparativa da mobilidade eletroforética da proteína do capsídeo das estirpes fracas (PRSV-W-1 e PRSV-W-2) e severas (PRSV-W-C, PRSV-W-PR e PRSV-W-PE) do PRSV-W não indicaram diferenças significativas no peso molecular na proteína do capsídeo, que permitissem distingui-las através da mobilidade eletroforética em SDS-PAGE. Esse resultado é semelhante ao obtido por Hurtt (1987), que não constatou diferenças na mobilidade da proteína do capsídeo de isolados do HCRSV obtidos de diferentes hospedeiros, porém diferem daqueles obtidos por Manoussopoulos et al. (2000) e Li et al. (1999) para as estirpes do PPV e do DsMV, respectivamente. Nesses dois casos, os autores constataram diferenças significativas na mobilidade eletroforética da proteína do capsídeo das estirpes estudadas. Entre os fatores que afetam a mobilidade de uma proteína encontra-se o seu peso molecular, que está diretamente relacionado com o número de amino ácidos na molécula. No presente estudo, apesar de as estirpes fracas possuírem dois amino ácidos a mais do que as estirpes severas, essa diferença não parece ter sido suficiente para permitir distingui-las através da mobilidade em gel de SDS-PAGE, com posterior marcação em teste serológico de "Western blot". Essa sugestão tem suporte no fato de que Wisler et al. (1995) foram capazes de diferenciar as estirpes MD e SV do ZYMV com base na mobilidade da proteína P1, após constatarem que a P1 da estirpe MD possuía seis amino ácidos a mais do que a da estirpe SV.

A seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica das estirpes fracas do PRSV-W trouxe informações relevantes sobre parte do genoma dessas estirpes. Primeiramente, constatou-se 100 % de identidade entre as

estirpes PRSV-W-1 e PRSV-W-2. Embora essas estirpes tenham sido obtidas de diferentes bolhas retiradas de folhas de aboborinha-de-moita infectadas com a estirpe severa de Campinas (PRSV-W-C) (Rezende et al., 1994), elas mostraram-se idênticas com base no gene da capa protéica. Quando essas estirpes fracas foram comparadas com a estirpe fraca PRSV-W-3, selecionada de bolha de folhas de melancia infectadas com uma estirpe do vírus de Tupã-SP, a identidade do gene da capa protéica foi de 98%. Essa diferença, embora pequena, pode estar, provavelmente, relacionada à origem das estirpes severas parentais das estirpes PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3.

Um segundo aspecto relevante é que, apesar das diferenças de origem, as estirpes fracas PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3 apresentaram a mesma inserção de seis nucleotídeos entre as posições 200 e 207 do gene da capa protéica (Figura 4). Esses seis nucleotídeos estão ausentes não só nas estirpes severas PRSV-W-C e PRSV-W-PE, como também em outras estirpes brasileiras e de outros países listadas na Tabela 2. Essa inserção, conforme mencionado anteriormente, resultou na adição dos amino ácidos Asn e Asp nas posições 67 e 68 da proteína do capsídio (Figura 5). Essa inserção está localizada na região mais conservada da proteína da capa protéica (Bos, 1992).

A inserção de seis nucleotídeos no gene da capa protéica das três estirpes fracas não permite afirmar que esta diferença é responsável pela modulação dos sintomas em espécies de cucurbitáceas. Isto porque, além de o gene da capa protéica representar apenas um décimo do genoma do PRSV-W, a identificação do gene que modula sintomas só é possível através de avaliações com mutantes obtidos a partir de clones infecciosos (cDNA) do vírus. Resultado semelhante ao desse estudo foi obtido por Yeh e Gonsalves (1984) quando compararam a estirpe fraca (HA5-1) e severa (HA) do PRSV-P, e constataram que a primeira apresentou inserção de dois e dez nucleotídeos nos genes da capa protéica e da proteína Nib, respectivamente. Esses autores

também afirmaram não possuírem dados suficientes para associarem essas alterações com a atenuação dos sintomas.

Conforme apontado anteriormente, a identificação do gene responsável pelos sintomas fracos causados pelas estirpes PRSV-W-1, PRSV-W-2 e PRSV-W-3 só é possível após estudos comparativos de mutantes produzidos a partir de clone infeccioso (cDNA) da estirpe severa do vírus. Mesmo assim, o gene responsável pela atenuação dos sintomas do PRSV-W pode ser diferente daquele que codifica a proteína da capa protéica do vírus, conforme constaram Atreya et al. (1992) e Gal-On (2000) para o gene que codifica a proteína HC-PRO dos potyvirus TVMV e ZYMV, respectivamente. Apesar de em ambos os vírus a atenuação dos sintomas ter sido associada ao gene HC-PRO, as diferenças entre as estirpes fracas e severas não estavam localizadas na mesma posição do referido gene. Wisler et al. (1995), por outro lado, verificaram que uma estirpe fraca do ZYMV apresentou dezoito nucleotídeos a mais do que a estirpe severa no gene que codifica a proteína P1, porém não realizaram testes adicionais para verificarem se essa alteração no gene P1 poderia estar relacionada com a atenuação dos sintomas.

