



JOSÉ ROMÁRIO FERNANDES DE MELO

**PATOSSISTEMA *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
(CABMV)/MARACUJAZEIRO-AMARELO:
INFECTIVIDADE E INVASÃO SISTÊMICA DE
ISOLADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

LAVRAS – MG

2011

JOSÉ ROMÁRIO FERNANDES DE MELO

**PATOSSISTEMA *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
(CABMV)/MARACUJAZEIRO-AMARELO: INFECTIVIDADE E
INVASÃO SISTÊMICA DE ISOLADOS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dr^a. Antonia dos Reis Figueira

**LAVRAS - MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Melo, José Romário Fernandes de.

Patossistema *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
(CABMV)/maracujazeiro-amarelo : infectividade e invasão
sistêmica de isolados e caracterização molecular / José Romário
Fernandes de Melo. – Lavras : UFLA, 2010.

105p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. 2. Virose. 3.
Destacamento foliar. 4. Endurecimento dos frutos. 5. Filogeografia.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –634.42598

JOSÉ ROMÁRIO FERNANDES DE MELO

**PATOSSISTEMA *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
(CABMV)/MARACUJAZEIRO-AMARELO: INFECTIVIDADE E
INVASÃO SISTÊMICA DE ISOLADOS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2010.

Dr. Alan Carvalho Andrade

CENARGEN

Dr. Antonio Carlos de Oliveira

UESB

Dr^a. Antonia dos Reis Figueira

Orientadora

LAVRAS – MG

2010

À minha família, por todo o amor e apoio incondicionais,
em especial aos meus pais, Jeová e Eliezita, irmãos, Lucas e Ruth,
à minha avó, Paulina (Gôda), e minha tia Francisca (Chica),
pela confiança e incentivo sem medir esforços.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À professora Antonia, pela orientação e por ter permitido que esse mestrado se realizasse, deixando sempre as portas abertas desde o início. Também por compartilhar parte de sua experiência para a minha formação.

Ao Laboratório de Virologia Molecular e ao Centro de Indexação, pela estrutura disponibilizada, a qual tornou possível a realização deste trabalho. Também pela ótima convivência com todos.

À UFLA e ao Programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade da realização do curso. Bem como à CAPES, pela concessão da Bolsa.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular pela estrutura disponibilizada, principalmente mediante os esforços, apoio, dedicação do Prof. Luciano Paiva. Também a Eula, Fabrício e Magda pela disponibilidade em servir sempre que necessário e pela amizade.

Ao Prof. Antonio Carlos de Oliveira pela orientação, colaboração e amizade sempre disponíveis.

Ao Prof. Alan Carvalho Andrade, pelos conselhos, ensinamentos, parcerias, troca de experiências e serventia.

A todos os professores do Programa de Biotecnologia Vegetal, por compartilhar parte de seus conhecimentos para a formação de novos profissionais.

Ao professores do DFP, especialmente ao prof. Ricardo Magela, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Murilo Zerbini e à Prof. Poliane Alfenas, pelo auxílio, colaboração e disponibilidade em parte do trabalho.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho, sem os quais nenhum trabalho poderia ser conduzido. Especialmente a Ana Maria, Dona Rosane, Eliete, Ruth, Bruno, Elisângela, Luciana e Ruth.

A todos os amigos da Virologia Molecular, João, Nara, Silvia, Priscila, Priscilla, Suellen, Bárbara, Anderson e Douglas (El Matancero), que, além do auxílio profissional e da contribuição neste trabalho, promoveram uma ótima convivência e sempre estiveram presente na amizade extra-profissional.

A todos do Centro de Indexação, pelo apoio, amizade e convivência, especialmente ao 'Carzin', Jaciara, Luciana e Maurício pelo apoio e amizade.

Aos amigos do DFP e da Entomologia, por compartilharem bons momentos ao longo do curso, tanto na UFLA quanto fora dela, especialmente a Robertinho, Flavinha, André, Glauco, Henrique, Ana Beatriz, André e Valquíria.

A todos os amigos e colegas de turma da Biotecnologia Vegetal, em especial a Fabrício, Eula, Kalyinka, Brenda, Fabiana, Felipe, Nádia, Douglas, Gustavo e Daniele.

Em especialíssima oportunidade, agradeço enormemente a Luiz Gustavo, Anderson, Gabriel e Ingrid pela convivência mais do que profissional, conselhos, paciência e colaboração profissional e pessoal, em que muitos momentos foram uma convivência absolutamente familiar.

Aos amigos de república e extra-profissionais, pela convivência em Lavras, especialmente a Moisés, Thiago, Charles, Teko, Henrique, Emmanuel, Leo, Pará, Álvaro, André, Zinho, Julian, Rodrigo, Joyce, Alessandra, Carol, Vanderley, Jessé, Angélica e todos que compartilharam bons momentos.

A toda a minha família pelo eterno apoio e carinho, especialmente à minha tia Marizete, meus primos Ramon, Robson, Léia, Cilma e Pablo.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste ótimo trabalho.

O meu imensurável agradecimento!

"Não sei dirigir de outra maneira que não seja arriscada. Quando tiver de ultrapassar, vou ultrapassar mesmo. Cada piloto tem o seu limite. O meu é um pouco acima do dos outros."

Ayrton Senna

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo estudar dez isolados virais (LNS-1 a LNS-10) oriundos de regiões produtoras de maracujazeiro em Livramento de Nossa Senhora/BA. Quatro desses isolados, escolhidos com base nos sintomas induzidos nas plantas hospedeiras (LNS-2, LNS4, LNS-9 e LNS-10), foram inoculados em plantas jovens de maracujá-‘amarelo’, genótipo ‘A9 x E32’, para avaliação da sua infectividade e velocidade de translocação em plantas que tiveram a folha inoculada destacada, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) do *Cowpea aphid borne vírus* (CABMV). Nesse mesmo experimento foi estudado o progresso da doença e a concentração de vírus nas plantas, submetidas aos diferentes tratamentos de destacamento foliar, por PCR em tempo real. Posteriormente os dez isolados tiveram o fragmento genômico referente ao gene capsidial amplificado e analisado, com um estudo da sua filogeografia. O isolado LNS-9 foi o que apresentou maior incidência e severidade de sintomas, quando as plantas submetidas a destacamento foliar foram avaliadas, aos 8 dias após a inoculação. Isso indicou que esse isolado possui uma maior velocidade de translocação na planta, em relação aos outros três isolados testados, que, apesar de terem apresentado um comportamento semelhante entre si, diferiram das parcelas controle. As concentrações de vírus nessas plantas sem destacamento foliar foram semelhantes quando avaliadas aos 35 e 60 DAI. A maior diferença nas concentrações virais foi observada quando as folhas foram destacadas 72HAI, as concentrações dos isolados LNS9 e LNS-10 foram significativamente maiores nas plantas inoculadas, em relação aos outros dois isolados. Essa técnica de destacamento foliar revelou-se como uma boa alternativa para testar a resistência de materiais obtidos em programas de melhoramento genético. Nos estudos moleculares, alguns isolados apresentaram diferentes porcentagens de identidade entre si e entre as sequências de isolados depositadas no banco de dados, o que levou a um agrupamento diferenciado, quando submetidos à análise filogenética. Na análise filogeográfica, a pequena população de isolados estudada neste trabalho mostrou-se geneticamente distinta, distante de isolados da mesma espécie de vírus que causa endurecimento dos frutos no continente africano, bem como da espécie viral causadora do endurecimento dos frutos na Austrália. Os resultados aqui apresentados ampliam os conhecimentos acerca do CABMV incidente no Brasil e, conseqüentemente, geram suporte para futuros estudos de infectividade, divergência genética e caracterização molecular de outros isolados virais de interesse.

Palavras-chave: Maracujá. Virose. Filogeografia. Destacamento Foliar.

GENERAL ABSTRACT

The aim of this work was to study isolates from different regions where there are several fields of passion fruit in Livramento de Nossa Senhora/BA. Different strains were inoculated on young plants of yellow passion fruit aiming to evaluate the infectivity of these isolates by observing the incidence and severity. The plants were inoculated with viral isolates to identify which of them are most infective, according to inoculated leaf detachment for identification of strains with high infectivity potential. We also analyzed nucleotide sequences of the coat protein in order to identify differences related to phylogeny among the different isolates and also determine the genetic divergence in relation to other isolates that have sequences deposited in GenBank. It was possible to identify isolates with differences in the infection features of plants and induced symptoms. According to molecular studies, some isolates has shown different percentage of identity between themselves and the sequences of isolates deposited in the database, which reflected a different group when submitted to phylogenetic analysis. Under the phylogeographic perspective, the small population of isolates studied in this work showed distant genetically, becoming isolated group from the same type of virus that causes hardening of the fruit on the African continent as well as the viral species causing the hardening of fruits in Australia. The results presented here extend the knowledge of the incident CABMV in Brazil and thus generate support for future studies of infectivity, genetic divergence and molecular characterization of other viral isolates of interest.

Keywords: Passion fruit. Viral Disease. Phylogeography. Leaf Detachment.

SUMÁRIO

| | | |
|---|---|-----------|
| CAPÍTULO 1 Revisão: A virose e o maracujazeiro- 'amarelo'..... | | |
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL..... | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 15 |
| 2.1 | A fruticultura mundial e brasileira..... | 15 |
| 2.2 | O maracujazeiro..... | 17 |
| 2.3 | A cultura do maracujazeiro amarelo..... | 19 |
| 2.4 | Doenças e pragas da cultura do maracujazeiro..... | 21 |
| 2.5 | O gênero <i>Potyvirus</i>..... | 22 |
| 2.6 | Funções da poliproteína viral..... | 23 |
| 2.7 | Movimento viral no interior da planta..... | 27 |
| 2.8 | Virose do Endurecimento dos Frutos..... | 28 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 31 |
| | REFERÊNCIAS..... | 33 |
| CAPÍTULO 2 Reação de plantas de maracujazeiro- 'amarelo' a diferentes isolados virais de Cowpea aphid-borne mosaic vírus..... | | 46 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 48 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 50 |
| 2.1 | Obtenção e manutenção de isolados virais..... | 50 |
| 2.2 | Origem e obtenção do genótipo 'A9 x E32'..... | 50 |
| 2.3 | Caracterização da infectividade dos isolados..... | 51 |
| 2.4 | Avaliação da sintomatologia foliar..... | 52 |
| 2.5 | Estimativa da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)..... | 53 |
| 2.6 | Análise estatística..... | 53 |
| 2.7 | Determinação da concentração viral por PCR quantitativo em tempo real..... | 54 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 3.1 | Avaliação da reação das plantas à infecção viral..... | 55 |
| 3.2 | Estimativa da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)..... | 60 |
| 3.3 | Estimativa da concentração viral por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)..... | 62 |
| | REFERÊNCIAS..... | 67 |
| CAPÍTULO 3 Caracterização molecular, diversidade e inferências filogeográficas de isolados de Cowpea aphid- borne mosaic virus da Bahia..... | | 71 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 73 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 74 |
| 2.1 | Obtenção e manutenção de isolados virais..... | 74 |
| 2.2 | Extração de RNA, PCR, Clonagem e Seqüenciamento..... | 75 |
| 2.3 | Extração de RNA Total..... | 75 |
| 2.4 | Síntese de cDNA (Transcrição Reversa) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 75 |
| 2.5 | Ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo vetor e screening de clones recombinantes..... | 76 |
| 2.6 | Extração de DNA plasmidial e seqüenciamento..... | 77 |
| 2.7 | Análise das sequências..... | 78 |
| 2.8 | Análises Filogeográficas..... | 78 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 81 |
| 3.1 | Análise do gene da capa protéica do isolados virais..... | 81 |
| 3.2 | Inferências filogeográficas sobre a população de isolados CABMV-LNS..... | 91 |
| | REFERENCIAS..... | 101 |

CAPÍTULO 1

Revisão: A virose do endurecimento dos frutos e o maracujazeiro-‘amarelo’

1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2010), em 2008, a produção de frutas frescas no mundo alcançou mais de 26 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia, apresentando, em 2008, uma área plantada de quase 6,5 milhões de Hectares no ano de 2008 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010). Dentre as frutas mais produzidas no Brasil, estão a Laranja, a Banana, a Manga e o Maracujá, que ocupa a 12^a posição no *ranking* de produção de frutas no país. O Nordeste brasileiro é a região que mais produz, sendo a Bahia o Estado de produção mais expressiva, respondendo por mais de 40% da produção nacional (IBGE, 2010).

O maracujazeiro-‘amarelo’ (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* O. Deg.), pertencente ao gênero *passiflora*, família Passifloraceae, é uma das mais importantes culturas frutíferas no Brasil. Este gênero abrange mais de 400 espécies, sendo caracterizado como o maior dos 12 gêneros, amplamente distribuídos nos trópicos (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001). As principais espécies do gênero *passiflora* comercializadas no Brasil são o maracujá-‘amarelo’ e o maracujá-doce (*Passiflora alata Curtis*) (SOUZA; MELETTI, 1997).

Apesar da sua importância, além de não apresentar a produtividade almejada pelos produtores, existem vários problemas que reduzem a capacidade produtiva do maracujazeiro-‘amarelo’, incluindo os de natureza fitossanitária, como pragas e patógenos (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI; BRUCKNER, 2001). Dentre esses patógenos, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e o *Passion fruit woodiness virus* (PWV), que causam o endurecimento dos frutos do maracujazeiro, são considerados os de maior importância econômica.

Os primeiros relatos acerca do endurecimento do fruto em maracujá, feitos no Brasil, foram baseados principalmente em suas propriedades biológicas e de transmissão e consideraram como agente etiológico o PWV (CHAGAS et al., 1981; KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; YAMASHIRO; CHAGAS, 1979). Entretanto, quando a caracterização molecular desse vírus começou a ser feita no país, observou-se que a sua identidade de nucleotídeos foi consideravelmente maior com os isolados de CABMV, o que levou a considerá-lo como um isolado/estirpe viral pertencente a essa espécie (BRAZ et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2004; SANTANA et al., 1999).

A obtenção de fontes de resistência a essas viroses e a incorporação de genes de resistência em seleções comerciais são objetivos basais dos principais programas de melhoramento do maracujazeiro-'amarelo' no Brasil (MELLETTI et al., 2005). No entanto, as estratégias até então desenvolvidas não foram efetivas o suficiente para controlar ou erradicar a doença dos pomares de produção. Estudar e conhecer o patógeno constitui numa boa estratégia inicial na tentativa de entender os mecanismos de ação do patógeno e a sua interação com a planta hospedeira.

Nesse trabalho foram estudados dez isolados virais de CABMV oriundos de campos de produção em Livramento de Nossa Senhora/BA, com o objetivo principal de investigar a interação de quatro deles com dois genótipos de maracujazeiro-'amarelo', obtidos no programa de melhoramento da UESB, e de realizar a caracterização molecular de todos eles visando conhecer a sua variabilidade e identidade com outros isolados já descritos no GenBank, bem como fazer inferências filogeográficas sobre essa população de dez isolados brasileiros de CABMV.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A fruticultura mundial e brasileira

A fruticultura é um segmento de importância *expressiva* na geração de empregos e renda, além de também contribuir para uma alimentação mais saudável e nutritiva para a população mundial. Assim sendo, o contexto sócio-econômico de um país pode ser dependente de aspectos importantes determinados pela fruticultura, como demanda de mão de obra, fonte alternativa para pequenas propriedades rurais, desenvolvimento de agroindústrias de pequeno ou grande porte e possibilidade de aumento nas divisas das exportações com conseqüente contribuição para a diminuição das importações. Em adição, oferece a possibilidade de enriquecimento alimentar com fontes de vitaminas, sais minerais, proteínas e fibras indispensáveis ao organismo (FACHINELLO; NACHTIGAL, 2009).

Considerando-se a produção mundial, o montante de frutas colhidas alcança a média de aproximadamente 340 milhões de toneladas por ano. Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/ONU) mostraram que, nesta década, a produção mundial aumentou 26% em relação à década anterior, levando-se em conta as médias dos triênios 1993/95 e 2003/05. Acompanhando esse aumento, a receita mundial com exportação de frutas apresentou um crescimento de 62% devido à abertura de novos mercados consumidores e maior rapidez na distribuição dos produtos (VITTI; BOTEON, 2008).

O Brasil, em 2005, ocupava o terceiro lugar na produção mundial, respondendo pela produção de 41,2 milhões de toneladas de frutas (OLIVEIRA-JÚNIOR; MANICA, 2006), sendo a China o grande líder do mercado mundial (167 milhões de toneladas). Atualmente, as posições no *ranking* de produção

não foram alteradas, entretanto o Brasil produziu mais de 43 milhões de toneladas de frutas. A área, em hectares, utilizada para toda esta produção ultrapassa os 2,2 milhões de hectares e gera um PIB de 1,5 bilhões de dólares (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA - IBRAF, 2009).

Nem sempre tem havido uma correlação positiva entre produção e exportação no Brasil, pois, apesar de ser ele o maior exportador de algumas espécies frutíferas, ainda existem muitas restrições impostas pelos padrões internacionais de importação, devido à rigidez para a realização das transações. Isso faz com que o Brasil ocupe apenas o 12º lugar entre os países exportadores de frutas, mesmo sendo o terceiro maior produtor mundial. Os Estados Unidos e o Japão, por exemplo, impõem restrições muito rigorosas para importação de frutas oriundas de áreas infestadas com alguns insetos, como a mosca das frutas, o que exige certificação de ‘área livre de doenças e pragas’ por parte do país exportador (FACHINELLO; NACHTIGAL, 2009).

Essas exigências fazem com que poucas sejam as culturas brasileiras que apresentam requisitos para exportação para esses mercados, como é o caso da laranja e da banana. Portanto, apesar da importância do mercado externo para o Brasil, o seu mercado interno é o principal consumidor de sua produção frutícola (LOURENZANI et al., 2008). Abrangendo o mercado interno brasileiro, pode-se destacar a produção de laranja, a qual responde por quase metade do volume (em toneladas) de frutas frescas produzido no país (IBRAF, 2009).

Outra fruta de grande importância no Brasil e no mundo é o maracujá, sendo que os maiores produtores do mundo se encontram na América do Sul, com o Brasil ocupando o primeiro lugar em produção. A espécie mais plantada é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.), que ocupa 97% da área cultivada, sendo os restantes 3% plantados com maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007). Em 2008, o Brasil

foi o líder mundial de produção, superando os números de anos anteriores, tanto em área plantada quanto em toneladas colhidas (IBGE, 2009).

2.2 O maracujazeiro

As espécies de maracujá são pertencentes à família *Passifloraceae*, sendo que o número de gêneros que compõem esta família parece ainda incerto, chegando ao ponto de alguns autores citarem dezoito gêneros (VANDERPLANK, 1991), dezessete gêneros e mesmo doze gêneros (JUNQUEIRA et al., 2005). O maior gênero desta família é o *Passiflora*, que compreende cerca de 350 a 500 espécies americanas (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001).

O maracujazeiro é uma planta tipicamente tropical e originária do continente sul-americano. O Brasil é um dos países de origem desta frutícola, onde ela é considerada como proveniente especificamente de áreas da região da mata atlântica do Centro-Norte brasileiro (MANICA, 1981). Dentre as mais de 350 espécies do gênero *Passiflora*, 120 foram descritas dentro do território brasileiro (BERNACCI; VITTA; BAKKER, 2003). Atualmente, imagina-se que haja de 111 a 150 espécies no Brasil, e a região Centro-Norte abarca a maior distribuição geográfica do gênero *Passiflora* (OLIVEIRA et al., 1994b; SOUZA; MELETTI, 1997).

