



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E  
BIOLÓGICAS**

**ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO  
*Cowpea aphid borne mosaic virus* QUE INFECTAM  
MARACUJAZEIRO (*Passiflora* spp.) E FEIJÃO-CAUPI  
(*Vigna unguiculata*)**

**CRUZ DAS ALMAS  
2012**

**ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO *Cowpea  
aphid-borne mosaic virus* QUE INFECTAM MARACUJAZEIRO  
(*Passiflora* spp.) E FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*)**

Monografia apresentada à disciplina CCA335-  
Trabalho de Conclusão de curso II, do Curso  
de Bacharelado em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia, como critério avaliativo.

Orientador:

Jorge Teodoro de Souza

Co- Orientador:

Emanuel Felipe Medeiros Abreu

Cristiane de Jesus Barbosa

**CRUZ DAS ALMAS  
2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B238

Barbosa, Alessandra Oliveira.

Caracterização molecular de isolados do *Cowpea aphid borne mosaic virus* que infectam maracujazeiro (*Passiflora spp.*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) / Alessandra Oliveira Barbosa. – Cruz das Almas, BA, 2012.

48f.; il.

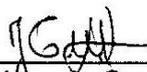
Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

**ALESSANDRA OLIVEIRA BARBOSA**

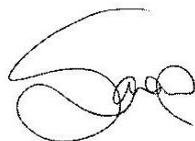
**TERMO DE APROVAÇÃO**

**Tese de Conclusão de Curso de Graduação aprovada em 21 de novembro de 2012, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela seguinte banca examinadora:**



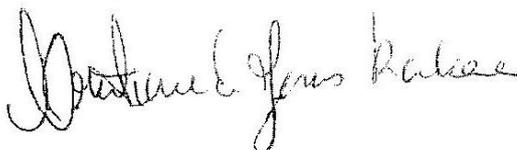
---

Jorge Teodoro de Souza - Orientador



---

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira - Dr. Convidado



---

Cristiane de Jesus Barbosa - Dra. Convidada

Aos meus pais Luiz Paulo Lopes Barbosa e Aurelice Barbosa, meu irmão querido Alisson Barbosa, e ao meu amor Nadson Passos pelo apoio e compreensão,

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus,**

Minha profunda gratidão a ti meu Deus! Obrigada papai do céu por ser o meu Criador, pela sua constante presença em minha vida, e por me conceder força nos momentos de luta;

### **Aos meus pais, Luiz Paulo Lopes Barbosa e Aurelice Oliveira Barbosa,**

por me gerar, acima de tudo me amar e acreditar na minha vitória, sendo eles o meu porto seguro nessa caminhada; Ao meu irmão Alisson, pelo afeto, risadas e abraços;

### **Ao meu amor Nadson Passos,**

pelo companheirismo e carinho, por fazer a diferença em minha vida a cada dia;

### **Aos meus parentes, tios, tias, primos,**

por me apoiarem e serem torcedores para o meu sucesso, em especial, tia Nay por sempre me incentivar e acreditar na minha vitória e tia Irineide Barbosa, pelo seu apoio, contribuindo para a minha formação;

### **À Dra. Cristiane Barbosa e ao Dr. Emanuel Abreu,**

pela oportunidade a mim concedida para realização desse trabalho, pela atenção e pelos ensinamentos ao longo desses anos;

### **À Dra. Larissa Pires Barbosa,**

pela confiança e incentivo, me ensinando os primeiros passos para o mundo da iniciação científica;

### **Ao Prof. Jorge Teodoro de Souza e ao Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira,**

pela aceitação em participar da minha defesa, dando as suas contribuições e sugestões ao meu TCC;

### **À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,**

por possibilitar a minha formação;

### **À Embrapa Mandioca e Fruticultura,**

por garantir infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho;