Diante desses fatos, seria interessante avaliar se essa diferença no gene da capa protéica das estirpes fracas e severas do PRSV-W pode ou não estar associada com os sintomas causados em cucurbitáceas. Esse conhecimento, caso verdadeiro, poderia eventualmente auxiliar na solução do problema de premunização do mosaico de mamoeiro causado pelo PRSV-P. Conforme relataram Rezende & Costa (1987), a premunização de mamoeiro não foi possível devido à instabilidade das estirpes fracas selecionadas naquela ocasião. Caso seja comprovada que a inserção de seis nucleotídeos no gene da capa protéica das estirpes fracas do PRSV-W é responsável pela atenuação de sintomas e, sabendo-se que essas estirpes têm se mantido relativamente estáveis há vários anos, é possível supor que a inserção dessa modificação no

gene da capa protéica do PRSV-P poderia originar uma estirpe fraca estável para fins de premunização de mamoeiros.

Essa diferença de seis nucleotídeos entre as estirpes fracas e severas do PRSV-W também pode ser utilizada para a confecção de primers que permitam detectá-las separadamente em RT-PCR. Esses primers já foram confeccionados e, caso confirmem essa hipótese de trabalho, poderão ser úteis para o monitoramento das estirpes fracas e estudos de mecanismos de proteção entre estirpes do PRSV-W em cucurbitáceas.

## **6 CONCLUSÕES**

1. O perfil eletroforético da proteína do capsídio analisada em “Western blot” não é capaz de distinguir as estirpes fracas das estirpes severas do PRSV-W.
2. A sequência do gene da capa protéica evidencia uma inserção de 6 nucleotídeos, entre as posições 200-207 do gene da capa protéica das estirpes fracas, quando comparadas com as severas. Essa inserção adiciona dois amino ácidos (Asn e Asp) à seqüência de amino ácidos deduzida da proteína.
3. As estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 apresentam 100 % de homologia no gene da capa protéica Quando comparadas com a estirpe fraca PRSV-W-3, a homologia é de 98 %.
4. O gene da capa protéica das estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 apresenta 95 % de homologia com o das estirpes severas PRSV-W-C e PRSV-W-PE.
5. O gene da capa protéica da estirpe fraca PRSV-W-3 apresenta 93 e 95 % de homologia com o das estirpes severas PRSV-W-C e PRSV-W-PE, respectivamente.



**ANEXO**

## A1 – Composição de tampões, meios e soluções utilizadas

Composição dos tampões para o preparo de células competentes

RF1 (para 250 mL)		RF2 (para 250 mL)	
K Ac 30 mM	7,5 mL solução 1M pH 7,5	MOPS 10 mM	5 mL solução 0,5 M pH 6,8
RbCl 100 mM	3 g	RbCl 100 mM	3 g
MnCl 50 mM	2,5 g	CaCl <sub>2</sub> 75 mM	2,75 g
CaC <sub>12</sub> 10 mM	0,38 g	Glicerol 15 % (p/v)	37,5 g
Glicerol 15 % (p/v)	37,5 g		
Ajustar o pH para 5,8 com ácido acético 0,2 M		Ajustar o pH para 6,8 com NaOH 2,0 M	

Filtrar em millipore 0,2 µm

Composição dos meios utilizados para o preparo de células competentes e transformação

SOB (100 mL)	SOC (100 mL)	LB (200 mL)	TB (200 mL)
2,0 g triptona	2,0 g triptona	2,0 g triptona	2,4 g triptona
0,5 g de extrato de levedura	0,5 g de extrato de levedura	1,0 g de extrato de levedura	4,8 g de extrato de levedura
0,05 g de NaCl	0,05 g de NaCl	2,0 g de NaCl	800 µL de glicerol
1,0 mL de KCl 250 mM	0,5 mL de MgCl <sub>2</sub> 2M	3,5 g de bacto ágar	
pH 7,0	2,0 mL de glicose 1 M	pH 7,0	

