

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion
fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua
detecção e estudos sobre sua variabilidade genética**

Renata Antonioli Luizon

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Renata Antonioli Luizon
Bióloga

Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética

Orientador:
Prof. Dr. **ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

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

Antonioli-Luizon, Renata

Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética / Renata Antonioli Luizon. - - Piracicaba, 2009.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Maracujá 2. Sequenciamento genético 3. Variação genética em plantas 4. Vetores de doenças de plantas 5. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.425
L953s

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

Aos meus pais, Valdemar e Maria Aurora,
ao meu marido Anderson e minha filha Gabriela

DEDICO

Aos meus amigos

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pela minha vida e vitória de chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela orientação, amizade, confiança e exemplo profissional, de que tive muito orgulho de conviver.

À Dra. Juliana Freitas-Astúa pela amizade, conselhos, experiências de vida e profissional e grande apoio durante todos os momentos desse trabalho.

Ao Dr. Marcos Machado e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC pelo apoio e oportunidade de fazer parte deste laboratório.

À Dra. Eliane Locali-Fabris pelo carinho, amizade, pelas experiências compartilhadas e momentos de descontração.

Às minhas colegas Renata Faier Calegario, Renata T. Gomes, Maria Cristina e Thayne Munhoz pelos dias de hospedagem em Piracicaba.

Aos colegas do NAP-MEPA Francisco e Renato pela amizade e auxílio.

Aos meus colegas de Mestrado pelos bons momentos na ESALQ.

À secretária Giovana da microbiologia pela paciência com todas as minhas dúvidas e informações.

Aos colegas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira Carol Munari, Raquel Caserta, Mariana, Valdenice, Juzinha, Alessandra, Karen, Rodrigo Stuart e Frank pelo apoio e amizade que demonstraram por mim.

Aos colegas Kleber e Adriano pelo auxílio no laboratório.

Aos pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical Drs. Francisco F. Laranjeira e Cristiane Barbosa pelo envio de amostras.

Aos meus pais, Valdemar e Maria Aurora pelo eterno amor, apoio e compreensão.

Ao meu irmão Marcelo pelo carinho e amizade.

Ao meu marido Anderson Luizon pelo apoio, carinho e atenção durante todos os momentos.

À minha filha Gabriela pelo carinho e amor e pelos momentos de alegria e descontração.

E também a minha cachorrinha Lessie, que sempre me recebe com carinho quando chego em casa, mesmo estando estressada.

“Jesus, ao morrer por uma causa, nos ensina que quando sofrermos por aquilo que amamos, nós estamos crescendo como pessoa”

“Não se precipite em querer vencer, há sempre um encanto a ser absorvido nos períodos dos preparos. Antes da vitória, a luta!”

“Não coloque muito empenho nos erros cometidos. Só o bem que pode ser feito merece nosso empenho. Chorar sobre o impossível é não viver”

“Os acontecimentos de hoje precisam ser repensados a partir das escolhas que fizemos ontem. Não cometa o equívoco de permanecer no erro”

“Quando o sofrimento se derramar sobre você, e na ausência de respostas, procure compreender. Há razões que só a fé pode entender”

“Quando Deus entra na nossa vida fica muito mais fácil viver”

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A cultura do maracujazeiro.....	17
2.2 A produção do maracujá.....	18
2.3 Vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i> (VTB).....	20
2.4 Pinta verde do maracujazeiro.....	23
2.5 Estudo da variabilidade genética através de ferramentas moleculares.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Material vegetal.....	27
3.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	27
3.3 Ensaio moleculares.....	28
3.3.1 Isolamento do RNA dupla fita (dsRNA).....	28
3.3.2 Purificação do dsRNA.....	28
3.3.3 Síntese de cDNA 1ª e 2ª fita.....	30
3.3.4 Construção da Biblioteca de cDNA e clonagem.....	30
3.3.5 Estoques dos clones positivos.....	31
3.3.6 Extração do DNA plasmidial.....	32
3.3.7 Sequenciamento.....	32
3.3.8 Análise das sequências.....	33
3.3.9 Síntese dos iniciadores (<i>primers</i>).....	33
3.3.10 RT-PCR	34
3.3.11 SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Material vegetal.....	37
4.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
4.3 Isolamento e purificação do dsRNA.....	39

4.4 Construção da Biblioteca de cDNA e clonagem.....	42
4.5 Análise das sequências.....	44
4.6 Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>).....	48
4.7 Desenvolvimento e validação do teste de diagnóstico.....	52
4.8 SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism.....	57
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética

A cultura do maracujazeiro tem sido afetada por um grande número de pragas e doenças, que exigem dedicação e esforços urgentes, no sentido de minimizar as perdas e evitar sua disseminação. O vírus da pinta verde do maracujazeiro (PVM) (Passion fruit green spot virus – PFGSV) caracteriza-se por induzir a formação de pequenas manchas verdes em frutos e em folhas, e lesões necróticas em ramos. Exames de secções ultrafinas de tecidos infectados ao microscópio eletrônico de transmissão consistentemente revelam a presença de partículas baciliformes em cisternas do retículo endoplasmático e viroplasma denso no citoplasma. Os efeitos citopáticos encontrados, a relação com o ácaro vetor, *Brevipalpus phoenicis*, e a comparação com outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB), como o da leprose dos citros, classifica o vírus como sendo do tipo citoplasmático. Seu relato inicial deu-se há cerca de 10 anos em Vera Cruz-SP, mas em 1994 foi relatada uma doença no Estado da Bahia chamada de definhamento precoce do maracujazeiro (DPM), que apresenta sintomas, efeitos citopáticos e vetor semelhantes ao da pinta verde, tendo sido sugerida a possibilidade de serem duas denominações para uma mesma doença. Atualmente a PVM/DPM encontra-se em vários outros Estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pará, além do Distrito Federal. Sua diagnose ainda depende dos sintomas observados, infestação por ácaros *Brevipalpus* e microscopia eletrônica. Para se desenvolver um método de diagnose molecular, que permita detectar o vírus causador da PVM/DPM de maneira rápida e confiável, em grande número de amostras, foi feita uma Biblioteca de cDNA a partir do RNA dupla fita do vírus, extraído de tecidos sintomáticos de maracujazeiros infectados com um isolado do PFGSV encontrado em Limeira-SP. Com o sequenciamento parcial do genoma viral, foram desenhados *primers* específicos que amplificam partes dos genes putativos da *p24* e aqueles que codificam a proteína de movimento (*MP*) e a Replicase (*Rep*) de diferentes isolados do PFGSV. *Primers* do PFGSV e de dois outros VTBs do tipo citoplasmático (VTB-C) para os quais se dispõe de *primers* para sua detecção por RT-PCR (vírus da leprose dos citros C - CiLV-C; mancha anelar de *Solanum violaeifolium* - SvRSV) foram testados em reações homólogas e heterólogas. Ocorreram ampliações por RT-PCR gerando fragmentos de tamanho esperados apenas para os vírus homólogos, mas não nas reações heterólogas, indicando que PFGSV deve diferir do CiLV-C e SvRSV. Assim, tem-se agora uma ferramenta molecular que detecta especificamente o PFGSV. Um estudo inicial sobre a variabilidade genética do PFGSV foi feito a partir da extração do RNA total, seguido de RT-PCR utilizando os *primers* específicos, purificação dos fragmentos obtidos e uso da técnica de “Single Strand Conformational Polymorphism” (SSCP). Foram analisados isolados procedentes de diferentes regiões brasileiras e em geral a variabilidade foi maior para as amostras do Estado de São Paulo. Logrou-se transmitir experimentalmente o PFGSV com ácaros para uma espécie silvestre de maracujá (*Passiflora morifolia*).

Palavras-chave: PFGSV, RT-PCR, Diversidade genética, SSCP, *Brevipalpus* sp.

ABSTRACT

Partial sequencing of the Passion fruit green spot virus (PFGSV), development of methods for the molecular detection and evaluation of the genetic variability of this virus

In Brazil, passion fruits are affected by several diseases and pests which affect their yield. Among them, a recently recognized viral disease, caused by Passion fruit green spot virus (PFGSV), is characterized by the presence of green spots on fruits and senescent leaves, and necrotic lesions on branches. When the infection is early, stem lesions may coalesce, girdling the branch resulting in the subsequent death of the plant. Electron microscopic examination of the thin sections of infected tissues revealed the presence of short, bacilliform particles in the cistern of the endoplasmic reticulum and dense, vacuolated viroplasma in the cytoplasm. The disease was shown to be transmitted by the mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). The localized symptoms, transmission by *Brevipalpus* mite and the observed cytopathic effect are considered evidences to demonstrate the viral nature of the disease and place it among the so-called cytoplasmic type of *Brevipalpus*-transmitted viruses (C-BTV), whose prototype is the Citrus leprosis virus C (CiLV-C). Though the first report of the disease occurred more than 10 years ago at Vera Cruz-SP, little is known about PFGSV, though it has been found in several passion flower growing areas in Brazil. In 1994 was report a disease named of DPM (“definhamento precoce do maracujazeiro”) was reported state of Bahia, with characteristics similar to that of the PVM and it has been suggested that DPM and PVM are the same disease. Subsequently the PVM/DPM has been found in several others Brazilian States as Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pará and Distrito Federal. Diagnosis has been made by symptoms, association with *Brevipalpus* mites and the time consuming transmission electron microscopy. This work reports the results of efforts to generate a quick and precise method to detect the virus for the diagnosis of the disease, evaluate the variability of the PFGSV isolates from different regions of the country and determine the taxonomic position of this virus. From the dsRNA present in extracts of the PFGSV-infected passion flower plant tissues, a cDNA library was obtained and its sequencing permitted to identify part of the viral genome. Based on these sequences, particularly of *p24* and the putative genes that code for the movement protein (*MP*) and replicase (*Rep*), specific primers were designed which specifically detected PFGSV by RT-PCR in extracts of PFGSV-infected tissues. Evaluation of the variability of different isolates of PFGSV was made by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the amplified fragments of the viral genome. In general, it a larger variation was found in isolates from São Paulo state. PFGSV seems to differ from two other C-BTV with available primers, CiLV-C and the *Solanum violaeifolium* ringspot virus (SvRSV), since RT-PCR assays do not cross amplify their genomes. Experimental transmission of PFGSV by mites to woodland passion flower (*Passiflora morifolia*) was achieved.

Keywords: PFGSV, RT-PCR, Genetic diversity, SSCP, *Brevipalpus* sp.

1 INTRODUÇÃO

Maracujazeiros são plantas da família *Passifloraceae*, sendo cultivadas para produção de frutos, fins ornamentais e produtos farmacológicos. O tipo mais cultivado é o amarelo (*Passiflora edulis* Deg. f. *flavicarpa* Sims.) cujo fruto é utilizado para produzir suco e polpa, sendo também conhecido pelo seu ativo calmante. Em menor escala são também cultivados o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* f. *edulis*), também para suco, e o maracujá doce (*Passiflora alata*), que é consumido ao natural.

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, principalmente o amarelo, tendo produzido em 2008, 684.376 toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2009). Esta produção destina-se tanto ao mercado *in natura* como ao processamento para produção de suco concentrado. Embora presente em todas as regiões, o destaque é a Bahia, o principal produtor com 275.445 t produzidas em 2008, seguidas por Espírito Santo, Sergipe, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2009).

Dentre as principais enfermidades da cultura encontra-se a pinta verde do maracujazeiro, que foi relatada pela primeira vez no município de Vera Cruz-SP (KITAJIMA et al., 1997) causando sérios prejuízos às plantações. Seu nome deriva de manchas verdes nos frutos amarelos e nos danos causados por lesões nas hastes que coalescem, anelam os ramos e resultam na morte prematura da planta. Constatou-se que é disseminado pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) e o combate ao vetor tem sido a melhor estratégia de controle desta virose. Uma enfermidade de características similares havia sido relatada na Bahia desde 1994 e denominada definhamento precoce do maracujazeiro (DPM) (SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 1994). Devido às similaridades encontradas entre a PVM e DPM foi sugerida a possibilidade de serem duas denominações para uma mesma doença. Atualmente a PVM/DPM encontra-se disseminada em vários outros Estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pará, além do Distrito Federal. (KITAJIMA et al., 2003; MORAES et al., 2006).

A extração e detecção de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) presentes em lesões foliares de laranjeiras infectadas pelo Citrus leprosis virus C (CiLV-C) permitiu a caracterização de seu genoma (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006), e o desenvolvimento de sistemas de diagnose molecular da doença (LOCALI et al., 2003). Estratégia similar foi utilizada

com outros vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* do tipo citoplasmáticos (VTB-C), como o da mancha anular do *Solanum violaeifolium* (*Solanum violaeifolium* ringspot virus – SvRSV), do qual se conseguiu sequência parcial do genoma (FERREIRA et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre PFGSV através da obtenção de sequências parciais do vírus, desenvolvimento de um método rápido, confiável e específico para a detecção do PFGSV e a diagnose da doença, determinação da relação – se existente – entre os agentes causais da pinta verde e do definhamento precoce do maracujazeiro, prospecção inicial sobre a variabilidade genética do PFGSV pela técnica de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), obtenção de subsídios para determinar se o PFGSV pode ser considerado um membro do recém-criado gênero *Cilevirus* e ampliar o conhecimento sobre VTBs-C a fim de estabelecer possíveis relações entre eles.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do Maracujazeiro

O Brasil é um dos principais centros de origem de espécies do gênero *Passiflora*, apresentando um grande potencial para seleção de plantas que possam ser utilizadas, direta ou indiretamente, com o intuito de atender os mercados de fruta fresca, suco concentrado e também explorar o uso dessas plantas como ornamentais e medicinais (LEONEL; SAMPAIO, 2007).

O gênero botânico *Passiflora* é composto, em sua maioria, de trepadeiras, algumas poucas espécies são herbáceas ou lenhosas, de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas (KILLIP, 1938), e algumas são arbustos. Existem cerca de 420 espécies de *Passifloraceas* na natureza e, no Brasil, cerca de 150 delas, sendo que aproximadamente 60 são comestíveis. Apenas duas espécies no momento, são aproveitadas comercialmente no país: o amarelo ou azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e o doce (*P. alata*). Esse gênero é espontâneo nas zonas tropicais e subtropicais da América, é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil o maior centro de distribuição geográfica (BRIGNANI NETO, 2002).

O maracujazeiro tem grande importância pelo valor decorativo de suas flores (Figura 1), pelas qualidades gustativas de seus sucos e pelas qualidades farmacodinâmicas e alimentares de seu suco, cascas e sementes (MANICA, 1981).

O maracujá de uso comercial é redondo ou ovóide, amarelo ou púrpura-escuro quando está maduro, e tem uma grande quantidade de sementes no seu interior (COMPANHIA DE ENTREPÓSITO E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO-CEAGESP, 2001). É um fruto carnoso, do tipo baga com tamanho e forma variada e que apresenta sementes com arilo carnoso (FIGUEIREDO et al., 1988).

A flor do maracujá é polinizada por um inseto conhecido como mamangava, uma espécie de abelha que pode viver solitária ou em sociedade, tem tamanho grande e muitos pelos.



Foto: Helton Sansão-Registro/MG
(URL: br.olhares.com/sansão)



Foto: Cortesia Dra. Juliana F. Astúa (Embrapa Mandioca e Fruticultura e Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC)

Figura 1 – Diferentes flores de maracujazeiro.

O maracujá, famoso por seu ativo calmante, é rico em vitaminas do complexo B e sais minerais, como cálcio, ferro e fósforo, além de fibras, que quando ingerido, dá ao organismo betacaroteno, que é transformado em vitaminas A, C, B2 e B3. Além disso, também contém uma substância chamada passiflorina ou maracujina, que tem propriedades sedativas, mas não é prejudicial à saúde, pois não causa dependência. Cada 100 mL de suco contém, em média, 53 calorias, variando conforme a espécie utilizada (BALBACK ; BOARIM, 1993).