**A todos que contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigado!**

## RESUMO

A ocorrência de pragas e doenças apresenta-se como um dos principais problemas a diversas culturas de grande importância agrônômica. No maracujazeiro, a virose do endurecimento dos frutos e no feijão caupi, o mosaico do caupi, são as viroses mais importantes em todo mundo, causando grandes prejuízos de ordem financeira. São doenças causadas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), gênero *Potyvirus*. No maracujazeiro o agente etiológico foi denominado *Passionfruit woodiness virus* (PWV), gênero *Potyvirus*, e posteriormente descobriu-se que mais duas espécies do mesmo gênero causavam a mesma doença, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e o *East asian passiflora virus* (EAPV). No Brasil, recentes estudos têm indicado ser o CABMV o vírus prevalente como causador desta doença. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética dos diferentes isolados de CABMV que infectam as culturas do maracujazeiro e feijão caupi em diferentes regiões produtoras do Brasil. O RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen) e utilizado na síntese do cDNA viral, através de reações de RT-PCR, que foram conduzidas utilizando kits comerciais, em diferentes combinações de oligonucleotídeos. Os produtos das amplificações foram clonados e encaminhados ao sequenciamento. Foram sequenciados e caracterizados sete isolados, sendo cinco provenientes do feijão caupi e dois do maracujá, e estes corresponderam a uma sequência de 838 nucleotídeos que codificam parte da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e a sequência parcial do gene da proteína 6K2. As sequências de aminoácidos e nucleotídeos revelaram identidade elevada, variando de 91 a 99% e 84 a 99% respectivamente, demonstrando uma baixa variabilidade genética entre os isolados deste estudo.

Palavras-chaves: Maracujá, Feijão-Caupi, CABMV, Variabilidade genética

## ABSTRACT

The occurrence of pests and diseases is presented as one of the main problems the diverse cultures of great agronomic importance. In passion, the fruit woodiness virus and cowpea, cowpea mosaic, viruses are the most important in the world, causing great financial losses. Are caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). In passionfruit etiologic agent was named *Passionfruit woodiness virus* (PWV), genus *Potyvirus*, and later it was discovered that two more species of the same genus were causing the same disease, the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *East Asian Passiflora virus* (EAPV). In Brazil, recent studies have indicated the CABMV be prevalent as the virus that causes this disease. Given this scenario, the present work was to study the genetic variability of different isolates of CABMV that infect cultures of cowpea and passion fruit in different producing regions of Brazil. Total RNA was extracted using the TRIZOL (Invitrogen) and used in the synthesis of viral cDNA through RT-PCR reactions that were conducted using commercial kits, for different combinations of oligonucleotides. The products of amplification were cloned and sent to sequencing. Were sequenced and characterized seven isolates, five cowpea and from the two passion fruit, and these corresponded to a sequence of 838 nucleotides encoding part of the protein Insertion Cylindrical (CI) and partial sequence of the protein gene 6K2. The nucleotide and amino acid sequences revealed high identity, ranging from 91 to 99% and 84-99% respectively, showing a low genetic variability among isolates of this study.

Keywords: Passionfruit, Cowpea, CABMV, Genetic variability

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
4.1 A cultura do Maracujazeiro.....	16
4.2 O Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.).....	18
4.3 O <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (Família <i>Potyviridae</i> ).....	20
4.4 Variabilidade genética de <i>Potyvirus</i> .....	23
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1 Coleta do Material.....	25
5.2 Testes Diagnósticos e Moleculares.....	26
5.2.1 Sintomatologia dos acessos do BAG Maracujá.....	26
5.2.2 RT-PCR.....	27
5.3 Análise das sequências.....	29
<b>6. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
6.1 Comportamento sintomatológico de acessos do BAG Maracujá da Embrapa, à infecção pela virose do endurecimento dos frutos.....	29
6.2 Análise pelo RT-PCR e Caracterização Molecular do CABMV.....	31
6.3 Caracterização <i>in silico</i> das sequências de aminoácidos do CABMV.....	36
6.4 Estudo de variabilidade genética do CABMV.....	37
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>42</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Planta de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) apresentando sintomas do endurecimento dos frutos causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).....18
- Figura 2.** Planta de feijão-caupi apresentando sintomas decorrentes da infecção pelo vírus do mosaico do feijão caupi (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)).....20
- Figura 3.** Representação figurativa da estrutura externa dos Potyvirus.....21
- Figura 4.** Representação esquemática do genoma dos *Potyvirus* e seus genes associados.....22
- Figura 5.** Escala de notas para avaliação da presença e severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro.....27
- Figura 6.** (A) Gel de Agarose 1%, mostrando o padrão de bandas (subunidades ribossomais) das amostras de RNA de maracujá analisadas (1 à 5). (B) Amplificação do fator de alongamento celular (Primers EF1F/EF1R) em amostras de maracujá com o vírus do endurecimento dos frutos. M (Marcador de 1kb).....32
- Figura 7.** (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral do *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) a partir do RNA total extraído de plantas com o endurecimento dos frutos (1 à 5). (B) Confirmação realizada através da clivagem com a enzima de restrição Eco RI, liberando o fragmento amplificado (6 à 11). M (marcador 1kb).....33
- Figura 8.** Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos da proteína Inclusão Cilíndrica (CI) e parte da proteína 6K2 codificada pelo genoma dos isolados de CABMV provenientes de caupi e maracujá coletados em diferentes regiões produtoras no Nordeste Brasileiro. O sítio de clivagem CI/6K2 está indicado em verde. Os motivos conservados na região codificadora da proteína CI estão indicados em vermelho. As mutações presentes na região de clivagem CI/6K2 e nas demais regiões estão marcadas em azul. Os asteriscos indicam posições conservadas de aminoácido entre os isolados.....37
- Figura 9.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de *Cowpea aphid borne mosaic virus* e espécies do gênero *Potyvirus* baseado em um fragmento do genoma de 838 nt do RNA viral. As sequências correspondentes às espécies de *Potyvirus* foram retiradas do banco de dados