As espécies maracujazeiro-‘amarelo’, maracujazeiro-‘roxo’ (*Passiflora edulis* Sims), granadilla (*P. ligularis*), maracujazeiro-‘curuba’ (*P. molissima*), maracujazeiro-‘açú’ (*P. quadrangularis*), maracujazeiro-‘de-cobra’ (*P. caerulea*), maracujazeiro-‘laranja’ (*P. 17noculo17ia*) e maracujazeiro-‘doce’ (*P. alata*) destacam-se na produção de frutos comestíveis (SOUZA; MELETTI, 1997). No âmbito comercial, as espécies mais cultivadas no mundo são *Passiflora edulis* Sims. *F. flavicarpa* O. Deg. (maracujazeiro-‘amarelo’ ou –

azedo), *Passiflora edulis* Sims. (maracujazeiro-‘roxo’) e *Passiflora alata* Curtis (maracujazeiro ‘doce’). As estimativas indicam que, dentre toda a produção mundial, 90% sejam de pomares mantidos com maracujá-amarelo e maracujá-roxo, proporções estas devido à grande diversidade edafoclimática a que estas espécies se adaptam, tanto em regiões tropicais quanto em subtropicais (CARVALHO et al., 1999; RUFINI et al., 2002). O maracujá-roxo é uma espécie muito cultivada nos países africanos, no sudeste asiático e na Austrália.

A ampla diversidade encontrada no Brasil proporciona uma grande variedade no potencial das espécies de maracujazeiro, com relação às características interessantes que podem ser incorporadas no maracujazeiro comercial, como: (i) resistência a doenças e pragas, (ii) menor altura do androginóforo, (iii) autocompatibilidade entre espécies de interesse, (iv) florescimento e frutificação durante o inverno (período de entressafra dos maracujás comerciais) (JUNQUEIRA et al., 2005).

Apesar da ampla variabilidade existente, muito pouco ainda é conhecido acerca do potencial agrônomo da maioria das espécies passifloras. Em trabalhos recentemente realizados, foram estudadas espécies como *Passiflora nítida* HBK, *Passiflora cincinnata* MAST e *Passiflora setacea* D.C. quanto ao potencial de reprodução por sementes e estaquia, biologia floral, formação dos frutos, ecologia e adaptação a novos ambientes, com o objetivo de melhor conhecer outras espécies além das comerciais. A principal evidência levantada pelos autores foi a necessidade de intensificação dos trabalhos de pesquisa visando o maior conhecimento das espécies silvestres com relação a produção de frutos, ao potencial ornamental ou, ainda, como material genético útil ao melhoramento genético e porta-enxerto (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

2.3 A cultura do maracujazeiro amarelo

O maracujazeiro-‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.) pertence à família *Passifloraceae* Juss. Ex DC., da ordem *Violales* (CRONQUIST, 1988).

Apesar de ser o mais cultivado no Brasil, a produção de maracujá-amarelo em larga escala é, relativamente, recente no país, tendo adquirido importância econômica a partir dos anos 70 (MELETTI; SANTOS; MIMAMI, 2000). Esta produção no Brasil vem aumentando continuamente desde que a cultura teve sua importância reconhecida, elevando os números de produção nas últimas 3 a 5 décadas (FERREIRA, 2005).

A região Nordeste é a maior produtora dentre todas as regiões do Brasil, responsável por quase 70% do total produzido. Em segundo lugar, está a região Sudeste, com a produção de aproximadamente 138 mil toneladas. O estado brasileiro que mais produz maracujá é a Bahia, disponibilizando mais de 275 mil toneladas desta frutícola em seus 20 mil hectares de pomares, o que representa o montante de 40,2% da produção nacional. A região do centro-sul baiano (quase sempre indicada como região sudoeste) é responsável por quase dois terços do total produzido no estado, totalizando aproximadamente 170 mil toneladas colhidas em 12 mil hectares, o que equivale a 25% da produção brasileira. Na região Sudeste, os estados que mais produzem são Espírito Santo e Minas Gerais, ambos responsáveis por mais de 75% da produção de maracujá do Sudeste brasileiro (IBGE, 2009).

A cadeia brasileira da cultura do maracujá gera diversos tipos de empregos relacionados aos diversos segmentos: mercado de frutas frescas, indústria de sucos, geléias, doces, sorvetes, refrigerantes e licores (AMARO, 1997). O segmento de cosméticos também tem utilizado do potencial do maracujazeiro, possibilitando a comercialização de sabonetes em barra e

líquidos, cremes, xampus, condicionadores, leites, óleos e perfumes (NATURA COSMÉTICOS, 2009).

As propriedades geleificante, espessante e estabilizante das pectinas, um dos principais constituintes da parede celular de dicotiledôneas, tem aplicações na indústria de alimentos de produtos lácteos, geléias, polpa de frutas, produtos cárneos, produtos de panificação, cerveja, entre outros (PINHEIRO, 2007). O maracujazeiro também tem sido foco da indústria farmacêutica e medicinal, principalmente com a indicação de chás e farinha (feita da casca dos frutos) que promove ações na redução do aumento de peso e redução dos níveis de colesterol (FIETZ; SALGADO, 1999).

No entanto, o maior mercado consumidor do maracujá-amarelo encontra-se voltado ao consumo *in natura* de frutos e na indústria de sucos. Quando destinados ao consumo da fruta fresca, os consumidores preferem frutos que apresentam tamanhos maiores, que tenham aparência atraente e sejam doces e menos ácidos (FORTALEZA et al., 2005). Já para a agroindústria, um elevado rendimento de suco, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis totais elevados são requeridos para o sucesso na comercialização (OLIVEIRA et al., 1994a).

Para que tais características sejam preservadas, são necessárias condições de cultivo favoráveis. No Brasil, as condições geográficas e edafoclimáticas são excelentes para o cultivo desta espécie, e isso proporcionou grande evolução na instalação de indústrias de beneficiamento de suco e no aumento da aceitação comercial da fruta fresca para consumo (ABREU, 2006).

Todavia, a ampla expansão da cultura sem a observação dos cuidados devidamente necessários propiciou o aparecimento de vários problemas que reduzem a capacidade produtiva do maracujazeiro-‘amarelo’, dentre os quais os principais são os de natureza fitossanitária, como pragas e patógenos (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI; BRUCKNER, 2001), que podem causar

a redução significativa da produtividade; em alguns casos, até inviabilizando por completo o cultivo da espécie na região afetada (SANTOS-FILHO et al., 2004).

2.4 Doenças e pragas da cultura do maracujazeiro

Mesmo com as variadas possibilidades de empregos comerciais (frutas frescas, sucos, plantas ornamentais, geléias, doces, sorvetes e licores) e a existência de larga variabilidade genética *in situ*, a cultura do maracujazeiro-amarelo é suscetível a vários problemas que são capazes de reduzir a sua capacidade produtiva. Dentre esses problemas, os de natureza fitossanitária, como pragas e patógenos, são os mais expressivos, uma vez que acarretam redução do período de produção de maracujás em campos de produção (JUNQUEIRA et al., 2005; LIBERATO; COSTA, 2001; MELETTI; BRUCKNER, 2001). Apesar de ser considerada uma cultura perene (cultivável por, no mínimo, 3 anos), em algumas regiões produtoras, tem ficado no campo por apenas um ano, devido à alta incidência de pragas e de algumas doenças mais severas (YUKI et al., 2002).

É possível citar mais de uma dezena de pragas e patógenos que infestam o maracujazeiro, como lagartas, percevejos, moscas, ácaros, abelhas, besouros e formigas (FANTON; MARTINS; FORNAZIER, 2005). Além das pragas, as diferentes doenças que chegam a causar perda total da produção e, por vezes, até inviabilizam o cultivo em algumas regiões podem ser causadas por: fungos, bactérias, vírus e nematóides (LIBERATO; COSTA, 2001; SANTOS-FILHO et al., 2004), vírus e fitoplasmas (KITAJIMA; REZENDE, 2001; REZENDE; KITAJIMA, 2003).

As doenças causadas por vírus têm sido consideradas as mais significativas na cultura do maracujazeiro, devido aos elevados danos e prejuízos causados à produção, bem como à dificuldade em definir estratégias de

diagnoses seguras e medidas eficazes de controle (ANDRADE; PIO-RIBEIRO, 2001). O maracujazeiro pode ser afetado por diferentes viroses em todo o mundo, como o ‘endurecimento dos frutos’ causado pelo *Passion fruit woodiness 22nocu* (PWV) e pelo *Cowpea aphid-borne mosaic 22nocu* (CABMV) ‘mosaico do pepino’ *Pepino mosaic 22nocu* (PepMV), mosaico amarelo do maracujá causado pelo *Passion fruit yellow mosaic 22nocu* (PYMV), mosaico do maracujá-roxo causado pelo *Purple granadilla mosaic 22nocu*, enfezamento do maracujá causado pelo *Passiflora vein clearing virus* e pinta verde do maracujá causado pelo *Passion fruit green spot 22nocu* (PFGSV) (KITAJIMA; REZENDE, 2001; REZENDE; KITAJIMA, 2003). Entretanto, apesar de todos esses vírus poderem infectar o maracujazeiro, no Brasil o mais expressivo é o vírus do endurecimento dos frutos causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic 22nocu* (CABMV), uma espécie do gênero *Potyvirus*, que abriga o maior número de vírus de plantas (FAUQUET et al., 2005).

2.5 O gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* pertence à família *Potyviridae*, que é uma das famílias de vírus que infectam plantas, bem como de maior impacto econômico no sistema agrícola (BERGER et al., 2005). O agrupamento nesta família ocorre juntamente a outros cinco gêneros (*Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimivirus* e *Bymovirus*), no entanto o *Potyvirus* abrange 20% do total dos vírus, já com mais de 100 espécies descritas (FAUQUET et al., 2005).

Os vírus que pertencem ao gênero *Potyvirus* possuem seu genoma disposto na forma partículas flexuosas não envelopadas, que variam de 680 a 900 nm de comprimento e de 12 a 15 nm de diâmetro, com simetria em formato helicoidal. O genoma dos potyvirus, em geral, é composto por uma fita simples de RNA, senso positivo, encapsulada por um capsídeo composto por

subunidades protéicas (MLOTSHWA et al., 2002). Com suas cerca de 2.200 cópias e massa molecular em torno de 34 kDa (NASCIMENTO, 2006), esse arranjo proporciona às partículas virais dos vírus desse gênero a característica alongada e flexuosa (ZERBINI-JUNIOR; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). O tamanho da cadeia polinucleotídica do genoma viral pode variar entre 9.500 e 10.000 nucleotídeos. Uma proteína viral (VPg) encontra-se ligada através de ligação do tipo covalente à região 5'-terminal do genoma viral, e este, por sua vez, é poliadenilado na sua terminação 3', formando a cauda Poli-A (BERGER et al., 2005).

Flanqueado por duas regiões terminais que não são codificadas em proteínas (5' UTR e 3' UTR), o RNA viral dispõe-se numa única fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) (BARROS, 2007). Esta ORF dá origem a uma poliproteína com cerca de 350 kDa, que será clivada por atividade enzimática de, pelo menos, três proteinases (P1, HC-Pro e Nia) traduzidas pela própria poliproteína. Após a clivagem, os produtos são oito proteínas, a saber: P1, HC-Pro, P3, CI, 6K2, Nia, Nib e CP (NASCIMENTO, 2006). Atualmente, sabe-se que o genoma dos potyvírus pode produzir cerca de 8 a 10 produtos finais após o processo de autoproteólise (BERGER et al., 2005).

2.6 Funções da poliproteína viral

A função de alguns dos produtos protéicos ainda é parcialmente desconhecida da comunidade científica, como, por exemplo, a função das proteínas P3 e das pequenas proteínas 6K1 e 6K2 que flanqueiam a proteína CI. Dentre algumas das mais importantes funções das proteínas virais dos potyvírus, estão a (i) replicação viral, (ii) movimento célula-a-célula, (iii) movimento de longa distância, (iv) transmissão por afídeos e (v) encapsulamento do genoma viral (PRUSS et al., 1997; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; VERCHOT;

CARRINGTON, 1995). A maioria das proteínas dos potivírus exerce duas ou mais funções (URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001).

A porção 5' UTR do segmento genômico do vírus tem suas funções definidas como região promotora da tradução e da replicação do RNA viral (CARRINGTON; FRED, 1990). Exerce ainda funções como competitividade e adaptação viral (SIMÓN-BUELA; GUO; GARCÍA, 1997) e é o local onde ocorre o início da encapsidação da partícula viral, devido a uma interação que ocorre entre subunidades da capa protéica e a região 5' UTR das moléculas virais recém-sintetizadas (WU; SHAW, 1998).

Duas das três proteinases do genoma viral (P1 e HC-Pro) estão localizadas em série na fita do RNA mensageiro, próximas à região 5' UTR. A proteína P1 é responsável pela clivagem da junção exatamente entre P1 e HC-Pro (VERCHOT; KOONIN; CARRINGTON, 1991). Além disso, tem função relacionada à replicação do genoma viral e pode estar envolvida no acúmulo de partículas e na infectividade do vírus (VERCHOT; CARRINGTON, 1995).

A proteína multifuncional HC-Pro (*Helper Component Protease*) é uma das proteínas com atividade de protease que clivam a poliproteína viral (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1987). Além disso, está relacionada: (i) à transmissão da partícula viral por afídeos (THORNBURY et al., 1985); (ii) (em parte pelo) ao movimento do vírus no interior da planta, tanto o movimento à longa distância (CRONIN et al., 1995) quanto o movimento célula-a-célula (CRONIN et al., 1995; KASSCHAU; CRONIN; CARRINGTON, 1997); (iii) à virulência do patógeno (severidade dos sintomas), (iv) como fator acessório da replicação viral (KASSCHAU; CARRINGTON, 1998), (v) ao acúmulo do vírus na planta, (vi) sinergismo viral (PRUSS et al., 1997); (vii) à transmissão por sementes (JOHANSEN et al., 1996) e, ainda, (viii) é caracterizada como supressora do mecanismo de silenciamento gênico (KASSCHAU;

CARRINGTON, 1998), que é uma forma de defesa dos biosistemas contra vírus.

A proteína P3 é a menos estudada dos potyvírus (NASCIMENTO, 2006). É uma das proteínas que participam do processo de replicação ativando ou regulando-o, o que pode ser evidenciado pela incapacidade de replicação em protoplastos de vírus mutantes com inserção nesta proteína (KLEIN et al., 1994). Como a proteína P3 é detectada em células infectadas tanto isoladamente quanto em conjunto com as proteínas CI (RODRIGUEZ-CEREZO; SHAW, 1991) e Nib (LANGENBERG; ZANG, 1997), e estas duas outras proteínas estão diretamente envolvidas no processo de replicação viral, a sugestão é de que a proteína P3 seja um fator acessório de amplificação do genoma do vírus (URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001).

A proteína formadora de inclusão (CI – *Cylindrical Inclusion*) parece estar envolvida na replicação viral atuando como Helicase e/ou ATPase (LAÍN et al., 1991). Há relatos de que esta proteína também esteja relacionada ao movimento viral célula-a-célula (CARRINGTON; HEINSEN; SHAAD, 1998).

O domínio central hidrofóbico, que faz parte da proteína potyviral 6K2, torna esta proteína capaz de associar-se a membranas, o que demonstra a propriedade de uma possível manutenção do complexo de replicação aportado na membrana plasmática das células infectadas (RESTREPO-HARTWING; CARRINGTON, 1992).

A proteína de inclusão nuclear (Nia), que se agrega no núcleo de células infectadas na forma de inclusões cristalinas, foi determinada como sendo responsável por diversas clivagens ao longo da cadeia poliprotéica viral. Sua característica de protease permite, inclusive, além das várias clivagens na poliproteína, a excisão do seu próprio sítio catalítico, o que a determina como uma proteína autocatalítica (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1987). Outra

função relacionada a esta proteína é o seu potencial de iniciadora da replicação do RNA viral e, por isso, denominada Pro-VPg (SCHAAD et al., 1996).

Já a proteína Nib é caracterizada como a proteína de inclusão nuclear 'b'. Possui um motivo protéico na região 2571-2614 do genoma que é conservada para a RNA polimerase dependente de RNA, tanto em vírus animal quanto em vegetal. Também é sugerido um outro motivo, em 2506-2511, que pode ser um dos responsáveis por uma possível atividade de RNA polimerase dependente de RNA (MLOTSHWA et al., 2002).

A proteína da capa protéica (CP) é outra multifuncional dentre as proteínas potyvírais. Pode estar envolvida no movimento célula-a-célula das partículas virais, na transmissão do vírus por afídeos (em associação com o HC-Pro), movimento de longa distância do vírus na planta e amplificação do genoma (ANDREJEVA et al., 1999; SIVAKUMARAN; SUN; KAO, 2001). Funções como encapsidação do genoma (ALLISON; JOHSTON; DOUGHERTY, 1986; VARRELMANN; MAISS, 2000) e a determinação da sintomatologia (HALDEMAN-CAHIL; DAROS; CARRINGTON, 1998) são importantes características associadas à proteína do capsídeo.

A última região no terminal 3' do genoma viral é a não traduzível (3'UTR). As funções a que esta região do genoma está associada são determinação de sintomatologia (RODRIGUEZ-CEREZO; SHAW, 1991), fator acessório à replicação (MAHAJAN; DOLJA; CARRINGTON, 1996), e promotor de replicação do RNA viral (HALDEMANN-CAHILL; DAROS; CARRINGTON, 1998).

2.7 Movimento viral no interior da planta

Dentre os mais importantes pré-requisitos para que a infecção viral num hospedeiro vegetal seja estabelecida, está a habilidade do patógeno em infectar a planta e ser transportado, com sucesso, do local de infecção até outras partes da hospedeira (RAO; CHOI, 2001). O ciclo viral dos fitovírus é altamente dependente do aparato molecular do hospedeiro que, com suas interações compatíveis com componentes virais, possibilita a replicação e o movimento do patógeno (LUCAS, 2006; ROBAGLIA; CARANTA, 2006).

Existem duas fases do movimento viral em plantas, o movimento célula-a-célula, ou de curta distância, e o movimento a longas distâncias. O primeiro é caracterizado pela translocação do vírus, após a sua entrada e replicação nas células inicialmente infectadas, de uma célula para a outra através dos plasmodesmas (CARRINGTON et al., 1996). Este movimento entre as células é mediado pela proteína de movimento (MP) na grande maioria dos vírus de plantas, senão em todos. Porém, evidências recentes sugerem que a proteína do capsídeo viral também é requerida, em alguns sistemas virais, para a ativação do processo. Então, o movimento pode ocorrer de duas formas: dependente da capa protéica ou independente da capa protéica (RAO; CHOI, 2001).

Evidências que corroboram essa afirmação foram obtidas por deleções na região amino-terminal da capa protéica e por mutações induzidas na porção central da capa protéica, em *Tobacco etch 27nocu* (TEV), que promoveram uma redução da movimentação do vírus de uma para outra célula (DOLJA et al., 1994, 1995). No entanto, outras proteínas podem também influenciar na movimentação do vírus. Estudos revelaram que mutações na proteína HC-Pro dos potyvirus também determinam uma redução do movimento célula-a-célula (CRONIN et al., 1995; KASSCHAU; CRONIN; CARRINGTON, 1997).