Seu uso principal está na alimentação humana, seus frutos, com sabor bastante forte e elevados teores de acidez (RUGGIERO, 1998, p. 175), são consumidos principalmente na forma *in natura*, sendo utilizados no preparo de sucos, doces, geléias, sorvetes e licores. Mas o suco do maracujá industrializado vem ganhando espaço no mercado do consumidor brasileiro. São aproximadamente 8,5% do volume de sucos prontos consumidos em todo país (COSTA; COSTA, 2005).

2.2 A produção do maracujá

O Brasil, devido à sua extensão territorial e diversidade climática, possui condições para a produção de frutas de clima temperado e, principalmente, de clima tropical. No entanto, embora

seja o maior produtor mundial de maracujá, tem uma participação pequena no mercado internacional. Um dos principais fatores que contribuem para essa situação são os problemas fitossanitários que a cultura apresenta (BRIGNANI NETO, 2002).

O maracujazeiro hospeda uma grande diversidade de insetos e ácaros. Algumas espécies podem causar injúrias capazes de provocar danos econômicos, por reduzir a produção de frutos e até mesmo levar à morte. Algumas são esporádicas e outras ocorrem em níveis baixos, não requerendo a adoção de medidas de controle. Do ponto de vista econômico, poucas são consideradas pragas (LEONEL; SAMPAIO, 2007).

As principais espécies que atacam o maracujazeiro são o ácaro da leprose, *Brevipalpus phoenicis*, o ácaro branco, *Pluphagotarsonemus latus* e os ácaros tetraniquídeos, *Tetranychus mexicanus* e *T. desertorum*. Estes ácaros localizam-se na face abaxial das folhas, onde sugam a seiva, causando desordem fisiológica pelas toxinas injetadas nos tecidos, provocando má formação, amarelecimento e morte das folhas (LEONEL; SAMPAIO, 2007, p. 85). O controle, segundo São José (1993) é efetuado quando verificado danos em níveis econômicos, utilizando acaricidas específicos como propargite 720 CE a 0,1% ou hexythiazox PM a 0,003% ou ainda abamectin 18 CE a 0,02% (RUGGIERO, 1998 p. 199).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá. Das cerca de 600 espécies de *Passiflora*, *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), *P. edulis* f. *edulis* (maracujá roxo) e *P. alata* (maracujá doce) são responsáveis por 95% da área plantada no Brasil, o maior produtor mundial da fruta com 684.376 toneladas produzidas em 2008 (IBGE, 2009). Dentre os estados brasileiros, o destaque é a Bahia, o principal produtor com 275.445 t produzidas em 2008, seguido por Espírito Santo, Sergipe, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2009). Vinte e seis estados do Brasil produzem maracujá, sendo que dez deles detêm mais que 40% do volume de produção (CEAGESP, 2001). São aproximadamente 36,5 mil ha plantados (FNP, 2007).

As exportações são prejudicadas pelas tarifas de importação e também pelas barreiras fitossanitárias, sendo necessário um programa de comercialização, além da padronização das frutas quanto ao aspecto, sabor, coloração, formato e uniformidade de tamanho (PIZZOL et al., 2000).

Uma vantagem da cultura do maracujá, do ponto de vista social, é que em geral a produção ocorre em pequenas propriedades, à maioria no contexto de agricultura familiar (NOGUEIRA et al., 2007).

Segundo Pimentel et al., (2009), o maracujazeiro é uma atividade atrativa e viável; a produção visa exclusivamente o mercado industrial, em 1 ou 5 ha, sendo somente viável do ponto de vista operacional se houverem mais produtores envolvidos na atividade, apoiado por contrato de fidelidade com a indústria, a fim de gerar volume de produção compatível com a demanda industrial.

A cadeia produtiva do maracujá tem apresentado importância crescente na economia brasileira, criando empregos nos meios rurais e urbanos e gerando divisas por meio das exportações de suco. Os mercados de suco e de fruta fresca têm crescido e a produção, embora estagnada nos últimos anos, é consideravelmente maior à das décadas anteriores (BRUCKNER; PICANÇO, 2001).

A cultura do maracujazeiro-azedo no Brasil evoluiu significativamente nos últimos anos, porém, para a expansão do mercado internacional da fruta *in natura* é necessário abrir espaço para outros cultivos, como o maracujá-roxo e o doce, pois estes apresentam boa aceitação pelos consumidores europeus, norte-americanos e canadenses, e sua comercialização tem crescido de forma expressiva nos últimos anos (LEONEL; SAMPAIO, 2007).

2.3 Vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB)

O primeiro relato do envolvimento dos ácaros tenuipalpídeos *Brevipalpus* sp. (Figura 2) com enfermidades virais de planta foi feito na Argentina com a leprose dos citros (FREZZI, 1940) e, pouco depois, com a “lepra explosiva” do ligustro (VERGANI, 1942). Demonstrou-se posteriormente também a associação destes ácaros com a mancha anular do cafeeiro (CHAGAS, 1972). Somente na década de 1990 demonstrou-se que outras viroses como a pinta verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 1997) e a mancha das orquídeas (Orchid fleck) (MAEDA et al., 1998) eram transmitidas por ácaros desse gênero. Desde então, um grande número de casos de associação de *Brevipalpus* com vírus de plantas, principalmente em ornamentais, foram relatados (KITAJIMA et al., 2003).

Uma das características destes vírus transmitidos ou associados aos ácaros *Brevipalpus* é a de sua infecção resultar em lesões localizadas (mancha clorótica, anelar, necrótica etc.) sem se tornar sistêmica. Estudos ultraestruturais indicam que há dois tipos de VTBs, o nuclear (VTB-N) e o citoplasmático (VTB-C) (KITAJIMA et al., 2003). A diagnose das doenças causadas por eles

tem sido feita pelos sintomas observados (lesões localizadas), presença de ácaros *Brevipalpus* (em alguns casos a demonstração da transmissão do vírus pelo ácaro) e detecção dos efeitos citopáticos característicos por Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

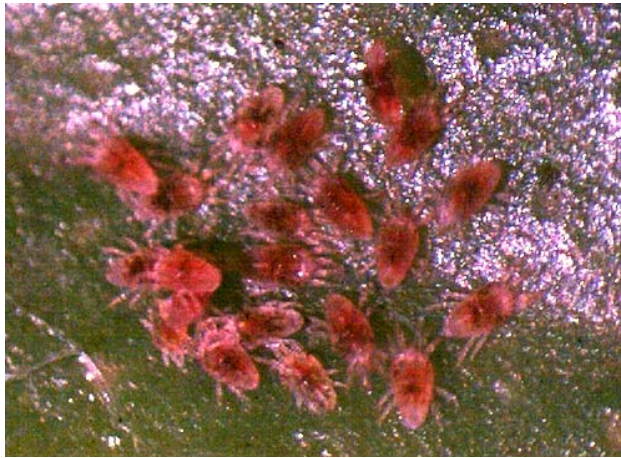


Figura 2 – Aspecto de uma colônia de ácaros *Brevipalpus phoenicis*, (Foto: cortesia Dra. Valdenice M. Novelli, Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC)

Os VTB-N apresentam partículas em forma de bastonetes curtos (40 nm x 100 nm), presentes no núcleo ou citoplasma das células, comumente associadas perpendicularmente às membranas nucleares e ao retículo endoplasmático. Frequentemente formam configurações conhecidas como “roda de carroça”, nas quais as membranas ficam arranjadas em círculos e os virions organizados radialmente (KITAJIMA et al., 2003). A principal característica destes vírus é a formação de um viroplasma eletrôn-transparente localizado no núcleo da célula hospedeira (KITAJIMA et al., 2003). Os vírus do tipo nuclear foram encontrados pela primeira vez em orquídeas infectadas pelo vírus da mancha da orquídea (Orchid fleck virus – OFV) (DOI et al., 1969, 1977; KITAJIMA et al., 1974a, 2003) e depois, em alguns isolados dos vírus da leprose dos citros do tipo nuclear (Citrus leprosis virus nuclear type – CiLV-N), da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus – CoRSV), da mancha clorótica do *Clerodendrum* (*Clerodendrum* ringspot virus – CIRSV), da mancha clorótica do *Solanum violaefolium* (*Solanum violaefolium* chlorotic spot virus – SvCSV), da mancha clorótica do *Hibiscus* (*Hibiscus* chlorotic spot virus –

HCSV), da mancha anular do *Malvaviscus* (*Malvaviscus* ringspot virus – MRSV), entre outros (KITAJIMA et al., 2003).

Os VTB-C apresentam partículas curtas, baciliformes e envoltas por membranas (50-60 nm x 110-120 nm), encontradas isoladas ou agrupadas em cisternas do retículo endoplasmático. Nas células infectadas, pode-se observar uma inclusão densa no citoplasma conhecida como viroplasma. O tipo citoplasmático foi encontrado pela primeira vez na Argentina, em amostras de folhas afetadas pela “lepra explosiva”, e identificadas como um isolado do CiLV (KITAJIMA et al., 1974b). Em seguida, a maioria dos isolados brasileiros do CiLV encontrados tem sido classificados como do tipo citoplasmático CiLV-C (COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003; LOCALI-FABRIS et al., 2008). Fazem parte deste grupo, além do CiLV-C, outros vírus como o PFGSV (KITAJIMA et al., 2003), o SvRSV (FERREIRA et al., 2007), o da mancha verde do *Hibiscus* (*Hibiscus* green spot virus – HibGSV) (KITAJIMA et al., 1999a), o da mancha anular do *Ligustrum* (*Ligustrum* ringspot virus – LigRSV) (VERGANI, 1942; RODRIGUES et al., 1995b), mancha anular de *Schefflera* (*Schefflera* ringspot virus – ScheFRSV) (KITAJIMA et al., 1999b), o da mancha anular do manacá (*Brunfelsia* ringspot virus – BrRSV) (NOGUEIRA et al., 2001), entre outros.

Os virions, tanto dos VTB-N quanto dos VTB-C, guardam certas semelhanças com os rhabdovirus e, enquanto informações sobre seus genomas não estavam disponíveis, eles foram tentativamente considerados possíveis membros da família *Rhabdoviridae*. Além da morfologia baciliforme, havia a similaridade no fato de os rhabdovirus de plantas serem enquadrados em dois gêneros, *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus*, de acordo com o local da sua replicação (WALKER et al., 2000).

De fato, o OFV, primeiro VTB a ser caracterizado molecularmente, possui genoma composto de RNA de sentido negativo, porém ele é bipartido, sendo que cada fita de RNA apresenta cerca de 6.000 nucleotídeos (KONDO et al., 2006). O sequenciamento completo do genoma do OFV, um VTB-N, evidenciou similaridade não apenas com sequências, mas também, com a estrutura genômica de nucleorhabdovirus. No entanto, como o OFV tem genoma bipartido, enquanto os rhabdovirus têm genomas monopartidos, os autores propuseram ser este o membro tipo de um novo gênero dentro da família *Rhabdoviridae*, denominado *Dichorhabdovirus* (KONDO et al., 2006). Hoje há informações sobre parte do genoma de outros VTB-N, como CoRSV (LOCALI et al., 2005) e CICSV (KUBO et al., 2007). As sequências conhecidas

apresentam similaridade com aquelas do OFV, além desses vírus apresentarem genomas bipartidos e estrutura genômica aparentemente similar, e, conseqüentemente, é possível que eles sejam também incluídos entre os *Dichorhabdovirus*.

No entanto, com o sequenciamento parcial (LOCALI et al., 2003) e completo (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006) do genoma do CiLV-C revelou-se que seu genoma é distinto dos demais rhabdovirus, não apenas em seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, mas também em aspectos estruturais e organizacionais. Constitui-se também de dois segmentos de RNA de fita simples (ssRNA), mas de senso positivo, tendo sido sugerida a criação de um novo gênero, o *Cilevirus*, para comportá-lo (LOCALI-FABRIS et al., 2006). Outro VTB-C, SvRSV, tem parte do seu genoma conhecido e apresenta similaridade com o CiLV-C (FERREIRA et al., 2007), o que sugere que talvez ele também seja um *Cilevirus*.

Outro aspecto que mostra as diferenças entre *Dichorhabdovirus* e *Cilevirus* é o tipo de relação vírus/ácaro vetor. Estudos ultraestruturais indicam que ácaros virulíferos para VTB-N (OFV, CoRSV, CICSV, CiLV-N e SvCSV) apresentam em suas células o mesmo padrão citopático exibido pelas células das plantas infectadas, indicando que ocorreria replicação do vírus nos tecidos do ácaro (KITAJIMA et al., 2008). Em contrapartida, vírions do CiLV-C foram detectados nos tecidos do ácaro vetor entre membranas de células vizinhas na região prossomal notando-se também a ausência de viroplasma. Estes fatos sugerem que a relação vírus/vetor no caso do CiLV-C seria apenas do tipo circulativo, sem ocorrer replicação. A hipótese recebe reforços em ensaios de RT-qPCR e também pelo fato de larvas do ácaro serem capazes de transmitir o vírus, mesmo com um período curto de alimentação de aquisição e inoculação (KITAJIMA et al., 2008).

2.4 Pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV)

Os frutos infectados com o PFGSV apresentam manchas circulares verdes. Nas folhas verdes não se vêem sintomas, exceto quando elas entram em senescência, quando podem se notar manchas irregulares verdes geralmente acompanhando as nervuras. Há lesões cloróticas nos ramos que evoluem para necróticas e quando numerosas confluem, causando anelamento e a conseqüente morte da planta. Com o amadurecimento das folhas, há intenso desfolhamento, o que também leva à diminuição da vida útil das plantas (MORAES et al., 2006). Por outro lado,

no estado da Bahia, atualmente o maior produtor de maracujá, descreveu-se em 1994 uma enfermidade referida como definhamento precoce, de etiologia desconhecida, e cujos sintomas se assemelhava ao da pinta verde (SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 1994).

Estudos iniciais com material coletado em Vera Cruz-SP, revelaram que a pinta verde seria causada por um VTB-C, após observar associação entre a incidência da moléstia e infestação dos pomares pelo ácaro *B. phoenicis*. Exames das áreas verdes em frutos e folhas senescentes e das lesões dos ramos ao MET revelaram efeitos citopáticos similares aos observados para o CiLV-C. Ensaio de transmissão infestando maracujazeiros sadios com ácaros coletados de plantas afetadas confirmaram tratar-se de um VTB que foi designado de pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus – PFGSV) (KITAJIMA et al., 1997).

O controle do ácaro vetor com acaricidas quando sua população atingia certo limiar teve sucesso e a enfermidade praticamente desapareceu na região. Amostras com sintomas de DPM da Bahia foram posteriormente analisadas por MET tendo sido também detectado VTB-C (SANTOS FILHO et al., 1999), indicando que esta enfermidade poderia ser causada por um isolado do PFGSV. No entanto, ainda faltava a confirmação de que as doenças seriam causadas por esse patógeno.

A única informação molecular que se tinha acerca do PFGSV foi obtida através da extração de seu dsRNA e diz respeito à segmentação de seu genoma que, como o do CiLV-C, é bipartido, com aproximadamente 5 e 9 Kb (FREITAS-ASTÚA; LOCALI; ANTONIOLI-LUIZON; MACHADO, *dados não publicados*). A presença do dsRNA vem sendo muito utilizada como indicativo de infecção viral e para diagnose de muitas enfermidades causadas por fitovírus (DODDS et al., 1984; VALVERDE et al., 1990). Esta molécula está normalmente relacionada com uma fase intermediária da replicação de vírus cujo genoma é constituído de ssRNA.

