



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG**

**CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO - CDSA**

**UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA**

**BIOPROCESSOS - UAEB**

**CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**FAGNER JOSÉ DA COSTA OLIVEIRA**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR NA INTERAÇÃO  
MARACUJAZEIRO – POTYVIRUS NA REGIÃO DO CARIRI PARAIBANO**

**SUMÉ - PB  
JUNHO - 2016**

**FAGNER JOSÉ DA COSTA OLIVEIRA**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR NA INTERAÇÃO  
MARACUJAZEIRO – *POTYVIRUS* NA REGIÃO DO CARIRI PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Engenheiro de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Verônica Silva do Nascimento**

**SUMÉ – PB**

**2016**

0482d Oliveira, Fagner José da Costa  
Detecção sorológica e molecular na interação  
maracujazeiro - Potyvirus na região do cariri paraibano. /  
Fagner José da Costa Oliveira. - Sumé: [s.n], 2016.  
39p.

Orientadora: Professora Doutora Ana Verônica Silva do  
Nascimento.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande;  
Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso  
de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Patogenia nas plantas. 3. Método de  
diagnose de fitovirus. 4. Método molecular RT-PCR. 5.  
Bioprocessos. 6. Doenças viróticas das plantas. 7.  
Maracujazeiro - Pomar. 8. Fitovirus - Potyvirus. 9. Virus  
do endurecimento do fruto. 10. Método ELISA. I. Ana  
Verônica Silva do Nascimento. II. Título

CDU 632.38(043.1)

**FAGNER JOSÉ DA COSTA OLIVEIRA**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR NA INTERAÇÃO  
MARACUJAZEIRO – POTYVIRUS NA REGIÃO DO CARIRI PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Engenheiro de Biotecnologia e Bioprocessos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Verônica Silva do Nascimento**

**Orientadora – UFCG/CDSA**

---

**Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz**

**Examinador – UFCG/CDSA**

---

**Prof. Dr. Rafael Trindade Maia**

**Examinador – UFCG/CDSA**

**Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016**

**SUMÉ – PB**

## DEDICATÓRIA

*À Todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para tornar este sonho realidade! A todos que acreditaram no meu potencial, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria das Graças da Costa Silvas e meu Pai, José Oliveira da Silva, que além de ter dado mim a dádiva da vida, foram as principais pessoas que mim apoiaram durante todo esse tempo, tanto de forma emocional quanto financeiramente, pois sem esse apoio com certeza não teriam frequentado nem o primeiro dia de aula.

A dona Zefinha e Nioneide Martins por terem mim acolhido em sua casa, sem nem me conhecerem direito e depois acabaram se transformando em duas mães pra mim em Sumé.

Às minhas irmãs: Wagner, Joséilda e Walberlene, que mim apoiaram, aconselharam e acima de tudo se fizeram presente durante todo esse tempo.

Aos meus irmãos: Wagner, Eslu, Rogerio e Luis Mateus, todos colaborando para minha formação e sempre prontos para mim ajudar no que eu precisasse durante todo esse tempo.

À minha cunhada, Euziberta que acabou se tornando em uma quarta irmã para mim e sempre mim aconselhando e apoiando nessa caminha de cinco anos em Sumé.

À prefeitura municipal de São José dos Cordeiros, pelo apoio ao longo desses 5 anos de curso.

Aos professores do CDSA em especial a Fabiana Pimentel, Jean César, Joelma Sales, Aldinete Barreto, Ranoel Gonçalves Mérgia Ribeiro, Humberto e Franklin Nóbrega, porque sem o conhecimento, orientação e conselhos deles, essa jornada teriam sido impossível de se completar.

À turminha inseparável: Débora Tavares, Anderson, Luana Camila, Renato Guimarães e Thalita Neves, sem essas pessoas para conversa, lamentar-se, chorar, abraçar de alegria, fazer comentários sem sentidos, em fim, pra compartilhar os bons e ruins momentos ao longo de todo esse tempo, o que tornou esses anos mais agradáveis e suportáveis. Débora a menina que mais vi dormindo durante o curso, aonde se encostava pegava no sono, mais uma grande amiga e muito inteligente. Luana a mais inteligente da sala e também a mais dramática que conheço, uma pessoa muito carinhosa e sensível. Thalita uma amiga pra todas as horas, mas vivia querendo bater em minha pessoa. Renato um rapaz muito crítico e chato as vezes, mas

um grande amigo durante o curso. Anderson bom amigo durante esse tempo, muito organizado.

À baixinha que mais quero bem, Rosilândia Almeida pelos momentos que mim fez rir e pelo companheirismo durante todo esse tempo.

À Izabela Campos uma das meninas mais brava que conheço, mas também uma das mais bonita e sincera que conheço também. Sempre pude contar com ela ao longe desses anos.

Aos Africanos João Socorro e Sendy Alves, amigos que sempre pude contar ao logo desses anos. Sendy é um ninja em tudo.

Aos meus colegas de curso, Jessica Bandeira, Ozires, Daniel, William, Lorrany, Erika, Joanny, Jessica, Lorena, Edgleiga, Magali Vanessa Oliveira e Vanessa Fárias.

À minha orientadora, Professora Ana Verônica, pela paciência e por ter mim orientado durante esse tempo.

Agradeço a todos que torceram por mim e se fizeram presente ao longo de todo esse tempo.

Muito Obrigado!!!

*Viver enquanto é tempo - Deus é a luz, e agradável para os olhos ver o sol. Se o homem viver por muitos anos, procure desfrutar de todos eles; mas lembre-se dos dias sombrios, que serão muitos, pois tudo o que acontece é fugaz.*

*Jovem, alegre-se na sua juventude e seja feliz nos dias da mocidade. Siga os impulsos do seu coração e os desejos dos olhos. Contudo, saiba que Deus vai pedir contas a você de todas essas coisas. Expulse a melancolia do seu coração e afaste do seu corpo a dor, porque a juventude e os cabelos negros são fugazes*

*(Eclesiastes, cap. 11, versículos 7-10. )*

## **DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR NA INTERAÇÃO MARACUJAZEIRO – POTYVIRUS NA REGIÃO DO CARIRI PARAIBANO.**

### **RESUMO**

Atualmente verifica-se uma carência de estudos que visem detectar o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cariri Paraibano. Neste contexto, estudos para identificar o potyvírus associado a esta virose nas plantações dos produtores locais contribuem para direcionar estudos futuros baseado no manejo dos pomares. O método ELISA constitui um teste relativamente fácil e de alta sensibilidade na identificação de fitovírus, juntamente com o teste molecular RT - PCR para confirmar os resultados obtidos. Estes métodos na diagnose de vírus em plantas quando utilizados juntos constituem-se uma das formas mais seguras na detecção do agente casual da patogenia nas plantas. Diante disso a análise dos resultados identificou que em todos os municípios em que as amostras foliares do maracujazeiro foram colhidas apresentaram infecção pelo vírus CABMV. O teste Elisa Indireto houve reação positiva tanto para o antissoro CABMV quanto para o antissoro PWV, mas não houve reação positiva para o antissoro CMV, indicando não haver ocorrência desse patógeno na região. No teste RT – PCR com a utilização de um “primer” específico para identificação da proteína da capa proteica do CABMV identificou a presença deste fitovírus em todas as amostras que houve reação positivo para o antissoro CABMV no teste ELISA indireto.

**Palavras-chave:** Potyvirus. ELISA indireto. RT-PCR.

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR NA INTERAÇÃO  
MARACUJAZEIRO – POTYVIRUS NA REGIÃO DO CARIRI PARAIBANO**

**ABSTRACT:**

Currently there is a lack of studies aimed at detecting the virus hardening of the fruits of passion fruit in Cariri Paraibano. In this context, studies to identify the potyvirus associated with this virus in the plantations of local producers contribute to direct future studies based on the management of orchards. The ELISA method is a relatively easy and high sensitivity in phytovirus identification test, together with the molecular test RT - PCR to confirm the results. These methods in the diagnosis of virus in plants when used together constitute one of the safest forms the casual agent of detecting the pathogen in plants. Thus the analysis of the results identified that in all municipalities where the leaf samples of passion fruit were harvested showed infection CABMV virus. Elisa Indirect test was positive reaction for both CABMV antiserum and for the PWV antiserum, but there was no positive reaction for CMV antiserum, indicating no occurrence of this pathogen in the region. In testing RT - PCR with the use of a "primer" specific for identification of the protein of the protein identified the presence CABMV this case phytovirus in all samples was positive reaction to the CABMV antiserum in indirect ELISA.