Composição das soluções utilizadas para a extração de DNA plasmidial

Solução I (pH 8,0)	Solução II	Solução III (100 mL)	Clorofórmio Saturado
50 mM de glicose	75 mL de água estéril	24,6 g de acetato de sódio	0,3 M acetato de sódio ou de potássio
10 mM de EDTA	20 mL de NaOH 1 N	pH 4,8 com ácido acético glacial	10 mM de Tris pH 7,0
25 mM de Tris	5 mL de SDS 20%		Mesmo volume de clorofórmio

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.C.; IKEDA, H.; COSTA, A.S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia (*Citrullus vulgaris* Schwad.) em plantações de melão (*Cucumis melo* L.) na região de Belém- PA. **Revista de Olericultura**, v.12, p.94, 1972.
- ATREYA, C.D.; ATREYA, P.L.; THORNBURY, D.W.; PIRONE, T.P. Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. **Virology**, v.191, p.106-111, 1992.
- ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.90, p.11919-11923, 1993.
- BATESON, M.; DALE, J. The nucleotide sequence of the coat protein gene and 3' untranslated region of papaya ringspot virus type W (Aust). **Archives of Virology**, v.123, p.101-109, 1992.
- BATESON, M.F.; HENDERSON, J.; CHALEEPROM, W.; GIBBS, A.J.; DALE, J.L. Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia). **Journal of General Virology**, v.75, p.3547-3553, 1994.
- BERGER, P.H.; SHIEL, P.J. Potyvirus isolation and RNA extraction. In: FOSTER, G.D. ; TAYLOR, S.C. **Plant virology protocols**. Totowa: Humana Press, 1998. cap.14, p.151-160.

- BOS, L. Potyviruses, chaos or order ? **Archives of Virology**, p.31-46, 1992. Supplement, 5.
- CHIANG, C-H.; YEH, S-D. Infectivity assays of in vitro and in vivo transcripts of papaya ringspot potyvirus. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, p.153-163, 1997.
- CONCI, V.L. Técnicas serológicas. In: DOCAMPO, D.M.; LENARDÓN, S.L. (Ed.) **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE; INTA; JICA, 1999. cap.2, p.23-39.
- DAHAL, G.; LECOQ H., ALBRECHTSEN, S.E. Occurrence of papaya ringspot potyvirus and cucurbit viruses in Nepal. **Annals of Applied Biology**, v.130, n.3, p.491-502, 1997.
- DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Problemas na premunização de melancia para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.3, p.651-654, 2001.
- DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida 'Tetsukabuto' para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus – type W*. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n.4, p.390-398, 2000.
- GAL-ON, A. A point mutation in the FRNK motif of the Potyvirus Helper Component-Protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. **Virology**, v.90, n.5, p.467-473, 2000.
- GREBER, R.S. Watermelon mosaic virus 1 and 2 in Queensland cucurbit crops. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.1235-1245, 1978.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEON, D. **Laboratory protocols**: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 2.ed. Mexico. CIMMYT, 1994. 51p.

- HURTT, S.S. Detection and comparison of eletrophorotypes of Hibiscus chlorotic ringspot Virus. **Phytopathology**, v.77, n.6, p.845-850, 1987.
- JAIN, R.K.; PAPPU, H.R.; PAPPU, S.S.; VARMA, A.; RAM, R.D. Molecular characterization of papaya ringspot potyvirus isolates from India. **Annals of Applied Biology**, v.132, p.413-425, 1998.
- JAWDAH, Y.A.; SOBH, H.; ZAMMAR, S.E; FAYYAD, A.; LECOQ, H. Incidence and management of virus diseases of cucurbits in Lebanon. **Crop Protection**, v.19, n.4, p.217-224, 2000.
- KLEIN, P.G.; KLEIN, R.R.; RODRIGUEZ-CEREZO, E.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. **Virology**, v.204, p.759-769, 1994.
- KUABARA, M.Y.; SALCEDO, M.J.G.; COSTA, C.P. Fontes de resistência ao vírus do mosaico da melancia – 1 (WMV-1) em abóbora. **Horticultura Brasileira**, v.5, n.2, p.20-22, 1987.
- LI, R.H.; ZETTLER, F.W.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D.E.; MORALES, F.J. Differentiation of Dasheen mosaic potyvirus isolates based on variability in the apparent size of the capsid protein in Western blots. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.359-364, 1999.
- LIMA, J.A.A; FERNANDES, E.R.; MENDES, M.L. Identificação sorológica de “Watermelon mosaic virus 1” em cucurbitáceas cultivadas e nativas do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, p.414, 1980.
- LIMA, J.A.A.; VIEIRA, A.C. Distribuição do vírus do mosaico da abóbora em municípios cearenses e gama de hospedeiros de um isolado. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.1, p.112-114, 1992.
- LOVISOLO, O. Virus and viriod diseases of cucurbits. **Acta Horticulturae**, n.88, p.33-71, 1980.