2.8 Virose do Endurecimento dos Frutos

A virose conhecida como endurecimento dos frutos do maracujazeiro é atualmente considerada como a mais importante para essa cultura (MACIEL et al., 2009). Possui diferentes agentes causais, em áreas distintas do globo terrestre. Na Austrália, onde foi inicialmente descrito por McKnight em 1953, o endurecimento dos frutos é causado pelo *Passion fruit woodiness* (PWV) (NOVAES, 2002). A doença também ocorre no sudeste do continente asiático, onde ocasionada pelo *East asian passiflora* (EAPV) (IWAI et al., 2006). No continente africano, são outros dois agentes causais os responsáveis pelo endurecimento dos frutos: *Cowpea aphid-borne mosaic*, estirpe *South passiflora*(CABMV-SAP) (MCKERN et al., 1994; SITHOLE-NIANG et al., 1996) e o *Cowpea aphid-borne mosaic* (CABMV) (LOVISOLO; CONTI, 1966).

Até aproximadamente o ano de 2004, quando o seu genoma viral ainda não era conhecido, acreditava-se que o endurecimento dos frutos no Brasil estava associado ao PWV (REZENDE; KITAJIMA, 2003). Entretanto, evidências moleculares baseadas na análise comparativa da sequência de nucleotídeos, que codifica a proteína da capa protéica e da região 3' não traduzida, realizada com isolados oriundos de diferentes regiões do Brasil, ficou demonstrado que o vírus existente que causa endurecimento dos frutos no Brasil possui maior identidade com o CABMV africano (NASCIMENTO et al., 2004). A partir de então, o agente causal do endurecimento dos frutos no país passou a ser creditado ao CABMV.

Desde a década de 70, quando a doença foi primeiramente detectada no Brasil (CHAGAS et al., 1981), são muitos os relatos de incidência desta virose por várias regiões produtoras do país (CHAGAS et al., 1981; KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; YUKI et al., 2002). A doença permaneceu restrita à região Nordeste até a década de 80, mas, depois, disseminou-se por

todo o território brasileiro onde se produz maracujazeiro, na maioria das vezes, com incidência de 100% nas plantações (REZENDE, 2006).

Com o passar dos anos, a incidência do agente etiológico do endurecimento dos frutos passou a ser detectada nos campos de produção de maracujazeiro dos Estados de Pernambuco (LORETO; VITAL, 1983), Sergipe, Ceará (KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986), São Paulo (CHAGAS et al., 1981), Minas Gerais (SÃO JOSÉ; REZENDE; COSTA, 1994), Distrito Federal (INOUE et al., 1995) e Pará (TRINDADE et al., 1999) e, ainda, mais tarde, Espírito Santo, Paraíba, Alagoas, Goiás e Paraná.

O vírus é facilmente transmitido por inoculação mecânica e por enxertia. Muitas vezes, os próprios tratamentos culturais, como a poda de condução, a desbrota, se não tomados os cuidados necessários, podem também transmitir a virose (COSTA; VENTURA, 2005). Atuando na transmissão de vários vírus de interesse agrônomo, *Aphis gossypii* (Glover) também é transmissor efetivo do CABMV no Brasil, de modo que esta transmissão é realizada de forma não persistente (DIPIERO et al., 2006). Outras espécies de afídeos do mesmo gênero também são relatadas como transmissoras do CABMV (COSTA, 1985).

Muito embora seja fácil e rápida a transmissão natural e mecânica do vírus em maracujazeiro, ainda não há relatos de transmissão através de sementes. Um relato de transmissão por via seminífera de uma estirpe de CABMV ocorrente no continente africano (SANTANA; LAU, 2002) é a única fonte que demonstra esta forma de transmissão, mas ocorre normalmente apenas em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Preto 153 (COSTA, 1985), podendo essa espécie ser utilizada como fonte de inóculo do vírus (NOVAES, 2002).

Plantas infectadas pelo CABMV apresentam diferenciados tipos de mosaico foliar, a depender do grau de severidade do vírus infectante, podendo ser acompanhado por manchas anelares e, em altos níveis de severidade, formação de bolhas e/ou rugosidade nas folhas, frutos com espessamento

(endurecimento) do pericarpo, que ocasiona redução significativa da polpa (KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; KITAJIMA; REZENDE, 2001). Os frutos podem apresentar-se deformados, pequenos e duros, com bolsas de goma no albedo espesso, acarretando comprometimento da produtividade e longevidade das plantas infectadas (CUNHA; BARBOSA; FARIA, 2004). É também característica desse gênero de vírus a formação de inclusões lamelares do tipo cata-vento, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células hospedeiras (GIORIA, 2003; SIVAKUMARAN; SUN; KAO, 2001).

Na região de Alta Paulista, SP, Yuki et al. (2002) demonstraram o potencial deste vírus quando ele infecta mudas de maracujazeiro, acarretando perdas entre 50-80% no caso de infecção precoce. Eles observaram que, além de reduzir fortemente a produtividade, essa virose vem tornando a cultura anual, inviabilizando, por vezes, a manutenção do plantio por mais dois ou três anos (YUKI et al., 2002), o que acarreta grandes perdas financeiras ao passicultor.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os isolados estudados neste trabalho constituem uma pequena população de vírus que causam endurecimento dos frutos no cento-sul baiano. Foi detectada variabilidade entre esses isolados comparados com sequências de isolados depositadas no GenBank e também quando comparados entre si. Com relação à origem geográfica, inferências apontam para uma maior proximidade genética entre isolados brasileiros com espécies de vírus africanas que causam endurecimento dos frutos. Ao contrário, espécies Australianas causadoras de endurecimento dos frutos se apresentam muito distante geneticamente dos isolados aqui estudados.

Variações no potencial de indução de sintomas em plantas de maracujazeiro foram detectadas entre isolados que compõem esta pequena população de vírus obtida na Bahia. Evidências experimentais mostraram variações na sequência do gene da capa protéica e porção 3'-UTR. Entretanto, seria prematuro concluir que essas variações estariam ligadas à capacidade destes isolados analisados infectarem plantas jovens de maracujá-‘amarelo’ ou à indução de sintomas na planta. Para investigar essa possibilidade, seria necessário induzir mutações nas regiões que apresentaram divergência para investigar o seu efeito na interação vírus-planta.

Por outro lado, a estratégia do destacamento foliar em diferentes épocas após a inoculação mecânica de diversos isolados de CABMV, em plantas de maracujazeiro, se revelou uma interessante ferramenta para testar novos genótipos provenientes do Programa de Melhoramento da UESB, visando a detecção de resistência a esse patógeno. Nesse trabalho foi possível detectar isolado com alta capacidade de translocação após a inoculação mecânica e com alta infectividade, que pode ser utilizado para desafiar clones com potencial resistência ao CABMVV. Deste modo, a combinação da técnica de

destacamento foliar à utilização de isolados mais severos parece ser um procedimento confiável para a seleção de genótipos resistentes.

Novos estudos de caracterização molecular do genoma completo dos isolados empregados nesse trabalho precisam ser conduzidos, para melhor embasar as inferências sobre a influência de genes específicos na infectividade viral e na expressão de sintomas pelas plantas hospedeiras.

REFERÊNCIAS

ABREU, S. P. M. **Desempenho agrônômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal**. 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

ALLISON, R.; JOHSTON, R. E.; DOUGHERTY, W. G. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genome RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. **Virology**, Washington, v. 154, n. 1, p. 9-20, Oct. 1986.

AMARO, A. A. Aspectos mercadológicos de frutas industrializadas. **IBRAF Acontece**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 17-29, 1997.

ANDRADE, G. P.; PIO-RIBEIRO, G. Estratégias e métodos aplicados ao controle de fitoviroses. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Org.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFPE, 2001. v. 3, p. 171-181.

ANDREJEVA, J. et al. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus–host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. **Journal of General Virology**, London, v. 80, n. 5, p. 1133-1139, May 1999.

ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CHARCHAR, M. J. A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil Central**. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2001. 17 p. (Documentos, 30).

BARROS, D. R. **Análise comparativa do genoma de dois isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) provenientes de diferentes hospedeiros**. 2007. 67 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

BERGER, P. H. et al. Family *Potyviridae*. In: FAUQUET, C. M. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic, 2005. p. 819-841.

BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A.; BAKKER, Y. V. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. v. 3, p. 247-274.

BRAZ, A. S. K. et al. Molecular characterization of two isolates of South African Passiflora virus infecting passion fruit in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 146, 1998. Abstract.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. **Journal of Virology**, Washington, v. 61, n. 8, p. 2540-2548, Aug. 1987.

CARRINGTON, J. C. et al. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plant. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1669-1681, Oct. 1996.

CARRINGTON, J. C.; FRED, D. D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. **Journal of Virology**, Washington, v. 64, n. 4, p. 1590-1597, Apr. 1990.

CARRINGTON, J. C.; JEINSEN, P. E.; SHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 393-400, May 1998.

CARVALHO, A. J. C. et al. Produtividade e qualidade do maracujazeiro amarelo em respostas à adubação potássica sob lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 333-337, jul./set. 1999.

CHAGAS, C. M. et al. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia, causado por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 259-268, jul. 1981.

COSTA, A. F. Contribuição ao estudo da epidemiologia e controle do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 2, p. 310-315, jun. 1985.

COSTA, H.; VENTURA, J. A. Diagnóstico e manejo das doenças do maracujazeiro. In: COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (Org.). **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória: INCAPER, 2005. p. 123-151.

CRONIN, S. et al. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 5, p. 549-559, May 1995.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Melhoramento genético. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. p. 67-93.

DI PIERO, R. M. et al. Transmissão do passion fruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização do maracujazeiro por vetor. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 139-140, 2006.

DOLJA, V. V. et al. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, Washington, v. 207, n. 2, p. 1007-1016, Feb. 1995.

_____. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 1482-1491, Mar. 1994.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Introdução à fruticultura. In: FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. (Ed.). **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: UFPel, 2009. v. 1, p. 1-3.

FANTON, C. J.; MARTINS, D. S.; FORNAZIER, M. J. Pragas do maracujazeiro. In: COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N. (Org.). **Tecnologias para a produção de maracujá**. Vitória: INCAPER, 2005. p. 103-121.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 1259 p.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, V. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA, 2005. p. 87-90.

FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 45-51, jul./set. 1999.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2007: anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, 2007. 394 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Preliminary 2009 data now available for selected countries and products**. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>.

Acesso em: 18 jul. 2010.

FORTALEZA, J. M. et al. Características físicas e químicas em nove genótipos de maracujá-azedo cultivado sob três níveis de adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 124-127, jan./mar. 2005.

GIORIA, R. **Caracterização sorológica, biologia e molecular de uma estirpe do *Passion fruit woodiness virus* que infecta sistemicamente algumas cucurbitáceas.** 2003. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

HALDEMAN-CAHILL, R.; DAROS, J. A.; CARRINGTON, J. C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 4072-4079, May 1998.

INOUE, A. K. et al. Characterization of passion fruit woodiness virus isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 479-487, maio/jun. 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **Indicadores:** produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 18 nov. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatísticas:** frutas frescas. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 3 ago. 2010.

IWAI, H. et al. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species East Asian *Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 4, p. 811-818, Apr. 2006.

JOHANSEN, I. E. et al. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. **Journal of General Virology**, New York, v. 77, n. 5, p. 3149-3154, Aug. 1996.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, V. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá:** germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: EMBRAPA, 2005. p. 81-108.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, Cambridge, v. 95, n. 4, p. 461-470, Nov. 1998.

KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. **Virology**, Washington, v. 228, n. 2, p. 251-262, Feb. 1997.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. W.; CRESTANI, O. A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 5, p. 409-432, ago./set. 1986.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 277-282.

KLEIN, P. G. et al. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. **Virology**, Washington, v. 204, n. 2, p. 759-769, Nov. 1994.

LAÍN, S. et al. Novel catalytic associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 1-6, Jan. 1991.

LANGENBERG, W. G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 118, n. 3, p. 243-247, Apr. 1997.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H. Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia, produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 243-276.

LORETO, T. J. G.; VITAL, A. **Viroses e micoplasmoses do maracujá em Pernambuco**. Recife: SERDV, 1983. 23 p.

LOURENZANI, W. L. et al. A fruticultura e sua importância para a região Nova Alta Paulista. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: SOBER, 2008. 1 CD-ROM.

LOVISOLO, O.; CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted *Cowpea mosaic virus*. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 72, n. 3/6, p. 265-269, Feb. 1966.

LUCAS, W. J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to cell trafficking of viral genomes. **Virology**, Washington, v. 344, n. 1, p. 169-184, Jan. 2006.

MACIEL, S. C. et al. Screening of *passiflora* species for reaction to cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 414-418, 2009.

MAHAJAN, S.; DOLJA, V. V.; CARRINGTON, J. C. Roles of the sequence encoding *Tobacco etch virus* capsid protein genome amplification: requirements for the translation process and cis-active element. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4370-4379, July 1996.

MANICA, I. **Maracujá**: fruticultura tropical. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 160 p.

MCKERN, N. M. et al. Cowpea aphid-borne mosaic virus Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 136, n. 1/2, p. 207-217, Mar. 1994.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia, produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI, L. M. M. et al. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, V. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA, 2005. p. 55-78.

MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'composto IAC-27'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 491-498, 2000.

MLOTSHWA, S. et al. The genomic sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus and its similarities with other potyviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 5, p. 1043-1052, May 2002.

NASCIMENTO, A. V. S. **Estudo de isolados brasileiros de potyvirus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e análise da resistência à doença em linhagens transgênicas R1 de maracujá-amarelo**. 2006. 73 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

NASCIMENTO, A. V. S. et al. Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 378-383, jan./fev. 2004.

NATURA COSMÉTICOS. **Natura ekos maracujá**. São Paulo, 2009.

Disponível em:

<<http://scf.natura.net/Busca.aspx?X=&LineId=6&SubLineId=67>>. Acesso em: 19 nov. 2009.

NOVAES, Q. S. **Seleção de estirpes fracas do Passion fruit woodness virus e tentativas de premunização para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro.** 2002. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

OLIVEIRA, J. C. et al. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá: produção e mercado.** Vitória da Conquista: UESB, 1994a. p. 27-37.

_____. Avaliação de Passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 12., 1994, Salvador. **Anais...** Salvador: SBF, 1994b. p. 827.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, V. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina: EMBRAPA, 2005. p. 143-156.

OLIVEIRA-JÚNIOR, M. E.; MANICA, I. **Principais países e quantidades de frutas produzidas em 2005.** Disponível em:
<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=14442>
. Acesso em: 20 jan. 2008.

PINHEIRO, E. R. **Pectina da casca de Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*):** otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PRUSS, G. et al. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer of transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 6, p. 859-868, June 1997.

RAO, A. L. N.; CHOI, Y. G. Molecular biology of plant virus movement. In: KHAN, J. A.; DIJKSTRA, J. **Plant viruses as molecular pathogens.** Binghamton: Food Products, 2001. 537 p.

RESTREPO-HARTWING, M. A.; CARRINGTON, J. C. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 5662-5666, Sept. 1992.

REZENDE, J. A. M. Práticas culturais para prevenção e convivência com as viroses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO NO CONTROLE DO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS (PWV) DO MARACUJAZEIRO, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Multipress, 2006. 1 CD-ROM.

REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Viroses e fitoplasmose do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Seropédica: UFRRJ, 2003. p. 178.

ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 40-45, Jan. 2006.

RODRIGUEZ-CEREZO, E.; SHAW, J. G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. **Virology**, Washington, v. 185, n. 2, p. 572-579, Dec. 1991.

RUFINI, J. C. M. et al. Caracterização físico química da sete seleção de maracujá-amarelo para a região de Lavras, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 29., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. p. 599.

SANTANA, E. N. et al. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passion fruit woodiness in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, v. 4, p. 153, 1999. Abstract.

SANTANA, E. N.; LAU, D. Controle dos vírus que causa endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro. In: _____. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 2, p. 827-836.

SANTOS-FILHO, H. P. et al. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 240-280.

SÃO JOSÉ, A. R.; REZENDE, J. A. M.; COSTA, A. F. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Norte do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1994, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. p. 797.

SCHAAD, M. C. et al. Analysis of the VPg-Proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutation of subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 7039-7048, Oct. 1996.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SIMÓN-BUELA, L.; GUO, H. S.; GARCÍA, J. A. Long sequence in the 5' noncoding region of plum pox virus is not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. **Virology**, Washington, v. 233, n. 1, p. 157-162, June 1997.

SITHOLE-NIANG, I. et al. Sequence of the 3'-terminal of a Zimbabwe isolate of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Archives of Virology**, New York, v. 141, n. 5, p. 935-943, May 1996.

SIVAKUMARAN, K.; SUN, J. H.; KAO, C. C. Mechanism of RNA synthesis by viral RNA-dependent RNA polymerase. In: KHAN, J. A.; DIJKSTRA, J. (Ed.). **Plant viruses as molecular pathogens**. New York: Food Products, 2001. p. 147-170.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

THORNBURY, D. W. et al. Purification and characterization of potyvirus helper component. **Virology**, Washington, v. 144, n. 1, p. 260-267, July 1985.

TRINDADE, D. R. et al. Ocorrência do “Passion fruit woodiness virus” (PWV) em maracujazais no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 5, p. 76-79, set./out. 1999.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 157-175, Apr. 2001.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit**. Massachusetts: The Mit, 1991. 176 p.

VARRELMANN, M.; MAISS, E. Mutations in the coat protein gene of *plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. **Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 3, p. 567-576, Mar. 2000.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence of the potyvirus P1 proteinase function in *trans* as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3668-3674, June 1995.

VERCHOT, J.; KOONIN, E. V.; CARRINGTON, J. C. The 35 kDa protein the N-Terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. **Virology**, Washington, v. 190, n. 1, p. 527-535, Sept. 1991.

VITTI, A.; BOTEON, M. Análise da competitividade da fruticultura brasileira frente a mundial. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: SOBER, 2008. 1 CD-ROM.

WU, X.; SHAW, J. G. Evidence that assembly of potyvirus begins near 5' terminus of the viral RNA. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 6, p. 1525-1529, June 1998.

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C. M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SBF, 1979. p. 915-917.

YUKI, V. A. et al. Epidemiologia do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. 1 CD-ROM.

ZERBINI-JÚNIOR, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 145 p.

CAPÍTULO 2

Reação de plantas de maracujazeiro-‘amarelo’ a diferentes isolados virais de *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas a infectividade e a velocidade de translocação de quatro isolados de CABMV, denominados LNS-2, LNS-4, LNS-9 e LNS-10, oriundos de campos de produção de Livramento de Nossa Senhora – Bahia, após inoculação mecânica em plantas de maracujazeiro amarelo do genótipo ‘A9 x E32’. Os experimentos se constituíram de cinco tratamentos com 1 planta cada e 9 repetições, sendo: destacamento da folha inoculada decorridas 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI), controle 1 (não inoculação das plantas) e controle 2 (não destacamento da folha inoculada). A avaliação da incidência e severidade dos sintomas foi feita aos 8, 20, 35 e 60 dias após a inoculação (DAI), sendo que em cada uma das três últimas épocas de avaliação foram coletadas folhas no ápice das plantas infectadas para avaliação da concentração viral por PCR em tempo real. Na primeira avaliação, aos 8 DAI, os maiores níveis de incidência e severidade foram verificados nas plantas inoculadas com o isolado LNS-9. As plantas inoculadas com os demais isolados comportaram-se de modo semelhante entre si e apresentaram índices de incidência e severidade diferentes das plantas controle quando as folhas inoculadas foram destacadas 24 HAI, mas não diferiram estatisticamente destas quando o destacamento foi feito aos 48 e 72 DAI. Nos tecidos coletados aos 20 DAI as concentrações de vírus tenderam a aumentar com o aumento do intervalo entre a inoculação e o destacamento foliar, para todos os isolados e épocas de destacamento, mas concentrações de todos os isolados nas plantas com destacamento foliar 24 HAI e 48 HAI, foram significativamente menores quando comparadas com os outros tratamentos. As plantas inoculadas com o isolado LNS-9 apresentaram concentrações virais maiores enquanto que as infectadas com o LNS-2 foram bem menores, em todas as épocas de destacamento foliar, em relação aos demais isolados. Na segunda e terceira avaliações, aos 35 e 60 DAI, nas plantas que tiveram as folhas destacadas 72 HAI, as concentrações nas inoculadas com os isolados LNS-9 e LNS-10 foram semelhantes entre si, mas significativamente maiores do que as naquelas inoculadas com os isolados LNS-2 e LNS-4, cujos valores permaneceram iguais ou menores do que os obtidos no destacamento de 24 e 48HAI.