**Keywords:** Potyvirus. ELISA indireto. *Cowpea aphid-borne mosaic vírus*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fruto do maracujazeiro (A), colhido de um plantio de um produtor rural do município de Serra Branca – PB; Folha do pé de maracujá – amarelo (B), de um plantio na cidade de Sumé – PB; Fotos da flor de maracujazeiro (C e D) sendo polinizada pela abelha popularmente conhecida com mangangá ( <i>Xylocopa</i> spp., <i>Apidae</i> ).....	18
Figura 2 - Visualização em microscopia eletrônica de partículas flexuosas e alongadas de potyvírus. ....	21
Figura 3 - Esquema do genoma do Potyvírus e sua codificação na poliproteína de aproximadamente 350 kDa e sua codificação nas nove proteínas. ....	22
Figura 4 - Placa de microtitulação utilizada no teste ELISA. ....	24
Figura 5 - Ilustração do teste ELISA indireto.....	25
Figura 6 - Plantas de maracujazeiro amarelo exibindo sintomas do endurecimento dos frutos coletadas nos municípios do Cariri Paraibano: A e B – amostra coletadas no município de São José dos Cordeiros; C – amostra coletadas no município de Serra Branca e D, E e F – amostras coletadas no município de Sumé.....	30
Figura 7 - Detecção viral pelo teste ELISA indireto de amostras coletadas em diferentes municípios Paraibanos. Amostras 1-3 foram coletadas no município de São José dos Cordeiros, amostras 4-6 foram coletadas no município de Serra Branca e amostras de 7- foram coletadas no município de Serra Branca e amostras de 7- foram coletadas no município de Sumé e a amostra 12 é o controle negativo (Planta sadia). ....	32
Figura 8 - Gel de RNA das amostras de reação positiva no teste ELISA indireto. ....	33
Figura 9 - Análise eletroforética das bandas amplificadas com os primers desenhados para o Cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV). Amostras selecionadas a partir do resultado sorológico (ELISA indireto) positivo para o vírus CABMV.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de maracujazeiro coletadas para diagnóstico.....	27
Tabela 2 - Valores médios de absorvância a 405 nm obtidos em ELISA indireto para identificação dos vírus isolados de maracujazeiro (Passiflora spp.), amostras (1-3) foram coletadas no município de São José dos Cordeiros - PB, amostras (4-6) foram coletadas no município de Serra Branca - PB e amostras (7-11) foram coletadas no município de Sumé –PB e amostra 12 é o controle negativo(Planta sadia.....	31

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CABMV	<i>Cowpea aphid-borne mosaic vírus</i>
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CI	<i>Cylindrical inclusion</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic vírus</i>
CP	<i>Coat protein</i>
EAPV	<i>East asian passiflora vírus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GMV	<i>Gramadilha mosaic vírus</i>
HC-Pro	<i>Helper Component-Protease</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NIa	<i>Nuclear inclusion protein a</i>
NIb	<i>Nuclear inclusion protein b</i>
PFVC	<i>Passion fruit vein-clearing</i>
PFYMV	<i>Cucumber fruit yellow mosaic vírus</i>
PWV	<i>Passion fruit woodiness virus</i>
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

**LISTA DE SÍMBOLO**

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
g/L	Gramas por litro
Kda	Quilo Dalton
M	Molar
t/ha	Toneladas por hectares

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Importâncias da cultura do maracujazeiro .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Viroses do maracujazeiro .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Métodos de diagnose de fitovírus .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.1 Método Sorológico ELISA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2 Método molecular RT-PCR.....</b>	<b>25</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Coleta das amostras.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Teste Elisa indireto .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Diagnóstico molecular .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.1 Extração de RNA e Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase - PCR.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Gel de Agarose 1% .....</b>	<b>28</b>
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Avaliações dos sintomas nas amostras coletadas .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2 Extração de RNA e Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR.....</b>	<b>33</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui um grande número de espécies, mais de 400, sendo que cerca de 120 são nativas do Brasil (BERNACCI, 2003). Aproximadamente 95% do cultivo comercial de maracujá do país se detêm em uma única espécie, o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis*), isso se deve, pelo fato dessa espécie possuir alta produtividade, vigor, rendimento em suco e alta qualidade de seus frutos (CUNHA; BARBOSA, 2002). O cultivo de maracujá de forma comercial no Brasil iniciou-se em 1970 e com dez anos depois o Brasil possuía uma área colhida de 6.590 ha com uma produtividade média de 11,112 t/ha, sendo que hoje o rendimento médio da cultura é de apenas 14,84 t/ha, podendo chegar a até 200 t/ha. O baixo rendimento da cultura de maracujá no país deve-se principalmente a falta de controle de doenças, provocando grandes prejuízos na lavoura. O Brasil situa-se como o maior produtor de maracujá do mundo com uma produção de 838.244 t do fruto, sendo que a região nordeste em conjunto com a região sudeste é responsável por 74,5% dessa produção (IBGE, 2014).

Dentre as doenças que atacam a cultura de maracujá no país, as viroses são as mais importantes, pois se propagam muito rápido por todas as regiões do Brasil, sendo a mais importante doença para essa cultura, o vírus do endurecimento dos frutos. O vírus do endurecimento dos frutos causa grandes prejuízos para os produtores de maracujá, pelo fato de está disseminado por todo o país e seu difícil controle nas plantações. É causado tanto pelo *Passion fruit woodiness virus* (PWV) como pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), doenças que vem tornando a cultura anual, em virtude da alta incidência, antes a cultura era perene e cultivada pelo menos três anos consecutivos, mas a alta contaminação por esta virose torna inviável manter a plantação por mais de um ano (CAVICHOLI *et al.*, 2011).

A disseminação do CABMV e PWV se dá por meio de afídeos (Pulgões) que, durante a picada de prova da alimentação, transmite o vírus. A disseminação pode ocorrer também por mudas contaminadas por ferramentas utilizadas nos tratamentos culturais e por microenxertia. O controle dessa doença se dá através de medidas preventivas como cuidados durante a produção de mudas, áreas de plantio e manejo cultural para evitar a rápida propagação da doença no plantio (SANTANA *et al.*, 2008).

Inicialmente, o endurecimento dos frutos do maracujá foi detectado em regiões produtoras do Brasil na década de 1970, sendo originalmente descrito na Austrália e era

atribuído ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV) pertencente ao gênero *Potyvirus*, família *potyviridae*. Estudos moleculares comparando sequências do gene da capa proteica de isolados brasileiros demonstraram alta identidade genética com o CABMV, indicando não ser o PWV o causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil (NICOLINI, 2011). Portanto a observação do sintoma não é suficiente para indicar com segurança o agente causal da doença (ANJOS *et al.*, 2001).

Os sintomas característicos do endurecimento dos frutos podem ser causados tanto pelo vírus PWV quanto o CABMV, mas estudos moleculares usando a comparação de sequências de nucleotídeos do gene da capa proteica e da região terminal 3' em que havia sido relatado o PWV como agente causador da doença, revelaram que o CABMV é o principal, senão o único, agente causador da doença no Brasil (BARROS, 2007).

Apesar dos prejuízos acarretados em diversas culturas, que incluem o maracujazeiro no Brasil, verifica-se uma carência de estudos baseados em identificar, o vírus causador do endurecimento dos frutos em maracujazeiro na região do Pariri paraibano, tendo em vista que a definição do agente casual permitirá uma elaboração de estratégias para o seu combate e manejo nas condições locais. Com isso, torna-se necessário efetuar um levantamento de graus de incidência de vírus em pomares de maracujazeiro amarelo, em diferentes pomares da região do Cariri paraibano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Identificar isolados de *potyvirus* induzindo endurecimento dos frutos em maracujazeiro, coletados em áreas de pequenos produtores do cariri paraibano.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar amostras foliares de plantas de maracujá-amarelo com sintomas da doença do endurecimento dos frutos, localizadas em plantações de pequenos produtores de maracujá na Paraíba.
- Realizar teste sorológico ELISA indireto.
- Realizar a RT-PCR com “primer” específico.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Caracterização e importâncias da cultura do maracujazeiro

As espécies de maracujazeiros (*Passiflora spp.*) pertencem à família *Passifloraceae*, está dividida em duas tribos: Paropsieae e Passiflorieae. A tribo Passiflorieae está representada no continente latino americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L.. Atualmente há descrição de aproximadamente 630 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, mas apenas cerca de 60 espécies são comestíveis, sendo que no Brasil apenas 10 são usadas para produção comercial. Entre as mais populares estão *Passiflora Edutilis sims* (maracujá - roxo), *P. edilis Sims f. flacicarpa Deg.* (maracujá - amarelo ou Maracujá - azedo) (ANJOS, JUNQUIRA & CHARCHAR, 2001).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira herbácea, possui gavinhas, apresenta alto vigor vegetativo, crescimento rápido e contínuo, com ramos de 5 a 10 m de comprimento (figura 1 B). Há necessidade de condução específica em sistemas de exploração comercial. As folhas são alternadas e simples (*P. edulis f. flacicarpa*), raramente compostas (*P. cirrhiflora*). As espécies do gênero *Passiflora* apresentam flores hermafroditas. Na estrutura masculina, se encontram cinco estames, em cujas extremidades estão as anteras e os grãos de pólen, apresentados na figura 1 (C e D). A lâmina apresenta nervuras secundárias ao longo da nervura principal ou nervuras que partem de sua base (WEBER, 2013).

**Figura 1** - Fruto do maracujazeiro (A), colhido de um plantio de um produtor rural do município de Serra Branca – PB; Folha do pé de maracujá – amarelo (B), de um plantio na cidade de Sumé – PB; Fotos da flor de maracujazeiro (C e D) sendo polinizada pela abelha popularmente conhecida com mangangá (*xylocopa spp., apidae*).