- MANOUSSOPOULOS, I.N.; MAISS, E.; TSAGRIS, M. Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. **Journal of General Virology**, v.81, p.2295-2298, 2000.
- MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, v.15, p.233-247, 1987.
- PAVAN, M.A.; CARVALHO, M.G; FERNANDES, J.J. Distribuição do vírus do mosaico da melancia ("*Papaya ringspot virus – W*"), nas principais regiões produtoras de pepino (*Cucumis sativus*) e abobrinha (*Cucurbita pepo*) de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.84-85, 1989.
- PINESE, B.; LISLE, A.T.; RAMSEY, M.D.; HALFPAPP, K.H.; DEFAVERI, S. Control of aphid-borne papaya ringspot potyvirus in zucchini marrow (*Cucurbita pepo*) with reflective mulches and mineral-oil insecticide sprays. **International Journal of Pest Management**, v.40, n.1, p.81-87, 1994.
- PURCIFULL, D.E.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. Papaya ringspot virus. CMI/AAB. **Description of Plant Viruses**, n.292, 8p, 1984.
- PROVVIDENTI, R.; ROBINSON, R.W.; MUNGER, H.M. Resistance in feral species to six viruses infecting *Cucurbita*. **Plant Disease Reporter**, v.62, p.326-329, 1978.
- REZENDE, J.A.M. Premunização de duas espécies e um híbrido de *Cucurbita* para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico – estirpe melancia. Piracicaba, 1996. 88p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S. Intensificação dos sintomas dificulta o controle do mosaico do mamoeiro por premunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.101-110, 1987.

- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Estabilidade de isolados fracos premunizantes do vírus do mosaico – estirpe melancia. **Fitopatologia Brasileira**: 22: 64-68. 1997.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of *Papaya ringspot virus* type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, v. 82, p. 171-175, 1998.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A.; IEMMA, A.F. Efeitos da premunização da abóbora ‘Menina Brasileira’ com estirpes fracos do vírus-do-mosaico-do-mamoeiro – Estirpe Melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.8, p.1481-1489, 1999.
- REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.F.; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.55-61, 1994.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRISCH, E.F. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 3v.
- SOUZA JÚNIOR, M.T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. Ithaca, 1999. 277p. Dissertation (PhD) Cornell University.
- STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P., BURIOLLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34, São Pedro, 2001. **Resumos**. São Pedro: Fitopatologia Brasileira, v.26, 2001. p.532.

- SUMMERS, C.G.; STAPLETON, J.J.; NEWTON, A.S.; DUNCAN, R.A.; HART, D. Comparison of sprayable and film mulches in delaying the onset of aphid-transmitted virus diseases in zucchini squash. **Plant Disease**, v.79, n.11, p.1126-1131, 1995.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FARCQUET, C.M.; BISHOP, D.H.C; CARTENS, E.B; ESTER, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MC GEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Ed.) **Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus**. San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.
- YEH, S-D.; GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. **Phytopathology**, v.74, p.1086-1091, 1984.
- YEH, S-D.; GONSALVES, D.; WANG, H-L.; NAMBA, R.; CHIU, R-J. Control of Papaya ringspot virus by cross protection. **Plant Disease**, v.72, n.5, p.375-380, 1988.
- YEH, S-D; JAN, F-J; CHIANG, C-H, DOONG, T-J; CHEN, M-C; CHUNG, P-H, BAU, H-J. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. **Journal of General Virology**, v.73, p.2531-2541, 1992.
- YUKI, V.A. Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita. Piracicaba, 1990. 84p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- YUKI, V.A.; COSTA, A.S.; NAGAI, V. Avaliação de perdas induzidas pelo mosaico da abobrinha de moita, causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro –estirpe melancia (VMM- Me). **Summa Phytopathologica**, v.17, p.40, 1991.



- YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 84, n.5, p.516-520, 2000.
- WANG, C-H.; YEH, S-D. Nucleotide sequence comparison of the 3' terminal regions of severe, mild and non papaya infecting strains of papaya ringspot virus. **Archives of Virology**, v.127, p.345-354, 1992.
- WISLER, G.C.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Characterization of the P1 protein and coding region of the *Zucchini yellow mosaic virus*. **Journal of General Virology**, v.76, p.37-45, 1995.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIN, E.M. A família Potyviridae: parte 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66, 1999.