(GenBank): HQ880243 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* MG Avr), HQ880242 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Br1), AF348210 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Zimbabwe) AY864851 (*Impatiens flower break virus*), NC\_016441 (*Yam mosaic virus*) PSU05771 (*Peanut stripe virus*), EU761198 (*Bean common mosaic virus*), AJ312437 (*Bean common mosaic virus*- Isolate cowpea), AY575773 (*Blackeye cowpea mosaic virus*), HQ229994 (*Bean common mosaic necrosis virus*), HQ122652 (*Passion fruit woodiness virus*), AB246773 (*East asian passiflora virus*), DQ851493 (*Telosma mosaic virus*), HQ161080 (*Hardenbergia mosaic virus*), AY656816 (*Wisteria vein mosaic virus*), JF273466 (*Watermelon mosaic virus*), FJ640973 (*Soybean mosaic virus*), EF105298 (*Calla lily latente virus*), AM039800 (*Fritillary virus* Y). Os valores de Bootstrap foram gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós.....39

**Figura 10.** Árvore filogenética corresponde a um consenso proveniente de uma sequência parcial de aminoácido deduzida de um fragmento genômico que codifica a proteína CI e um fragmento pequeno da proteína 6K2 de sete isolados brasileiros de CABMV.....40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Localidades de coleta dos isolados deste estudo, que foram sequenciados, sua associação com o nível de sintoma encontrado e o hospedeiro.....	25
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o vírus do CABMV em maracujazeiro e em feijão-caupi.....	28
<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos acessos do BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura quanto à presença e severidade de sintomas foliares do CABMV.....	30
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos (diagonal abaixo) a partir da análise das sequências do fragmento genômico de 838pb provenientes dos sete isolados de CABMV, e isolados disponíveis no GenBank.....	37

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de frutas está em torno de 540,0 milhões de t, correspondendo ao montante de US\$162,0 bilhões. O Brasil, depois da China e Índia (55,6 milhões e 48,1 milhões de toneladas, respectivamente), é o 3º maior produtor de frutas do mundo, estimado em 38 milhões de toneladas no ano de 2003. As frutas possuem um grande valor nutricional, com vitaminas, sais minerais, antioxidantes, açúcares naturais, além de várias outras substâncias que auxiliam na prevenção e no combate de doenças.

O maracujazeiro é uma cultura típica de países tropicais, destacando-se o Brasil que é responsável por cerca de 90% da produção mundial (SILVA *et al.*, 2005). Em 2010, o Brasil produziu cerca de 920 mil toneladas de frutos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o estado da Bahia é o maior produtor de maracujá do Brasil, sendo o responsável por mais da metade da produção brasileira, seguido dos estados de São Paulo, Sergipe, Espírito Santo, Pará, Ceará e Minas Gerais.