Fonte: A autoria do autor.

Entre suas funcionalidades destaca-se o seu alto valor econômico, devido suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais. O seu principal uso está na alimentação humano, caracterizando-se um alimento de elevado valor nutritivo e medicinal devido suas propriedades calmantes (BARBOSA, 2012). O maracujá é mais consumido na forma de sucos, mas já foi considerada uma fruta de pomar doméstico durante muitos anos, em razão de suas propriedades medicinais. Seu valor comercial foi descoberto bem mais tarde, na década de 60, quando os primeiros pomares paulistas foram instalados (MELETTI, 2011).

O cultivo em escala comercial do maracujá-amarelo no Brasil teve início na década de 1960 com grande expansão a partir da década de 1980 com uma área colhida de 6.590 hectares, hoje o Brasil ocupa o primeiro lugar em termos de produção mundial de maracujá

com uma área colhida de 57.277 ha (IBGE, 2013). O Nordeste seguiu como a maior região produtora de maracujá do país com uma produção de 622.036t do fruto (IBGE, 2013). Em segundo lugar fica o Sudeste, também considerando área e produção, sendo que Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo têm participações muito semelhantes. As demais regiões, hoje, estão praticamente com áreas e produções iguais, com ligeira vantagem para o Sul. A produção conjunta de Nordeste e Sudeste representa mais de 70% da produção brasileira.

Segundo José Rafael da Silva, engenheiro agrônomo e diretor do Viveiro Flora Brasil, a produção brasileira cresceu muito nos últimos anos, mas também oscila bastante. No entanto, os recuos de produção quase sempre permanecem muito próximos do último pico, mostrando que o maracujá faz parte da dieta do brasileiro (LINS, 2014). Mesmo com um investimento inicial elevado esta cultura representa uma boa opção para os pequenos produtores de maracujá, pois oferece um retorno econômico rápido e distribuído pela maior parte do ano. A maioria das outras frutas leva alguns anos para entrar em produção, o que é incompatível para produtores descapitalizados que necessitam de retorno econômico rápido (MELETTI et al., 2010).

Com o aumento da área plantada no país e a concentração de grandes pomares de maracujá em determinadas regiões, têm aumentado a incidência e disseminação de várias doenças e pragas, reduzindo o período de vida útil dos pomares Brasileiros de seis para dois anos. A alta suscetibilidade dos pomares de maracujá a doenças e pragas vem acarretando em redução e posterior diminuição da área plantada em importantes estados produtores, como no estado de São Paulo por exemplo.

Um dos fatores que vem afetando a produção do maracujá são as doenças, principalmente as viroses que vem inviabilizando a produção, tornando a cultura itinerante. Pelo menos em São Paulo, que um dos estados que mais produz maracujá no país, a maioria dos produtores deixaram ou estão deixando de produzir o fruto, em razão da perda de produtividade, e conseqüentemente devido aos prejuízos que ocorrem na lavoura. Assim, apesar dos bons preços que o fruto tenha alcançado nos últimos anos, a produtividade não tem compensado, principalmente a partir do segundo ano da cultura (NARITA, 2012).

### **3.2 Viroses do maracujazeiro**

Há relatos de que pelo menos 9 vírus infecta o maracujá em condições naturais, dos quais, 6 foram relatados no Brasil : vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro;

(“Cowpea aphid-borne mosaic vírus” - CABMV), o vírus do mosqueamento amarelo brilhante das folhas; (“Cucumber mosaic vírus” - CMV ) o vírus do mosaico do pepino (“Cucumber fruit yellow mosaic vírus” - PFYMV); o vírus do enfezamento do maracujazeiro (“*Passion fruit vein-clearing*” - PFVC ); o vírus do mosaico do maracujá-roxo (“*Gramadilha mosaic vírus*” -GMV) e o (*Passion fruit woodiness virus* (PWV)) (FAPESP, 2013).

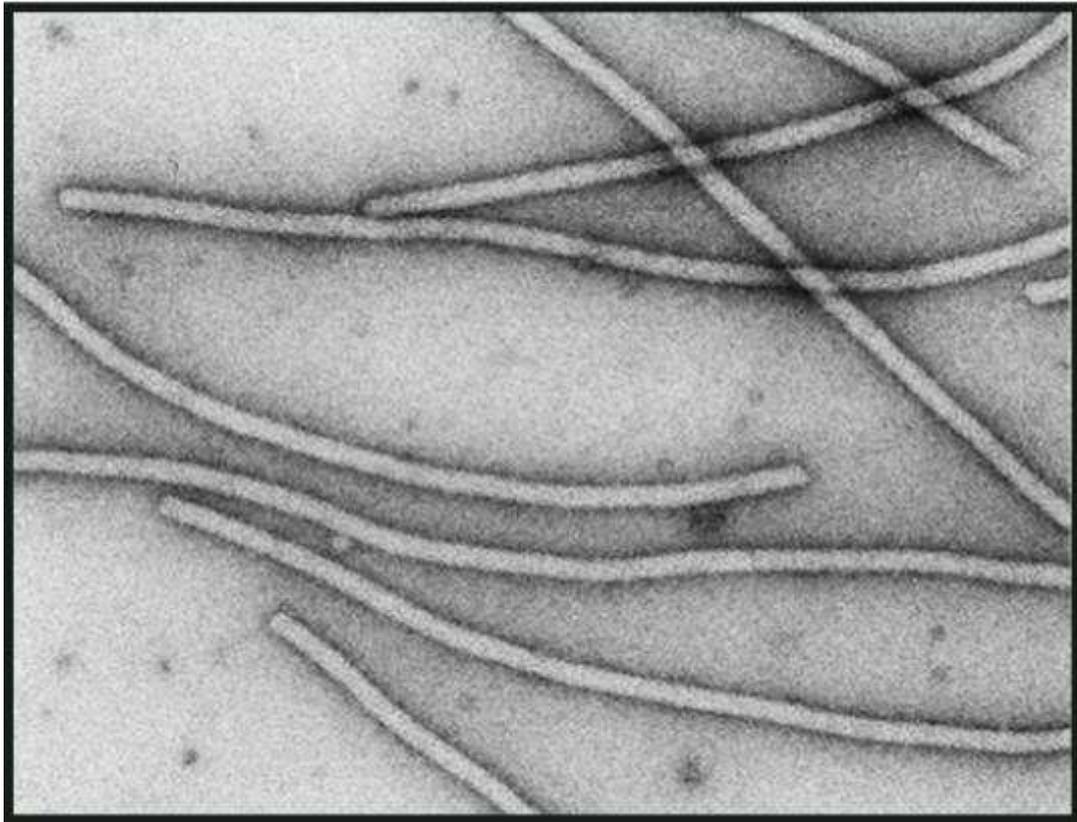
Esses vírus pertencem a família *Potyviridae* que constitui uma das maiores e mais importantes famílias de vírus que infectam plantas no mundo, sendo encontradas praticamente em todas as regiões do globo infectando mais de 2.000 espécies de plantas de mais de 550 gêneros em 81 famílias botânicas, causando perdas enormes em diversas culturas comerciais pelo mundo, chegando a superar as perdas causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto (ALESSANDRO, 2000; FAUQUET *et al.*, 1995). A família *Potyviridae* está dividida em 7 gêneros: *Potyvirus* (maior gênero), *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus*, *Tritimovirus* e *Brambyvirus* (BERGER *et al.*, 2000).

As viroses que afetam o maracujazeiro é o principal problema enfrentado pela cultura no Brasil, pois prejudicam a produtividade e ameaçando a expansão da cultura. O primeiro relato de um vírus causando o endurecimento dos frutos do maracujá ocorreu na Austrália em 1901, quando foi denominado PWV (GARCÊZ, 2012). No Brasil o endurecimento do fruto do maracujá foi inicialmente atribuído ao PWV, Nicolli (2011) cita que estudos moleculares comparando sequências do gene da capa proteica de isolados brasileiros apresentaram alta identidade genética com o CABMV, indicando não ser o PWV o causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro do Brasil. No Japão e Taiwan, foi encontrado o East asian passiflora vírus (EAPV) infectando maracujazeiros, através de estudos moleculares foi reconhecido como uma nova espécie de potyvírus como agente causador do endurecimento dos frutos (NICOLINI, 2011).

Os vírus da espécie *potyvirus* são normalmente transmitidos naturalmente de maneira não persistente ou estiletar por várias espécies de afídeos (pulgões), principalmente o *Myzus persicae* Sulzer, durante a picada de prova da alimentação acabam transmitindo o vírus para o maracujazeiro, também podem ser transmitidos mecanicamente através das ferramentas utilizadas na poda das plantas e tão importante quanto à transmissão por afídeos é a que ocorre através de mudas contaminadas e principalmente as assintomáticas (GARCEZ, 2008; SANTANA *et al.*, 2008).