O DPM, foi detectado em 1994 na região de Nova Soure-BA (SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 1994) em plantações de maracujá, causando um grande número de lesões necróticas nos caules e ramos, que secam totalmente, causando a morte da planta. Estudos recentes mostraram que, de maneira similar ao PFGSV, o agente causal do definhamento precoce é um vírus baciliforme transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus* (SANTOS FILHO et al., 1999). Bragança et al. (2006) transmitiram o definhamento precoce por ácaros do gênero *Brevipalpus* e mecanicamente de maracujá para maracujá.

A natureza etiológica da PVM somente foi comprovada por meio de testes de transmissão com *B. phoenicis*. As tentativas de transmissão mecânica e com ácaros para plantas cítricas e herbáceas sensíveis ao CiLV tiveram resultado negativo, indicando que os agentes da pinta verde e leprose dos citros são distintos (KITAJIMA et al., 1997).

Tanto a pinta verde quanto o definhamento precoce estão sempre associados à infestação com ácaros *B. phoenicis*, um tenuipalpídeo cosmopolita e polífago com ampla gama de hospedeiros alternativos, os quais podem manter e/ou incrementar suas populações.

Atualmente a PVM/DPM encontra-se em vários outros Estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pará, além do Distrito Federal (SANTOS FILHO et al., 1997; KITAJIMA et al., 1997; MORAES et al., 2006).

As informações sobre os efeitos citopáticos observados em MET, a associação com o ácaro vetor e os sintomas observados indicam que o DPM e a PVM são na realidade, a mesma doença, que receberam duas denominações, mas são causadas pelo mesmo patógeno, o PFGSV.

2.5 Estudo da variabilidade genética através de ferramentas moleculares

Ferramentas moleculares permitem o estudo da variabilidade genética de vírus. Existem vários métodos para essa finalidade, mas dois deles são bastante utilizados em fitovirologia: o SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) e o sequenciamento de regiões ou de todo o genoma viral. O sequenciamento, quando factível, vai revelar a sequência de nucleotídeos de parte ou de todo genoma dos isolados e permitir a avaliação do grau de diferença.

Contudo, pode-se ter uma idéia preliminar desta variação, e que pode ser posteriormente confirmada pelo sequenciamento, através de ensaios por SSCP. Este método se baseia na migração de duas fitas simples de fragmentos de DNA, após desnaturação parcial de fragmentos do genoma viral, amplificados por PCR e visualizados por eletroforese em gel de poli-acrilamida. A migração dessas duas fitas depende da conformação adquirida pelo ssDNA nas condições da eletroforese e que por sua vez é um reflexo da sequência de nucleotídeos deste fragmento. Pequenas diferenças nas sequências podem alterar a conformação das fitas e, dessa maneira, o perfil eletroforético permitindo distinguir diferentes isolados, ou em outras palavras, detectar a variabilidade genética de um dado vírus e mesmo projetar a sua filogenia (SOUZA et al., 2001).

Um exemplo representativo do uso desta técnica foi a avaliação da variabilidade do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV). Rubio et al. (1996) demonstraram a presença de 11 haplótipos distintos quando analisaram por SSCP o gene da capa protéica de 17 isolados do CTV de diferentes localidades. Souza et al. (2002) demonstraram que existe relação entre diferentes regiões de cultivo e variabilidade do gene da capa protéica do CTV e Sambade et al. (2002) utilizaram o SSCP para identificar as estirpes severas desta doença.

O SSCP também já foi utilizado com sucesso para o estudo da variabilidade de dois VTBs, o CiLV-C (LOCALI et al., 2004) e o OFV (KUBO et al., 2006b).

Trabalhos de sequenciamento de genomas completos ou dos genes que codificam proteínas virais têm permitido caracterizar e obter ferramentas que possibilitam a seleção de estirpes fracas utilizadas em programas de proteção cruzada (TARGON et al., 2000), detecção de regiões homólogas e preservadas em sítios específicos para avaliação mais criteriosa de classificação taxonômica (LING et al., 1997), análise de sequências de proteínas homólogas altamente conservadas possibilitando estudos filogenéticos de evolução, e obtenção de ferramentas para a diagnose de doenças virais (LOCALI et al., 2003).

Uma vez detectadas variações entre isolados de um dado vírus por SSCP, a origem de tal variação pode ser confirmada através do sequenciamento. Certas anomalias observadas nos ensaios de SSCP, descritos, por exemplo, em trabalhos feitos com o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*- CMV) (LIN et al., 2003) e OFV (KUBO et al., 2009) puderam ser esclarecidas após o sequenciamento dos fragmentos estudados, quando se verificou que variações de perfis eletroforéticos notados em repetições do mesmo experimento seriam atribuíveis à mescla de populações de isolados em uma mesma hospedeira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizados ramos, folhas e frutos de maracujazeiro sintomático para PVM/DPM provenientes do campo das regiões de Limeira-SP, São Miguel Arcanjo-SP, Piracicaba-SP, Atibaia-SP, Araras-SP, Cordeirópolis-SP, Brotas-SP, Vera Cruz-SP, Brasília e Planaltina-DF e Bahia-BA. As amostras foram lavadas em água de torneira, secas em papel toalha e as regiões contendo as lesões foram cortadas com o auxílio de uma tesoura, previamente desinfetada em álcool 70% e as lesões dos ramos foram retiradas com o auxílio de um bisturi, também desinfetado com álcool 70%. Em seguida, as lesões foram maceradas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C em recipientes fechados. O mesmo procedimento foi utilizado com as amostras sadias de maracujá para controle negativo.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Análises dos efeitos citopáticos em tecidos de plantas infectadas pelo PFGSV foram feitas através de exames de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico. Para tal, fragmentos de áreas sintomáticas (folhas, frutos, ramos) de plantas de maracujazeiro, de diferentes procedências, natural ou experimentalmente infectadas pelo vírus, foram processados como se segue (KITAJIMA; NOME, 1999): (a) fixação em uma solução Karnovsky modificada (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) por um período mínimo de 1 hora, seguida por uma pós-fixação por OsO₄ a 1%; (b) desidratação em série crescente de acetona, infiltração e emblocamento em resina epóxica de baixa viscosidade Spurr; (c) desbaste e seccionamento do tecido emblocado em um ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de diamante e montagem das secções (70-100 nm) em retículo de cobre de 100 ou 300 mesh; (d) contrastação com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e exame em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 e as imagens registradas digitalmente.

3.3 Ensaios moleculares

3.3.1 Isolamento do dsRNA

O dsRNA do PFGSV foi isolado das lesões de plantas infectadas, segundo protocolo básico que envolve filtragem do extrato com resina CF-11 (LOCALI et al., 2003). Dois gramas de lesões foram trituradas com o auxílio de N₂-líquido até a obtenção de um pó fino, transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL contendo 7,0 mL de 2x STE (2x STE = 0,05M Tris-Base; 0,1M NaCl; 0,001M EDTA pH 6,8), 7,0 mL de fenol equilibrado, 7,0 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 1,6 mL de SDS 20%. A amostra foi agitada vigorosamente por 30 minutos e centrifugada a 12000 rpm à 4°C por 10 minutos. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, a concentração do etanol foi ajustada para 16% e em seguida, a amostra foi aplicada em uma coluna contendo CF-11 (Celulose Fibrosa – Whatman) preparada em 1x STE contendo 16% de etanol (2g CF-11; 50 mL de 1x STE + 16% etanol). A coluna foi lavada com 80 mL de 1x STE contendo 16% de etanol, e com 5 mL de 1x STE. O dsRNA foi eluído em 20 mL de 1x STE e em seguida, foi adicionado etanol para uma concentração final de 16%. A amostra foi aplicada em uma segunda coluna como descrito acima, porém, contendo metade do volume da primeira. O dsRNA foi eluído em 6 mL de 1x STE e precipitado em 0,1 volume de 3 M de acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol absoluto, durante 16h a -20°C. O dsRNA foi coletado por centrifugação a 12000 rpm por 25 minutos a 4°C, lavado com etanol 70%, seco em liofilizador e ressuspendido em 25 µL de água Milli-Q autoclavada. Uma alíquota do dsRNA foi analisada em gel de agarose 1% preparado em TAE (0,04M Tris-acetato; 0,001M EDTA) contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

3.3.2 Purificação do dsRNA

O dsRNA do PFGSV foi submetido a dois tratamentos utilizando-se enzimas específicas, para eliminar possíveis contaminações.

O primeiro tratamento foi feito com a enzima Mung Bean Nuclease (Promega), tendo sido utilizados 220 µL do dsRNA (aproximadamente 5 µg), 25 µL do Buffer 10x MBN e 5 µL da enzima Mung Bean Nuclease 85U/µL. A reação foi incubada a 30°C por 30 minutos. Para

controle do tratamento foi utilizada uma amostra de ssRNA nas mesmas condições e concentrações. A digestão foi avaliada em gel de agarose 1%. Em seguida, o dsRNA digerido com Mung Bean Nuclease, foi precipitado com um volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol absoluto, incubado por 1h à -80°C e centrifugado por 25 minutos a 4°C a 12000 rpm. Foi descartado o sobrenadante, lavado com etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 4°C a 12000 rpm, em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado, o “pellet” foi seco e ressuspenso em 100 µL de água milli-Q autoclavada.

O segundo tratamento foi feito com a enzima DNase I – Ampl. Grade (Invitrogen), onde foram utilizados os 100 µL do volume final do dsRNA da digestão anterior, 5 µL da enzima DNase I 1U/µL, 15 µL do Buffer 10x e 30 µL de água milli-Q autoclavada para um volume final de 150 µL. A reação foi incubada a 25°C por 15 minutos, tendo a reação inativada com 1 µL de EDTA 25 mM por 10 minutos a 65°C. Para controle do tratamento foi utilizada uma amostra de DNA nas mesmas condições e concentrações. A digestão foi avaliada em gel de agarose 1%.

Após a digestão com as duas enzimas, foi feita uma extração com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), centrifugado por 3 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), foi centrifugado por 3 minutos a 8000 rpm, transferido novamente o sobrenadante para um novo tubo e adicionado um volume de acetato de sódio 3 M pH 5.2 e 3 volumes de etanol absoluto. O dsRNA foi incubado à -20°C por 16h e em seguida, centrifugado por 25 minutos a 4°C a 12000 rpm. Foi descartado o sobrenadante, lavado com etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 4°C a 12000 rpm, em seguida o sobrenadante foi novamente descartado, o “pellet” foi seco em liofilizador e ressuspenso em 15 µL de água milli-Q autoclavada. Todo volume foi submetido à eletroforese em gel de agarose Low Melting Point (LMP) 1%, tendo as bandas de interesse cortadas e purificadas segundo o Kit GFX da GE (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit), e eluídas em 15 µL de água Milli-Q autoclavada.

Para avaliar a concentração do dsRNA purificado, 2 µL do volume final da purificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3.3 Síntese de cDNA 1ª e 2ª fita

A 1ª fita do cDNA foi sintetizada como indicado por Sambrook et al. (1989), utilizando-se a enzima M-MLV-RT 200U/μL (Invitrogen) e Random Primers 3μg/μL (Invitrogen), a partir de uma alíquota de 5 μL do dsRNA (aproximadamente 250 ng), para um volume final de 20 μL. A 2ª fita do cDNA foi feita utilizando-se os 20 μL do cDNA 1ª fita, 10 μL do Tampão 10x 2ª fita, 2,5 μL da enzima DNA Polimerase I - 9U/μL (Promega), 0,8 μL de RNase H 1,5U/μL (Promega) e água-DEPC para um volume final de 100 μL e incubada a 12°C por 2h, tendo em seguida a reação inativada a 68°C por 10 minutos. Após a síntese da 2ª fita do cDNA, foi feita uma extração com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado e centrifugado durante 5 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugado durante 5 minutos a 8000 rpm. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (1,5 mL) e adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol absoluto para precipitação em temperatura de -20°C por 16h. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado com etanol 70%. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 12000 rpm, foi retirado o sobrenadante, o “pellet” foi seco em liofilizador e a amostra foi ressuspendida em 10 μL de água milli-Q autoclavada.

3.3.4 Construção da Biblioteca de cDNA e clonagem

O cDNA 2ª fita foi ligado a adaptadores (Adap2R 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCGACGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'), através do Kit CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas), onde foi utilizado 5 μL do cDNA 2ª fita, 5 μL de 2x Reaction Buffer, 0,5 μL de DNA Blunting Enzyme, agitado com o auxílio do vortex, incubado a 70°C por 5 minutos e colocado no gelo. Em seguida, foram adicionados 0,5 μL do Adaptador 2R (10 μM), 0,5 μL de T4 DNA ligase 5U/μL para um volume final de 11,5 μL e incubada por 30 minutos a 22°C, tendo a ligação inativada com 1 μL de EDTA 25 mM por 5 minutos a 72°C. O cDNA ligado ao adaptador foi amplificado por Nested PCR (Nested2R 5' AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'), onde foram feitas 2 reações de amplificação, sendo que a

primeira consistiu de 5 μL do cDNA ligado ao adaptador, 2,5 μL do Buffer 10x, 1,1 μL de MgCl_2 50 mM, 1,5 μL do *primer* Nested 2R (10 μM), 1 μL de dNTP 2,5 mM, 0,5 μL de *Taq* DNA Polimerase 5U/ μL (Invitrogen) e água milli-Q autoclavada para um volume final de 25 μL . O programa de termociclagem consistiu de 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e 1 ciclo final de 72°C por 10 minutos, em aparelho termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf). O amplicon da primeira reação foi diluído 1:9 e utilizado como molde para a segunda reação, que consistiu de 7 μL do cDNA amplificado e diluído, 2,5 μL do Buffer 10x, 1,1 μL de MgCl_2 50 mM, 1,5 μL do *primer* Nested 2R (10 μM), 1 μL de dNTP 2,5 mM, 0,5 μL de *Taq* DNA Polimerase 5U/ μL (Invitrogen) e água milli-Q autoclavada para um volume final de 25 μL . O programa de termociclagem foi o mesmo utilizado na primeira reação de amplificação do cDNA e também em mesmo aparelho termociclador. O amplicon obtido da segunda reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose LMP 1%. O fragmento foi cortado do gel, purificado com o Kit GFX da GE e quantificado em gel de agarose 1%.

Após a purificação do amplicon, o purificado foi ligado em vetor pJET1.2 (Kit CloneJET PCR Cloning Kit-Fermentas), para clonagem, onde foi utilizado uma alíquota de 2,5 μL do amplicon purificado, 5 μL de 2x Reaction Buffer, 0,5 μL de DNA Blunting Enzyme, 1 μL de Water nuclease-free, agitado e incubado a 70°C por 5 minutos e colocado no gelo. Em seguida, foi adicionado 0,5 μL do pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/ μL) e 0,5 μL de T4 DNA ligase (5U/ μL) para um volume final de 10 μL e incubado a 22°C por 30 minutos. Após a reação de ligação, o plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α através de transformação por choque térmico. A cultura de célula transformada (100 μL) foi plaqueada em meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,5% de ágar) acrescido de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubada em estufa a 37°C por 16h.

3.3.5 Estoques dos clones positivos

Os clones foram coletados com palitos previamente esterilizados, para microplacas de 96 poços, contendo cada poço 90 μL de meio CG acrescido de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubados

por 16h em estufa a 37°C. As culturas permanentes foram feitas através da adição de 30 µL de glicerol 50% em cada poço e estocadas em freezer -80°C.