O *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* (maracujá-amarelo) é a principal espécie da família *Passifloraceae* cultivada no Brasil, devido às características físico-químicas de suas frutas, alta produtividade e grande aceitação do suco no mercado nacional (LIMA, 2002). O gênero *Passiflora* possui um grande número de espécies, mais de 400, sendo cerca de 120 nativas do Brasil (BERNACCI, 2003). Apesar da grande variabilidade, os cultivos comerciais baseiam-se nessa única espécie, representando 95% dos pomares, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento (MELETTI & MAIA, 1999).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie que pertence ao gênero *Vigna*, e membro da família Fabaceae (SMART, 1990), a qual foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses, no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 2000). A região nordeste se destaca como uma das principais regiões do Brasil onde o feijão caupi é cultivado e consumido, representando aproximadamente 84% da área plantada e 68% da produção nacional. Os maiores produtores são os Estados do Ceará, Piauí, Bahia e Maranhão, e em relação aos aspectos socioeconômicos, é responsável pela

geração de 1.451.578 empregos por ano no Brasil (LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2007).

O endurecimento dos frutos é a principal virose do maracujazeiro em todo mundo e foi relatada pela primeira vez no Brasil ocorrendo em plantios comerciais de maracujá doce (*Passiflora alata*) e de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) em Feira de Santana, estado da Bahia. Atualmente, se encontra disseminada na Região Nordeste, tendo sido relatada também nos estados do Ceará, Sergipe e Alagoas.

No maracujazeiro, as plantas infectadas com esta virose apresentam mosaico foliar acentuado e frutos com endurecimento do pericarpo e grande redução da polpa (KITAJIMA ET AL., 1986). Na maioria das culturas, o vírus induz mosaico nas folhas, onde se pode observar, além de áreas verdes escuras circundadas por áreas verdes claras, bolhosidade e enrugamento. É comum aparecerem manchas amarelas associadas ao mosqueado em anéis. Quando a infecção é mais severa, as folhas tornam-se grossas, onduladas, torcidas e curvadas para baixo (VIANA, 2007).

O *Passionfruit woodiness virus* (PWV) família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* foi descrito como agente causador da doença do endurecimento dos frutos por Cobb, na Austrália, em 1901 (SHUKLA & WARD, 1988). A análise das características biológicas e sorológicas dos isolados indicava que todos eles pertenciam a uma única espécie do gênero *Potyvirus*, o PWV. Com o advento de novas tecnologias moleculares ao longo dos anos, verificou-se que mais duas espécies dentro do mesmo gênero *Potyvirus* causavam a mesma doença, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) presente na África e no Brasil e o *East asian passiflora virus* (EAPV) presente no Japão (NASCIMENTO, et al., 2006).

Análises moleculares da região codificante da proteína capsidial de isolados brasileiros de CABMV e também de isolados previamente identificados como PWV, demonstraram que o CABMV é o principal agente associado à doença no Brasil (NASCIMENTO, et al., 2004; NASCIMENTO, et al., 2006). A identidade apresentada entre os isolados brasileiros do PWV e o CABMV é superior à mínima necessária para agrupar estes vírus na mesma espécie de

*Potyvirus*, de acordo com os critérios estabelecidos pelo International Committee of Virus Taxonomy (VAM REGENMORTELL *et al.*, 2000).

Esses vírus infectam naturalmente espécies de *Passiflora* e de leguminosas, além de infectarem artificialmente alguns membros das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* (MCKERN *et al.*, 1994). Eles são transmitidos de maneira não circulatória por várias espécies de afídeos, e no campo a transmissão natural ocorre no momento da picada de prova do inseto, o que caracteriza a relação vírus-vetor como sendo do tipo não persistente (NARITA, 2007).

Apesar dos prejuízos acarretados em diversas culturas, que incluem o maracujazeiro e o feijão-caupi no Brasil, verifica-se uma carência de estudos baseados em caracterização molecular e classificação taxonômica, portanto, esse trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de isolados do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em maracujazeiro e em feijão-caupi no Nordeste Brasileiro.

## 2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho pretende identificar e caracterizar molecularmente a espécie de *Potyvirus* que causa o endurecimento dos frutos em maracujazeiro, o CABMV. A identificação da prevalência da espécie causadora do endurecimento dos frutos dará suporte ao Programa de Melhoramento Genético do maracujazeiro, realizado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura para a seleção de híbridos e variedades mais resistentes à doença na Bahia e em outros Estados.