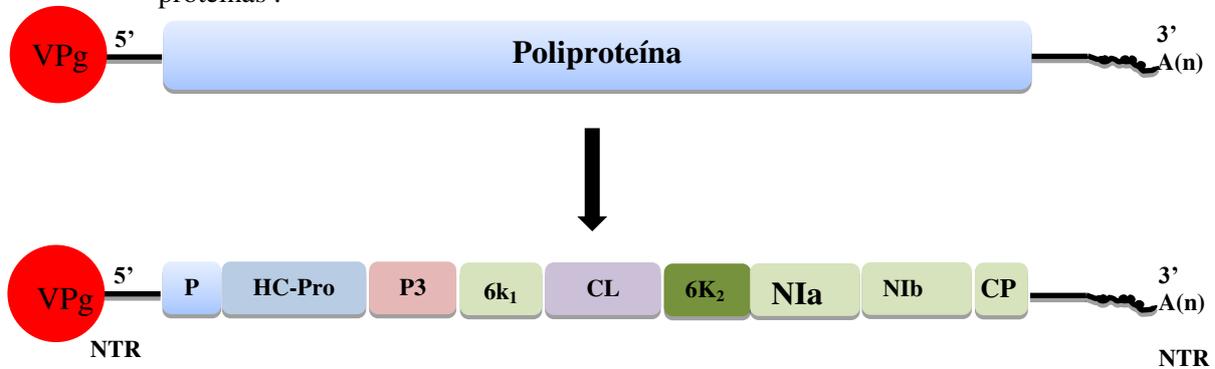
Os vírus desse gênero são caracterizados por apresentarem partículas alongadas e flexuosas com cerca de 750 x 15 nm (Figura 2). Seu genoma é constituído exclusivamente por uma molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com cerca de 10.000 nucleotídeos e uma única fase aberta de leitura (Open Reading Frame, ORF) principal que codifica uma poliproteína percussora de aproximadamente 350 kDa. A partir dessa poliproteína, são codificadas oito proteínas: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6k2, NIa, NIB e CP (Figura 3). Além disso, há uma segunda e pequena ORF, denominada PIPO, com cerca de 60 códons, sobreposta na região do genoma correspondente à proteica P3 (CHUNG *et al.* 2008)

**Figura 2** - Visualização em microscopia eletrônica de partículas flexuosas e alongadas de potyvírus.



Fonte: Shukla et al., 1989.

**Figura 3** - Esquema do genoma do *Potyvirus* e sua codificação na poliproteína de aproximadamente 350 kDa e sua codificação nas nove proteínas .



Fonte: Adaptada, SHUKLA *et al.*, 1989.

As 10 proteínas funcionais são clivadas através da atividade das proteases, como a P1 e HC-Pro que clivam apenas seus respectivos C-terminais, o restante dos sítios proteolíticos são processados pela protease NIa-pro e a NIB é um RNA dependente de RNA polimerase. Ambas atuam na formação de inclusões nucleares.

A NIa-Pro é uma proteína de inclusão nuclear, que se agrega no núcleo das células infectadas na forma de inclusões cristalinas, foi determinada como sendo responsável por diversas clivagens ao longo da cadeia poliprotéica viral (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1987)

A proteína P1 tem função de protease e também atua como fator de amplificação do genoma. Como protease a P1 atua na clivagem de seu próprio terminal carboxílico e também pode estar envolvida no acúmulo de partículas e na infectividade do vírus (VERCHOT; CARRINGTON, 1995)

A P3 é uma proteína que não é essencial na replicação, porém juntamente com a P1 e HC-Pro, são consideradas fatores de amplificação do genoma viral, por aumentarem a taxa da replicação (ZERBINI & ZAMBOLIM, 1999).

A proteína CI e a NIB atuam juntas na formação de corpos de inclusão citoplasmáticos e na ativação da helicase (CARRINGTON *et al.*, 1998; KNUHTSEN *et al.*, 1974). Essas inclusões citoplasmáticas são do tipo “cata-vento”, característica da infecção por membros da família *Potyviridae*. A CI também atua no movimento célula-a-células do vírus e catalisa

processos enzimáticos essenciais durante a replicação do vírus no hospedeiro (CALDER & INGERFELD, 1990).

A proteína HC-pro também tem atividade proteinase, clivando seu próprio terminal carboxílico figura 2, e atua juntamente com CI no movimento célula-a-célula e de supressão de silenciamento gênico pós-transcricional (CARRINGTON *et al.*, 1998; PLISSON *et al.*, 2003).

As funções da proteína 6K2 ainda não estão totalmente elucidadas pelos pesquisadores, mas sabe-se que é uma proteína relativamente pequena e possivelmente está envolvida na via de replicação ao reticulo endoplasmático (SCHAAD *et al.*, 1997).

A Proteína CP desempenha funções de encapsidação do RNA viral, movimento célula-a-célula e transmissão pelo inseto vetor (afídeos) (ANDREJEVA *et al.*, 1999; SIVAKUMARAN; SUN; KÃO, 2001). Apresenta função de encapsidação do genoma (ALLISON; JOHSTON; DOUGHERTY, 1986; VERRELMANN; MAISS, 2000).

No vírus a região 3' do genoma é a não traduzível (3' UTR). Essa região do genoma do vírus está associada a determinação da sintomatologia (RODRIGUEZ-CEREZO; SHAW, 1991), fator acessório à replicação (MAHAJAN; DOLJA; CARRINGHT, 1996), e promotor de replicação do RNA viral (HALDEMANN-CAHILL; DAROS; CARRINGTON, 1998).

### **3.3 Métodos de diagnose de fitovírus**

Para detecção de fitovírus são empregados diferentes métodos de detecção: biológicos, sorológicos e moleculares (ALENCAR, 2011). Os diagnósticos pelo método biológico para detecção de fitovírus são métodos simples e fáceis de serem realizados. Entre as técnicas sorológicas o ELISA (do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou ensaio de imunoabsorção enzimática é mais utilizado devido a sua praticidade e rapidez, podendo ser realizado em grande escala (BERIAN, 1985; DANIELS, 1994; FIGUEIRA 200). Os métodos moleculares são os mais sensíveis em relação aos métodos biológicos e sorológicos devido a alta eficiência e precisão dos resultados obtidos (ALENCAR, 2012).

Técnicas clássicas como quarentena, erradicação, rotação de culturas e sementes/plantas certificadas livre de vírus, são ferramentas ainda muito utilizadas e que apresentam algumas desvantagens por serem dispendiosas e perderem a efetividade ao longo dos anos. Entretanto, é fundamental o diagnóstico correto da virose para adotar medidas

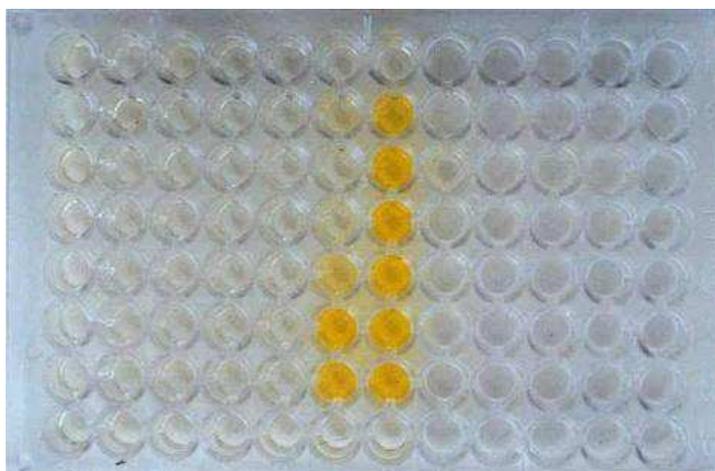
eficientes de controle. O diagnóstico através de testes biológicos (gama de hospedeiro) e sorologia são bastante utilizados no diagnóstico de viroses, sendo de baixo custo, rápido e sensível (LANE, 2002).

### 3.3.1 Método Sorológico ELISA

A sorologia apresenta diversos métodos para detecção viral que se baseia basicamente pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais. De uma forma simplificada, as provas sorológicas envolvem uma reação entre antígeno e anticorpo, utilizando-se o plasma sanguíneo de um animal e, se constituem em um valioso instrumento de pesquisa, por serem altamente específicos e sensíveis (CASTRO & COUTO, 2002).

Um dos métodos sorológico mais comum para detecção de vírus em material vegetal e insetos vetores é o ELISA (Figura 4), utilizado na detecção de vírus em plantas pela primeira vez por Clark e Adams (1977). Neste, os anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um determinado vírus são empregados na sua detecção. Nesta reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado em tampão são utilizados como antígeno.