Palavras-chave: Maracujá. CABMV. Infectividade. Destacamento Foliar.

ABSTRACT

Passion fruit is one of the most important crops in Brazil. This country is the world's largest producer of passion fruit. The production has been significantly affected by woodiness the fruit caused by *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). The infectivity and rate of translocation of four CABMV isolates were studied and these isolates were identified as LNS-2, LNS-4, LNS-9 and LNS-10. These isolates were collected in production fields of Livramento de Nossa Senhora, State of Bahia, Brazil. Yellow passion fruit seedlings, of genotype 'A9 x E32' were infected with the different isolates by mechanical inoculation. The experiment was assayed with five treatments with one plant each and nine replicates. The treatments follow time of detachment of the leaf inoculated elapsed one, two and three days after inoculation (DAI), a control 1 (non-inoculated plants) and control 2 (no detachment of the inoculated leaf). At 8 DAI, we evaluated the incidence ('I') and ('S') severity of symptoms and confirmation of infection was performed by conventional one-step RT-PCR. The highest levels of incidence and severity were identified in inoculated plants with isolate LNS-9, which did not differ from control 2 plants, even when the sheet was highlighted one day after inoculation ('I': $0,2 \leq p \leq 0,4$; 'S': $0,14 \leq p \leq 0,82$), showing us a high rate of viral translocation from the inoculated leaf. Inoculated plants with other isolates reacted similarly to each other, and showed incidence and severity different from control 2 plants when leaves inoculated were detached one day after inoculation, but these same plants did not differ when the detachment was made at 2 and 3 DAI ('I': $0,12 \leq p \leq 0,50$; 'S': $0,13 \leq p \leq 0,76$). The determination of the infectivity and rate of translocation of these isolates on the plant can be considered as an important tool to test resistant passion fruit genotypes to CABMV. Studies of the sequence of the coat protein gene also showed significant differences among these four isolates.

Keywords: Passion fruit. CABMV. Infectivity. Leaf Detachment.

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* O. Deg.), pertencente ao gênero *Passiflora*, família *Passifloraceae*, é uma das mais importantes culturas frutíferas no Brasil. Este gênero abrange mais de 400 espécies, sendo caracterizado como o maior dos 12 gêneros que constituem a família *Passifloraceae*, amplamente distribuída nos trópicos (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001).

A produtividade média de maracujá no Brasil, cerca de 10 t/ha, ainda é considerada baixa se comparada a alguns relatos em torno de 30 a 50 t/ha (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001; MALAVOLTA, 1994; RUGGIERO, 1987). Isso porque a ampla expansão da cultura, sem a observação dos cuidados necessários, propiciou o aparecimento de vários problemas que reduzem a capacidade produtiva do maracujazeiro-‘amarelo’, incluindo os de natureza fitossanitária, como pragas e patógenos (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI; BRUCKNER, 2001), que podem causar a redução significativa da produtividade, até inviabilizando por completo, em alguns casos, o cultivo da espécie na região afetada (SANTOS-FILHO et al., 2004).

Dentre as doenças que acometem o maracujazeiro-amarelo, a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e/ou *Passion fruit woodiness virus* (PWV), é considerada a de maior importância econômica. Os primeiros relatos do endurecimento do fruto em maracujá, feitos no Brasil, foram baseados principalmente em suas propriedades biológicas e de transmissão e consideraram como agente etiológico o PWV (CHAGAS et al., 1981; KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; YAMASHIRO; CHAGAS, 1979). Entretanto, quando a caracterização molecular desse vírus começou a ser feita no país, observou-se que a sua identidade de nucleotídeos foi consideravelmente maior com os isolados de

CABMV, caracterizando-o como um isolado/estirpe viral pertencente a essa espécie (BRAZ et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2004; SANTANA et al., 1999).

Por ser um vírus transmissível por vetor, o controle do CABMV no campo é difícil e, na maioria das vezes, ineficiente. Assim sendo, uma das alternativas mais desejadas seria o uso de cultivares resistentes, capazes de conviver com a virose no campo com o mínimo de perdas possível. No entanto, tem sido notada uma variabilidade natural na infectividade e agressividade dos isolados, de modo que diferentes isolados virais de CABMV provenientes do maracujazeiro podem apresentar níveis de infectividade distintos que, além de induzir sintomas com diferentes severidades, são capazes de invadir sistemicamente a planta com velocidades distintas. Portanto, a sua distinção e a definição de métodos de inoculação artificial precisos são fundamentais para o êxito na detecção de eventuais fontes naturais de resistência no maracujazeiro ao CABMV.

Considerando-se a necessidade de caracterizar os isolados de CABMV, que têm sido utilizados para testar a resistência de maracujazeiros nos programas de melhoramento da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), este trabalho foi realizado com quatro isolados virais pré-selecionados com base na reação de plantas inoculadas mecanicamente, visando testar e definir uma metodologia de inoculação e avaliação de sintomas em plantas de maracujazeiro-‘amarelo’ genótipo ‘A9 x E32’, bem como determinar a infectividade e velocidade de translocação dos diferentes isolados nessas plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e manutenção de isolados virais

Os 4 isolados virais utilizados foram obtidos em diferentes fazendas no município de Livramento de Nossa Senhora/BA, principal pólo produtor de maracujá-amarelo da região Sudoeste da Bahia. Os isolados foram coletados em plantas infectadas de campos de produção de maracujá-‘amarelo’, de diferentes localidades, apresentando sintomas severos da virose, e transferidos para o Laboratório de Biologia Molecular da UESB, onde foram identificados como LNS-2, LNS4, LNS-9 e LNS-10. Esses isolados foram enviados para o Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da UFLA, onde foram inoculados mecanicamente em plantas de *P. edulis*, sendo as folhas com sintomas dessecadas e estocadas em freezer a -20 °C e a -80 °C, para utilização no decorrer desse trabalho. Periodicamente, foram feitas inoculações mecânicas em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) subsp. *unguiculata* Walp., cv. ‘Pitiúba’, e de *Nicotiana benthamiana* L. para re-multiplicação e manutenção desses isolados.

2.2 Origem e obtenção do genótipo 'A9 x E32'

O genótipo de maracujazeiro denominado 'A9 x E32' é constituído por uma progênie de irmãos-completos, obtidos na UESB por meio de cruzamentos dirigidos, mediante polinização manual entre plantas de maracujazeiro-‘amarelo’, e foram geradas com o objetivo de manter baixa a variabilidade genética entre as repetições, entre tratamentos e dentro do tratamento.

Na geração das progênies, as flores dos genótipos receptores de pólen foram abertas manualmente quando se encontravam em pré-antese, emasculadas

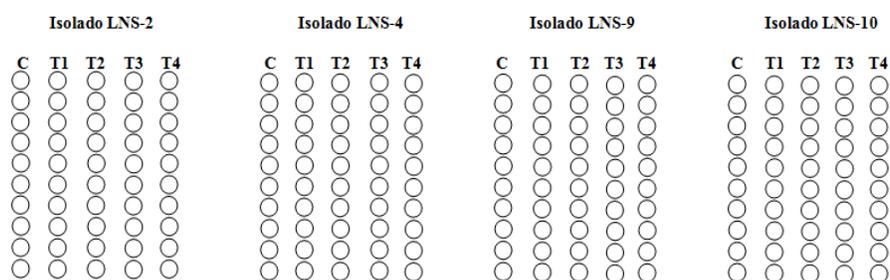
e, posteriormente, isoladas com embalagem de papel vedada com elástico. A polinização foi realizada algumas horas após o isolamento da flor, considerando que, após o período aguardado, encontrar-se-iam no estágio ideal de curvatura dos estigmas, parcialmente curvados ou totalmente curvados, o que sinaliza maior receptividade do estigma para fecundação (BORGES et al., 2003).

Decorridas 48 horas da realização do cruzamento, foram retiradas as embalagens de papel, identificando-se a genealogia das sementes de cada fruto gerado com a colocação de etiquetas de papel vegetal no ramo onde se encontrava o fruto. O fruto foi protegido por embalagem de papel durante alguns dias para um melhor desenvolvimento inicial. Após um período de, aproximadamente, 45 a 60 dias, os frutos foram coletados para retirada das sementes. Estas foram lavadas, secadas e armazenadas a 4 °C, para posterior utilização.

2.3 Caracterização da infectividade dos isolados

A avaliação da infectividade dos isolados foi baseada na incidência e na severidade dos sintomas apresentados pelas plantas de maracujazeiro-‘amarelo’, genótipo 'A9 x E32', inoculadas mecanicamente com o CABMV. Nesse experimento, os quatro isolados virais foram inoculados mecanicamente nas folhas basais das plantas, que foram destacadas em diferentes épocas após a inoculação. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, constituído por quatro blocos, representados pelos diferentes isolados, e 5 tratamentos, sendo: destacamento da folha inoculada em 3 diferentes períodos: 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI), não destacamento da folha (controle 1) e planta não inoculada (controle 2), utilizando-se uma planta com 9 repetições (Figura 1). A inoculação mecânica foi feita com o extrato foliar de plantas de maracujazeiro infectadas, obtido por

maceração dos tecidos em solução tampão fosfato 0,01M pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade. Esse extrato foi friccionado em plantas sadias, previamente polvilhadas com carborundum (carbeto de silício – malha 600 mesh), e em seguida as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa de vegetação até a avaliação final dos sintomas, que foi feita aos 8, 20, 35 e 60 dias após a inoculação (DAI).



Legenda:

- C – Controle 1 (plantas não inoculadas)
- T1 – Não destacamento da folha inoculada (controle 2)
- T2 – Destacamento da folha inoculada 24 hai (grupo-teste)
- T3 – Destacamento da folha inoculada 48 hai (grupo-teste)
- T4 – Destacamento da folha inoculada 72 hai (grupo-teste)

Figura 1 Croqui da montagem do experimento em casa de vegetação

2.4 Avaliação da sintomatologia foliar

Todas as plantas inoculadas foram avaliadas visualmente, em casa de vegetação, aos 8, 20, 35 e 60 DAI, determinando-se a incidência e a severidade de sintomas em todas as folhas das plantas inoculadas, expressa pela percentagem de plantas mostrando sintomas entre as inoculadas. Para avaliação da severidade dos sintomas, foi empregada a Escala de Notas (EN), sendo: [0 = ausência de sintomas; 1 = mosaico leve e sem deformações foliares; 2 = mosaico

severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo com bolhas e 4 = deformações foliares do tipo enrolamento, encarquilhamento, com mosaico severo (NOVAES; REZENDE, 1999). As notas obtidas empregando-se esta escala foram utilizadas para calcular o Índice de Intensidade de Infecção (III), que variou de 0 a 100 (CZERMAINSKI, 1999), conforme descrito por Silva (1969). As médias finais foram obtidas pelo uso de planilha do Microsoft Excel, previamente preparada com as fórmulas e transformações indicadas, gentilmente cedida pela Dra. Ana Beatriz Czermainski.

2.5 Estimativa da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)

Foi estimada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), baseada nas observações periódicas da severidade da sintomatologia foliar da virose. A área abaixo da curva do progresso da doença foi gerada agregando-se numa só média os valores do 'III' de cada avaliação sintomatológica.

2.6 Análise estatística

Todas as análises e testes estatísticos utilizados para processamento dos dados dos ensaios foram feitas com o emprego dos softwares Microsoft EXCEL 2007, Teste Exato de Fisher (TEF) por tabela de contingência 2x2 (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html>), Bioestat v. 5.0 (AYRES et al., 2007). Para verificação da normalidade dos dados, foram realizados o teste de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. A análise de variância foi realizada de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Também foi conduzido teste de separação de médias, quando se julgou necessário, utilizando-se do teste de Skott-Knott.

2.7 Determinação da concentração viral por PCR quantitativo em tempo real

A quantificação da concentração viral das plantas foi realizada mediante utilização do kit Platinum SYBR Green (Invitrogen). O par de primers utilizado foi o qCABMV-F05: 5' TCAAGCCCATCGTGGAGAAT 3' e qCABMV-R05 5' CCCTTCAGAATTTCTCATCTCAATG 3', que geraram um fragmento de 100 pb. Foram seguidas as recomendações do fabricante para todas as etapas do procedimento, desde a síntese da fita de cDNA até a reação final de quantificação em tempo real, que foi realizada no aparelho ABI7500 não-fast (Applied).

O material utilizado para extração do RNA total foi a penúltima folha do ápice de cada planta, sendo esta destacada nas três últimas épocas de avaliação (20 DAI, 35 DAI e 60 DAI). O processamento das folhas foi realizado utilizando 2g de tecido vegetal, seguindo o método TRIzol de extração de RNA.

A eficiência dos primers foi realizada mediante diluição seriada (10^{-n}) do vetor plasmidial recombinante com o gene da capa protéica do vírus inserido por clonagem gênica. A melhor amplitude de amplificação desta mesma diluição seriada foi utilizada para a elaboração da curva padrão e estimar a carga viral após quantificação do número de cópias existente nas amostras. As médias finais utilizadas para a análise estatística resultaram de quatro repetições, com uma planta por tratamento, onde cada unidade amostral teve sua reação de PCR conduzida em triplicata técnica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da reação das plantas à infecção viral

Na primeira avaliação sintomatológica, realizada aos 8 DAI, já foi possível a diferenciação dos níveis de infecção para todos os isolados virais inoculados nas plantas de maracujazeiro-‘amarelo’. Nessa época de avaliação, dentre as plantas inoculadas com os quatro isolados, a incidência e severidade dos sintomas induzidas pelo LNS-9 não foram estatisticamente diferentes das plantas controle, em que as folhas inoculadas não foram destacadas, nas três épocas de destacamento foliar (Tabela 1). Os níveis do *p value* aos 8 DAI, para incidência, variaram de 0,2 a 0,4 entre os tratamentos do LNS-9 (TEF) e os valores de *p* para a severidade dos sintomas variaram entre 0,14 e 0,82. É importante ressaltar que nessa avaliação apenas as plantas inoculadas com esse isolado não diferiram estatisticamente das plantas controle, quando o destacamento foi feito 24 HAI, apresentando sintomas foliares considerados muito severos (nível 3, segundo a escala de notas). Algumas diferenças nos sintomas provocados pelos diferentes isolados nas plantas inoculadas são mostradas na Figura 2.

O mesmo não aconteceu com os demais isolados, que induziram sintomas que diferiram estatisticamente dos observados nas plantas controle, na primeira época de avaliação, com destacamento 24 HAI, tendo o valor de *p* para incidência variado entre 0,001 e 0,02 e o para a severidade entre 0,01 e 0,02.

O comportamento das plantas que foram inoculadas com os 4 isolados, quando avaliadas aos 8 DAI, foi semelhante naquelas inoculadas com os isolados LNS-4 e LNS-10, que apresentaram uma tendência de aumentar a severidade dos sintomas com o aumento do período entre a inoculação e o destacamento foliar. Por outro lado, os sintomas induzidos pelo isolado LNS-9

apresentaram uma severidade média de 4,3 no destacamento 24 HAI, enquanto que no de 48 HAI diminuíram para 1,6 e aumentaram novamente para 2,5 72 HAI. O LNS-2, por sua vez, induziu sintomas com severidade média igual a 0,8, com destacamento 24 HAI, aumentou para 5,2, com 48 HAI e diminuiu novamente para 1,7 com destacamento 72 HAI. Observou-se, portanto, que destacar a folha das plantas inoculadas 24HAI, com os isolados LSN-2, LNS-4 e LNS-10, pareceu comprometer, de alguma forma, a quantidade de partículas virais que foram translocadas a partir da folha inoculada, influenciando na incidência e severidade dos sintomas observados visualmente.

De certa forma, o aumento da incidência e da severidade dos sintomas em plantas que ficaram por mais tempo com as folhas inoculadas já era esperado, pois, após a inoculação viral, o vírus se multiplica nas células onde foram inoculadas e as novas progênes virais se translocam em seguida para as células vizinhas até chegar ao xilema e/ou floema, sendo então rapidamente translocado para outros órgãos e tecidos da planta. O movimento de uma célula para outra célula é mais lento, pois é realizado via plasmodesma, podendo o vírus se translocar na forma de partículas completas, no caso de vírus isométricos como o *Cowpea mosaic virus* (CPMV) e *Tobacco ringspot virus* (TRSV), ou na forma de complexos ribonucleoprotéicos como o *Tobacco mosaic virus* (TMV) (BOEVINK; OPARKA, 2005; LAZAROWITZ; BEACHY, 1999; LUCAS, 2006). Assim sendo, após a inoculação a infecção sistêmica pelo vírus será altamente dependente da sua eficiência em se multiplicar e da translocação da sua progênie para outros tecidos da hospedeira.

Tabela 1 Teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias das notas atribuídas às plantas inoculadas com cada isolado viral e com todos os tratamentos realizados, considerando os valores da severidade dos sintomas aos 8 DAI

| Tratamento | Média | Kruskall-Wallis ¹ |
|------------------------|-------|------------------------------|
| LNS-2 - não destacada | 3,6 | -- |
| LNS-2 - 24 HAI | 0,8 | S |
| LNS-2 - 48 HAI | 5,2 | Ns |
| LNS-2 - 72 HAI | 1,7 | ns |
| LNS-4 - não destacada | 3,0 | -- |
| LNS-4 - 24 HAI | 0 | S |
| LNS-4 - 48 HAI | 1,3 | Ns |
| LNS-4 - 72hai | 2,6 | Ns |
| LNS-9 - não destacada | 6,8 | -- |
| LNS-9 - 24 HAI | 4,3 | Ns |
| LNS-9 - 48 HAI | 1,6 | Ns |
| LNS-9 - 72 HAI | 2,5 | Ns |
| LNS-10 - não destacada | 4,1 | -- |
| LNS-10 - HAI | 0,6 | S |
| LNS-10 - 48 HAI | 1,2 | Ns |
| LNS-10 - 72 HAI | 1,9 | Ns |
| C.V. (%) | 2,61 | |

¹ Resultado da análise estatística comparando-se com o tratamento de folha

O tempo entre a inoculação e a sua translocação pode variar com o vírus, sendo que existem estudos mostrando que a translocação do *Tobacco rattle virus* (TRV) em *Nicotiana clevelandii* é de 4 horas e a do TMV em *N. tabacum* de 5 a 6 horas (DERRICK; BARKER; OVARKA, 1992; FANNIN; SHAW, 1987). Nesse trabalho, após a inoculação mecânica dos quatro isolados, as plantas tiveram as suas folhas destacadas após 24, 48 e 72 horas, o que permitiu que as partículas inoculadas tivessem um período de tempo crescente para se multiplicar e translocar, o que parece ter sido refletido nos resultados obtidos.