Além disso, a definição do agente causal e o estudo da sua variabilidade genética permitirá uma melhor elaboração de estratégias para o seu combate e manejo nas condições locais. Este trabalho será importante devido à carência de estudos baseados na identificação e caracterização molecular de *Potyvirus*, sendo que o nordeste detém a maior produção nacional de maracujá, e pelo endurecimento dos frutos ser a principal virose existente em todo mundo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar a caracterização molecular dos isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* que infectam o maracujazeiro e o feijão-caupi em diferentes regiões produtoras no nordeste brasileiro.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliação sintomatológica quanto à presença e a severidade dos sintomas do CABMV, em plantas do banco de germoplasma de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura;
2. Estabelecer a metodologia de detecção, utilizando oligonucleotídeos específicos que amplificam um fragmento genômico do CABMV, pelo método do RT-PCR, e isolamento do RNA viral, que será enviado ao sequenciamento;
3. Realizar análises de caracterização molecular e variabilidade genética entre os isolados sequenciados, utilizando as ferramentas de bioinformática.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 A cultura do Maracujazeiro

O maracujazeiro pertence ao gênero *Passiflora*, família *Passifloraceae*, que constitui-se de aproximadamente 630 espécies (LIMA, 2002). Apesar da grande variedade de espécies dentro do gênero *Passiflora*, poucas são cultivadas em função de suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais. Das cento e vinte espécies que ocorre no Brasil, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) destaca-se por seu potencial ornamental e alimentício (SOUZA & LORENZI, 2005).

A espécie mais cultivada comercialmente no Brasil é o maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *Flavicarpa*. Acredita-se que tenha sido resultante do cruzamento entre *P. Edulis* e uma espécie próxima, possivelmente *P. ligularis*, ou uma mutação em *P. edulis*, ou ainda seria uma forma mutante originária da Austrália (OLIVEIRA & FERREIRA, 1991).

O maracujá é uma fruta silvestre e ficou conhecida como a fruta da paixão, devido ao formato de suas flores que segundo os religiosos que a encontraram, lembrava a paixão de Cristo. O principal uso está na alimentação humana, caracterizando-se um alimento de elevado valor nutritivo. O maracujazeiro é utilizado como planta medicinal há muitos anos por povos americanos, europeus e asiáticos, devido as suas propriedades calmantes (MARTINS, *et al.*, 2005). O valor ornamental é conferido pelas belas flores, que exercem atração pelo seu tamanho, pela exuberância das cores e singularidade das formas (MELETTI *et al.*, 2010).

A produção brasileira de maracujá é de mais de 920 mil toneladas sendo 76% concentrado na região nordeste (IBGE, 2012), que vem liderando a produção brasileira de maracujá nos últimos anos, seguida pelas regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul (MELETTI *et al.*, 2010). A Bahia é responsável por 52% da área plantada e 50% da produção brasileira, gerando R\$ 400 milhões de reais ao ano (IBGE, 2012). Apenas cinco municípios distribuídos nos territórios baianos do Sertão Produtivo, Litoral Norte e

Submédio Vale do São Francisco cobrem 71% da área plantada na Bahia (IBGE, 2012).

Em virtude disso, a cultura do maracujazeiro ocupa um lugar de destaque na fruticultura tropical, representando uma interessante opção que oferece um rápido retorno econômico, porém, ciclos de retração e expansão da cultura foram observados, definidos por problemas fitopatológicos e dificuldades de comercialização (MELETTI *et al.*, 2010).

No maracujazeiro, o endurecimento dos frutos é a virose mais importante em qualquer parte do mundo onde ocorre (VIANA, 2007). O agente causal foi identificado como sendo pertencente ao gênero *Potyvirus*, o *Passionfruit woodiness virus* (PWV) (BEZERRA *et al.*, 1995; CHAGAS *et al.*, 1981). Entretanto, com o advento das técnicas moleculares, verificou-se que pelo menos duas outras espécies do gênero estão associadas à doença: *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), presente na África e no Brasil, e *East Asian Passiflora virus* (EAPV), presente no Japão (NASCIMENTO, *et al.*, 2006).

Essa doença está presente nas principais áreas produtoras do Brasil. A transmissão natural do vírus, ocorre por meio de afídeos, principalmente pelas espécies *Mysus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover, sendo a relação vírus-vetor não persistente e não circulativa (BARBOSA, 2004).