3.3.6 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com o protocolo Boiling prep. A cultura permanente foi repicada em placas (“Mega Titer”) contendo 1 mL de meio CG acrescido de ampicilina (100µg/mL). As placas foram seladas com filme adesivo e cada poço perfurado com agulha estéril para aeração da bactéria. Os clones foram crescidos por 16h a 37°C em shaker sob agitação de 300 rpm. Após o crescimento dos clones transformados, as placas foram centrifugadas por 6 minutos a 3000 rpm, sendo em seguida, checada qualquer irregularidade. O adesivo foi removido, o sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida sobre papel absorvente por 1 minuto. As placas foram levadas ao freezer -80°C por 15 minutos e em seguida incubadas em forno a 37°C por 10 minutos. Foi adicionado 25 µL de água milli-Q autoclavada e agitado vigorosamente por 5 minutos, em seguida foi adicionado 70 µL da solução de Lise (STET-Tween 20, 10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM de EDTA 0,5M pH 8.0, 100 mM de NaCl, 5% de Tween 20, 500µg/mL de Lysozyme), agitado vigorosamente por 1 minuto e mantido em temperatura ambiente (20-25°C) por 10 minutos. As placas foram colocadas lado a lado no microondas, sem o adesivo, por 25 segundos e o processo foi repetido virando as placas a 180°. Foi adicionado 400 µL de água milli-Q autoclavada e as placas foram seladas e misturadas com o auxílio do vortex por 1 minuto e logo em seguida resfriadas no gelo por 15 minutos. As placas foram centrifugadas a 3000 rpm, a 20°C por 45 minutos. Foi transferido 50 µL do sobrenadante para uma nova placa. As placas contendo o DNA foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.3.7 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas de acordo com as instruções da Applied Biosystems para o “DNA sequencing Kit Big Day Terminator cycle sequencing ready reaction”. Para a reação foram utilizados 2 µL de DNA (aproximadamente 400 ng), 0,5 µL do *primer* T7 (5 pmols), 0,4 µL de Big Day, 2 µL de “Save Money” (400 mM Tris-HCl pH 9.0; 10 mM MgCl₂) e 5,1 µL de água milli-Q autoclavada para um volume final de 10 µL. A reação foi submetida ao

aparelho termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf) com o programa de termociclagem composto de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos e 1 ciclo final de 16°C. Para a reação de precipitação foi adicionado em cada amostra 80 µL de isopropanol 65%, misturado 3 vezes por inversão e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, foi centrifugado a 3000 rpm, a 20°C por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi retirado o excesso de líquido invertendo a placa em papel absorvente por 1 minuto, foi adicionado 200 µL de etanol 60% e centrifugado a 3000 rpm, a 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e mais 200 µL de etanol 60% foi adicionado, sendo novamente centrifugado a 3000 rpm, a 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o excesso foi retirado centrifugando-se a placa invertida em papel absorvente por 5 segundos. As amostras foram secas a temperatura ambiente por 1h. Antes das amostras serem submetidas ao aparelho de sequenciamento, foi adicionado ao DNA 9 µL de hi-di formamida, sendo desnaturado a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento foi feito no Sequenciador automático ABI 3730 da Applied Biosystems.

3.3.8 Análise das sequências

Os cromatogramas foram submetidos à análise pelos programas “PhredPhrap e Consed”, empregando-se como critério de classificação pelo menos 300 bases por sequência com qualidade acima de 20. Através do alinhamento das sequências similares, foram formados “contigs” com suas respectivas sequências consensos. As sequências-consensos foram submetidas à consulta de similaridade com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information). As ferramentas utilizadas para esta consulta foram o BLASTx e BLASTn e só foram considerados os alinhamentos entre sequências protéicas e nucleotídicas que obtiveram e-value inferior a 10^{-10} .

3.3.9 Síntese dos iniciadores (*primers*)

A partir dos “contigs” formados pelas análises das sequências obtidas, foram desenhados *primers* específicos, visando à amplificação de regiões genômicas codificadoras das proteínas de movimento (*MP*), replicase (*Rep*) e p24 associadas ao PFGSV. Para a síntese desses *primers* foi

utilizado o programa Primer3 e para verificação da qualidade dos *primers* foi utilizado o programa NetPrimer.

3.3.10 RT-PCR

Os *primers* sintetizados para as regiões da *MP* (5' CGATATTTGATCAATCCGTT 3'/3' AACCTCGAATTTTAAGGTG 5' – PFGSV-MP-F/R), *Rep* (5' ATTCATGCGTTTCACGGTTA 3'/3' CGAATGCCTCTGACACA ACT 5' – PFGSV-Rep-F/R) e *p24* (5' CTGTTGTGCCAAATCATCAA 3'/3' TTCATCGCAAGTTCGTATACCT 5' - PFGSV-p24-F/R) putativas do PFGSV foram testados através de PCR a partir de uma alíquota de 2 µL de cDNA, 2,5 µL de Tampão 10x, 0,9 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTP 2.5 mM, 0,5 µL do *primer* Forward (PFGSV-F) 10 µM e 0,5 µL do *primer* Reverse (PFGSV-R) 10 µM, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen) e água Milli-Q autoclavada para um volume final de 25 µL. O programa de termociclagem consistiu de 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 35 segundos e 1 ciclo final de 72°C por 5 minutos em aparelho termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µL do RNA total, que foi previamente desnaturado a 70°C por 5 minutos e resfriado no gelo. Em seguida, foram adicionados 1 µL de dNTP 2,5 mM, 0,8 µL de Random Primers 3µg/µL (Invitrogen), 4 µL de Tampão 5x FS, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL da enzima M-MLV-RT 200U/µL (Invitrogen), 0,5 µL de RNase OUT 40U/µL (Invitrogen) e água-DEPC autoclavada para um volume final de 20 µL. O RNA total foi extraído a partir do protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997), com algumas modificações. Foi utilizado de 50 a 100 mg de tecido vegetal, tanto para as amostras sintomáticas quanto para as amostras sadias, sendo o tecido macerado em N₂-líquido. Foi adicionado 500 µL de Tampão Wash Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2M NaCl e 0,05 % de BSA), misturado por alguns segundos com o auxílio do vortex e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 600 µL de CTAB (2% de CTAB, 1.4M NaCl, 0,1M Tris-HCl pH8, 0,5% de β-ME), as amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas em banho-maria a 60°C por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitado vigorosamente e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi coletado e

transferido para um novo tubo (1,5 mL), foi adicionado novamente 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitado vigorosamente e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e foram adicionados um volume de isopropanol 100% e 1/10 do volume de acetato de amônio 7.5 M. As amostras foram levadas ao freezer -20°C por 15 minutos para precipitação e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 70%, centrifugadas por 1 minuto a 12000 rpm a 4°C e o sobrenadante novamente descartado. As amostras foram secas em liofilizador e ressuspensas com 30 µL de água-DEPC autoclavada.

Foram feitos ensaios de tentativas de amplificação com outros VTB-C, como o CiLV-C, SvRSV, HibGSV e SchefRSV.

3.3.11 SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism

A avaliação dos padrões de SSCP foi feita a partir dos amplicons das regiões genômicas correspondentes à *MP*, *Rep* e *p24* do PFGSV, que foram purificados do gel LMP 1% com o Kit GFX da GE. As amostras analisadas foram purificadas antes da análise por SSCP para maior precisão dos resultados.

Para análise por SSCP, foi adicionado um volume da solução desnaturante (95% de formamida, 20 mM de EDTA e azul de bromofenol) e os fragmentos foram desnaturados a 95°C por 10 minutos. Em seguida, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% (16 x 20 cm x 1mm BIO-RAD Protean II xi) utilizando o tampão TBE 10x (Tris-Base 108g/L, Ácido Bórico 55g/L, EDTA 0,5M pH 8,0 40mL/L) na concentração 0,5x. A corrida foi realizada a 200 volts por 5h a 20°C. Os géis foram corados em nitrato de prata conforme descrito por Beidler et al. (1982).

Os fragmentos foram analisados pela comparação das diferenças das fitas simples desnaturadas após eletroforese.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal

Todos os sintomas de pinta verde encontrados em ramos, folhas e frutos de maracujazeiro provenientes de todas as regiões já citadas anteriormente, foram registrados com câmera digital. Entre as amostras analisadas encontram-se espécies de maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), maracujá-roxo (*P. edulis* f. *edulis*) e maracujá doce (*P. alata*). Os sintomas observados foram semelhantes em todas as regiões analisadas. Nos ramos lesões que inicialmente são cloróticas, evoluem para necróticas (Figura 3A e B), e quando numerosas podem coalescer, anelando o ramo e resultando na morte da planta. As amostras de folha foram encontradas em menor quantidade, devido à difícil identificação dos sintomas quando as folhas ainda estão verdes. Mas quando as folhas entram em senescência, áreas verdes, em geral ao longo das nervuras, tornam-se evidentes (Figura 3C) onde por MET confirma-se a presença do PFGSV. Os sintomas mais visíveis, e que deram nome à enfermidade e ao vírus, estão nos frutos, onde surgem manchas verdes, pequenas e circulares, bem visível em frutos maduros amarelos, mas visível também, nos frutos esverdeados (Figura 3D). Isolados coletados em Piracicaba-SP e em Brasília e Planaltina-DF, parecem ser mais fracos, pois embora exibam sintomas em folhas e frutos, as lesões nos ramos são menos numerosas e não causam a morte do ramo ou da planta. Os sintomas são essencialmente similares aos da enfermidade conhecida como definhamento precoce, na região da Bahia, notando-se contudo, que as lesões caulinares (Figura 3B) são mais severas resultando em maiores danos às plantações de maracujá. Algumas plantas de maracujá silvestre (*Passiflora morifolia* Mast.) foram infectadas com PFGSV e apresentaram sintomas típicos em suas folhas (Figura 3E), sendo então coletadas para análise por RT-PCR.



Foto: Cortesia do Dr. Francisco F. Laranjeira, EMBRAPA Mandioca e Fruticultura



Foto: Cortesia Prof. Dr. Elliot W. Kitajima (NAP/MEPA-ESALQ/USP)

Figura 3 – Sintoma de pinta verde em diferentes tecidos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) (A-D) e em *Passiflora morifolia* (E): A e B. Lesões nos ramos; C. áreas verdes em folhas senescentes; D. manchas verdes nos frutos; E. áreas verdes ao longo das nervuras em folha de *P. morifolia*.

4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Nos exames de secções ultrafinas feitos por MET a partir dos tecidos de maracujazeiro com sintoma de PVM/DPM, foram encontrados partículas baciliformes em cisternas do retículo endoplasmático como pode ser visto na Figura 4A, e esses efeitos citopáticos também foram visualizados na amostra de *P. morifolia* (Figura 4B), nova hospedeira do PFGSV. Os resultados positivos por MET, também foram confirmados por RT-PCR.

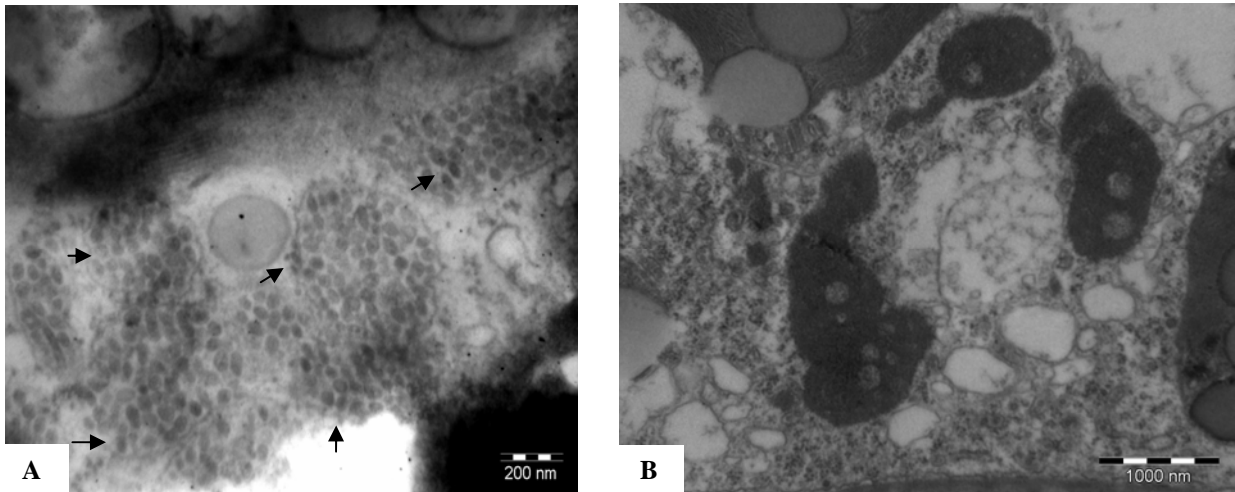


Foto: Cortesia Prof. Dr. Elliot W. Kitajima (NAP/MEPA-ESALQ/USP)

Figura 4 – Micrografia de secções ultrafinas de tecido de maracujazeiro com sintoma de PVM/DPM. As setas indicam partículas baciliformes contidas em cisternas do retículo endoplasmático. **A** – *P. edulis* sp.; **B** – *P. morifolia*

4.3 Isolamento e purificação do dsRNA

Tentativas de se obter dados moleculares do PFGSV foram feitas com um isolado proveniente da região de Limeira-SP, de onde se obteve maior quantidade de material vegetal. Através do protocolo básico como descrito no item 3.3.1 envolvendo filtragem do extrato com resina CF-11 (LOCALI et al., 2003), foram utilizadas apenas as lesões provenientes de folha e ramo. O extrato das lesões de fruto após as primeiras etapas do isolamento apresentaram-se muito viscoso, resultando na obstrução da coluna e assim não foram utilizados. Esse protocolo resulta

no isolamento do dsRNA viral dos tecidos infectados. Para confirmar a presença de dsRNA e avaliar sua concentração, 2 μ L do volume final do extrato foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 5). Os extratos geraram duas bandas bem definidas com aproximadamente 9Kb e outra em torno de 5Kb, semelhantes aos padrões encontrados em CiLV-C (LOCALI et al., 2003) e SvRSV (FERREIRA et al., 2007).

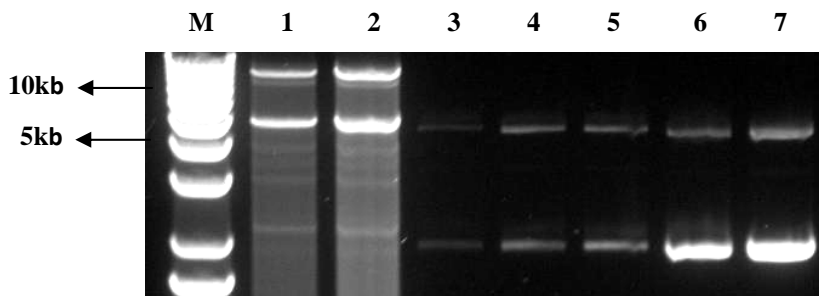


Figura 5 – **M** – Marcador molecular de 1Kpb DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** – dsRNA de folha sintomática para PFGSV; **2** – dsRNA de ramo sintomático para PFGSV; **3 a 7** – Maracador pGEM3Z de 25, 50, 100, 200 e 400 ng respectivamente

Para evitar contaminação com material genômico da planta, o dsRNA do PFGSV foi purificado através de dois tratamentos utilizando-se enzimas específicas que removem ssRNA e DNA residual do extrato.

O primeiro tratamento foi feito com a enzima Mung Bean Nuclease (Promega), como descrito no item 3.3.2, para eliminar contaminação com ácidos nucleicos de fita simples. Para controle do tratamento foi utilizada uma amostra de ssRNA nas mesmas condições e concentrações do dsRNA do PFGSV. A digestão foi avaliada em gel de agarose 1% (Figura 6).