Aparentemente, o LNS-9 que induziu sintomas bastante visíveis na primeira época de avaliação, diferentemente dos demais, pode ter uma maior eficiência nos processos de replicação e translocação na hospedeira. Outra possibilidade seria o isolado induzir sintomas mais severos nas plantas, independentemente da concentração das partículas virais, pois nem sempre essa é diretamente proporcional à severidade dos sintomas (RESENDE et al., 2000), dependendo da planta e do patógeno. Como as plantas de maracujazeiro empregadas nesse trabalho eram uma progênie de irmãos completos, a variabilidade nos sintomas provavelmente estava relacionada às diferenças entre os isolados de CABMV.

Aos 20 DAI, a incidência de sintomas nas plantas inoculadas com o isolado LNS-10, apesar de não diferir estatisticamente do controle ($p= 0,12$), foi muito inferior ao apresentado pelos demais tratamentos ($p= 1,0$). Mas, de um modo geral, da segunda época de avaliação em diante, 20, 35 e 60 DAI, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de incidência e severidade dos sintomas das plantas inoculadas e controle, para nenhum dos isolados inoculados, em nenhuma das épocas de destacamento foliar. Isso porque provavelmente os isolados virais tiveram mais tempo para se multiplicar e invadir sistemicamente a planta, resultando numa não diferenciação entre os sintomas.

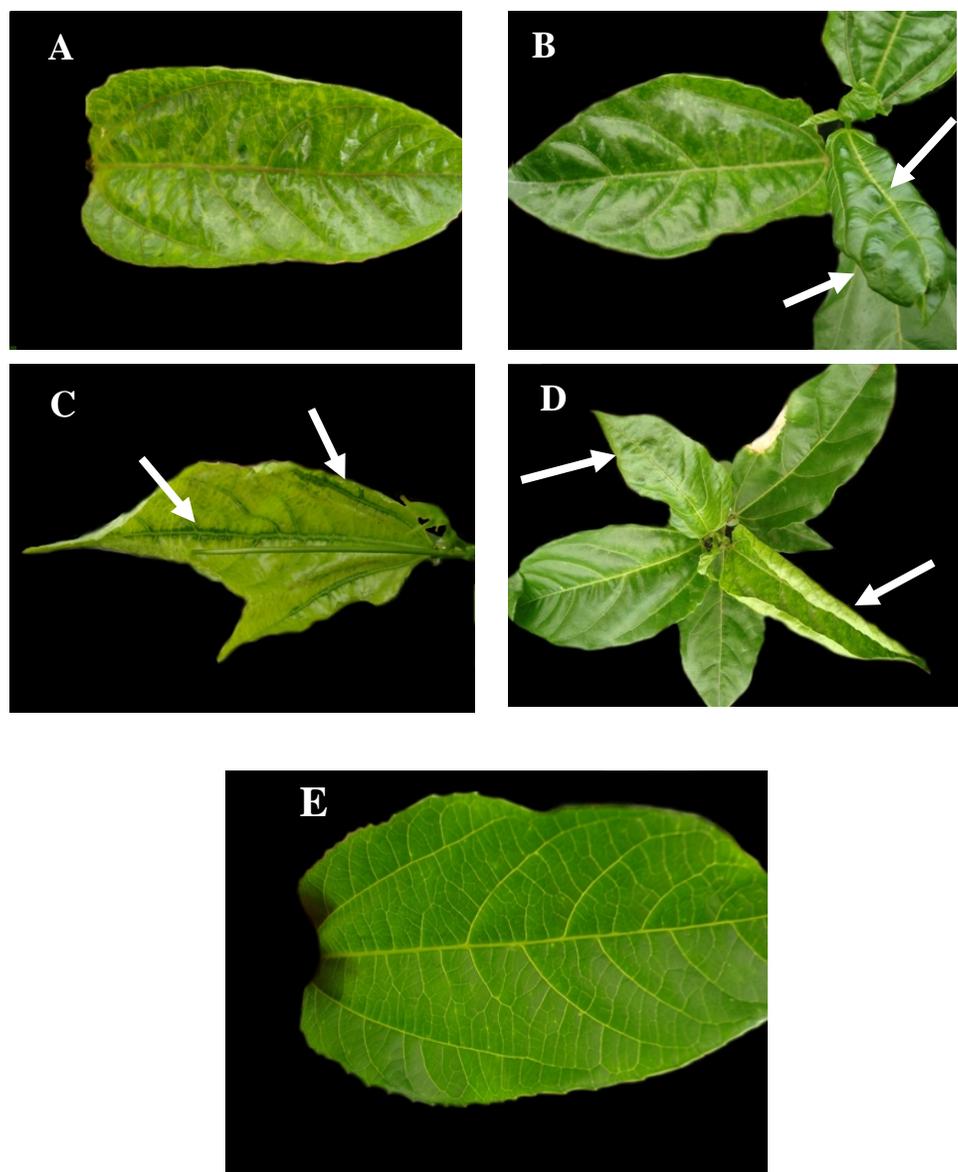


Figura 2 Sintomas foliares expressos pelas plantas inoculadas com os diferentes isolados aos 8 DAI: LNS-2 (A), LNS-4 (B), LNS-9 (C) e LNS-10(D), controle: folha de planta sadia (E). Setas indicam sintomas com maior severidade e/ou deformações

3.2 Estimativa da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD)

Os valores médios do AACPD indicaram que os sintomas induzidos pelos isolados LNS-2, LNS-4 e LNS-10 apresentaram uma tendência de apresentar um aumento significativo na severidade dos sintomas, à medida que o período entre a inoculação e o destacamento da folha aumentou (Tabela 2), conforme já observado nas avaliações anteriores. Por outro lado, a média dos sintomas induzidos pelo isolado LNS-9 diminuiu de 72,5 para 53,1 com destacamento 24HAI e 48 HAI, respectivamente, para de novo aumentar para 193,4, 72 HAI.

Analisando-se a média geral dos sintomas induzidos pelos 4 isolados, nota-se que as maiores médias, que foram apresentadas pelas plantas com destacamento foliar após a inoculação, foi obtida quando este foi feito 72HAI, sendo que o maior valor foi observado nas inoculadas com o LNS-9, seguidas pelo LNS-10 e o LNS-4, e o menor valor (141,8) foi observado nas inoculadas com o LNS-2. Entretanto, o valor da média para as plantas controle, que não tiveram a folha inoculada destacada, foi menor nas plantas inoculadas com o LNS-9 (188,3) enquanto que nas inoculadas com os demais isolados esse valor ficou acima de 210.

Tabela 2 Teste de Kruskal-Wallis para comparação de médias de todos os tratamentos de cada isolado viral segundo os valores de AACPD, relativos às médias obtidas pelo 'III' para a severidade dos sintomas ao longo das quatro épocas de avaliação

| Tratamento | Média | Kruskall-Wallis ¹ |
|------------------------|-------|------------------------------|
| LNS2 - não destacada | 213,2 | -- |
| LNS2 - 24h | 21,5 | S |
| LNS2 - 48h | 65,1 | S |
| LNS 2 - 72h | 141,8 | Ns |
| LNS 4 - não destacada | 219,6 | -- |
| LNS 4 - 24h | 80,4 | S |
| LNS 4 - 48h | 100,1 | S |
| LNS 4 - 72h | 167,2 | Ns |
| LNS 9 - não destacada | 188,3 | -- |
| LNS 9 - 24h | 72,5 | S |
| LNS 9 - 48h | 53,1 | S |
| LNS 9 - 72h | 193,4 | Ns |
| LNS 10 - não destacada | 213,3 | -- |
| LNS 10 - 24h | 27,4 | S |
| LNS 10 - 48h | 43,6 | S |
| LNS 10 - 72h | 170,6 | Ns |
| C. V. (%) | 48,4 | |

¹ Resultado da análise estatística comparando-se com o tratamento de folha inoculada não destacada entre tratamentos do mesmo isolado viral ($\alpha = 0,05$). S: Significativo; Ns: Não significativo.

Para todos os isolados houve um padrão semelhante de evolução dos sintomas ao longo das épocas de avaliação. Gráficos de AACPD para cada isolado viral foram construídos com base nas médias apresentadas na Tabela 3 (gráficos não mostrados), porém todos os isolados apresentaram progresso da doença médio, como podem ser observados na Figura 3.

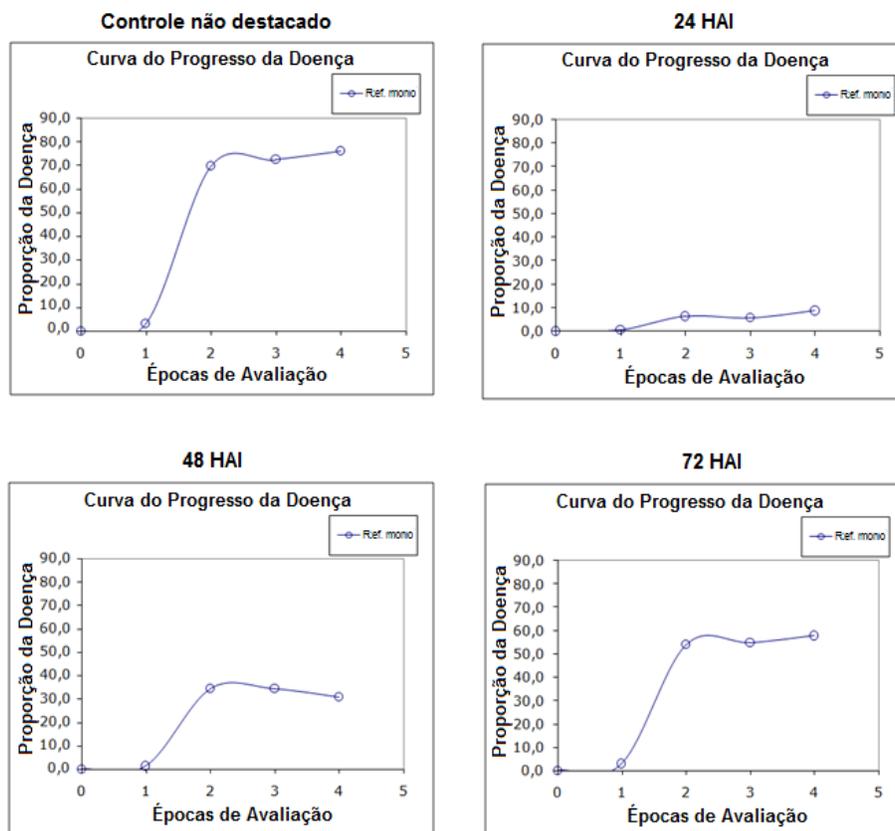


Figura 3 Gráficos da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD), referente às médias de severidade dos sintomas para as quatro épocas de avaliação [1 (8 DAI), 2 (20 DAI), 3 (35 DAI), e 4 (60 DAI)], representando a infecção

3. 3 Estimativa da concentração viral por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Após teste de eficiência dos *primers* obteve-se precisão de 99,8%, seguindo a diluição seriada com vetor plasmidial recombinante (dados não

mostrados). As melhores ampliações foram definidas pelas diluições na faixa de 10^{-3} a 10^{-9} .

Os gráficos representando a quantificação da concentração viral nos tecidos coletados, do ápice da planta infectada, em três épocas de avaliação, podem ser observados na figura 3. Percebe-se que foi possível diferenciar a concentração viral tanto entre os isolados como entre as diferentes épocas de destacamento da folha inoculada (Figura 4). Analisando-se os valores médios identificados para o número de cópias do RNA viral, aos 20 DAI, nota-se que as concentrações de vírus nos tecidos infectados, aumentaram com o aumento do intervalo entre a inoculação e o destacamento foliar, para todos os isolados em todas as épocas de destacamento da folha inoculada (Figura 4a). Entretanto, as concentrações de todos os isolados nas plantas com destacamento foliar 24 HAI e 48 HAI, foram significativamente menores quando comparadas com os outros tratamentos. Comparando-se esses valores entre os isolados, as plantas inoculadas com o isolado LNS-9 apresentaram concentrações virais ligeiramente maiores enquanto que as infectadas com o LNS-2 foram bem menores, em todas as épocas de destacamento foliar, em relação aos demais isolados. Entretanto, nas plantas que não tiveram as folhas inoculadas destacadas, apenas o isolado 2 mostrou uma menor concentração, enquanto que os demais isolados apresentaram concentrações virais semelhantes.

Na segunda e terceira avaliações, aos 35 e 60 DAI, comparando-se as concentrações entre os isolados nas plantas controle, sem destacamento foliar, nota-se que elas foram semelhantes, com uma pequena diferença indicando uma menor concentração para o isolado LNS-4 aos 35 DAI. Por outro lado, as concentrações de vírus novamente foram bem menores, com pequenas variações entre as plantas inoculadas com os diferentes isolados, no tratamento de destacamento foliar 24 HAI e 48 HAI. Entre as plantas que

tiveram as folhas destacadas 72 HAI, as concentrações nas inoculadas com os isolados LNS-9 e LNS-10 foram semelhantes entre si, mas significativamente maiores do que as naquelas inoculadas com os isolados LNS-2 e LNS-4, cujos valores permaneceram iguais ou menores do que os obtidos no destacamento de 24 e 48 HAI.

As plantas controle não inoculadas (C) não amplificaram o genoma viral, indicando ausência desse patógeno em seu tecidos. Todas estas diferenças foram confirmadas pelo teste T de Student, além da significância observada pelos desvios das médias.

Ficou evidente a diferença de concentração viral, para todos os isolados, entre as épocas de destacamento da folha inoculada. No entanto, os valores médios da concentração viral, quando comparados entre essas épocas de destacamento, agrupando-se todos os quatro isolados do mesmo tratamento num só valor, apresentaram desvios muito discrepantes, o que se justifica devido às grandes diferenças identificadas, por exemplo, entre os isolados LNS-2 e LNS-4 comparados aos isolados LNS-9 e LNS-10, às '72HAI' (Figura 4b e 4c).

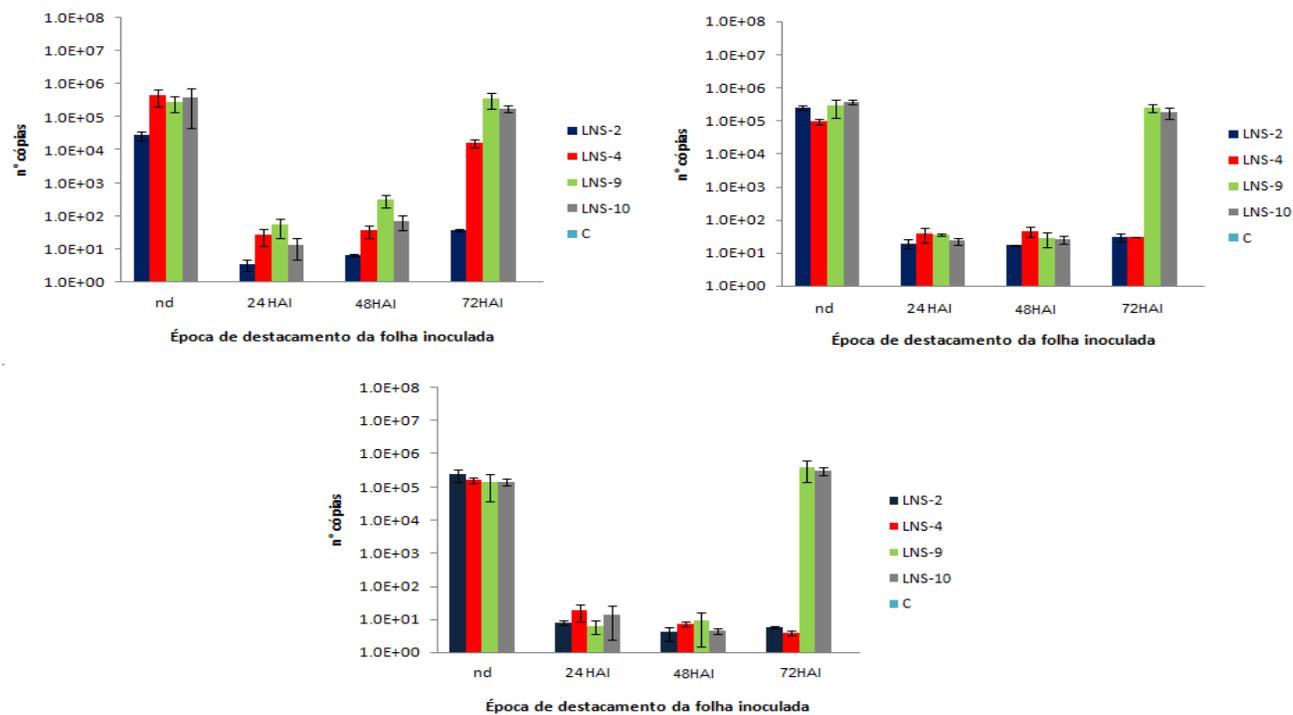


Figura 4 Gráficos construídos com os resultados obtidos por PCR em tempo real, mostrando a estimativa da concentração viral, em potência de dez, nas plantas inoculadas com os isolados de CABMV, em três avaliações: (a) aos 20 DAI, (b) aos 35 DAI e (c) aos 60 DAI, submetidas a quatro tratamentos: nd: não destacamento da folha inoculada e destacamento das folhas inoculadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação

Apesar de todos os isolados terem induzido infecção sistêmica nas plantas inoculadas, houve variabilidade quanto à severidade dos sintomas apresentados pelos diferentes isolados nesta primeira época de avaliação, à semelhança do que foi identificado com isolados de Pernambuco e Sergipe em relação a isolados de outras federações (NASCIMENTO et al., 2006).

Além disso, os sintomas que algumas plantas infectadas com o isolado LNS-9 foram maiores (baseado na escala de notas) do que plantas infectadas com os demais isolados, pelo menos por uma ou algumas épocas de avaliação, o que pode ter relação com variações, ligadas à determinação de sintomatologia e replicação, existentes no genoma dos diferentes isolados (HALDEMAN-CAHILL; DAROS; CARRINGTON, 1998). Também é possível verificar que a concentração viral do LNS-9, obtida por PCR em tempo real, foi maior do que os outros três isolados em todos os tratamentos que tiveram a folha inoculada destacada, exceto no controle 2 (Figura 4a).

Os resultados da quantificação da concentração viral por PCR em tempo real também demonstraram haver diferenças entre estes isolados. Pois, embora submetidos às mesmas condições ambientais, aos mesmos tratamentos e inoculados em progênes de irmãos-completos, a severidade dos sintomas induzidos pelos diversos isolados foram significativamente diferentes, entre tratamentos e entre isolados. No entanto, as concentrações virais identificadas entre as diferentes épocas de avaliação, para cada isolado, apresentaram-se muito variáveis. Novaes e Rezende (2003), utilizando o teste ELISA, identificou também concentrações virais muito irregulares entre diferentes folhas, e até mesmo em diferentes regiões da mesma folha, ao estudar estirpes deste vírus em maracujazeiro. Os resultados aqui obtidos mostram essa dificuldade em encontrar um padrão nas concentrações do vírus neste trabalho, pois a

distribuição das partículas na planta depende da translocação do vírus e nem sempre são homogêneas nas diversas partes das plantas.