**Figura 1. Planta de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) apresentando sintomas do endurecimento dos frutos causado pelo *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). Fonte: Google Imagens.**

Plantas infectadas com essa virose apresentam mosaico foliar, pequenas lesões necróticas marrons, ligeiramente deprimidas, que podem surgir nos ramos afetados, ocasionando a morte das folhas. Os frutos afetados se tornam pequenos, deformados e seu pericarpo apresenta-se endurecido, por causa da lignificação das paredes internas. Com isso, o espaço interno do fruto torna-se menor do que nos frutos saudáveis, o que reduz a quantidade de polpa (VIANA, 2007). Entretanto, é necessário cuidado na diagnose visual porque nem todo fruto endurecido é indicativo da doença, fazendo-se necessário a confirmação através de análises sorológicas ou moleculares (TREVISAN, 2005).

#### **4.2 O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie que pertence ao gênero *Vigna*, e é considerado como sendo membro da família *Fabaceae* (SMARTT, 1990). A área plantada em todo mundo, está em torno de 12,5 milhões de hectares (ha). Os principais produtores mundiais são Nigéria, Níger e Brasil. O feijão-caupi apresenta-se

como uma cultura de origem africana, a qual foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses, no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 2000).

Desde então foi disseminado por todo o país, principalmente na região Norte e Nordeste do Brasil. No Nordeste, a produção e a produtividade são de 429.375 toneladas (t) e 303,5 kg/ha, respectivamente, representando 84% da área plantada e 68% da produção nacional. Os maiores produtores são os Estados do Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) e Maranhão (35.213 t). Em 2011 foram colhidos no Brasil aproximadamente 1,6 milhão de hectares, com produção de 822 mil toneladas de feijão caupi (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2012).

Com relação aos aspectos socioeconômicos, a cultura do feijão-caupi é responsável pela geração de 1.451.578 empregos por ano no Brasil, com o valor de produção estimado em US\$ 249.142.582,00/ano (LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2007).

Também se destaca como uma leguminosa com excelente fonte de proteínas (23-25% em média) e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de colesterol, representando um alimento de alto valor nutritivo. Essa cultura apresenta ciclo curto, baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade e, por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, tem a habilidade para fixar nitrogênio do ar.

O feijão-caupi também pode ser afetado por diversas espécies de vírus, que incluem o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) (gênero *Comovirus*, família *Secoviridae*); *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*); *Cucumber mosaic virus* (CMV) (gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) (BESERRA JUNIOR, 2011).

O estudo do vírus do mosaico do feijão caupi que é transmitido pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) tem se tornado cada vez mais relevante, por ser um dos mais importantes fatores limitantes da produção na cultura, tanto pela forma de disseminação, bem como pela dificuldade no

controle (LIMA *et al.*, 2005; GHORBANI *et al.*, 2008). Os sintomas mais comuns são mosaico intenso do limbo foliar, formado por áreas amareladas em alternância com áreas de verde normal, faixas verdes nas nervuras, distorção das folhas e redução do porte da planta quando esta apresenta-se severamente infectada.



**Figura 2. Planta de feijão-caupi apresentando sintomas decorrentes da infecção pelo vírus do mosaico do feijão caupi (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)). Fonte: Google Imagens**

Pode ser transmitido eficientemente por várias espécies de pulgão, como *Aphis craccivora* e *Myzus persicae* ou internamente pela semente. As principais medidas de controle dos vírus utilizados para reduzir as perdas na produtividade são: o emprego de cultivares resistentes, o uso de sementes saudáveis e a eliminação de plantas hospedeiras do vírus.

#### **4.3 O *Cowpea aphid borne mosaic virus* (Família *Potyviridae*)**

A família *Potyviridae* apresenta-se como uma das maiores e mais importantes famílias de vírus que infectam plantas (FAUQUET *et al.*, 2005). Os *potyvirus* podem ser encontrados em todas as regiões do globo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas de mais de 550 gêneros em 81 famílias botânicas (BRUNT *et al.*, 1997). Coletivamente, os *Potyvirus* causam perdas

superiores às causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto (ZERBINI, 1999). Uma das características do grupo é a formação de corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo um fator relevante para a identificação de espécies pertencentes à família.