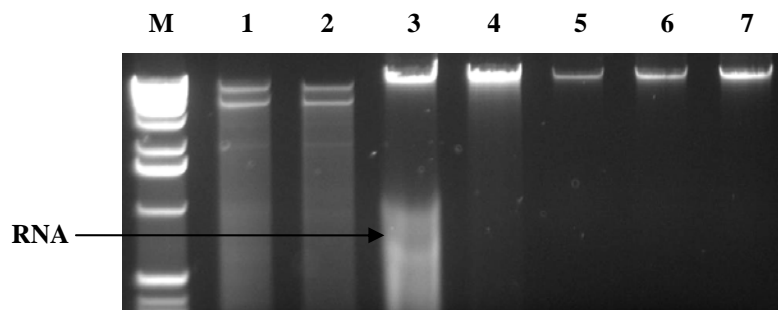


Figura 6 – **M** – Marcador molecular 1Kpb DNA Extension Ladder (Invitroge); **1** - 2 μ L do dsRNA não digerido; **2** – 2 μ L do dsRNA digerido com Mung Bean Nuclease; **3** – 2 μ L do RNA controle não digerido; **4** – 2 μ L do RNA controle digerido; **5 a 7** – Marcador Lambda de 50, 100 e 200ng respectivamente

Em seguida, o dsRNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol absoluto, como já descrito no item 3.3.2, para eliminar os resíduos da enzima Mung Bean Nuclease.

O segundo tratamento foi feito com a enzima DNase I – Ampl. Grade (Invitrogen), também já descrito no item 3.3.2, onde foram eliminadas possíveis contaminações com DNA genômico. A digestão foi avaliada em gel de agarose 1% (Figura 7).

O rastro na canaleta três, como indicado pela seta branca, corresponde à degradação da amostra do DNA controle, porém, o tratamento funcionou como mostra a indicação da seta na canaleta um, que correspondente ao DNA genômico, e também pela ausência de banda e rastro da canaleta quatro. Mostrando assim, que o DNA genômico foi eliminado da amostra em tratamento (canaleta dois) utilizada assim, nas próximas etapas.

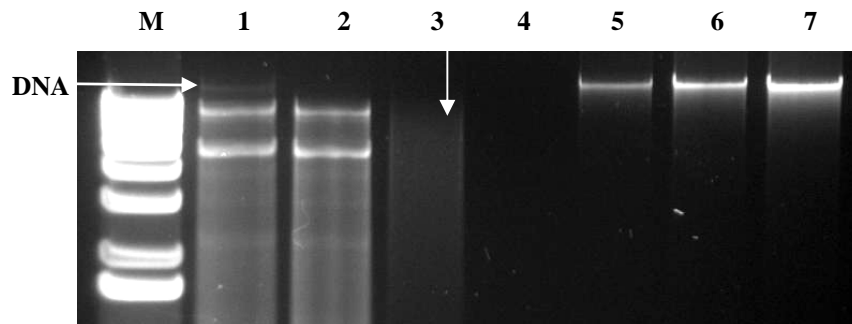


Figura 7 – **M** – Marcador molecular 1Kpb DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** - 2 μ L do dsRNA não digerido; **2** - 2 μ L do dsRNA digerido com DNase I; **3** - μ L do DNA controle não digerido; **4** - 2 μ L do DNA controle digerido; **5 a 7** – Marcador Lambda de 50, 100 e 200 ng respectivamente

Em seguida, como descrito no item 3.3.2, foi feita uma extração com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e uma precipitação com acetato de sódio e etanol absoluto, eliminando assim, todos os resíduos dos reagentes anteriores. Após essas digestões e extrações a amostra foi então purificada, limpa de qualquer contaminante, restando apenas o dsRNA do PFGSV.

Todo o volume foi submetido à eletroforese em gel de agarose LMP 1%, sendo as bandas de interesse cortadas do gel e purificadas segundo o Kit GFX da GE, com um volume final de 15 μ L (Figura 8).

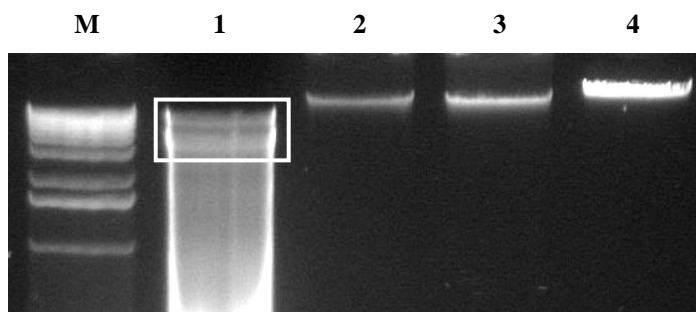


Figura 8 – **M** – Marcador molecular 1Kbp DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** – dsRNA purificado; **2 a 4** – Marcador Lambda de 200, 400 e 600 ng respectivamente. O retângulo branco no gel indica as bandas de interesse que foram cortadas e purificadas

Para avaliar a concentração do dsRNA purificado com o Kit, 2 μ L do volume final da purificação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 9).

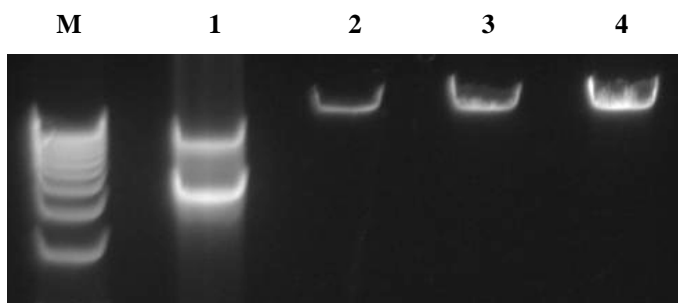


Figura 9 – **M** – Marcador molecular 1Kbp DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** – dsRNA purificado do gel; **2 a 4** – Marcador Lambda de 25, 50 e 100 ng, respectivamente

4.4 Construção da Biblioteca de cDNA e clonagem

A partir do dsRNA do PFGSV já purificado uma alíquota foi utilizada para a síntese da 1ª e 2ª fitas do cDNA como descrito no item 3.3.3, sendo em seguida ligada a adaptadores. Esses adaptadores auxiliaram no anelamento do *primer* Nested para a amplificação do fragmento de interesse. Após as duas reações de amplificação utilizando o *primer* Nested, o amplicon obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose LMP 1%. O fragmento foi purificado do gel com o Kit GFX da GE (Figura 10) e quantificado em gel de agarose 1% (Figura 11).

A região de interesse corresponde a um fragmento com tamanho de 500 pb a 1000 pb, fragmentos menores que 500 pb foram desconsiderados a fim de evitar possíveis contaminações.

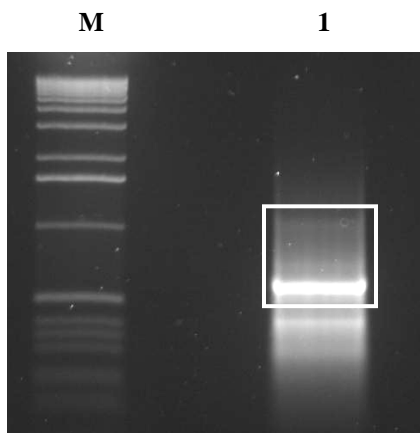


Figura 10 – **M** – Marcador molecular de 1Kbp DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** – amplicon da segunda reação de amplificação (Nested). O retângulo branco indica o fragmento de interesse que foi cortado do gel e purificado

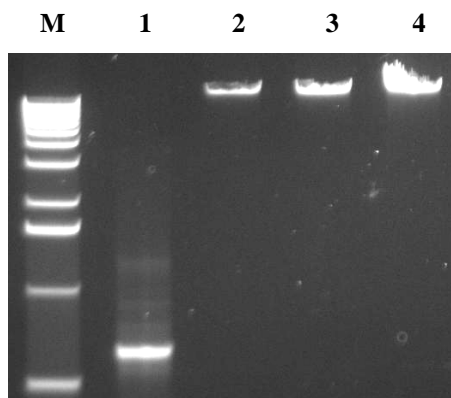


Figura 11 – **M** – Marcador molecular de 1Kbp DNA Extension Ladder (Invitrogen); **1** - 2 μ L do purificado do amplicon da segunda reação (Nested); **2 a 4** – Marcador Lambda 25, 50 e 100 ng, respectivamente

Após a quantificação do purificado, o mesmo foi ligado em vetor pJET1.2 (Kit CloneJET PCR Cloning Kit-Fermentas), para clonagem, como descrito no item 3.3.4. Para essa clonagem foi utilizado o vetor pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit-Fermentas), por ter se mostrado mais eficiente e ter uma metodologia mais rápida (poucos minutos de ligação), além de não necessitar do uso de IPTG e X-Gal para identificação dos clones contendo o inserto de DNA, devido ao seu processo de seleção positiva.

Em relação à biblioteca, inicialmente foi feita com amostras provenientes da região da Bahia-BA, mas as amostras por não estarem em boas condições, muito oxidadas, não foi possível chegar até o final dessa última etapa de purificação, com boa qualidade e concentração. O purificado foi clonado e sequenciado, mas não houve resultado significativo. Dessa forma, a biblioteca foi feita apenas a partir de amostras provenientes da região de Limeira-SP, da qual foi possível obter grande quantidade de material vegetal e também boa qualidade e concentração do purificado, tendo assim resultados significativos nas análises das sequências.

Ao final da transformação foram gerados 672 clones, os quais foram devidamente coletados e estocados em freezer -80°C.

4.5 Análise das sequências

Após a extração do DNA plasmidial e sequenciamento, como descrito nos itens 3.3.6 e 3.3.7, os cromatogramas foram submetidos à análise pelos programas “PhredPhrap e Consed”. Através do “PhredPhrap”, foram retiradas das sequências as regiões correspondentes aos vetores e adaptadores empregados na clonagem. Através do alinhamento das sequências similares, foram formados “contigs” com suas respectivas sequências consensos. As sequências consensos foram submetidas à consulta de similaridade com outras sequências depositadas no GenBank. Para verificação da qualidade dos “contigs”, os mesmos foram analisados pelo “Consed”, que mostrou o número de “reads” que formavam cada “contig”, a sequência de bases e sua qualidade.

Dos 672 clones obtidos da biblioteca do PFGSV, foram gerados 23 “contigs” que evidenciaram similaridade com parte das regiões codificadoras da proteína de movimento (*MP*), replicase (*Rep*) e *p24* do CiLV-C, membro-tipo do recém-criado gênero *Cilevirus* e que apresenta morfologia, efeitos citopáticos e vetor semelhantes aos do PFGSV.

A ORF replicase é umas das que compõem o RNA 1 do CiLV-C. Codifica uma poliproteína com função envolvida na replicação viral e apresenta quatro domínios funcionais conservados. A região do PFGSV apresentou similaridade com a região da cisteína-protease da replicase, como indicado na figura 12.

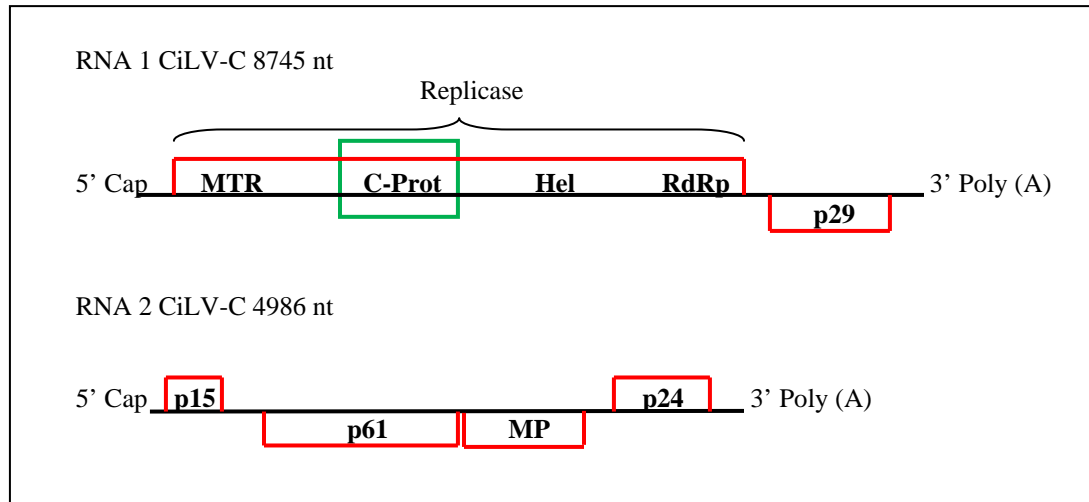


Figura 12 – Esquema da organização e estrutura do genoma do CiLV-C. **RNA 1** – composto por duas ORFs. A primeira ORF é composta por quatro domínios: metiltransferase (MTR), cisteína-protease (C-Prot), helicase (Hel) e RNA polimerase (RdRp). A segunda ORF codifica uma proteína de uma possível capa protéica de 29KDa (p29). **RNA 2** – composto por quatro ORFs, a primeira codifica uma proteína de 15KDa, a segunda uma de 61KDa, a terceira uma de 32KDa (a proteína de movimento) e a quarta uma proteína de 24KDa. Fonte: Locali-Fabris et al. (2006)

A comparação por BLASTx indicou 23 “contigs” apresentando similaridade com regiões associadas aos genes do CiLV-C, parte da região codificadora da *MP* e *Rep*, e da região da *p24* com e-value menor que 10^{-10} . Após a análise de todos esses resultados foram escolhidos três “contigs” para o desenho dos *primers*. Nesses três “contigs”, não foram encontradas similaridades significativas em nível de nucleotídeo (BLASTn), ou seja, não foi detectada similaridade com nenhuma sequência depositada em todo o GenBank. Foi possível apenas encontrar similaridade em nível de proteína (BLASTx).

A figura 13 apresenta os resultados correspondentes aos primeiros “hits” e ao alinhamento obtidos no BLASTx para o “contig 6” correspondente a região codificadora da *MP* do PFGSV, que apresentou similaridade com a região codificadora da proteína de movimento (*MP*) do CiLV-

C. As figuras 14 e 15 correspondem também aos primeiros “hits” e alinhamentos obtidos no BLASTx para os “contigs 8 e 13” das proteínas *p24* e *Rep* respectivamente, e que apresentou similaridade com a região codificadora da *p24* e replicase também do CiLV-C.


Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gb ABG33782.1 	31 kDa protein [Cytoplasmic citrus leprosis vi...	<u>141</u>	5e-32
gb ABA42871.1 	p32 [Cytoplasmic citrus leprosis virus]	<u>141</u>	5e-32
ref YP_654542.1 	putative movement protein [Cytoplasmic citru...	<u>141</u>	5e-32 
GENE ID: 4155852 MP putative movement protein [Cytoplasmic citrus leprosis virus] (10 or fewer PubMed links)			
Score = 141 bits (355), Expect = 6e-32 Identities = 65/120 (54%), Positives = 93/120 (77%), Gaps = 2/120 (1%) Frame = +3			
Query	24	EAIFDQSVVNSTSGPQIAIFNSGYSIPNEDRVSVGGNESHRRRLGLSYEIEHSENISGGH	203
		EA+ DQ V VNST GP + + N +SIPNEDR V G+E HRRLG+ Y+++ +NISG	
Sbjct	113	EAVNDQEVTVNSTGGPCVVMNCAHSIPNEDRTHVNGSEVHRRRLGIQYQVD-CDNISG-R	170
Query	204	ITTFALTLWREAFYFQPSNFKVHEPRLIPITVGYKKAQMSRSHADLKRAISRGMVTTGH	383
		+TTF++T LWREAF F+PS +KV +P ++PI+VG++KA +++SHADL+R+I RG++ T H	
Sbjct	171	VTTFSITALWREAFSFRPSFYKVSDDLVPISVGFRAKAVIAKSHADLQRSIGRGLIVTHH	230

Figura 13 – Primeiros “hits” e alinhamento obtidos pelo BLASTx para o “contig 6” do PFGSV que apresentou similaridade com a região codificadora da *MP* do CiLV-C


Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
ref YP_654543.1 	p24 [Citrus leprosis virus C] >gb ABA42872.1...	92.8	2e-17 
GENE ID: 4155848 p24 p24 [Cytoplasmic citrus leprosis virus] (10 or fewer PubMed links)			
Score = 92.8 bits (229), Expect = 2e-17			
Identities = 48/85 (56%), Positives = 62/85 (72%), Gaps = 1/85 (1%)			
Frame = -3			
Query	378	MDPRFLRG-RSLVTNVTDKREERLKSASFSLSDIQQILLRYIQKPYVLLMYACVLVLF	202
		MD + L+ + L+ + R+R K A+ S ++DI+QILLR+IQKP V++MY VLVLF	
Sbjct	1	MDAQLLQANKRLRRRAANVRQRYKMLATESFVADIKQILLRFIQKPNVIIMYISVLVLF	60
Query	201	MHIDAGTHDILDDLAQFPNNPVIE	127
		HID+ THDILDDLA QFPNN IE	
Sbjct	61	AHIDSNTHDILDDLAAQFPNNTFIE	85

Figura 14 – Primeiros “hits” e alinhamento obtidos pelo BLASTx para o “contig 8” do PFGSV que apresentou similaridade com a região codificadora da *p24* do CiLV-C



Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gb ABA42875.1	polyprotein [Citrus leprosis virus C]	<u>324</u>	8e-87
ref YP_654538.1	replicase [Citrus leprosis virus C] >gb ABC7...	<u>324</u>	8e-87 
gb ABG33779.1	286 kDa polyprotein [Cytoplasmic citrus leprosis virus]	<u>320</u>	2e-85
ref YP_654566.1	cysteine protease; C-prot [Citrus leprosis v...]	<u>115</u>	8e-24 
GENE ID: 4155849 CLVC_sRNA-1gp1 putative replication-like polyprotein [Cytoplasmic citrus leprosis virus] (10 or fewer PubMed links)			
Score = 324 bits (831), Expect = 8e-87			
Identities = 159/308 (51%), Positives = 215/308 (69%), Gaps = 2/308 (0%)			
Frame = +1			
Query	31	LLYRHLCHINYEDYKSSVPVDYNDKHVCDTPLQHVS VAGDGNCLYNC FVKAGLYKGVTVCL	210
		L +LC +++ Y S ++ ND C L + V GDGNCLY CFVKA LY+G++VC	
Sbjct	654	LTLSNLCDHDFDAYLPS-HIEVNDAK-CTKDLTVIQVPGDGNCLYYCFVKACLYRGISVC	711
Query	211	DLKARLRDSIFYSEVDVLATEEGDTEFSESLHRDGVFGNKFTLMLIAKTFHINICVHLMF	390
		DLK+RLRDS ++ EV LA + G+ EF +SL RDGV+GNKFTL+LI+KTF++NICVHL	
Sbjct	712	DLKSRLRDSPLYFLEVAKLARDAGEDEFLDSLRLDGVYGNKFTLILISKTFNVNICVHLKG	771
Query	391	RETTFMRFVTVNKGSRYIHLQLRDQHYDLLIPYVKMGLMDRTIVACGSVALQTPSDCTRTRK	570
		F NKGSR+IHLQL HY LL+P +K GL+D ++ G++++ P+ +	
Sbjct	772	GRELITHFISNKGSRFIHLQLEHSHYSLLVPCIKAGLIDEHVLCHGALSMVVP TTHDYRR	831
Query	571	LDNLYKVYSMDGTL SKYRNVFNTVFKGPFLNLREMYMELLNAAELCQRHSNKFLITDAN	750
		L +LYK+Y+ DGT++ Y N+FN +KGPFLN+ E+ +ME+ ++ E+ NKFLITD	
Sbjct	832	LVDLYKIYTRDGTIASYFNIFNNSYKGPFLNVYELGFMEIASSLEIPSSSGNKFLITDVW	891
Query	751	MRDAVRALRILD PSSYVIAMRCNSNKRPNDR LGVCDFTMDSSFHEESFCLSTVLSDVLEV	930
		+ ++ALR+LDP S VI +R ++ R DR GVCDF TMS FHEESFCLST LSDVL +	
Sbjct	892	LHHCIKALRVLDPHSNVIVLRSSNTRSIPDRYGVCDF TMDSEFHEESFCLSTTSLSDVLNL	951
Query	931	GLYSQCNV 954	
		G+YSQC V	
Sbjct	952	GIYSQCMV 959	

Figura 15 – Primeiros “hits” e alinhamento obtidos pelo BLASTx para o “contig 13” do PFGSV que apresentou similaridade com a região codificadora da *Rep* do CiLV-C

4.5 Desenho dos iniciadores (*primers*)

Foram desenhados *primers* específicos visando à amplificação da região genômica que codifica a proteína de movimento (*MP*), a *p24* e a replicase (*Rep*) associadas ao PFGSV, como descrito no item 3.3.9. Foi analisada a melhor região dos “contigs” e também, aceitável pelo

4.7 Desenvolvimento e validação do teste de diagnóstico

Os *primers* sintetizados para as regiões das putativas *MP* (5' CGATATTTGATCAATCCGTT 3'/3' AACCTCGAATTTTAAGGTG 5' – PFGSV-MP-F/R), *Rep* (5' ATTCATGCGTTTCACGGTTA 3'/3' CGAATGCCTCTGACACA ACT 5' – PFGSV-Rep-F/R) e *p24* (5' CTGTTGTGCCAAATCATCAA 3'/3' TTCATCGCAAGTTCGTATACCT 5' - PFGSV-p24-F/R) do PFGSV, foram testados através de RT-PCR como descrito anteriormente no item 3.3.10. Foram utilizadas amostras de plantas sintomáticas para a PVM e, como controle da reação, amostras de maracujazeiro sadias.

Houve alta correlação entre a presença de sintomas de PVM/DPM e a detecção do PFGSV por RT-PCR. Das 44 amostras testadas, 34 apresentavam sintomas típicos da doença e todas foram positivas para PFGSV para os três pares de *primers* testados (Tabela 1, Figura 19). Dessas, 18 foram também confirmadas por MET que indicou a presença de efeitos citopáticos característicos para VTB-C nos tecidos examinados. Tecidos de frutos e ramos não foram avaliados por MET, pois oferecem dificuldades para seu processamento, indicando dessa maneira uma vantagem a técnica molecular (RT-PCR) para diagnóstico da doença.

A RT-PCR resultou na amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado, de aproximadamente 245 pb para a região da *MP*, 299 pb para a região da *p24* e 322 pb para a região da *Rep*, para as amostras sintomáticas obtidas de diversas regiões geográficas do Brasil (SP, BA e DF), inclusive para as amostras identificadas como apresentando definhamento precoce e para a nova espécie hospedeira identificada *P. morifolia* (Figura 19). O fato de esta espécie silvestre ser suscetível ao PFGSV indica que esta e outras espécies de *Passiflora* podem servir como reservatórios naturais do vírus.

A hipótese de que PVM e DPM seriam duas denominações para a mesma doença, já havia sido levantada em função das similaridades dos sintomas observados, vetor e morfologia do agente causal. No entanto, os resultados aqui apresentados correspondem à primeira evidência concreta e inequívoca de que realmente se trata da mesma enfermidade, uma vez que a RT-PCR é um teste específico e confiável usado em diagnóstico de doenças virais e os resultados foram consistentes para várias regiões do genoma viral.

Tabela 1 – Resultado das amplificações por RT-PCR em amostras de maracujazeiro de diferentes localidades sintomáticas para pinta verde

Espécies ¹	Origem	No. de amostras	Tecido vegetal	RT-PCR MP/p24/Rep	MET ²
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Limeira-SP	4	Folha, ramo e fruto	3/4	n.e.
<i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	Limeira-SP	1	Fruto	1/1	n.e.
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Araras-SP	1	Fruto	1/1	n.e.
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Cordeirópolis-SP	2	Folha	2/2	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Vera Cruz-SP	2	Fruto	2/2	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Piracicaba-SP	3	Folha	2/3	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Brotas-SP	2	Folha	1/2	n.e.
<i>P. alata</i>	São Miguel Arcanjo-SP	1	Folha	1/1	n.e.
<i>P. alata</i>	Atibaia-SP	2	Fruto	1/2	n.e.
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Bahia-BA	2	Folha	1/2	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Bahia-BA	9	Folha e ramo	7/9	n.e.
<i>P.a alata</i>	Bahia-BA	1	Folha	1/1	n.e.
<i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	Bahia-BA	1	Folha	1/1	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Planaltina-DF	3	Folha	3/3	+
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Brasília-DF	8	Folha e ramo	5/8	+
<i>P. edulius</i> f. <i>edulis</i>	Brasília-DF	1	Fruto e folha	1/1	+
<i>P. morifolia</i>	Piracicaba-SP	1	Folha	1/1	+

¹ *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* = maracujá azedo ou amarelo; *Passiflora edulis* f. *edulis* = maracujá-roxo; *Passiflora alata* = maracujá doce

² MET – Microscopia eletrônica de transmissão: n.e., não examinado; presença (+) ou ausência (-) de efeitos citopáticos associados com a infecção do vírus da pinta verde do maracujazeiro

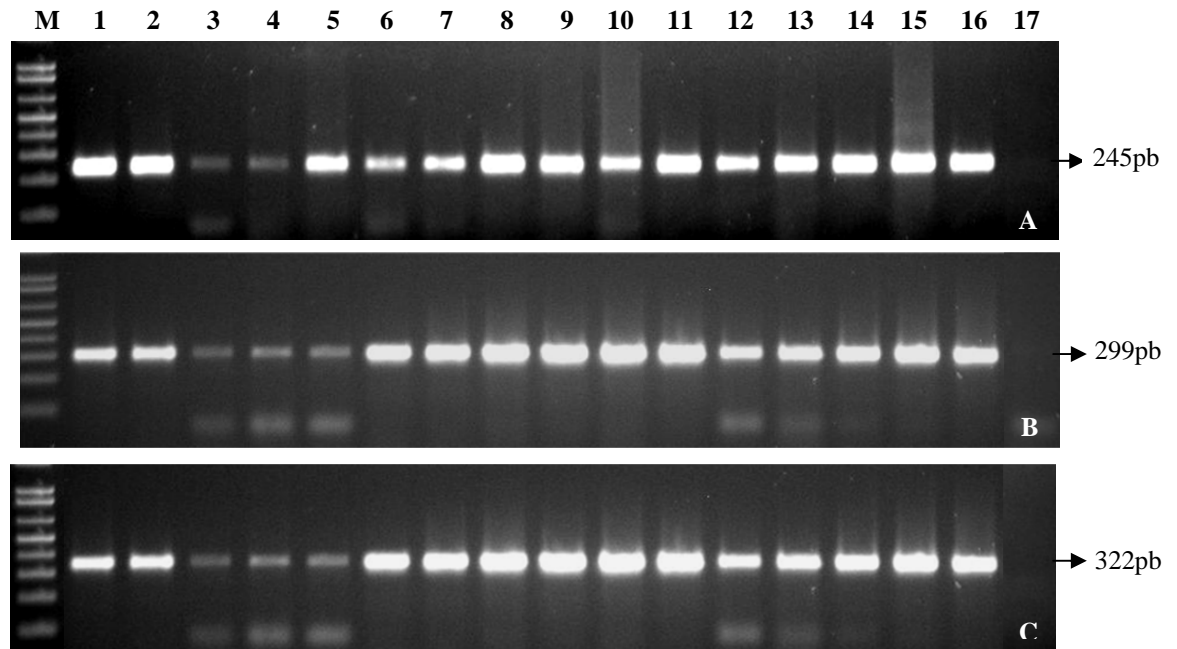


Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos amplicons obtidos por RT-PCR a partir de amostras de maracujazeiro de diferentes localidades exibindo sintomas de PVM/DPM usando os três pares de *primers* para o PFGSV. **A** - *MP*, **B** -*p24*, **C** -*Rep*. **M** – 1Kpb DNA Ladder Plus (Invitrogen); **1** – maracujá azedo de Limeira-SP; **2** – maracujá azedo de Araras-SP; **3** – maracujá doce de Atibaia-SP; **4** – maracujá doce de São Miguel Arcanjo-SP; **5** – maracujá azedo de Vera Cruz-SP; **6** – maracujá azedo de Brotas-SP; **7** – maracujá azedo de Cordeirópolis-SP; **8** – maracujá azedo de Piracicaba-SP; **9 e 10** – maracujá azedo de Brasília-DF; **11** – maracujá roxo de Brasília-DF; **12 e 13** – maracujá azedo da Bahia-BA (PVM/DPM); **14** – maracujá doce da Bahia-BA; **15 e 16** – maracujá silvestre de Piracicaba-SP; **17** – maracujá azedo sadio de Cordeirópolis-SP (controle negativo)

Devido à similaridade observada entre as sequências do PFGSV e do CiLV-C, foram feitos testes com os *primers* do PFGSV para a região codificadora da *MP*, *p24* e *Rep*, em amostras de laranja doce sadias e sintomáticas para o CiLV-C, e todos os resultados foram negativos (Figura 20). Isto está de acordo com resultados de ELISA usando anti-soro contra proteína da capa protéica do CiLV-C, que não reconheceu o PFGSV em extratos de tecidos infectados (CALEGARIO, 2009).

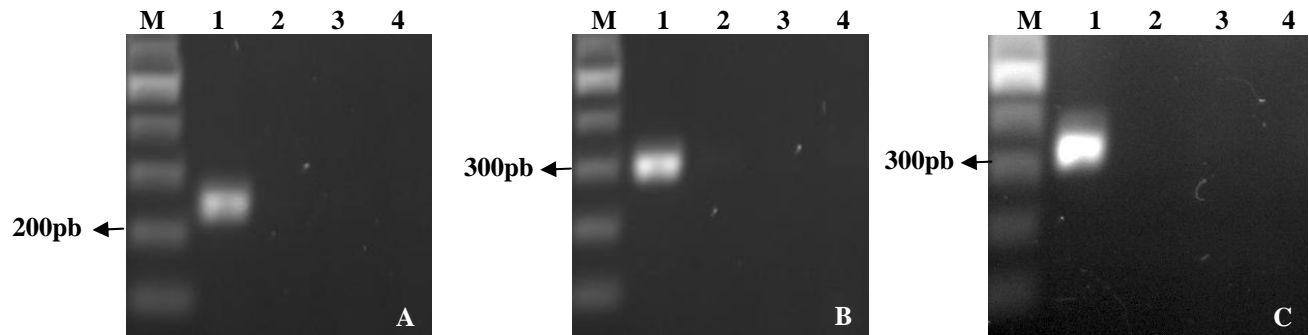


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose 1 %. **A** – Usando *primers* para *MP*, **B** – Usando *primers* para *p24*, **C** – Usando *primers* para *Rep*. **M** – Marcador molecular de 100bp DNA Ladder (Fermentas); **1** – maracujá sintomático para PFGSV; maracujá sadio; **3** – laranja doce sintomática para CiLV-C; **4** – laranja doce sadia

Também foram feitos testes para os três pares de *primers* do PFGSV em amostras de fumo e abobrinha ‘caserta’ infectadas com o CMV, vírus que também infecta maracujazeiro, e em plantas de maracujazeiro infectadas com *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) *passiflora strain*, que assim como o *Passionfruit woodiness virus* (PWV) é um isolado encontrado no Brasil que causa o endurecimento do fruto em maracujazeiro. Esses testes tiveram resultados negativos para os *primers* da região da *MP* e *Rep* (Figura 21), sugerindo que esses dois pares de *primers* sejam específicos para o PFGSV (ANTONIOLI-LUIZON et al., 2009). Os *primers* da *p24* apresentaram algumas bandas inespecíficas em repetições de algumas amostras e foi desconsiderado para esse teste, porém, foi eficiente para a detecção do PFGSV.