Estudos recentes, utilizando estirpes severas e fracas de *Tobamovirus*, Vogler et al. (2007) demonstraram que existe correlação entre mutações na região viral supressora do mecanismo de silenciamento da planta e a atenuação da infecção viral. Estas mutações agem contornando a ação supressora de silenciamento do vírus e podem ser selecionadas pelo vírus, para reduzir os efeitos da infecção na planta hospedeira e, assim, mantê-la viva (NIEHL; HEINLEIN, 2009).

Como algumas evidências experimentais já corroboram, o aparecimento de sintomas pode não estar relacionado diretamente com a concentração viral na planta hospedeira. Nesse contexto, o isolado LNS-4 foi o que apresentou os maiores índices de sintomatologia na avaliação visual, ao passo que nas avaliações por PCR em tempo real, ele apresentou número de cópias igual ou abaixo dos outros isolados, em vários tratamentos. Já os isolados LNS-9 e LNS-10 apresentaram níveis de sintomatologia relativamente altos, bem como se destacaram em vários tratamentos demonstrando um alto número cópias do vírus nas plantas inoculadas.

REFERÊNCIAS

ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CHARCHAR, M. J. A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil Central**. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2001. 17 p. (Documentos, 30).

AYRES, M. et al. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2007. 334 p.

BOEVINK, P.; OPARKA, K. J. Virus-host interactions during movement processes. **Plant Physiology**, Washington, v. 138, n. 4, p. 1815-1821, Aug. 2005.

BORGES, T. A. et al. Índices de cruzabilidade do maracujazeiro-azedo comercial (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) com espécies de passifloras silvestres e pregênes de retrocruzamentos, visando a obtenção de resistência a doenças e autocompatibilidade. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 9., 2003, Brasília. **Anais...** Brasília: UnB, 2003. 1 CD-ROM.

BRAZ, A. S. K. et al. Molecular characterization of two isolates of South African Passiflora virus infecting passion fruit in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, v. 3, p. 146, 1998. Abstract.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.

CHAGAS, C. M. et al. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) no Estado da Bahia, causado por um isolado do vírus do “woodiness” do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 259-268, jul. 1981.

CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1545-1555, set. 1999.

DERRICK, P. M.; BARKER, H.; OVARKA, K. J. Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 11, p. 1405-1412, Nov. 1992.

FANNIN, F. F.; SHAW, J. G. Evidence for concurrent spread of *Tobacco mosaic virus* from infected epidermal cells to neighboring epidermal and mesophyll cells. **Plant Science**, Shannon, v. 51, n. 2/3, p. 305-310, Mar. 1987.

HALDEMAN-CAHILL, R.; DAROS, J. A.; CARRINGTON, J. C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the *Tobacco etch virus* genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 4072-4079, May 1998.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA, 2005. p. 81-105.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. W.; CRESTANI, O. A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 5, p. 409-432, ago./set. 1986.

LAZAROWITZ, S. G.; BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 535-548, Apr. 1999.

LUCAS, W. J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, Washington, v. 344, n. 1, p. 169-184, Jan. 2006.

MALAVOLTA, E. **Nutricion y fertilizacion del maracuya**. Quito: Potafos, 1994. 52 p.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia, produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 300-371.

NASCIMENTO, A. V. S. et al. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 378-383, jan./fev. 2004.

_____. Cowpea aphid borne-mosaic virus (CABMV) is widespread in Passion fruit and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 9, p. 1797-1809, Sept. 2006.

NIEHL, A.; HEINLEIN, M. Impact of RNA virus infection on plant cell function and evolution. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 1178, n. 8, p. 120-128, Oct. 2009.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao "*Passion fruit woodiness virus*". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 76-79, mar. 1999.

_____. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (pwv) fail to protect pre-immunized vines in brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 699-708, 2003.

RESENDE, L. V. et al. Correlations between symptoms and DAS-ELISA values in two sources of resistance against tomato spotted wilt virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 135-139, Apr./June 2000.

RUGGIERO, C. Alguns fatores que podem influir na frutificação. In: _____. **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 77-85.

SANTANA, E. N. et al. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passion fruit woodiness in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, v. 4, p. 153, 1999. Abstract.

SANTOS-FILHO, H. P. et al. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-280.

SILVA, J. G. C. Análise estatística de um novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 3-7, fev. 1969.

VOGLER, H. et al. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 19, p. 10379-10388, Oct. 2007.

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C. M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SBF, 1979. p. 915-917.

CAPÍTULO 3

Caracterização molecular, diversidade e inferências filogeográficas de isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* da Bahia

RESUMO

Neste trabalho, foram feitas a caracterização molecular e inferências filogeográficas sobre uma população de 10 isolados virais coletados em diferentes fazendas da região de Livramento de Nossa Senhora/BA, denominados de LNS-1 a LNS-10. Os isolados LNS-5 e LNS-7 não tiveram o gene da capa protéica amplificado com os mesmos *primers* desenhados para os outros isolados, necessitando de um outro par de *primers* para estes dois isolados, devido a variabilidade na região de anelamento dos mesmos. Motivos conservados entre os genes N1b e capa protéicas foram identificados sem apresentar mutações. Igualmente, motivos conservados íntegros foram identificados na região codificadora da capa protéica. Comparações filogenéticas demonstraram um agrupamento único para todos os dez isolados de Livramento de Nossa Senhora. A identidade das sequências demonstrou maior parentesco com um isolado CABMV oriundo do Distrito Federal. Inferências filogeográficas demonstraram haver uma separação dos isolados de acordo com a origem geográfica de cada um. Os resultados permitiram classificar os dez isolados como pertencentes a uma mesma população e, filogeograficamente, distinta de todas as outras sequências depositadas no GenBank.

Palavras-chave: Maracujá-amarelo. Filogeografia. CABMV. Haplótipos.

ABSTRACT

The woodiness of passion fruit viruses is now considered the most important disease of this crop. The causative agent of this disease in Brazil is CABMV and, despite the importance of this pathogen and culture passion, few studies has already been carried out in comparison with others viral pathosystems. This work aimed the molecular characterization and the study of phylogeographic inferences upon a population of 10 isolates collected from different farms in the region of Livramento de Nossa Senhora / BA. Isolates LNS-5 and LNS-7 did not have the coat protein gene amplified with the same primers designed for the other isolates, needing another pair of primers for these two isolates. Motifs conserved identified between the NIb and coat protein genes did not show any polymorphisms. Phylogenetic comparisons showed a single grouping for all ten isolates of Livramento de Nossa Senhora/BA. The identity demonstrated a greater kinship with CABMV from the Distrito Federal. Phylogeographic inferences showed a separation of isolates according to its each geographical origin. The results allowed us to classify the ten isolates belonged to the same population and phylogeographic distinguished from all other sequences deposited in GenBank.

Keywords: Passion fruit. Phylogeography. CABMV. Haplotypes.

1 INTRODUÇÃO

A virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é atualmente considerada como a mais importante desta cultura (MACIEL et al., 2009). Apesar de possuir diferentes agentes causais em várias regiões do mundo, no Brasil, todos os relatos confirmaram ser o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) o causador da doença (NASCIMENTO et al., 2004).

Os vírus que pertencem ao gênero *potyvirus* possuem seu genoma disposto na forma partículas flexuosas não envelopadas, composto por uma fita simples de RNA, senso positivo, encapsulada por um capsídeo composto por subunidades protéicas (MLOTSHWA et al., 2002). Uma das proteínas mais importantes do genoma viral é o capsídeo viral. Geralmente, é associada a diversas funções como movimento viral no interior da planta (SIVAKUMARAN; SUN; KAO, 2001), encapsidação do genoma (VARRELMANN; MAISS, 2000) e determinação da sintomatologia (HALDEMAN-CAHILL; DAROS; CARRINGTON, 1998).

Apesar da importância deste patógeno e da cultura do maracujazeiro, são poucos os estudos já realizados, em comparação com outros patossistemas virais. Embora a caracterização molecular de isolados virais de alguns Estados do Brasil já tivesse sido realizada (BARROS, 2007; BRAZ et al., 1998; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2004, 2006; NOVAES; REZENDE, 2005; SANTANA et al., 1999), ressalta-se a importância de identificar variações genéticas entre isolados diferentes, principalmente, correlacionando-os com sua origem geográfica (ABUBAKAR et al., 2003).

Diferentemente da ampla gama de estudos de variação genética e estrutura populacional de vírus de RNA em animais, em plantas, poucos estudos similares foram realizados (GARCÍA-ARENAL; ESCRIU; ARANDA, 2000). A melhor compreensão das variações do gene da capa protéica promove um

melhor entendimento da diversidade de isolados e da divergência genética entre populações de isolados.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma população de isolados oriundos da região produtora de maracujazeiro-‘amarelo’ em Livramento de Nossa Senhora/BA e inferir sobre sua origem geográfica com relação aos demais isolados já estudados em outros trabalhos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e manutenção de isolados virais

Foram estudados 10 isolados virais, obtidos em diferentes fazendas no município de Livramento de Nossa Senha/BA, principal pólo produtor de maracujá-amarelo da região Sudoeste da Bahia. Plantas infectadas em meio a campos de produção de maracujá-‘amarelo’, apresentando sintomas severos da virose, foram identificadas, e folhas com sintomas foram coletadas de indivíduos distintos nas diferentes fazendas, sendo, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular – UESB. Os isolados virais foram sequencialmente identificados como LNS-1 a LNS-10. Amostras destes isolados foram, então, enviadas para o Laboratório de Fitovirologia Molecular (LFM) do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Os isolados foram mantidos em plantas de *P. edulis*, com repicagens periódicas para plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) subsp. *unguiculata* Walp., cv. ‘Pitiúba’, e de *Nicotiana benthamiana* L., por inoculação mecânica (maceração de folhas sintomáticas em solução tampão Fostafo de Potássio 0,01M pH 7,0 e posterior fricção da suspensão viral sobre folhas de plantas sadias previamente polvilhadas com carborundum (carbeto de silício – malha 600 mesh), seguida por lavagem das folhas com água corrente). As

plantas foram mantidas em casa de vegetação, em diferentes bancadas distantes umas das outras, para prevenir a contaminação entre os isolados. Algumas folhas foram dessecadas e estocadas em freezer a -20 °C, bem como armazenadas em freezer -80 °C para re-multiplicação, sempre que necessário.

2.2 Extração de RNA, PCR, Clonagem e Sequenciamento

2.3 Extração de RNA Total

Para realizar a caracterização molecular do gene da capa protéicas dos dez isolados virais, foi conduzida a extração de RNA total de plantas infectadas que apresentavam infecção sistêmica do vírus. Para extração do RNA total, seguiu-se protocolo Trizol (ARABIDOPSIS FUNCTIONAL GENOMICS CONSORTIUM - AFGC, 2007), com algumas modificações. Dois microlitros de cada amostra foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7% para verificação da qualidade do RNA total obtido, antes do material ser empregado para a síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa (RT-PCR).

2.4 Síntese de cDNA (Transcrição Reversa) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O RNA total extraído das plantas infectadas foi utilizado como molde para sintetizar a primeira fita do DNA completar (cDNA) do vírus. Os oligonucleotídeos utilizados foram *primers* antisense (i) desenhados a partir de sequências de isolados depositadas no GenBank, (ii) desenhados a partir de sequências parciais das capas protéicas dos dez isolados utilizados neste trabalho (Tabela 1). O kit utilizado para a síntese do cDNA foi o M-MLV Reverse

Transcriptase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante com modificações pelo LFM-UFLA.

A reação de amplificação dos fragmentos por PCR foi realizada por meio do Kit GoTaq DNA Polymerase e GoTaq Flexi DNA Polymerase (ambos Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 0,7% e, em seguida, purificados (i) diretamente do produto de PCR (quando se amplificou somente a única região esperada) ou (ii) a partir de gel de agarose 1% (quando se amplificou mais de uma região). Os Kits utilizados para a purificação do DNA foram, respectivamente, PCR Purification Kit (NORGEN) e Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A banda purificada foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,7% para verificação da pureza e quantidade do DNA obtido.

Tabela 1 *Primers* utilizados para amplificação da região codificadora completa do gene da capa protéica

| Nome do primer | Sequência (5' → 3') | Posição (nt) |
|-----------------------|----------------------------|---------------------|
| CABMV8364-F | CCTTTCCTTCTACGATG | 8364-8380 |
| CABMV9389-R | CAACCGGGGTATGGCCTC | 9389-9406 |
| CABMV8359-F | GGCATCCTTTCCTTCTATG | 8359-8377 |
| CABMV9402-R | CACTCTGAGCACTCCAACC | 9402-9420 |

2.5 Ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo vetor e screening de clones recombinantes

Os fragmentos obtidos por PCR e purificados foram ligados ao plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega) segundo as recomendações do

fabricante. O produto da ligação foi utilizado para transfecção de célula competente, Max Efficiency DH5 α Competent Cell (Invitrogen) preparada segundo as instruções de Hanahan (1983). O produto da transfecção foi plaqueado em placas de Petri descartáveis com meio LB sólido e equivalente a 1 μ L/mL de ampicilina (100mg/mL), sobre o qual foram plaqueados IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) (200mg/mL) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) (20mg/mL). Colônias apresentando vetores recombinantes puderam ser selecionadas por diferenciação branco/azul, devido à inatividade da β -Galatosidase nos transformantes, possibilitando a seleção de colônias brancas.

2.6 Extração de DNA plasmidial e sequenciamento

Colônias com os plasmídeos recombinantes foram adicionadas em meio LB líquido com ampicilina e submetidas às condições de crescimento a 37 °C sob agitação vigorosa overnight. Após a verificação do crescimento, procedeu-se com o método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para a extração plasmidial. A confirmação dos recombinantes que continham o fragmento de interesse foi procedida por digestão com Enzima de Restrição EcoRI, ou PCR de colônia com os mesmos *primers* utilizados na amplificação e posterior comparação, em gel de agarose 0,7%, do produto da digestão com as bandas obtidas na PCR e purificação de DNA.

Os plasmídeos contendo os fragmentos genômicos de interesse foram liofilizados e enviados para sequenciamento na Macrogen – Coréia do Sul e no Laboratório Central de Biologia Molecular – UFLA. O sequenciamento de cada fragmento foi realizado nas duas direções forward/SP6 e reverse/T7.

2.7 Análise das sequências

As sequências foram previamente ajustadas após o sequenciamento nas direções *Forward* (SP6 *promoter*) e *Reverse* (T7 *promoter*). Os contigs foram construídos utilizando o programa DNA Baser Sequence Assembler v2 (DNA..., 2010). Após obtenção dos contigs, foi realizada análise mediante alinhamento local básico por intermédio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível *online* no website do NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Nesta mesma plataforma, encontra-se o banco de dados GenBank, o qual foi fonte para a prospecção de sequências do vírus já depositadas (Tabela 2), possibilitando a comparação dos isolados deste trabalho com outros isolados mediante alinhamento múltiplo.

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram realizados utilizando-se o programa CLUSTALW (CHENNA et al., 2003). Distâncias genéticas e árvores filogenéticas foram geradas utilizando-se o programa MEGA 4.1 (TAMURA et al., 2007), com bootstrap, considerando-se valores superiores a 2.000 repetições.

2.8 Análises Filogeográficas

As sequências da capa protéica dos 10 isolados de Livramento de Nossa Senhora e mais 26 sequências obtidas no GenBank (Tabela 2) foram utilizadas para essas análises. Os dez isolados foram considerados como uma população. Diferentemente da análise filogenética anteriormente descrita, apenas 26 das 29 sequências identificadas no GenBank foram utilizadas para compor esta avaliação, já que *gaps* existentes no meio destas três sequências comprometiam os resultados do estudo.

Uma região de 688 nucleotídeos das sequências, do interior da capa protéica, foi utilizada para alinhamento múltiplo no programa ClustalW, utilizando-se parâmetros padrão do mesmo. O alinhamento foi checado visualmente para a seleção apenas da região que apresentou homologia dentre as 36 sequências utilizadas, excluindo-se regiões das extremidades que possuíam *gaps*.

Após o alinhamento, as sequências foram submetidas à análise de diversidade, polimorfismo e distância genética pelo programa DnaSP v5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) para a determinação do número de haplótipos existentes e das relações entre as distâncias genética e geográfica dos isolados. Esta última análise gerou um arquivo de entrada para o programa Network 4.5, no qual, com estes resultados, foi possível desenhar a *Network* e determinar o padrão de variação e distribuição que os isolados estudados apresentaram com relação à sua origem geográfica e distância genética.

Tabela 2 Sequências de isolados obtidos do GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2010) e usadas para comparação entre os isolados estudados

| Acesso | Origem | Isolado | Autor/Publicação |
|---------------|---------------|----------------|-----------------------------|
| AY253909 | Brasil | CABMV-PE | Nascimento et al. (2006) |
| AY253911 | Brasil | CABMV-SE | Nascimento et al. (2006) |
| AY433950 | Brasil | CABMV-SP | Gioria et al. (2004) |
| AY433951 | Brasil | CABMV-F101 | Gioria et al. (2004) |
| AY433952 | Brasil | CABMV-M2 | Gioria et al. (2004) |
| AY434454 | Brasil | CABMV-M3 | Gioria et al. (2004) |
| AY505342 | Brasil | CABMV-F144 | Novaes e Rezende (2005) |
| AY253906 | Brasil | CABMV-PE2 | Nascimento et al. (2006) |
| AY253907 | Brasil | CABMV-PB1 | Nascimento et al. (2006) |
| AY253908 | Brasil | CABMV-PE3 | Nascimento et al. (2006) |
| AY253910 | Brasil | CABMV-PB2 | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397526 | Brasil | CABMV-PE Bnt | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397528 | Brasil | CABMV-ITB | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397529 | Brasil | CABMV-Vni | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397539 | Brasil | CABMV-SP Vcz | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397531 | Brasil | CABMV-Prp | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397532 | Brasil | CABMV-Brs | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397525 | Brasil | CABMV-MG | Nascimento et al. (2006) |
| DQ397527 | Brasil | CABMV-Jgr | Nascimento et al. (2006) |
| EU004070 | Brasil | CABMV-SP | Kitajima et al. (2008) |
| AJ132414 | Nigeria | CABMV-Iba | Boxtel et al. (2000) |
| AF241233 | Brasil | CABMV | Pio-Ribeiro et al. (2000) |
| NC_004013 | Zimbábue | CABMV-Z | Mlotshwa et al. (2002) |
| X82873 | Zimbábue | CABMV-Z | Sithole-Niang et al. (1996) |
| U72204.1 | Desconhecido | CABMV | Sae-Ung et al. (1996) |
| Y17822 | Nigeria | CABMV-Mog | Boxtel et al. (2000) |
| Y17824 | Desconhecido | CABMV | Boxtel et al. (2000) |
| Y18634 | Marrocos | CABMV-Mor | Boxtel et al. (2000) |
| D10053 | Africa | SAPV | Brand et al. (1993) |
| AF208662 | Taiwan | PWV | Chu et al. (1999) |
| AJ430527 | Australia | PWV | Dietzgen (2002) |
| U67149 | Australia | PWV-Culness | Sokhandan et al. (1997) |

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do gene da capa protéica do isolados virais

Os produtos clonados e sequenciados possibilitaram analisar sequências de até 1.062 nt, pois os *primers* utilizados flanquearam o gene completo da capa protéica (1-828 nt ou 275 aa) além de grande parte da região 3'-UTR (1-183 nt) e pequena porção do gene N1b (8362-8409 nt). Todos os isolados apresentaram ORF da capa protéica de 275 aminoácidos, à semelhança das sequências depositadas no GenBank. As comparações foram realizadas mediante avaliação da identidade entre os isolados aqui estudados e entre estes e os disponíveis no GenBank.