**Figura 4** - Placa de microtitulação utilizada no teste ELISA.



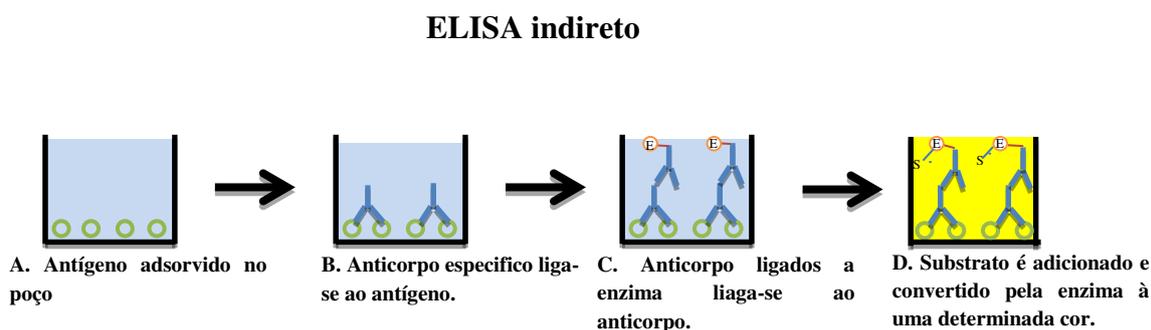
Fonte: Testessorológico.com. Acesso em 2016.

O método ELISA está dividido basicamente em dois tipos, o ELISA direto e o ELISA indireto, ambos se distinguem por um usar IgG simples e o outro usa a IgG conjugada, ambas para o antígeno viral. A conjugação do anticorpo com a enzima torna possível o desenvolvimento de uma coloração nas reações positivas, coloração está devido a reação da enzima com o seu substrato, cuja intensidade é medida por um espectrofotômetro, com filtros

adequados para o comprimento de onda desejado (CLARK & ADAMS, 1997). As enzimas mais empregadas na conjugação com o anticorpo é a fosfatase alcalina e a peroxidase.

Entre os vários modelos de testes ELISA, o mais simples em sua forma, chamado ELISA indireto, constitui-se em um antígeno (para a patologia a ser analisada), aderido a suporte sólido (figura 5), neste caso o antígeno fica aderido aos poços da microplaca. Posteriormente coloca-se o soro nos poços da placa, no qual contêm ou não os anticorpos que se ligarão aos antígenos presente na placa formando o complexo: antígeno – anticorpo. Em seguida adiciona um segundo anticorpo chamado de anti-anticorpo, marcado com uma enzima que reage com o substrato fazendo com que o complexo adquira uma coloração, indicando a presença do anticorpo em questão (WATSON, 2013).

**Figura 5** - Ilustração do teste ELISA indireto.



Fonte: Adaptada Slideplay.com.br, acesso em 2016.

Como suas vantagens o teste Elisa possui alta sensibilidade, sendo capaz de identificar pequenas quantidades de antígenos, correndo um risco menor de um diagnóstico falso positivo, além da facilidade no teste ele é um ensaio altamente específico, fazendo com que varias amostras encarem testes no mesmo momento e tem uma realização bastante rápida, de baixo custo, levando em consideração outros testes de imunodiagnóstico.

### 3.3.2 Método molecular RT-PCR

As técnicas moleculares na diagnose de fitovírus são consideradas de alta eficiência e segurança devido à alta sensibilidade na diagnose. Os Testes moleculares no geral são os mais específicos e precisos, porque não se relacionam apenas com a proteína, como nos métodos sorológicos, mas como o genoma viral, incluindo os genes que codificam as proteínas

(ZERBINI *et al.*, 2006). Estudos através de técnicas moleculares de fitovírus, em especial PCR, começaram a ganhar espaço entre os pesquisadores a partir de 1992 e tem sido utilizada para diversos estudos moleculares (EIRAS *et al.*, 1998). A técnica PCR é amplamente difundida no estudo de patógenos com genoma composta de DNA, sendo aqueles cujo genoma é composto de RNA, utiliza-se RT-PCR que é apenas uma variação da técnica PCR (MACIEL *et al.*; 2009).

O método de RT-PCR se baseia na síntese de inicial de um DNA complementar (cDNA) a um vírus cujo ácido nucleico é o RNA empregando uma transcriptase reversa. As enzimas mais utilizadas são as obtidas do Avian myeloblastosis virus (AMV) e do Moloney murine leukemia virus (MmLV), sendo a primeira mais usada para a síntese de cDNAs de fitas curtas e a segunda, para cDNAs de fita longa, devido à sua baixa atividade de RNAses. Outra enzima que pode ser utilizada como transcriptase reversa é a Tth polimerase, enzima termoestável isolada de *Thermus thermophilus*, que pode tanto ser usada como transcriptase reversa como DNA polimerase, bastando, para isso, ajustar as concentrações de manganês e magnésio (ALMEIDA, 2013).

Após a síntese do cDNA, este é amplificado sucessivamente, com o auxílio da Taq DNA polimerase, na reação denominada reação da polimerase em cadeia (PCR), empregando-se um par de oligonucleotides desenhados para uma região específica, de modo a gerar um fragmento de DNA de tamanho conhecido que, geralmente, é analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SASTRY, 2013).

Os Testes moleculares no geral são os mais específico e precisos, porque não se relacionam apenas com a proteína, como nos métodos sorológicos, mas como o genoma viral, incluindo os genes que codificam as proteínas (ZERBINI *et al.*, 2006). Na diagnose de vírus em plantas o método mais utilizado é a reação de polimerase em cadeia (PCR), o emprego dessa técnica deve-se principalmente pela sua praticidade, eficiência e maior sensibilidade frente a outros testes. A PCR é utilizado para detecção de patógenos cuja sequência de nucleotídeos é composta de DNA. Para patógenos cuja sequencia de nucleotídeos é composta de RNA é necessário fazer a etapa de transcrição reversa (RT) para a síntese do DNA complementar (cDNA) antes da realização da PCR (SANCHES & KRAUSE SAKATE, 2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta das amostras

A coleta do material foi realizada através de visitas em propriedades de pequenos produtores de maracujá-amarelo localizados nos municípios de São José dos Cordeiros, PB, (três amostras), Serra Branca, PB (três amostras) e Sumé, PB (cinco amostras), conforme tabela 1. Foi coletado o material de plantas de maracujá-amarelo que apresentaram algum sintoma típico de infecção por vírus.

As amostras coletas foram postas em pequenos sacos de papel e devidamente identificados com data da coleta, nome do produtor e município onde a amostra foi coletada.

**Tabela 1** – Amostras de maracujazeiro coletadas para diagnóstico.

Amostras	Hospedeiro	Município de coleta
1	Maracujá- amarelo	São José dos Cordeiros, PB
2	Maracujá- amarelo	São José dos Cordeiros, PB
3	Maracujá- amarelo	São José dos Cordeiros, PB
4	Maracujá- amarelo	Serra Branca, PB
5	Maracujá- amarelo	Serra Branca, PB
6	Maracujá- amarelo	Serra Branca, PB
7	Maracujá- amarelo	Sumé, PB
8	Maracujá- amarelo	Sumé, PB
9	Maracujá- amarelo	Sumé, PB
10	Maracujá- amarelo	Sumé, PB
11	Maracujá- amarelo	Sumé, PB

Fonte: Dados do autor

### 4.2 Teste Elisa indireto

A caracterização sorológica foi realizada em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco. O teste ELISA indireto foi realizado em folhas de maracujazeiro apresentando infecção viral contra os vírus: *Cowpea aphid-borne Mosaic Virus* (CABMV), *Passionfruit Woodiness vírus* (PWV) e *Cucumber Mosaic Virus* (CMV). O teste consistiu nas etapas seguintes: A princípio cobriram-se os orifícios da placa com 200 µL da amostra diluída em tampão de cobertura (carbonato de sódio pH 9,6) na proporção 1:10 (1grama da amostra para

10 mL do tampão). Incubou-se por 2 horas a 37°C em câmara úmida, após a incubação seguiu-se, com três lavagens com Tampão PBS, contendo 0,5 ml de Tween 20 e 2 g/L ovalbumina. Em seguida, adicionou-se em cada poço 150 µL da solução de IgG diluído em Tampão de cobertura (pH 9,6) e incubado novamente nas mesmas condições anteriores, seguindo-se novamente três lavagens. Adicionou-se aos orifícios 100 µL da solução anti-IgG, obtida de cabra, conjugada a enzima (Sigma A8025). Realizaram-se os procedimentos de incubação e lavagens descritos anteriormente. Foi adicionado ainda 100 µL do substrato aos orifícios da placa, aguardou-se a formação da coloração até a intensidade desejada (absorbância entre 0,3 e 0,8), finalizou-se, adicionando-se 40 µL de NaOH 3M aos orifícios e efetuou-se a leitura.

### **4.3 Diagnóstico molecular**

#### **4.3.1 Extração de RNA e Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase - PCR**

A extração do RNA foi feito de acordo com a metodologia de Maritan (2004), onde foi usado o vírus purificado usando-se o kit "RNeasy Plant Mini" de acordo com instruções do fabricante (Qiagen). O RNA viral foi empregado como molde para a síntese de cDNA via transcrição reversa, utilizando-se o kit "SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis" (GibcoBRL) e um oligonucleotídeo com uma seqüência de bases timina (poli-T: 5'G-A-C-T-G-G-A-T-C-C T<sub>(14)</sub>3').