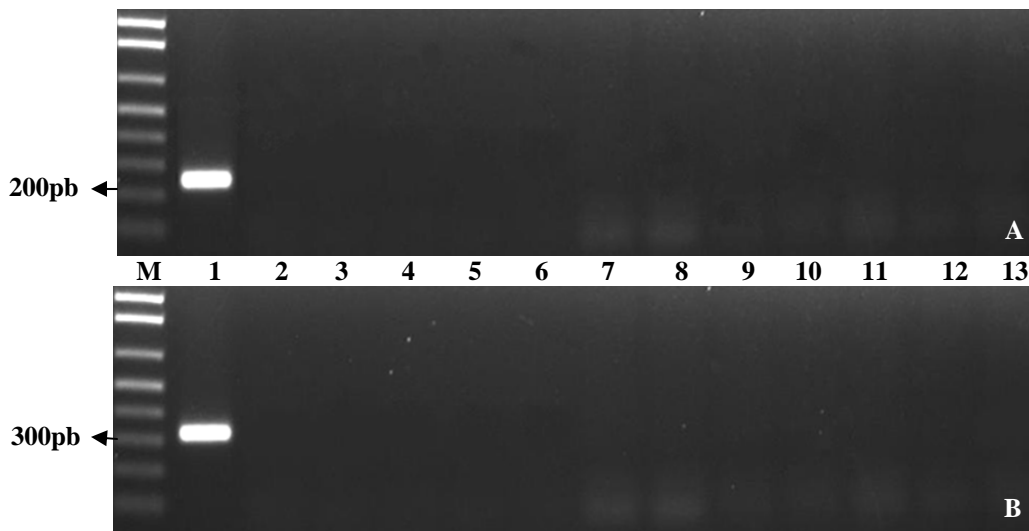


Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1%. **A** – usando *primers* para *MP*, **B** – Usando *primers* para *Rep*. **M** – marcador molecular 1Kpb DNA Ladder Plus (Invitrogen); **1** – maracujá infectado com PFGSV; **2** – maracujá sadio; **3 a 5** – maracujá com CABMV; **6** – abobrinha ‘caserta’ sadia; **7 a 9** – abobrinha ‘caserta’ com CMV; **10** – fumo sadio; **11 a 13** – fumo com CMV

Alguns testes preliminares foram feitos utilizando-se os *primers* do CiLV-C (que amplificam parte da região da *MP*) em amostras de maracujá infectado com PFGSV e em amostras de *Solanum violaefolium* infectado com SvRSV e também com os *primers* do SvRSV (que amplificam parte da região da *Rep*) em amostras de laranja doce infectada com CiLV-C e amostras de maracujá infectado com PFGSV e os resultados foram todos negativos (dados não mostrados).

Algumas lesões de plantas infectadas com outros VTB-C como SvRSV, HibGSV e SchefRSV foram coletadas e testadas por RT-PCR utilizando-se os *primers* para as regiões da *MP*, *p24* e *Rep* do PFGSV. Para os *primers* da região da *Rep* não ocorreu amplificação para nenhum dos vírus, porém, para os *primers* das regiões da *MP* e *p24*, ocorreu uma reação inespecífica somente com o SvRSV, amplificando plantas sintomáticas e sadias (dados não mostrados).

As três repetições da amostra de *P. morifolia* testadas por RT-PCR com os três pares de *primers* do PFGSV, também apresentaram resultado positivo (Figura 19), assim como todas as amostras de *Passiflora* testadas para a validação desse teste de diagnóstico, confirmando-se assim mais uma hospedeira para o PFGSV.

4.8 SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism

As avaliações dos padrões de SSCP foram feitas por RT-PCR a partir de regiões genômicas correspondentes às proteínas de movimento, p24 e replicase purificados do gel de agarose LMP 1%. As amostras foram purificadas para se obter maior precisão dos resultados e diminuir a interferência de artefatos.

Os resultados obtidos até o momento por SSCP para o PFGSV mostrou diferentes padrões de bandas dos isolados nas diferentes regiões geográficas para os três genes estudados, mas posteriormente através do sequenciamento, serão gerados mais detalhes sobre a variabilidade genética dos diferentes isolados.

Em geral, as amostras de São Paulo apresentaram maior variabilidade que as da Bahia e do Distrito Federal. Isso pode ser decorrência do maior número de amostras obtidas desse estado e também da maior abrangência geográfica das mesmas, uma vez que foram coletadas amostras em oito cidades paulistas, algumas delas distantes centenas de quilômetros umas das outras. Já as amostras da Bahia foram coletadas em áreas próximas entre si. O mesmo ocorreu com as amostras do Distrito Federal. Mesmo assim, foi possível detectar um padrão característico dessas duas regiões (Figuras 22A, 23A e 24A). Em seguida, as figuras 22B, 23B e 24B apresentam os padrões de bandas encontrados para as regiões genômicas analisadas, *MP*, *p24* e *Rep*, nas diferentes regiões geográficas estudadas.

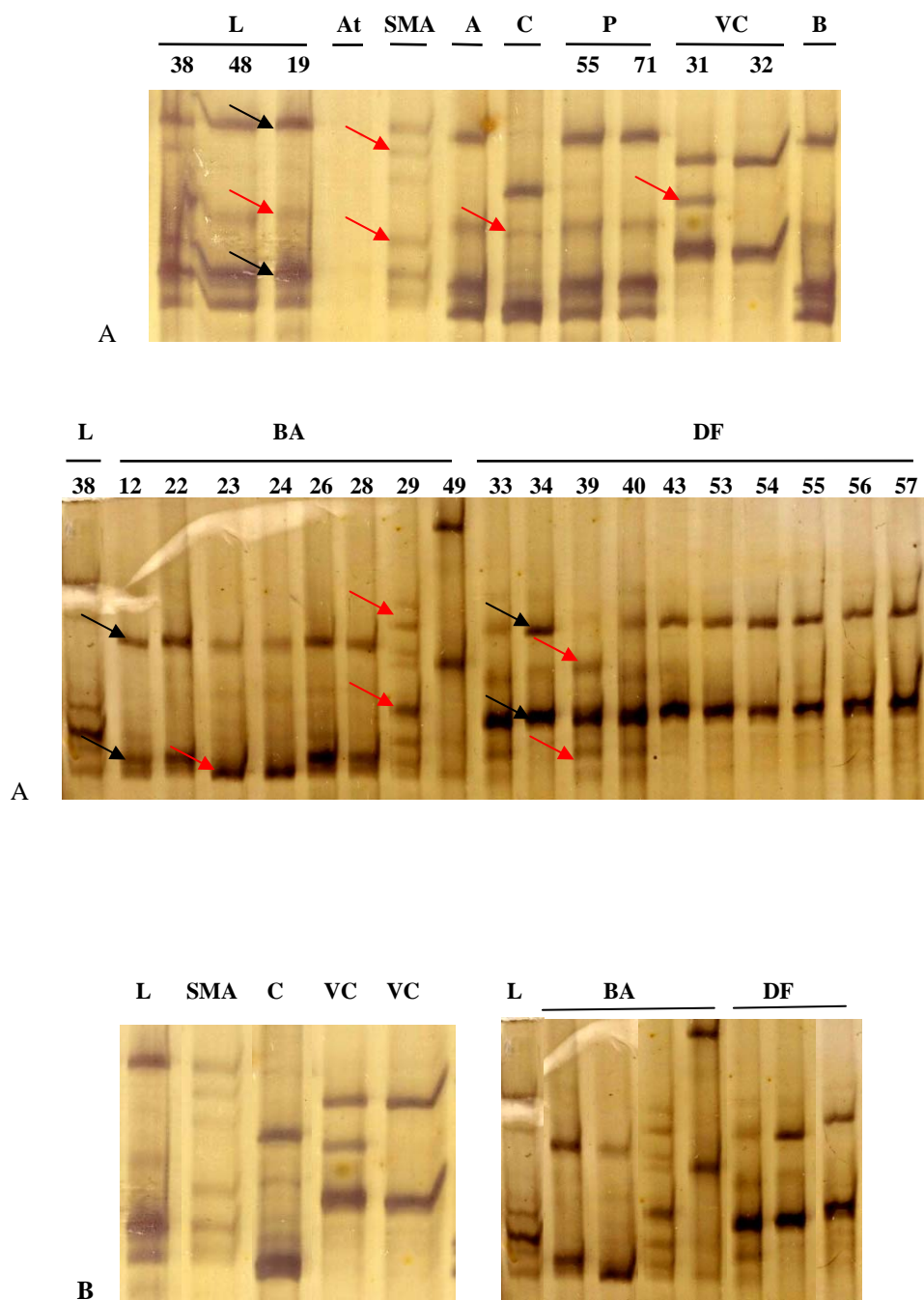


Figura 22 – **A** – Resultado do gel de SSCP 8% utilizando os *primers* para *MP*; **B** – Diferentes padrões de bandas encontrados. As setas pretas indicam as bandas principais e as setas vermelhas indicam algumas bandas secundárias. L – Limeira-SP (amostra padrão); At – Atibaia-SP; B – Brotas-SP; A – Araras-SP; C – Cordeirópolis-SP; P – Piracicaba-SP; VC – Vera Cruz-SP; SMA – São Miguel Arcanjo-SP; BA – amostras da Bahia; DF – amostras de Brasília

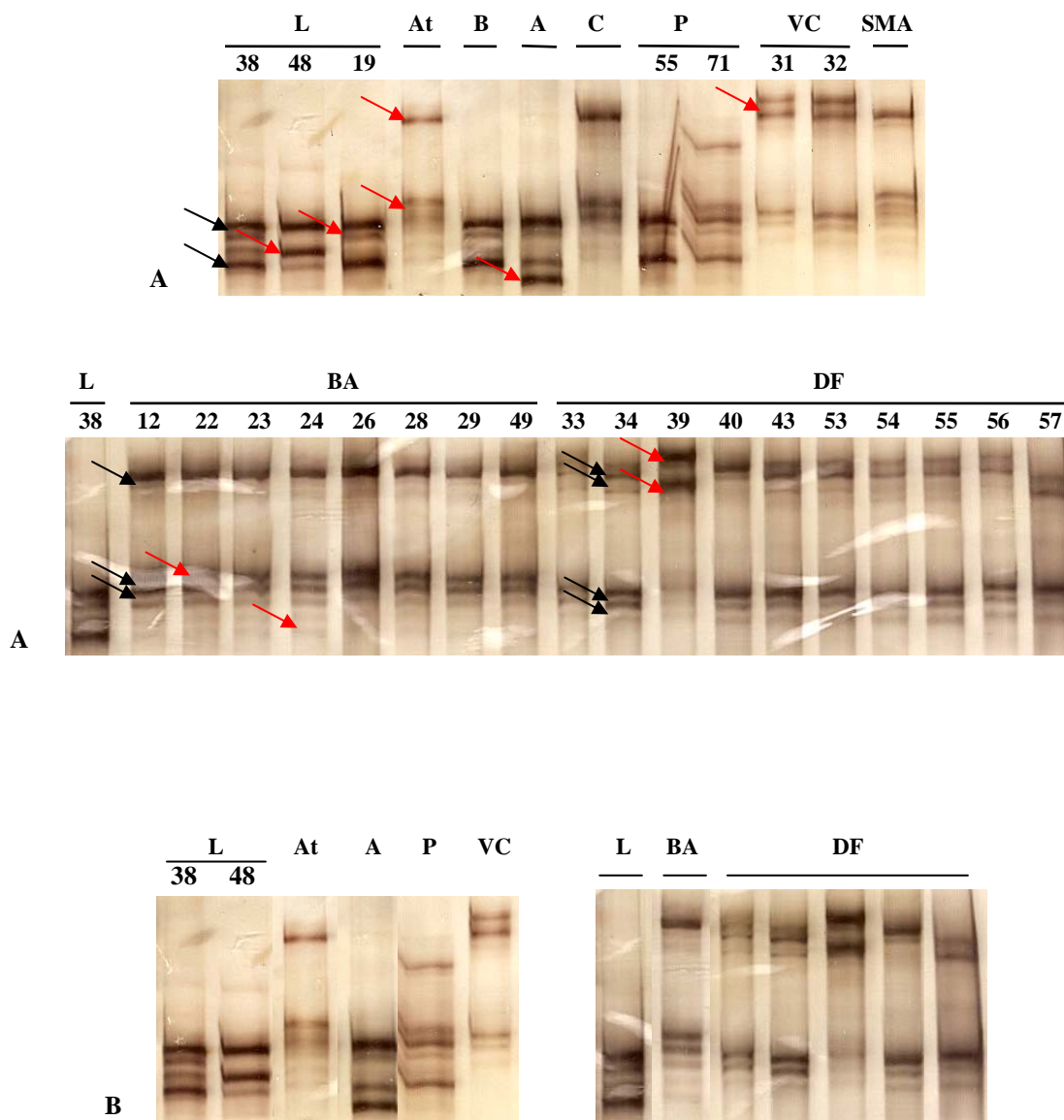


Figura 23 – **A** – Resultado do gel de SSCP 8% utilizando os *primers* para a *p24*. **B** – Diferentes padrões de bandas encontrados. As setas pretas indicam as bandas principais e as setas vermelhas indicam algumas bandas secundárias. L – Limeira-SP (amostra padrão); At – Atibaia-SP; B – Brotas-SP; A – Araras-SP; C – Cordeirópolis-SP; P – Piracicaba-SP; VC – Vera Cruz-SP; SMA – São Miguel Arcanjo-SP; BA – amostras da Bahia; DF – amostras de Brasília

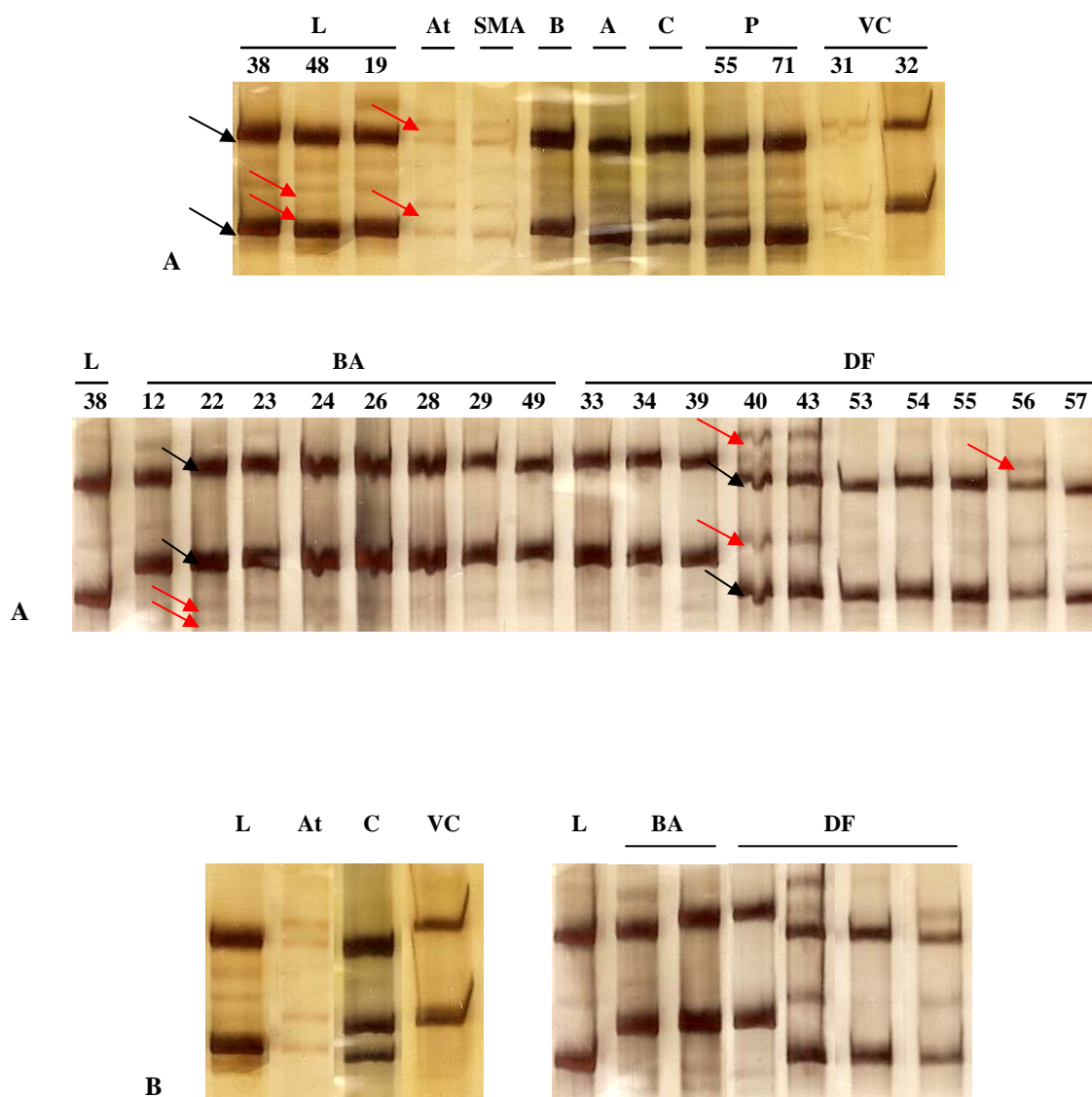


Figura 24 – **A** – Resultado do gel de SSCP 8% utilizando os *primers* para *Rep*. **B** – Diferentes padrões de bandas encontrados. As setas pretas indicam algumas bandas principais e as setas vermelhas indicam algumas bandas secundárias. L – Limeira-SP (amostra padrão); At – Atibaia-SP; B – Brotas-SP; A – Araras-SP; C – Cordeirópolis-SP; P – Piracicaba-SP; VC – Vera Cruz-SP; SMA – São Miguel Arcajo-SP; BA – amostras da Bahia; DF – amostras de Brasília.