Os isolados LNS-5 e LNS-7 não tiveram a região da capa protéica amplificada com o par de *primers* CABMV8359-F / CABMV9402-R, que foi eficiente na amplificação dos outros oito isolados (dados não mostrados). Após várias tentativas, desenhou-se um novo par de *primers* CABMV8364-F / CABMV9389-R que permitiu amplificar o gene da capa protéica desses dois isolados.

Analisando-se a sequência de nucleotídeos da região da capa protéica, a identidade entre os dez isolados de Livramento de Nossa Senhora variou de 97% (entre LNS-1 e LNS-6, LNS-4 e LNS-6, LNS-5 e LNS-6, LNS-6 e LNS-7, LNS-6 e LNS-8) a 98% e 99% entre os demais isolados (Tabela 3).

Quando os dez isolados tiveram suas sequências de nucleotídeos comparadas com as sequências depositadas no GenBank, foi identificada baixa identidade com o isolado de SAPV da África do Sul, o D10053, variando de 84 a 85%. A identidade entre esse isolado de SAPV e os demais isolados de CABMV do GenBank variou de 80 a 85%. Quando comparados com o PWV, a identidade dos isolados brasileiros foi ainda menor, variando entre de 59 a 71%

com os três isolados disponíveis no GenBank. Com relação aos isolados de CABMV do banco de dados, o que mais se aproximou dos isolados deste estudo foi DQ397532, de Brasília, o qual demonstrou 92% de identidade com o isolado LNS-6 e 94% com LNS-4. A menor identidade entre os isolados brasileiros e os de CABMV do banco de dados (76%) foi verificada com o isolado Y17822, de Monguno e com o isolado AJ132414, da Nigéria, ambos com (Tabela 4).

A identidade entre as sequências de aminoácidos dos dez isolados variou de 95% (entre LNS-6 e LNS-7) a 100% (LNS-1 e LNS4, LNS-2 e LNS-9, LNS-3 e LNS-10). Estes valores evidenciam que a maioria das substituições existente na sequência de nucleotídeos resultou na substituição de aminoácidos. Isto indica que grande parte da variação identificada foi de substituições sinônimas. Variações entre os isolados de CABMV disponíveis no GenBank também foram identificadas. As porcentagens destas variações foram maiores do que 76%, com exceção da identidade entre DQ397526 x Y18634, Y17824 e Y17822, que foi de 73%, 75% e 73%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3 Identidade da sequência de nucleotídeos (parte superior direita) e aminoácidos (parte inferior esquerda) referente ao capsídeo viral dos dez isolados CABMV-LNS

| | LNS-1 | LNS2 | LNS3 | LNS4 | LNS5 | LNS6 | LNS7 | LNS8 | LNS9 | LNS10 |
|--------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| LNS-1 | --- | 99 | 99 | 99 | 99 | 97 | 98 | 99 | 99 | 99 |
| LNS-2 | 99 | --- | 99 | 99 | 99 | 98 | 99 | 99 | 99 | 99 |
| LNS-3 | 99 | 99 | --- | 99 | 99 | 98 | 99 | 99 | 99 | 99 |
| LNS-4 | 100 | 99 | 99 | --- | 99 | 97 | 98 | 99 | 99 | 99 |
| LNS-5 | 98 | 98 | 98 | 98 | --- | 97 | 98 | 99 | 98 | 98 |
| LNS-6 | 96 | 97 | 97 | 96 | 96 | --- | 97 | 97 | 98 | 98 |
| LNS-7 | 98 | 98 | 98 | 98 | 97 | 95 | --- | 98 | 98 | 99 |
| LNS-8 | 99 | 98 | 99 | 99 | 98 | 96 | 97 | --- | 99 | 99 |
| LNS-9 | 99 | 100 | 99 | 99 | 98 | 97 | 98 | 98 | --- | 99 |
| LNS-10 | 99 | 99 | 100 | 99 | 98 | 97 | 98 | 99 | 99 | --- |

O isolado U72204, de origem desconhecida, disponível no GenBank, apresentou identidade de aminoácidos de 66% com o isolado LNS-6, de 68% com os isolados LNS1, LNS-4, LNS-5 e LNS7. Com os demais isolados, estas porcentagens foram de 69%. Em comparação aos outros isolados de CABMV disponíveis no GenBank a magnitude da variação foi ainda maior, sendo de 57% (com DQ397526) a 68% (com DQ397528). Este fato chama a atenção, pois o referido isolado está caracterizado como sendo pertencente à espécie CABMV, portanto sua identidade entre os isolados deste estudo e outros isolados de CABMV do GenBank deveria ser acima de 76%, para seguir o padrão dos isolados analisados. Semelhante ao isolado U72204, identidades de aminoácidos inferiores a 75% foram detectadas entre DQ397526 x Y18634, Y17824 e Y17822.

A análise da sequência de aminoácidos mostrou ainda que os motivos conservados que estão representados, dentro da e flanqueando a capa protéica, na grande maioria das espécies pertencentes ao gênero *potyvirus*, foram identificados nos dez isolados estudados (Figura 1). Foram eles: (i) o motivo EDVVLQS foi identificado na região imediatamente entre os genes N1b e CP, o que caracteriza o ponto de clivagem Q/S da poliproteína potyviral entre esses dois produtos gênicos do vírus (MLOTSHWA et al., 2002); (ii) o motivo DAG, responsável pela transmissibilidade por insetos (ATREYA; ATREYA; PIRONE, 1991), foi identificado na porção N-terminal da região codificadora da capa protéica, (iii) o motivo altamente conservado em *potyvirus*, foi o (Y)AFDF(YE) identificado na porção C-terminal da região codificadora da capa protéica (BARROS, 2007; YUN et al., 2002; ZHENG et al., 2008).

As árvores filogenéticas construídas com base nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos apresentaram dois grandes clados, distinguindo as espécies PWV e CABMV. O agrupamento de todos os isolados oriundos de Livramento de Nossa Senhora demonstrou que estes são mesmo isolados de CABMV. Em comparação aos demais disponíveis no GenBank, o agrupamento ocorreu separadamente, quando todos os dez isolados ficaram agrupados num mesmo ramo (Figuras 2 e 3).

Dentre os isolados aqui estudados, dois subgrupos distintos são formados por eles em ambas as árvores geradas por sequência de nucleotídeos ou aminoácidos. A árvore baseada na sequência de aminoácidos revela o isolado LNS-6 separado de todos os demais, além do LNS-5 e LNS-7 apresentarem-se isolados de seus subgrupos. Na árvore gerada com base na sequência de aminoácidos os isolados LNS-5 e LNS-6 apresentam-se isolados de todos os outros oito isolados de Livramento de Nossa Senhora. O isolado LNS-6 aparece num ramo isolado de todos os demais. O isolado LNS-7 apresenta-se também mais separados dos dois subgrupos formados nos ramos mais internos da árvore, mas, apesar de demonstrar alguma separação num ramo separado dos outros grupos, compartilhou agrupamento, com os isolados LNS-2, LNS-3, LNS-9 e LNS-10 (Figura 3).

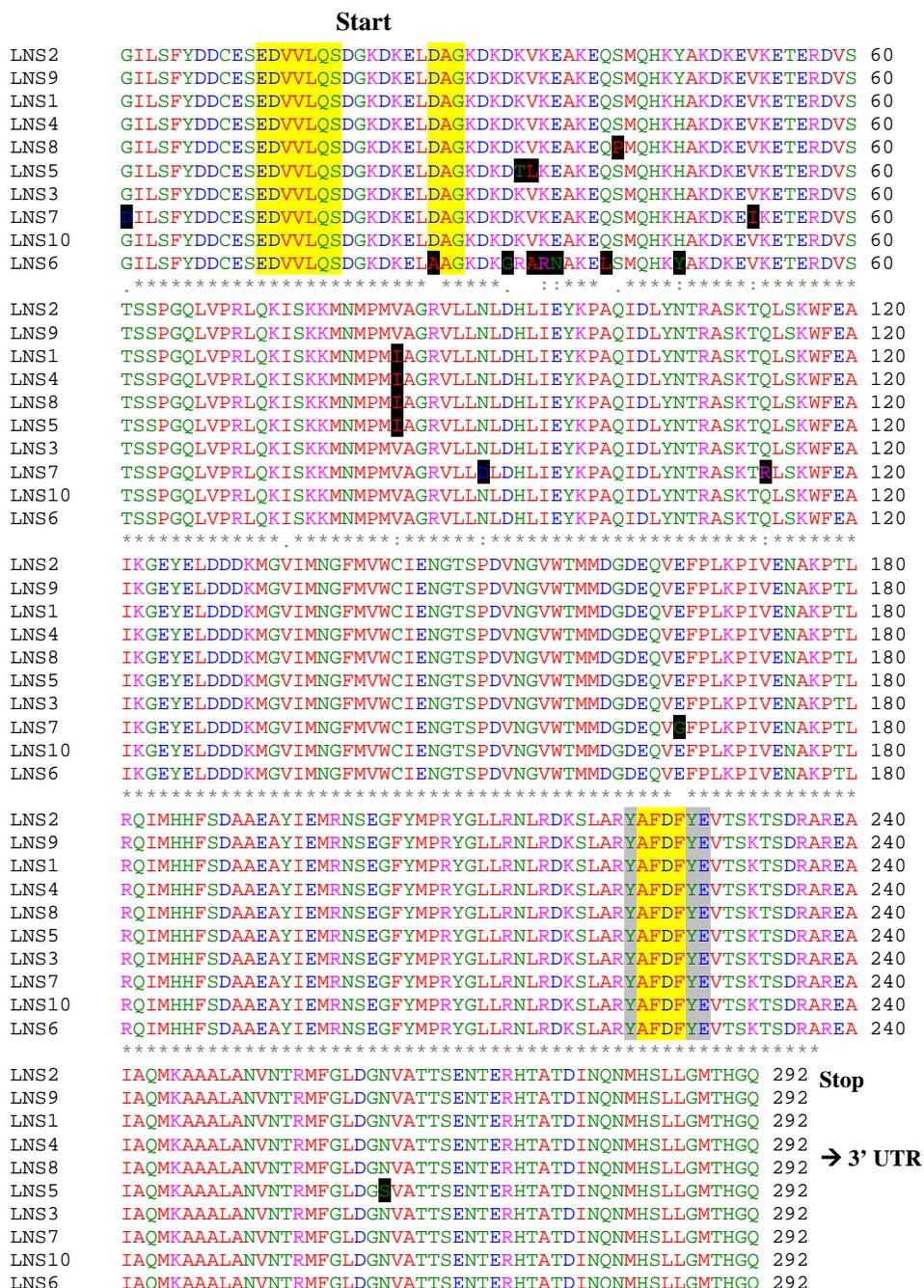


Figura 1 Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos referente a parte da proteína de inclusão nuclear (NIB), região codificadora completa da capa protéica (CP)

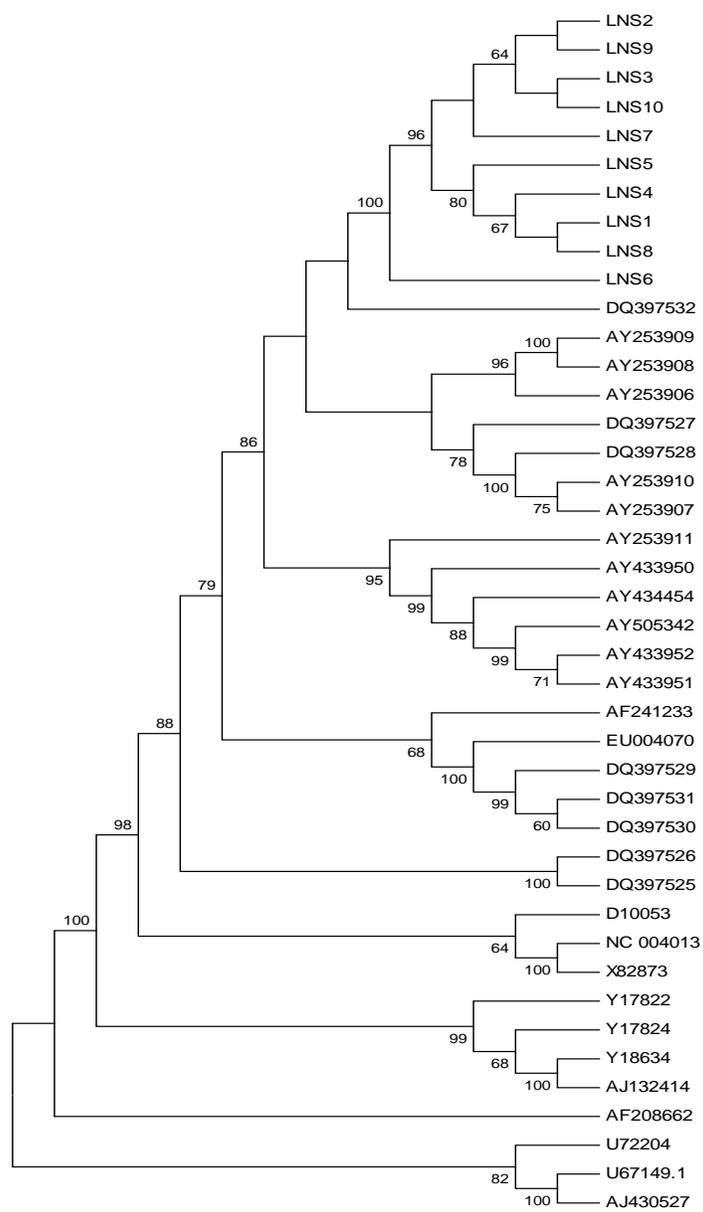


Figura 2 Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos de isolados de CABMV. Valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2000 repetições

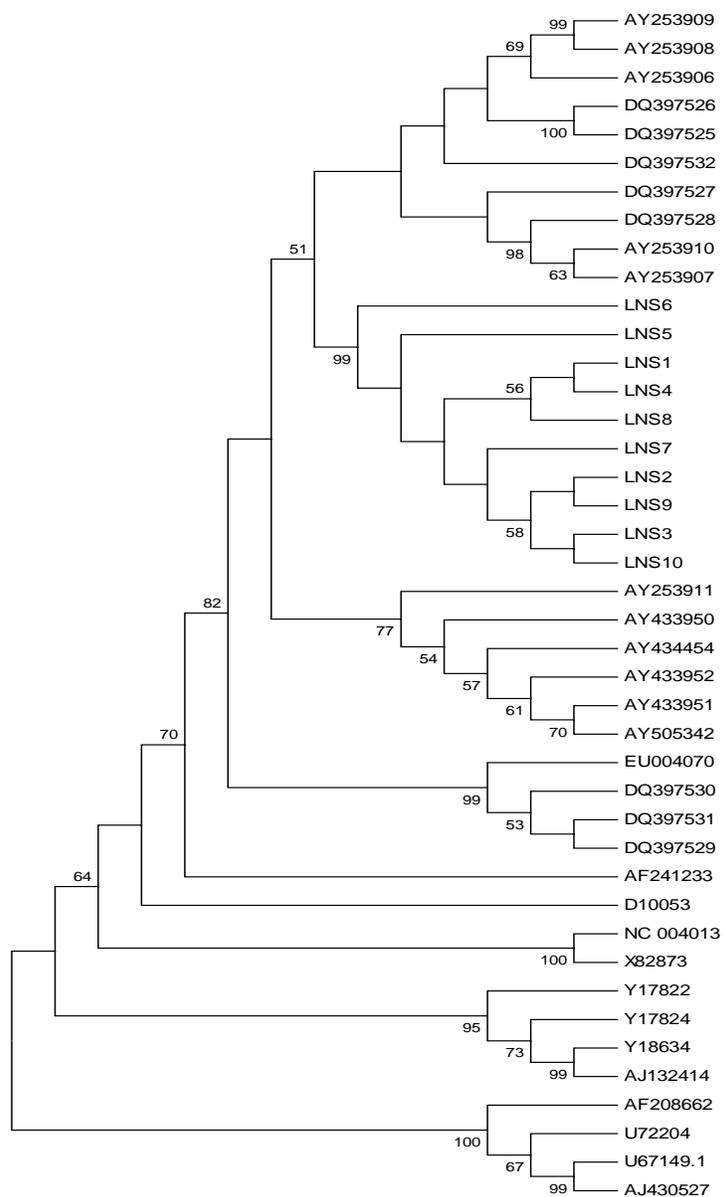


Figura 3 Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos de isolados de CABMV. Valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbor-joining, com 2000 repetições

3.2 Inferências filogeográficas sobre a população de isolados CABMV-LNS

Foram observados dois grandes filogrupos que apresentam a separação entre as espécies CABMV (junto ao SAPV) e PWV. Mais uma vez, ficou evidente a semelhança do isolado de referência U72204 com vírus da espécie PWV e não CABMV, sendo sua divergência entre PWV muito menor do que com CABMV. Um total de 33 haplótipos foi identificado de forma que a maioria foi específica para cada isolado viral (Figura 4). Apenas 5 haplótipos foram comuns a mais de um isolado, sendo eles os haplótipo 6 (DQ397531 e DQ397529), 8 (DQ397528, AY253910 e AY253907), 12 (AY253909 e AY253908), 21 (NC004013 e X82873) e 26 (LNS-2 e LNS-6). Dentre esses, apenas o haplótipo 8 foi comum a três isolados. Todos os outros foram comuns a apenas dois isolados.

Foi muito evidente a influência da origem de diferentes localidades geográficas sobre os isolados. Entre as diferentes espécies de vírus que causam o endurecimento dos frutos do maracujá, é possível observar que o PWV que ocorre na Austrália é muito distante, geneticamente, dos isolados de CABMV e de SAPV. Isolados do continente africano, pertencentes à mesma espécie (CABMV), apresentam distância genética muito significativa entre si (CABMV-Zimbábue e SAPV-África do Sul x CABMV-Nigéria), se comparados com os isolados brasileiros. Estes, por sua vez, se localizaram no centro da linha de divergência dos isolados africanos, onde se observa um grande número de pontos de mutação (Figura 4).

Todos os haplótipos referentes a isolados de origem brasileira distribuíram-se de modo menos divergente do que quando comparado a outras localidades geográficas. Isto torna possível verificar a relação de origem geográfica entre eles. Ao observar uma subdivisão dentro da população brasileira de haplótipos, é possível verificar, também, que a divergência é menor

entre haplótipos classificados por Estados da federação do que entre a população de haplótipos brasileiros, comparada com os africanos.

Ainda na Figura 4, ao avaliar os isolados CABMV-LNS, é possível inferir claramente que eles formam uma pequena população distinta dos demais isolados incidentes no Brasil. Tomando como referência as mutações entre os haplótipos, é factível a distância genética muito inferior entre os 10 isolados do que entre eles e os demais isolados brasileiros. O não compartilhamento genético mais próximo entre isolados baianos de Livramento de Nossa Senhora (em verde claro) com os oriundos de Jaguaquara e Itaberaba (em salmon) pode ser um indicativo de que eles são distintos.