As partículas virais são alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. O genoma é composto por uma única molécula de RNA de fita simples, com aproximadamente 10000 nucleotídeos e envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsial (CP), que possui massa molecular de aproximadamente 34 kDa (BERGER, 1997).



**Figura 3. Representação figurativa da estrutura externa dos Potyvirus. Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html) (Adaptado)**

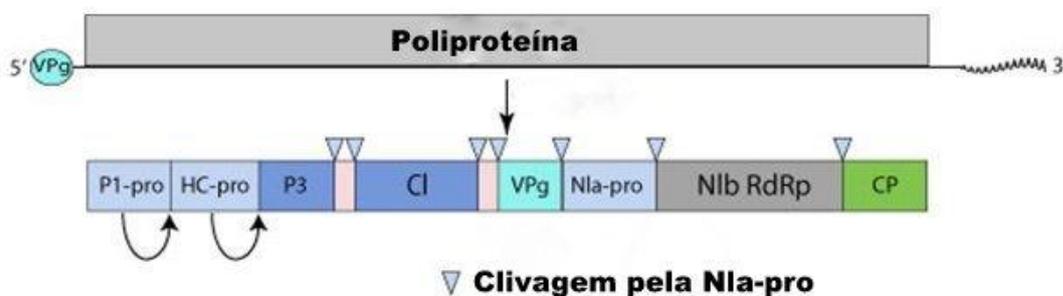
Em relação à organização do genoma dos *Potyvirus*, a proteína capsial apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (BOCK & CONTI, 1974).

O RNA dos potyvirus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral denominada Vpg (genome-linked viral protein) em sua extremidade 5' e apresenta uma cauda poliadenilada, de origem viral, em sua extremidade 3' (ALISSON *et al.*, 1986). O RNA genômico apresenta uma única fase aberta de leitura (open reading frame, ORF) localizada entre duas regiões não codificadas denominadas 5'NTR e 3'NTR. A tradução da ORF origina

potencialmente uma poliproteína com peso molecular de aproximadamente 350 kDa (ALISSON *et al.*, 1986), que é processada por meio da atividade de três proteases (P1, HC-PRO e NIa) contidas na própria sequência gerando 8 a 10 produtos finais.

As proteases P1 e HC-Pro, catalisam unicamente suas próprias clivagens em cis. A protease NIa, além de catalisar sua própria clivagem em cis, catalisa seis clivagens adicionais em trans. Uma característica das proteínas sintetizadas pelos *Potyvirus* é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção (CARRINGTON, 1990).

As infecções por membros da família *Potyviridae* induzem inclusões citoplasmáticas do tipo “cata-vento”, resultado do acúmulo da proteína CI (MURPHY *et al.*, 1991). Essa proteína é a helicase dos *Potyvirus*, responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação. A CI, juntamente com a NIa e NIb, forma o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A CI desempenha também papel no movimento célula-a-célula dos potyvirus (CALDER & INGERFELD, 1990).



**Figura 4. Representação esquemática do genoma dos Potyvirus e seus genes associados.** Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html) (Adaptado).

Um aspecto interessante dos *Potyvirus* são as interações sinérgicas entre diferentes *Potyvirus*, e também entre *Potyvirus* e outros gêneros ou famílias. Assim, vírus que normalmente não são capazes de infectar determinados hospedeiros, passam a causar sintomas severos quando são

infectam simultaneamente com um *Potyvirus*. Uma possível explicação para esse fenômeno é a evidência de que a proteína HC-Pro é responsável pela supressão da resposta da planta à infecção por *Potyvirus*, por mecanismos ainda não esclarecidos. Essa supressão facilitaria a replicação e disseminação do vírus na planta, e provavelmente essa proteína atue inibindo um mecanismo geral de defesa da planta, permitindo assim a infecção por outros agentes semelhantes aos *Potyvirus* (ZERBINI & ZAMBOLIM, 2000).

A obtenção de informações a respeito das características de diversos *Potyvirus* vem se acumulando, permitindo uma melhor compreensão, dos mecanismos de infecção, de interação com o hospedeiro e com os vetores, e do relacionamento taxonômico entre os inúmeros membros da família. Entretanto, ainda existem diversos aspectos da biologia dos *Potyviridae* que permanecem pouco compreendidos (ZERBINI, 2000).