A reação de PCR consistiu na amplificação da região codificadora da CP via reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os oligonucleotídeo poli-T em conjunto com um oligonucleotídeo específico, desenhado a partir da sequencia da região codificadora da CP de um isolado de potyvírus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro de Minas Gerais (poty-5: 5'G-C-G-G-G-A-T-C-C-A-T-G-T-C-T-G-A-T-G-G-A-A-A-G-G-A-C-A-A-A-G-A3') (BRAZ, 1999). O ciclo da reação consistiu em desnaturação inicial por 10 min e 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento dos oligonucleotídeos a 47 °C e 2 min de extensão a 72 °C, em um Termociclador MJ Research.

#### **4.3.2 Gel de Agarose 1%**

A preparação do gel de agarose consistiu de 1 grama de agarose e 100 mL de tampão TBE 0,5% (Tris, Borato e EDTA). Após solidificação do gel em cuba eletroforética, as amostras foram aplicadas e coradas com SYBR Green I, comparadas com marcador de peso molecular 1Kb e visualizadas em fotodocumentador.

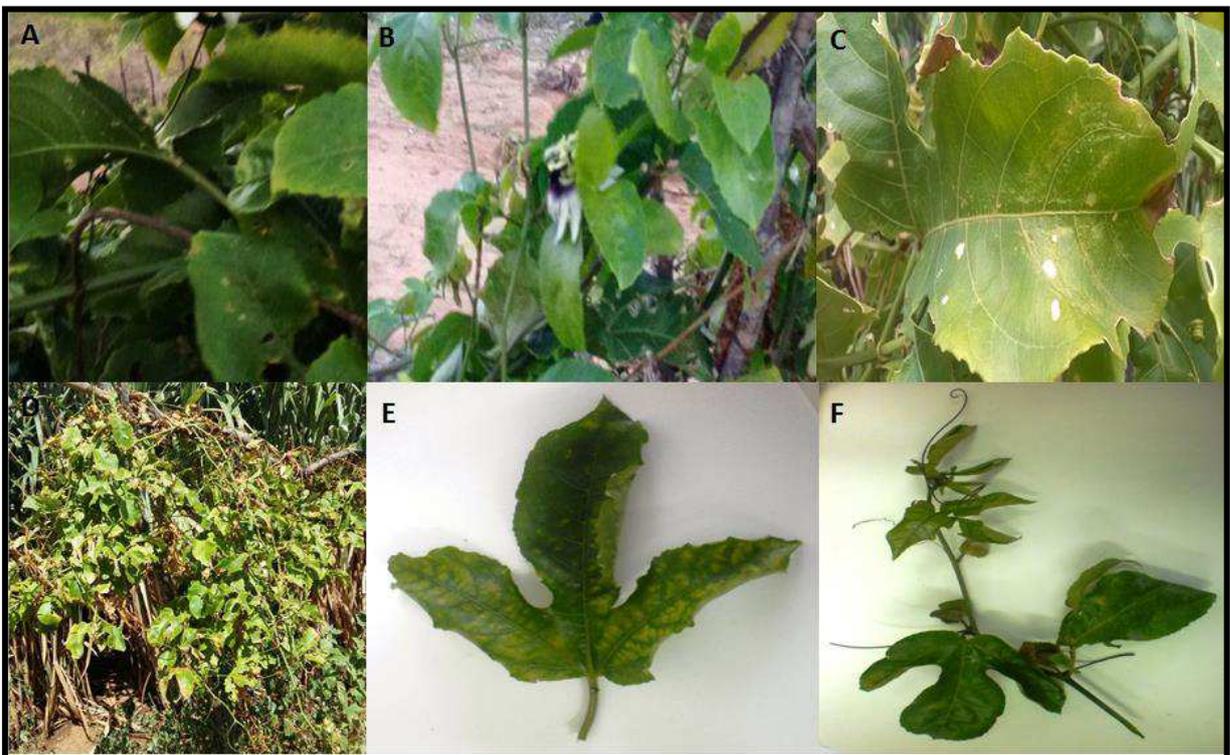


## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliações dos sintomas nas amostras coletadas

As amostras de folhas de maracujazeiro coletadas foram levadas para o laboratório de Biologia Celular e Molecular UFCG/CDSA/UAEB para o prévio diagnóstico. Foi observado que estas, apresentavam sintomas diferenciados de um mosaico suave até mosaico intenso (Figura 6). Este resultado está de acordo com a literatura, quando descrevem os sintomas de infecção do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NASCIMENTO, et al, 2006).

**Figura 6** - Plantas de maracujazeiro amarelo exibindo sintomas do endurecimento dos frutos coletadas nos municípios do Cariri Paraibano: A e B – amostra coletadas no município de São José dos Cordeiros; C – amostra coletadas no município de Serra Branca e D, E e F – amostras coletadas no município de Sumé.



Fonte: Dados do autor

De acordo com a figura acima, podemos observar uma variação de sintomas de infecção do vírus, de mosaico leve ao mosaico severo. A figura A, apresenta um leve mosaico e amarelecimento. Resultados semelhantes são observados nas figuras B, C e D. Entretanto, as figuras E e F apresentaram uma sintomatologia de mosaico severo com deformação foliar e amarelecimento. Embora tenham sido observadas variações na severidade dos sintomas

induzidos, que é bastante comum em amostras coletadas no campo, isso pode ocorrer provavelmente devido o tempo de infecção na interação vírus-hospedeiro.

## 5.2 Caracterização sorológica através do Teste ELISA indireto

Na realização do teste ELISA indireto, foi identificado reação positiva com o antissoro para *Caoupea aphid borne Mosaic Virus* (CABMV) e *Passion fruit woodiness virus* (PWV). Não houve reação sorológica positiva com o *Cucumber Mosaic Virus* (CMV). Resultado semelhante foi obtido por Nascimento e colaboradores (2004), trabalhando com caracterização biológica e sorológica do Potyvírus causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro em amostras coletadas nos estados da Paraíba, Pernambuco e Sergipe.

**Tabela 2** - Valores médios de absorbância a 405 nm obtidos em ELISA indireto para identificação dos vírus isolados de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), amostras (1-3) foram coletadas no município de São José dos Cordeiros - PB, amostras (4-6) foram coletadas no município de Serra Branca - PB e amostras (7-11) foram coletadas no município de Sumé -PB e amostra 12 é o controle negativo(Planta sadia).

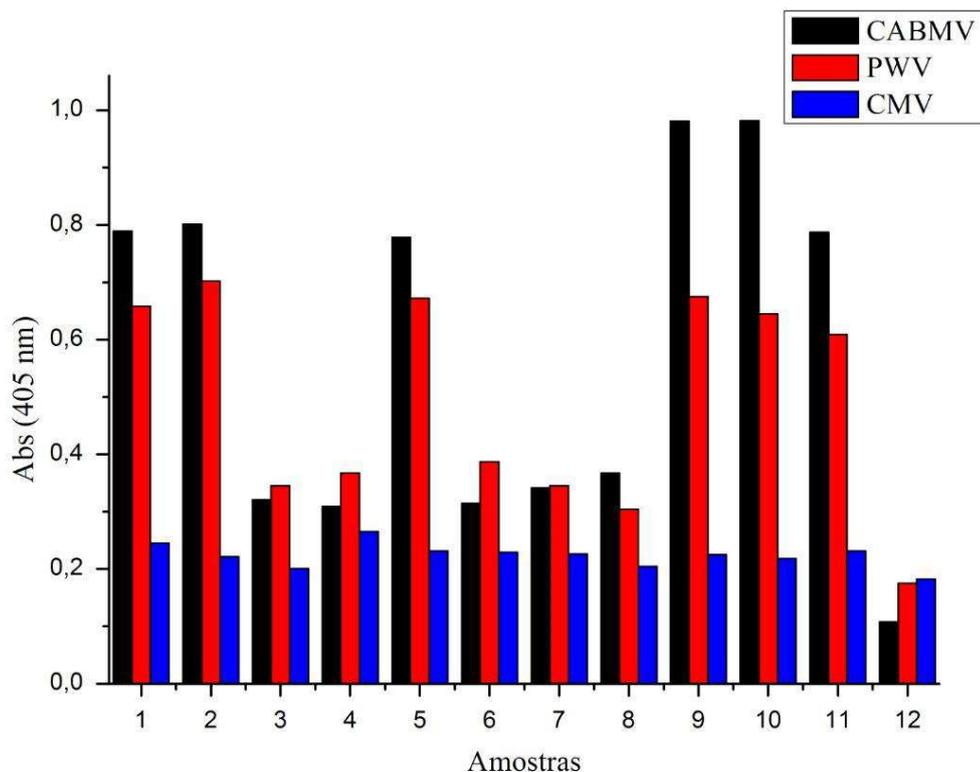
Amostras foliares de Maracujazeiro	Anti-soros		
	CABMV	PWV	CMV
1	0,789	0,658	0,245
2	0,801	0,702	0,221
3	0,321	0,345	0,201
4	0,309	0,367	0,265
5	0,778	0,672	0,231
6	0,314	0,387	0,229
7	0,341	0,345	0,226
8	0,367	0,304	0,204
9	0,981	0,675	0,225
10	0,982	0,645	0,218
11	0,787	0,609	0,231
12	0,108	0,175	0,182

Fonte: Dados do autor.