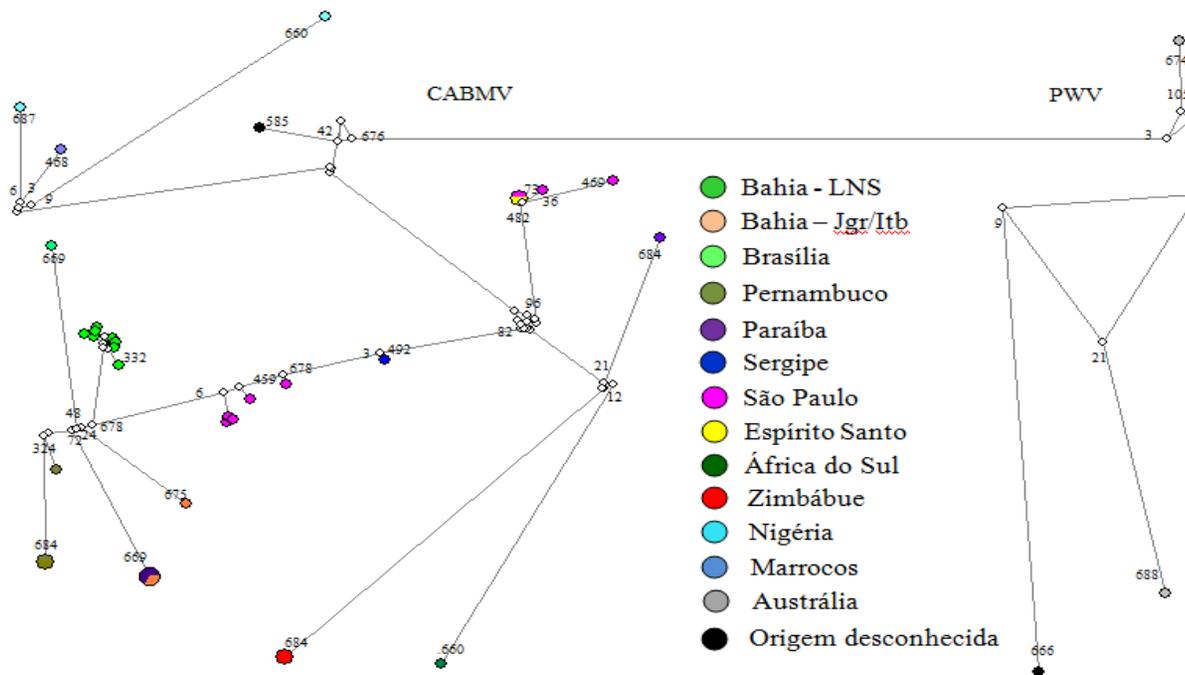


Figura 4 Median joining network gerada ilustrando haplótipos (em cores) e seus respectivos haplótipos hipotéticos (em branco), relativos às sequências de CABMV-LNS e demais sequências de CABMV e PWV obtidas do GenBank. As áreas dos círculos representam a frequência dos haplótipos e as cores a região de coleta dos isolados. As linhas entre os haplótipos representam distância genética derivada das mutações (números) entre dois ou mais haplótipos

O agrupamento filogenético dos isolados, segundo os dados filogeográficos, corrobora tanto os resultados filogenéticos apresentados anteriormente quanto os resultados filogeográficos ilustrados na *network*. Todos os isolados CABMV-LNS agruparam-se num mesmo ramo, demonstrando que formam mesmo uma pequena população distinta dos demais isolados, inclusive dos isolados que apresentaram identidade próxima de 95%, como foi o caso do isolado do Distrito Federal. Os demais isolados de CABMV, SAPV e PWV agruparam-se de acordo com o agrupamento por espécie e segundo suas regiões geográficas de origem (Nigéria, Marrocos, Zimbábue, África do Sul e Austrália) (Figura 5).

Tanto na árvore quanto na *network*, ficou evidente a existência de isolados identificados como CABMV, em determinadas regiões, que apresentaram maior identidade com isolados de outra localidade. Assim, ocorreu entre isolados de São Paulo/Espírito Santo/Paraíba, São Paulo/Sergipe, Bahia/Paraíba e Bahia/Distrito Federal. Este tipo de informação é relevante, pois demonstra que pode haver fluxo de materiais infectados de um Estado para outro, provocando a disseminação do vírus para regiões ainda não afetadas.

Apesar de este estudo ter outros objetivos, além de caracterizar isolados virais que causam endurecimento dos frutos em região produtora de maracujazeiro na Bahia, também corrobora os resultados obtidos em outras pesquisas (BARROS, 2007; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; MOREIRA, 2008; NASCIMENTO et al., 2004, 2006), afirmando que o responsável, em Livramento de Nossa Senhora/BA, por causar endurecimento dos frutos em maracujazeiro-‘amarelo’ é o CABMV.

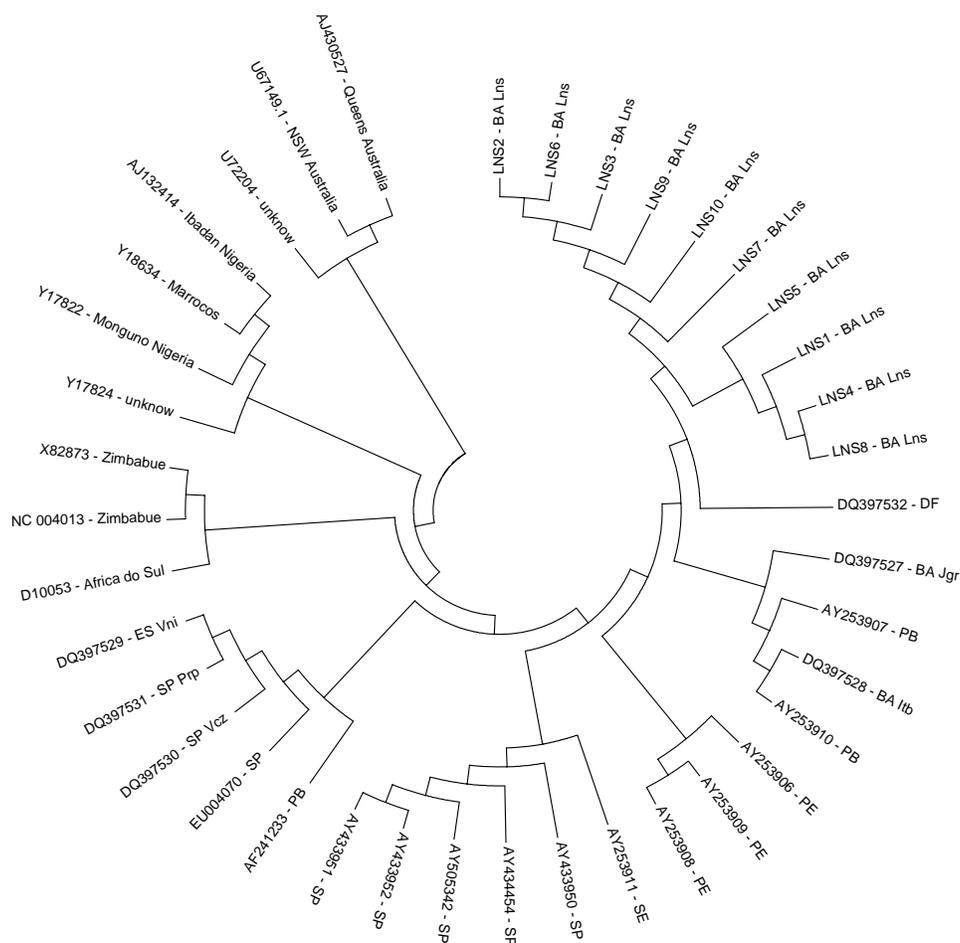


Figura 5 Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos de região codificadora da proteína capsial, homóloga entre todos os isolados, dos isolados de CABMV-LNS e demais isolados de CABMV, SAPV e PWV disponíveis no GenBank. O teste utilizado foi UPGMA com Bootstrap 2000 repetições

Muito embora todos os motivos presentes nesta região do genoma viral tenham sido identificados, há algumas diferenças observadas na literatura com relação a alguns deles. O motivo altamente conservado existente na parte C-

terminal da capa protéica, o AFDF, foi recentemente referido como YAFDFYE (Figura 1), tendo incorporado a soma de três aminoácidos às suas duas extremidades (ZHENG et al., 2008). O motivo DAG, responsável pela transmissibilidade por insetos, que sempre foi identificado nas proximidades da região N-terminal da capa protéica, foi deduzido estar presente em duas posições num outro potyvírus caracterizado na Malásia (ABDULLAH et al., 2009).

Por ser caracterizado como um isolado de CABMV, a identidade de aminoácidos de U72204, comparada aos isolados aqui estudados, não poderia ser menor do que o limite inferior à encontrada entre isolados de CABMV, como foi identificado. Portanto, ao que parece, a sequência depositada no GenBank U72204 provavelmente não é de material virológico de CABMV. Além disso, o alinhamento local básico realizado com a sequência de nucleotídeos deste isolado determina 98% de sua identidade com *Bean common mosaic virus* (BCMV) e 96% de sua identidade com *Blackeye common mosaic virus* (BICMV).

Segundo a literatura especializada, somente sequências que apresentam identidade de nucleotídeos menor que 76% e identidade de aminoácidos inferior a 80% são consideradas espécies diferentes para a maioria dos vírus (ADAMS; ANTONIE; FAUQUET, 2005), assim como foi relatado para o *East asian passiflora virus* (IWAI et al., 2006). Além disso, em ambas as árvores filogenéticas, este isolado se agrupa juntamente com o PWV e não com os isolados de CABMV como deveria. Filogeograficamente, estes mesmos resultados foram confirmados, demonstrando que as mutações existentes entre U72204 e PWV promovem uma divergência genética muito inferior entre eles do que deste isolado com os isolados de CABMV até então estudados.

O alinhamento local básico (BLAST) demonstrou que todos os dez isolados pertencentes a este estudo apresentaram identidade máxima (até 94%) com o isolado da referência DQ397532. A sequência de nucleotídeos de

DQ397532, disponível no GenBank, pertence a um isolado de CABMV oriundo da região do Distrito Federal. Como Livramento de Nossa Senhora é um dos maiores pólos de produção e distribuição de maracujá na Bahia (tanto de frutos quanto de mudas) e está numa região que tem ligações rodoviárias e comerciais com Brasília, há possibilidades de que a ocorrência do mesmo isolado viral em ambas as regiões possa ser devida ao transporte de material infectado entre as cidades.

O agrupamento filogenético de isolados provindos de uma mesma região geográfica parece estar muito relacionado à sua sequência de nucleotídeos. Indícios de agrupamento filogenético de isolados provenientes de uma mesma região já foram sinalizados em estudos anteriores, nos quais foram analisados isolados de CABMV dos Estados de Pernambuco, Paraíba e Sergipe (NASCIMENTO et al., 2006). Nesses estudos, os isolados pertencentes a um mesmo Estado sempre se agrupavam num mesmo ramo filogenético, enquanto ramos distintos eram definidos pelos isolados de estados diferentes.

A separação dos isolados por haplótipos relacionados à origem geográfica, auxiliada pela observação e análise estatística dos eventos mutacionais entre os haplótipos, pode fornecer informações preciosas sobre a origem, ancestralidade e evolução de um vírus. Paralelamente, de posse de informações complementares, há possibilidades de estimar a origem/divergência de novas linhagens de um vírus e definir, com grande aproximação, o tempo em que esta divergência ocorreu (GIBBS; TRUEMAN; GIBBS, 2008).

O agrupamento filogenético diversificado das sequências disponíveis no GenBank corrobora a separação geográfica, já aventada pela observação prévia das sequências depositadas no banco de dados que representarem (i) materiais virológicos de diferentes regiões de um mesmo continente ou país, sobretudo, (ii) de diversas regiões do planeta e, possivelmente, (iii) apresentarem muitos pontos de mutação correlacionados às suas respectivas regiões.

Estudos com *Rice yellow mottle virus*, na África, demonstraram que as distâncias geográficas muito grandes, que separam sítios de coleta de diferentes isolados, estão consistentemente associadas às altas distâncias genéticas evidenciadas entre os diferentes isolados virais (ABUBAKAR et al., 2003).

Análises mais específicas voltadas para as mutações entre os haplótipos, que definem origens geográficas diferentes, constituem uma boa estratégia para discriminação de populações virais. Evidências identificadas em pesquisas realizadas com *Turnip mosaic virus*, na qual os autores estudavam populações virais do leste asiático, demonstraram que populações consideradas diferentes eram, na verdade, parte de uma mesma população, porém com uma linhagem emergente em escala de divergência recente. A constatação é de que esta linhagem emergente ocorreu no Japão, mas não na China, o que demonstrou a emergência devida às diferenças geográficas (TOMITAKA; OHSHIMA, 2006).

Nesse sentido, é relevante atentar-se para possíveis padrões de migração que possibilitariam o surgimento de novas linhagens, estirpes e, provavelmente, espécies virais. Tomando como exemplo o BCMV, alguns modelos aventados para a origem da espécie sugerem que o vírus é original do sul e leste asiático, mas que houve migrações para a Austrália, Oceania e para o oeste asiático (GIBBS; OHSHIMA, 2010), dando origem às novas variantes deste vírus ou espécies.

Investigações futuras mais criteriosas podem também sugerir melhor sobre a origem do CABMV, já que o seu ancestral pode ter sido o PWV da Austrália, tomando por base as relações filogenéticas demonstradas em vários estudos citados neste trabalho. A identificação de novas estirpes e espécies na Ásia, regiões sul e norte da África e, por fim, no Brasil somente após o primeiro relato do PWV Australiano (MCKNIGHT, 1953) pode ser um indício para tal. A árvore filogenética demonstra o agrupamento de diferentes isolados segundo a sua região geográfica de origem. Porém, isolados pertencentes a regiões

geográficas diferentes formando o mesmo haplótipo e que apresentam identidade de nucleotídeo alta podem ser evidência de migração de isolados.

O agrupamento diferenciado dos isolados LNS-5 e LNS-7 com relação aos outros nove isolados deste estudo promove a interpretação de que mutações na região codificadora podem tê-los diferenciado dos demais, já que apenas a ORF do gene da capa protéica foi utilizada para a análise filogenética. Adicionalmente, o fato de os isolados serem integrantes de uma pequena população, oriunda de uma mesma região geográfica, porém provindos de pontos de coleta separados uns dos outros por alguns quilômetros, conduz à idéia de que pode haver pequenas diferenças intra-populacionais devidas à alta taxa de mutação exibida pelos potyvírus (DOMINGO; HOLLAND, 1997).

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, N. et al. Nucleotide sequence of the coat protein gene of the *Malaysian Passiflora virus* and its 3' non-coding region. **American Journal of Applied Sciences**, New York, v. 6, n. 9, p. 1633-1636, Sept. 2009.

ABUBAKAR, Z. et al. Phylogeography of Rice yellow mottle virus in África. **Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 3, p. 733-743, Mar. 2003.

ADAMS, M. J.; ANTONIE, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 3, p. 459-479, Mar. 2005.

ARABIDOPSIS FUNCTIONAL GENOMICS CONSORTIUM. **Total RNA isolation**. Disponível em:
<<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2007.

ATREYA, P. L.; ATREYA, C. D.; PIRONE, T. P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Microbiology**, New York, v. 88, n. 17, p. 7887-7891, Sept. 1991.

BARROS, D. R. **Análise comparativa do genoma de dois isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) provenientes de diferentes hospedeiros**. 2007. 67 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

BOXTEL, J.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J. Phylogenetic analysis of two potyvirus pathogens of commercial cowpea lines: implications for obtaining pathogen-derived resistance. **Virus Genes**, Norwell, v. 20, n. 1, p. 71-77, Mar. 2000.

BRAZ, A. S. K. et al. Molecular characterization of two isolates of South African *Passiflora virus* infecting passion fruit in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, n. 3, p. 146, 1998. Abstract.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions, 1209-1216. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1209-1216, 2008.

CHENNA, R. et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3497-3500, July 2003.

DNA baser sequence assembler v2.9 heraclesoftware. Disponível em: <<http://www.DnaBaser.com>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 151-178, Sept. 1997.

GARCÍA-ARENAL, F.; ESCRIU, F.; ARANDA, M. A. Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 1-8, Nov. 2000.

GIBBS, A. J.; OHSHIMA, K. Potyvirus and the digital revolution. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, n. 10, p. 10-19, 2010.

GIBBS, A. J.; TRUEMAN, J. W. H.; GIBBS, M. J. The bean common mosaic virus lineage of potyvirus: where did it arise and when? **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 12, p. 2177-2187, Dec. 2008.

GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Biological, serological and molecular characterization of a strain of Passion fruit woodiness virus (PWV) inducing leaf mottling on some cucurbit species. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 3, p. 256-264, 2004.

HALDEMAN-CAHILL, R.; DARÒS, J. A.; CARRINGTON, J. C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 4072-4079, May 1998.

HANAHAN, D. J. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 2, p. 558-580, Apr. 1983.

IWAI, H. et al. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species East Asian *Passiflora* virus (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 4, p. 811-818, Apr. 2006.

KITAJIMA, E. W. et al. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 4, p. 743-747, Mar. 2008.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, New York, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, June 2009.

MACIEL, S. C. et al. Screening of *passiflora* species for reaction to cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 414-418, 2009.

MCKNIGHT, T. The woodiness virus of the passion vine (*Passiflora edulis Sims*). **Queensland Journal of Agricultural Science**, Brisbane, v. 10, p. 4-35, 1953.

MLOTSHWA, S. et al. The genomic sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus and its similarities with other potyviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 6, p. 1043-1052, June 2002.

MOREIRA, C. N. **Caracterização de isolados virais associados ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) provenientes de Livramento de Nossa Senhora, Bahia.** 2008. 27 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

NASCIMENTO, A. V. S. et al. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 378-383, jan./fev. 2004.

_____. Cowpea aphid borne-mosaic virus (CABMV) is widespread in Passion fruit and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 9, p. 1797-1809, Sept. 2006.

NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Genotypes and phenotypes. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 jul. 2010.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Protection between strains of Passion fruit woodiness virus in sunnhemp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 307-311, maio/jun. 2005.

PIO-RIBEIRO, G. et al. Occurrence of cowpea aphid-borne mosaic potyvirus in peanut in Brazil. **Plant Disease**, Quebec, v. 84, n. 7, p. 760-766, July 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 3, 253p.

SANTANA, E. N. et al. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passion fruit woodiness in Brazil. **Virus Reviews and Research - Supplement**, Belo Horizonte, n. 4, p. 153, 1999. Abstract.

SITHOLE-NIANG, I. et al. Sequence of the 3'-terminal of a Zimbabwe isolate of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Archives of Virology**, New York, v. 141, n. 5, p. 935-943, May 1996.

SIVAKUMARAN, K.; SUN, J. H.; KAO, C. C. Mechanism of RNA synthesis by viral RNA-Dependent RNA Polymerase. In: KHAN, J. A.; DIJKSTRA, J. (Ed.). **Plant viruses as molecular pathogens**. New York: Food Products, 2001. p. 147-170.

SOKHANDAN, N.; GILLINGS, M. R.; BOWYER, J. W. Polymerase chain reaction detection and assessment of genetic variation in New South Wales of passionfruit woodiness potyvirus. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 26, n. 3, p. 155-164, 1997.

TAMURA, K. et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

TOMTAKA, Y.; OHSHIMA, K. A phylogeographical study of the Turnip mosaic virus population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 14, p. 4437-4457, Dec. 2006.

VARRELMANN, M.; MAISS, E. Mutations in the coat protein gene of *plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. **Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 3, p. 567-576, Mar. 2000.

YUN, W. S. et al. Variation of potato virus Y isolated from potato, tobacco, pea and weeds in Korea on the C-terminal region of coat protein gene and 3' non-translated region. **Plant Pathology Journal**, Netherlands, v. 18, n. 3, p. 130-137, May 2002.

ZHENG, L. et al. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. **PLOS One**, San Francisco, v. 3, n. 2, p. 1586-1588, 2008.