Nas amostras analisadas por SSCP pode-se observar um padrão de bandas que permite diferenciar claramente os isolados em função da região geográfica e isso ocorreu nos três genes estudados. Cada haplótipo gerado é formado por duas bandas, sendo dois haplótipos formado por

quatro bandas e assim, sucessivamente e foi observado um número maior de haplótipos do que os comumente encontrados em VTBs, como CiLV-C (LOCALI et al., 2004) e OFV (KUBO, et al., 2009).

Nos VTBs até agora estudados, foram observados um ou dois haplótipos. Com o CiLV-C foram estudadas variações nos genes MP e Rep e, mais recentemente, para o gene da p29 (PEREIRA et al., 2008; 2009) e em geral observou-se baixa variabilidade, independentemente do gene, da espécie de citros e da região geográfica. O mesmo sucedeu com o OFV (gene do nucleocapsídeo) que no geral revelou baixa variabilidade por SSCP, embora tenha revelado alta variabilidade após o sequenciamento de nucleotídeos de apenas alguns isolados. Para o PFGSV observaram-se a presença de um, dois (na maior parte das amostras) e em alguns casos até três haplótipos dependendo da região genômica analisada, como por exemplo, o caso da amostra de São Miguel Arcanjo-SP que para as regiões codificadoras da *MP* e *p24* apresentou três haplótipos e para a região codificadora da *Rep*, dois.

No caso do PFGSV, comparando-o com esses outros VTBs estudados, pode ser observado maior variabilidade dos isolados.

A técnica de SSCP foi informativa e pode ser utilizada para identificar padrões de bandas, que depois, podem ser melhor analisados através do sequenciamento, que evidenciará maiores detalhes de cada isolado estudado.

5 CONCLUSÕES

1. Foi possível obter partes do genoma do PFGSV a partir do dsRNA presente nos extratos de tecidos infectados, a partir dos quais foram desenhados *primers* que amplificam especificamente fragmentos do genoma viral por RT-PCR, tendo-se assim gerado uma ferramenta molecular específica e eficiente para detecção do PFGSV. Estas sequências do genoma do PFGSV serão depositadas no GenBank e serão as primeiras sequências disponíveis em banco de dados.
2. Os dados disponíveis indicam regiões nas sequências de PFGSV com similaridade ao CiLV-C, mas as diferenças parecem ser suficientes para tentativamente separar estes vírus como espécies distintas dentro do gênero *Cilevirus*. O fato de os *primers* específicos não promoverem amplificação cruzada, associado ao fato do anticorpo contra a p29 do CiLV-C não reconhecer o PFGSV seriam evidências favoráveis a esta hipótese. O conhecimento de parte da sequência genômica do PFGSV também permitirá gerar sondas moleculares como outra ferramenta para detectar este vírus.
3. Os resultados preliminares sobre a variabilidade do PFGSV por SSCP demonstraram ser maiores do que a dos outros VTBs já estudados, como CiLV-C e OFV, indicando haver divergências filogenéticas entre os isolados do PFGSV, em geral baseado em sua distribuição geográfica, que serão confirmados por sequenciamento.
4. Os ensaios de RT-PCR confirmaram que o definhamento precoce do maracujazeiro descrito no estado da Bahia é de fato causado pelo PFGSV, sendo assim, a PVM e o DPM são na realidade a mesma doença.
5. O PFGSV foi experimentalmente transmitido com ácaros virulíferos para uma espécie de maracujá silvestre, *Passiflora morifolia* indicando que elas podem servir como reservatório natural deste vírus.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; REZENDE, J.A.M.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Detecção específica do vírus da pinta verde do maracujazeiro por RT-PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. **Resumos...** 2009. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p. S269, 2009.
- BALBACH, A.; BOARIM, D.S.F. **As frutas na medicina natural**. Itaquaquecetuba: Ed. Vida Plena., 1993.
- BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, New York, v.126, p. 374-380, 1982.
- BRAGANÇA, C.A.D.; BARBOSA, C.J.; CHAGAS, C.M.; NORONHA, A.C.S.; SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F. Transmissão mecânica do vírus da pinta verde. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p.352, 2006. Suplemento.
- BRIGNANI NETO, F. Produção Integrada de Maracujá, **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.195-197, jul./dez., 2002.
- BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre, Cinco Continentes, 2001. 472p.
- CALEGARIO, R.F. **Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**. 2009. 123p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- CHAGAS, C.M.; JULY, J.R.; ALBA, A.P.C. Mechanical transmission and structural features of coffee ringspot virus (CRV). **Phytopathology**, Lancaster, n.102, p.100-106, 1981.
- COLARICCIO, A. LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETI, S.R.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultra structural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.208-13, 1995.
- COMPANHIA DE ENTREPOSTO E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO – CEAGESP, **Informativo**. Disponível em <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 20.nov.2009.
- COSTA, A.F.S. da; COSTA, A.N. da. Polo de maracujá no Estado do Espírito Santo: importância socioeconômica e potencialidades. In: COSTA, A. F. S. da; COSTA, A. N. da. **Tecnologias para produção de maracujá**. Vitória-ES: INCAPER, 2005. p.13-20. .
- DODDS, J.A.; MORRIS, T.J.; JORDAN, R. L. Plant viral double-stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.22, p.151-168, 1984.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Distribution of bacilliform virus particles in Lasaki disease and *Cymbidium* ringspot disease. **Annals of Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v.35, p.388, 1969.

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. Orchid fleck virus. **Description of Plant Viruses**, Kew, n.183, p.1-3, 1977.

FERREIRA, P.T.O.; LOCALI-FABRIS, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; GOMES, R.T.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaeifolium* transmitido pelo ácaro *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 264-269, 2007.

FIGUEIREDO, R.W.; SESSA, M.C.M.; HOLANDA, L.F.F. et al. Estudos das características físicas do rendimento do maracujá amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. **Anais...**, 1988. v. 2, p. 613-617.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Maracujá. **Agrianual 2007**: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2007. 516 p.

FREZZI, M.S. La lepra explosiva del naranjo- Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bella Vista (Corrientes). **Bol. Frutas y Hortalizas**. Min.Agr.la Nacion (Buenos Aires) 5. 1940, 16p.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v.63, p.9-16, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. 2003. **Banco de dados agregados**. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda> .Acesso em: 10.jul.2007.

_____. **Banco de dados agregados**. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda> . Acesso em: 18.out.2009.

KILLIP, E.P. **The American species of Passifloraceae**. Chicago: Field Museum of Natural History, 1938. 613p. (Botanical Series, 19).

KITAJIMA, E.W.; BLUMENSCHNEIN, A.; COSTA A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Phytopathologist Zeither**, Berlin, v.81, p.280-286, 1974a.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.V.C. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuiplapidae) in passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1-3, p.225-231, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; MORAIS, G.J. Short rhabdovirus-like particles and a caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. **Analp: Swedish University of Agricultural Sciences**, Bergen, v.99, p.63-64, 1999a.

KITAJIMA, E.W.; ROSILO, M.A.; PORTILLO, M.M.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v.9, p.55, 1974b.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JR., C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p. 555-559, 1997.

KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.33, p.S289, 2008.

KITAJIMA, E.W.; PEDRAZZOLI, D.S.; NOVAES, Q.S.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J.; RODRIGUES, J.C.V. 1999b. Ivy green spot and *Schefflera* ringspot: two additional cases of plant diseases caused by citrus leprosis type virus. **Virus Review Research**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.148-149, 1999b.

KUBO, K.S.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; KITAJIMA, E.W. Diagnose molecular do vírus da mancha clorótica do clerodendron (CICSV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.S12, 2007.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. Orchid fleck virus, a Rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, London, v.87, p.2413-2421, 2006.

KUBO, K.S.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; STUART, R.M.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Estudo da variabilidade genética do Orchid fleck virus (OFV) por SSCP. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Botucatu, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.29, 2006b.

KUBO, K.S.; STUART, R.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Evaluation of the genetic variability of Orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the coat protein gene. **Archives of Virology**, New York, v.154, p.1009-1014, 2009.

LEONEL, S.; SAMPAIO, A.C. **Maracujá-doce**: aspectos técnicos e econômicos. São Paulo: Ed. UNESP, 2007. 134p.

LIN, H.; RUBIO, L.; SMYTHE, A.; JIMINEZ, M.; FALK, B.W. Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v.84, p.249-258, 2003.

LING, K.S.; ZHU, H.Y.; ALVIZO, H.; HU, J.S.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. The coat protein gene of grapevine leafroll associated clostovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. **Archives of Virology**, New York, v.142, p.1101-1116, 1997.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Citrus leprosis virus C (CiLV-C): Membro-tipo de um novo gênero de vírus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.16, p.185-206, 2008a.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R. BOARI, A.J.; MACHADO, M.A. Diagnose da mancha anular do cafeeiro através de RT-PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2005, Brasília, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.185, 2005.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.1317-1321, 2003.

LOCALI-FABRIS E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIONI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis vírus, cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, London, v.87, p.2721-2729, 2006.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MULLER, G.W.; NUNES, W.M.C.; NUNES, M.J.C.; THEODORO, G.F.; ANTONIOLI, R.; SOUZA, A.A.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. 2004. Haplótipos do vírus da leprose dos citros identificados nos Estados do Sul do Brasil através de SSCP do gene da proteína de movimento e replicase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Gramado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.S98-99, 2004. Suplemento.

MAEDA, T.; KONDO, H.; MISUHATA, K.; TAMADA, T. Evidence that orchid fleck virus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite *Brevipalpus californicus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998, Edinburg. **Proceedings...** Edinburg, v.3, p.13-18, 1998.

MANICA, I. **Fruticultura tropical**: maracujá. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1981. 160p.

MORAES, F.H.R.; BELO, W.R.F.; MORAES, G.J.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência do vírus da pinta verde em maracujá no Estado do Maranhão, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, 2006.

NOGUEIRA, N.L.; RODRIGUES, J.C.V.; ROSSI, M.L. Partículas semelhantes a rhabdovirus associadas a sintomas de mancha verde em folhas de manacá (*Brunfelsia* sp.) **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.513, 2001.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C. de; RIGHETTO, P. R.; SANNAZZARO, A. M. **Produção integrada de frutas:** a inserção do maracujá paulista. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br>. 2007, Acesso em: 10.out.2009.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.I.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO JR., H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.L.; FRANCHISCINI, F.J.B; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated virus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Virus Genes**, New York, v.32, p.289-298, 2006.

PEREIRA, J.A.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI-FABRIS, E.C.; KUBO, K.S.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Estudo da variabilidade genética da possível capa protéica do *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) em espécies de citros de 14 estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Rio de Janeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.S275, 2009.

PEREIRA, J.A.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; NICOLINI, F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; KUBO, K.S.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Análise da variabilidade genética do gene da capa protéica do vírus da leprose do citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Belo Horizonte. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, p.S287, 2008.

PIMENTEL, L.D.; SANTOS, C.E.M. dos.; FERREIRA, A.C.C.; MARTINS, A.A.; WAGNER JR., A.; BRUCKNER, C.H. Custo de produção e rentabilidade do maracujazeiro no mercado agroindustrial da Zona da Mata Mineira. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online], v.31, n.2, p.397-407, Acesso em: 10.nov.2009.

PIZZOL, S.J.S de.; WILDER, A.; ELEUTÉRIO, R.C. Mercado Norte-americano de maracujá. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, p.41, 2000.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S. Ringspot of *Ligustrum lucidum* Aiton, a new disease transmitted by *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) in Brazil. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 28, 1995, Ilhéus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.292, 1995b. Suplemento.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.161-179, 2003.

RUBIO, L.; ANGELES, M.; GUERRI, J.; PAPPU, H.; NIBLETT, C.; MORENO, P. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformational polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.129, p.479-489, 1996.

RUGGIERO, C. **Maracujá:** do plantio a colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal, 1998, 388p .

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.3, p.257-265, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2edth, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS FILHO, H.P.; NASCIMENTO, A.S. do. **Fruticultura** :pragas e doenças. Cruz das Almas, BA:EMBRAPA-CNPMF, 1994. (Relatório técnico de visitas à CAJUBA - período: 1994 /1997)

SANTOS FILHO, H.P. Fatores químicos e biológicos do solo associados ao definhamento precoce do maracujazeiro. Pesquisa em Andamento. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, 1997, 3p.

SANTOS FILHO, H.P.; CHAGAS, C.M.; MIYA, T.; BARBOSA, C.J. Identification of passion fruit green spot in Bahia State. In: **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.150-151, 1999.

SÃO JOSÉ, A.B. **A cultura do maracujazeiro**: práticas do cultivo e mercado. Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, 1993, p.19-21.

SOUZA A.A.; TARGON M.L.N.; SANTOS F.A.; MÜLLER G.W.; MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnose de vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, p.503-516, 2001.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do *Citrus tristeza virus* em plantas pré-imunizadas de laranja 'Pêra'. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, p.154-159, 2002.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W. Sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica de três isolados brasileiros do vírus da tristeza dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.26, p.201-205, 2000.

VALVERDE, R.A; NAMETH, S.T.; JORDAN, R.L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnostic. **Plant Disease**, Saint Paul, v.74, p.255-258, 1990.

VERGANI, A.R. La transmission de la lepra explosiva de La ligustrina por ácaros. **Revista Argentina de Agronomia**, Buenos Aires, v.9, p.292-294, 1942.

WALKER, P.J.; BENMANSOUR, A.; DIETZGEN, R.; FANG, R.X.; JACKSON, A.O.; KURATH, C.; LEONG, J.C.; NANDIN-DAVES, S.; STESH, R.B.; TORDO, N. Family Rhabdoviridae. In: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 7. 2000, San Diego, **Report...** San Diego: Academic Press, 2000. 1162 p.