As amostras 1 e 2 coletadas no município de São José dos Cordeiros-PB apresentaram reação positiva tanto para o CABMV como para o PWV (Figura 5 e Tabela 2 ), indicando a

ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos nesse município. As amostras foliares coletadas no município de Serra Branca-PB, apenas uma ocorreu reação positiva para o vírus CABMV e PWV. Já as amostras 9-11 coletadas no município de Sumé – PB apresentaram reação positiva tanto para CABMV quanto PWV (Figura 7 e Tabela 2).

**Figura 7** - Detecção viral pelo teste ELISA indireto de amostras coletadas em diferentes municípios Paraibanos. Amostras 1-3 foram coletadas no município de São José dos Cordeiros, amostras 4-6 foram coletadas no município de Serra Branca e amostras de 7- foram coletadas no município de Serra Branca e amostras de 7- foram coletadas no município de Sumé e a amostra 12 é o controle negativo (Planta sadia).



Fonte: Dados do autor

Como os vírus CABMV e PWV pertencem à mesma família e espécie de vírus, no teste ELISA indireto pode estar ocorrendo a reação cruzada para esses dois Potyvírus, acarretando em um falso positivo para o PWV. Entretanto, o vírus PWV era considerado a única espécie de Potyvírus causador de endurecimento dos frutos em maracujazeiro no Brasil (INOUE *et al.*, 1995 & COSTA 1996). Estudos de sequenciamento de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsial do PWV de diferentes isolados brasileiros demonstrou que

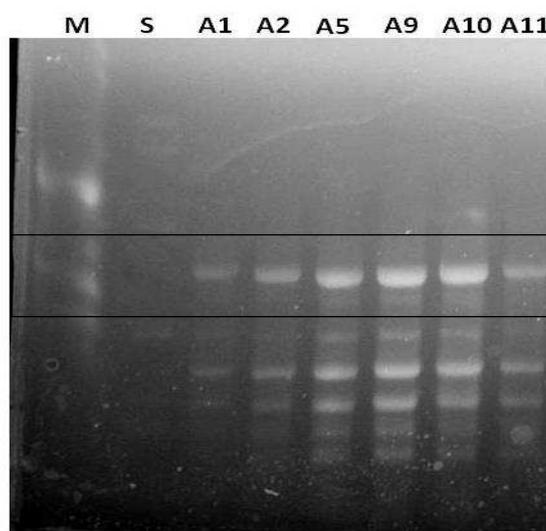
apresentaram alta homologia entre si, mas apresentaram maior homologia com CABMV (SANTANA, 2001).

Ricardo, (2003) relatou que na comparação das sequências da capa protéica e da região terminal 3' não traduzida dos isolados do potyvírus do mosqueado do maracujazeiro com outros potyvírus, foi identificado que aquele potyvírus é na verdade uma estirpe do PWV, mas em análises adicionais observou que os isolados tinham alta identidade com o CABW. Dessa forma, atualmente, existe a necessidade de detecção molecular através de RT-PCR para confirmação da taxonomia da infecção viral.

## 6.2 Extração de RNA e Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR

Na extração de RNA total foram confirmadas as bandas de RNA sem degradação (Figura 8). As bandas iniciais, quando comparadas ao marcador de 1Kb, são as bandas correspondentes as amostras da infecção do vírus.

**Figura 8** - Gel de RNA das amostras de reação positiva no teste ELISA indireto.



Fonte: Dados do autor

## 5.4 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR

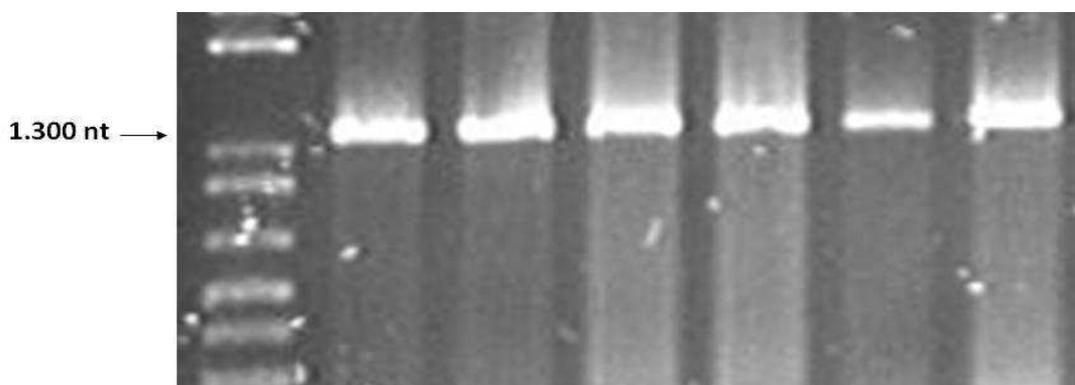
Devido à possibilidade de ocorrer um falso positivo para o vírus PWV no teste ELISA indireto, houve a necessidade de se fazer um teste molecular para confirmação dos resultados

obtidos no teste sorológico. A RT-PCR é usado para amostras compostas de RNA pelo fato da necessidade de converter em RNA em cDNA para posteriormente fazer o PCR.

No Brasil grande parte dos estudos relacionados ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro tem sido feito com base em caracterização biológica e sorológica, mas com o avanço das técnicas moleculares, estudos utilizando destas ferramentas comprovaram que a estirpe de vírus encontrados infectando maracujazeiro no Brasil possui maior similaridade com o CABMV. Nascimento (2004), através de análise filogenética de Potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil comprovou a identidade dos isolados analisados como estirpes do CABMV.

A análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* desenhados especificamente para o vírus CABMV (Figura 9) confirmou que as amostras que reagiram positivamente no teste sorológico ELISA indireto para o PWV estavam infectadas pelo CABMV. Esse resultado falso positivo deve-se devido à alta similaridade do gene da capa proteica do PWV com o CABMV. Estudos realizados por Ricardo (2004) relatou que apesar da alta similaridade do gene da capa proteica de isolados de Potyvirus causador do mosqueamento do maracujazeiro com o PWV, estudos moleculares indicaram uma maior similaridade com o CABMV.

**Figura 9** - Análise eletroforética das bandas amplificadas com os primers desenhados para o Cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV). Amostras selecionadas a partir do resultado sorológico (ELISA indireto) positivo para o vírus CABMV.



Fonte: Dados do autor.

A utilização do RT-PCR como método para a detecção do vírus do endurecimento dos frutos em maracujazeiro permitiu a detecção precisa do CABMV. A utilização de um

“*primers*” específica para o CABMV, consiste em um método bastante útil para detecção de infecção do mesmo na planta, sem necessitar da separação e purificação dos possíveis componentes de um complexo viral.

Os resultados apresentados nesse trabalho estão acordo com Cavichioli e colaboradores (2007), na avaliação da incidência e severidade do vírus do endurecimento do fruto em maracujazeiros enxertados em pé – franco no estado de São Paulo. Barbosa (2012) na caracterização molecular CABMV no estado da Bahia, comprovou através do sequenciamento da proteína de inclusão cilíndrica (CI) e da proteína 6K2, que a identidade desses isolados era pertencente a estirpes do CABMV. Nascimento e colaboradores (2006), observou em estudo baixa variabilidade genética entre os isolados de CABMV de maracujá que são próximos geograficamente, reforçando os resultados obtidos neste estudo. Barros *et al.*, (2011) em análise do genoma de dois isolados de CABMV provenientes de hospedeiros distintos, demonstrou que a distância genética não está relacionado à gama de hospedeiro do qual este vírus é encontrado e a sua origem geográfica.

Os resultados deste trabalho contribui para o desenvolvimento de novos estudos mais aprofundado como a caracterização molecular do vírus CABMV no cariri paraibano, já que não existia trabalhos de detecção do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na região, abrindo caminhos para posteriores estudos direcionando o manejo apropriado das lavouras, a fim de diminuir a proliferação desse potyvírus. Assim aumentar a produtividade das plantações e sua vida útil nos campos, já que o clima da região possui suas peculiaridades, podendo adaptar o manejo dos pomares as condições climáticas da região.

## 6 CONCLUSÃO

As amostras das folhas de maracujazeiro coletadas nos municípios de São José dos Cordeiros, Serra Branca e Sumé apresentaram infecção típica da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro.

O teste EIISA indireto confirmou reação positiva para os antissoros CABMV e PWV e reação negativa para antissoro CMV..

O Teste Molecular RT-PCR utilizando *primer* específico, confirmou que o agente casual do endurecimento dos frutos em maracujazeiros na região do cariri paraibano é causado pelo vírus CABMV e não pelo PWV.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. **Cucurbitáceas em áreas produtoras do Tocantins e seus efeitos em diferentes hospedeiras**. 2011, 77 f. Dissertação ( Pós - Graduação em Fitopatologia) Lavras) Universidade Federal de Lavras, MG. 2011.
- ALLISON, R.; JOHNSTON, R. E.; DOUGHERTY, W. G. **The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein**. *Virology*. New York, v. 15, n. 154, p. 9–20, out. 1986.
- ALMEIDA, J. E. M. **Detecção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora, pimentão e tomate**. Lavras, 2013. 101 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras
- ANDREHEVA, J. **Potyvirus helper componente-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions n virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmissão and accumulation**. *Journal of General Virology*, London, v. 80, n. 5, p. 1133-1139, 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. Agosto de 2011. 30 v.
- ARAGÃO, M. A. C.; **Desenvolvimento e padronização do dot-ELISA para o diagnóstico sorológico da maedi-visna**. 2007. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2007.
- ARAUJO, T. S. L.; **Imunologia**. Publicado em 12 de novembro de 2012. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABan4AA/imunologia-seminario-elisa>. Acesso em: 9 de maio. 2016.
- BARBOSA, A. O. **Caracterização molecular de isolados do Cowpea aphid borne mosaic virus que infectam maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)**. 2012. 50 f. Trabalho de Conclusão de curso II (Bacharelado em Ciências biológicas), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012.
- BARROS D. R. **Comparative analysis of the genomes of two isolates of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts**. *Archives of Virology*, v. 156, p.1–7, 2011.
- BARROS, D. R. **Análise comparativa do genoma de dois isolados cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV) provenientes de diferentes hospedeiros**. 2017. 70 f. Tese (Pós-graduação em Fitopatologia) Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- BERIAN, L. O. S. **A serologia como método auxiliar no controle de fitovírus**. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 121-126, Mar. 1985.
- BERNACCI, L.C.; WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. **Passefloracea**. (Ed.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: RiMa, FAPESP, v.3, p. 247-248, 2003.
- CALD, V. L.; INGERFELD, M. **The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cel-to-cel spread**. *Journal of Structural Biology* 105:62-66, 1990.

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. 61, n. 8. P. 2540-2548, 1987.

CARRINGTON, J. C.; HALDEMAN, R.; DOLJA, V. V.; RESTREPO-HARTWING, M. A. **Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo.** *Journal of Virology* 67, p. 6995 – 7000, 1993.

CASTRO, L. A. S.; COUTO, M. E. O. **Metodologia para utilização do teste ELISA na diagnose de murcha bacteriana em batata (*solanum tuberosum*).** Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Pelotas, RS. Dezembro de 2002.

CAVICHIOLO, J. C.; CORRÊA, L. S.; NARITA, N.; KASAI, F. S. **Incidência e severidade dos vírus do endurecimento dos frutos em maracujazeiros enxertados em pé-francoi.** *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 411-414, Outubro 2011.

COSTA, A. F. **Comportamento de *Passiflora* spp. Diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre nutrição mineral e a interação vírus – *Passiflora edulis f. flavicarpa*.** Viçosa, 1996. 129p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

COSTA, K. T.; SOUTO, R. E. Detecção por ELISA-indireto de um isolado do PRSV-W de

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.C. **Aspectos botânicos.** In: LIMA, A.A. Maracujá produção: aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 11-14, 2002.

DANIELS, J. **Utilização de técnicas sorológicas para detecção de vírus em batata-doce.** Brasília: EMBRAPA/CPACT, 1999. p. 1-3. (Comunicado Técnico 46).

DANIELS T. **Quando o vírus está na semente.** Embrapa Clima Temperado. *Rev. Cultivar Grandes Culturas*, 5 de junho de 1999.

DOUGHERTY, W. G.; HIEBERT, E. **Translation of potyvirus RNA in a robbitt reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a proteinase.** *Virology* 104, p 174-182, 1980.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** San Diego: Elsevier Academic Press. 1259 p. 2005.

FIGUEIRA, A. R., Manejo de doenças viróticas. 99 p. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.

GARCÊZ, R. M. **Aspectos epidemiológicos do Cowpea aphid-borne mosaic virus em maracujazeiros e sua associação com a afidofauna.** 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, São Paulo, 2012.

GIORIA, R. **Caracterização biológica, sorológica e molecular de uma estirpe do *passion fruit woodiness virus* (PWV) que infecta sistematicamente algumas cucurbitáceas.** 2003. 105 f. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2003.

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

IBGE, **Produção Brasileira de maracujá em 2013.** Disponível em: < [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)> Acesso em 28 de fevereiro de 2016.

INOUE, A. K.; MELLO, R. N. NAGAA, T.; KITAJIMA, E. W. **Characterization of Passionfruit woodiness virus from Brasília and surrounding region Brazil.** Fitopatologia Brasileira, v. 20, p. 479-485, 1995.

LIMA, M. F. **Detecção e controle de viroses em videira.** Petrolina, PE. Dezembro, 2009.

LINS, M. **Avanços no cultivo de maracujá no Brasil.** Hortifrúti em 12 de março de 2015.

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

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

MARITAN, A. C.; GASPAR, J. O.; CAMARGO, L. E. A. **Identificação e caracterização de um potyvírus isolado de *Zinnia elegans*.** Fitopatologia Brasil. vol.29 n°.1 Brasília, Fevereiro 2004.

Melancia. Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Agronomia/Maringá,PR. 2015.

MELETTI, L. M. M.; **Avanços na cultura do maracujá no Brasil.** Rev. Bras. Fruticultura, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 083-091, Outubro 2011.

NARITA, N.; YUKI V. A.; NARITA, H. H.; HIRATA, A. C. S. **Maracujá amarelo: tecnologia visando a convivência com o vírus do endurecimento dos frutos.** Pesquisa & Tecnologia, vol. 9, n. 1, Jan-Jun. 2012.

NASCIMENTO, A. V.; SOUZA, A. R. R.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; RIBEIRO, G. P.; ZERBINI, F. M. **Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil.** Fitopatologia vol. 29, n° 4, Brasília, Julho de 2004.

PLISSON, C.; DRUCKER, M. BLAC, S.; GERMAN-RETANA, S.; LE GALL, O.; THOMAS, D.; BRON, P. **Structural characterization of HC-pro, a plant virus multifunctional protein.** Journal of Biological chemistry. 278: 23753-23761, 2003.

PROGRAMA, BIOTA/MICRO-ORGANISMOS. **Lista comentada dos vírus de plantas descritos no Brasil (1911-2013).** Dept. Fitopatologia e Ematologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Disponível em: [http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista\\_comentada\\_2011\\_2013.pdf](http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista_comentada_2011_2013.pdf). Acesso em 19 de mai. 2016.

RIECHMANN, J. L.; LAIN S.; GARCIA, J. A. **Highlights and prospects of potyvirus molecular biology.** *Journal of General Virology, London*, v. 73, p. 1-16, 1992.

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

SANCHES, M. M.; KRAUSE-SAKATE, R. **Análise para vírus, viroides e titoplastos em material vegetal importado.** *Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia*. Brasília p. 31, ed. 1, 2013.

SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; COSTA A. F. S.; LIMA I. M. **Vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no estado do espírito santo.** Documento n° 161, Vitória- ES, Abril 2008.

SANTANA, E.N. **Caracterização de isolados brasileiros de *Potyvirus* causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e avaliação de plantas transgênicas de maracujá-amarelo expressando RNAs virais.** Viçosa, 2001. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SCHAAD, M. C.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CRONIN S.; CARRINGTON, J. C. **Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch *potyvirus*: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification.** *Journal of Virology, Washington*, v. 70, p. 7039-7048, 1996.

SCHAAD, M. C.; JENSEN, P. E.; CARRINGTON, J. C. **Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of na endoplasmic reticulum-targetes viral protein.** *Journal The EMBO, Oxford*, v. 16, p. 4049-4060, 1997.

SHUKLA, D. D.; TOSIC, M.; JILKA, J.; FORD, R. E. TOLER, R. W. & LANGHAM, A. C. **Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N - termini of coat proteins.** *Phytopathology*. v. 79, p. 223 - 229. 1989

SILVA, L. A. **Cowpea aphid-borne mosaic virus na cultura do maracujazeiro: avaliação da tolerância de acessos avançados e efeito nutricional.** Dissertação (Mestrado) São Paulo 2012.

SIVAKUMARAN, K.; SUN J.H.; KAO, C. C. **Mechanism of RNA synthesis by viral RNA-dependente RNA polymerase.** New York: Food Products, p 147-170, 2001.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence of the potyvirus P1 proteinase function in trans as na accessory fator for genome amplification. **Journal of Virology**, Washington, v 69, n. 6, p.3668-3667, 1995.

WATSON, H.; **Teste ELISA e sua aplicação.** Publicado em 12 de novembro de 2013. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/teste-elisa-e-sua-aplicacao/115312/>. Acesso em: 10 de maio. 2016.

WEBER, D. **Densidade de plantio e produção do maracujazeiro-amarelo no Sul do Brasil** Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas) Pelotas, 2013.

ZERBINE JUNIOR, F M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. Métodos de diagnósticos de viroses vegetais. In : SANCHES, M. M.; KRAUSE-SAKATE, R. **Análise**

**para vírus, viroides e titoplastos em material vegetal importado. Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia.** Brasília p. 31, ed. 1, 2013.

ZERBINI, F.M. & ZAMBOLIM, E.M. A família *Potyviridae*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** v. 7: p. 1-66. 1999.