#### **4.4 Variabilidade genética de *Potyvirus***

Os vírus constituem um grupo numeroso e heterogêneo. São classificados em categorias hierárquicas baseadas em várias características. A classificação é dinâmica, já que novos vírus estão sendo continuamente descobertos e novas informações se acumulam sobre os vírus já conhecidos. As alterações mais recentes sobre a classificação dos vírus são verificadas de acordo com o Comitê Internacional para Taxonomia Viral (ICTV).

De uma maneira geral, a única base que se tinha para a classificação e identificação dos vírus em famílias, eram as suas características. Algumas características básicas eram o tipo de ácido nucleico e a estrutura do genoma, bem como a organização e a presença de determinados genes. Considera-se também a morfologia, ou seja, o tamanho e forma do vírus, propriedades imunológicas, físico-químicas como massa molecular, densidade, inativação térmica, estabilidade ao pH e sensibilidade a solventes eram utilizados na classificação viral.

Além disso, características como espectro de hospedeiros, sintomatologia, morfologia de inclusões citoplasmáticas e sorologia constituíram durante vários anos os principais critérios para classificação de espécies e estirpes de *Potyvirus*. Apesar de essas características terem

desempenhado papel significativo na determinação do relacionamento taxonômico entre muitos *potyvirus*, elas por si só não fornecem uma solução adequada para a identificação de espécies e estirpes no gênero como um todo, devido a intensa variação biológica e antigênica observada entre os membros do gênero (SHUKLA et al., 1994).

Ao longo dos anos, vários métodos biológicos, sorológicos e físico-químicos têm sido utilizados para detectar, diagnosticar e classificar os vírus que infectam vegetais em todo mundo, que incluem a técnica do ELISA, a mais amplamente utilizada na diagnose de fitoviroses, porém não é suficientemente sensível na diagnose de alguns vírus, por exemplo, para aqueles que ocorrem em baixas concentrações nos tecidos das plantas (SEQUEIRA, 1992).

No entanto, parâmetros moleculares começaram a ser amplamente explorados no estudo dos vírus com a descoberta da técnica de PCR que foi introduzida em 1992 e tem sido utilizada na diagnose de diferentes espécies virais, na obtenção de clones genômicos, na seleção inicial de plantas transgênicas e na produção de sondas moleculares específicas (MEISSNER FILHO, 1996). Esta técnica utiliza uma pequena quantidade de amostras de tecido e permite a detecção do vírus mesmo em baixas concentrações e além da detecção pode ser feita uma caracterização suplementar do vírus e clonagem completa do genoma viral para estudos de infectividade (ZERBINI et al., 2001).

Atualmente, um dos principais critérios adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para a designação de novas espécies para o gênero *Potyvirus* é a comparação da sequência de aminoácidos da poliproteína e da proteína capsidial, bem como a sequência de nucleotídeos da 3'NTR. De um modo geral, espécies distintas apresentam identidade de até 53% para as sequências de aminoácidos da CP, enquanto estirpes de um mesmo vírus apresentam de 83% a 99% de identidade (ADAMS et al. 2005).

A análise de cada região dentro do genoma isoladamente indicou níveis de identidade nucleotídica para demarcação de espécies de 58% (P1) e de 74 a 78% (demais genes) (ADAMS et al., 2005). Uma análise com base em 1.220 sequências de proteínas capsidiais indicou um valor de 76 a 77% de identidade

de nucleotídeos para a demarcação de espécies, o mesmo valor encontrado para as comparações baseadas no genoma completo (ADAMS *et al.*, 2005). O nível de identidade para demarcação de espécies foi proposto em 76% para sequências de nucleotídeos, e 82% para sequências de aminoácidos (ADAMS *et al.*, 2005).

Avanços substanciais ocorreram recentemente no conhecimento da biologia molecular de interação entre *Potyvirus* e seus hospedeiros. Isso se deve em grande parte à clonagem de genoma completo desses vírus, proporcionando estudos baseados em simples comparações entre sequências de isolados biologicamente distintos, podendo indicar diferenças moleculares correspondentes.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleta do Material Vegetal

Amostras foliares de maracujá e feijão-caupi com diferentes níveis de sintomas do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) foram coletadas em oito unidades federativas do território Nacional, que incluem Bahia, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, sendo que as amostras de maracujá foram coletadas apenas no estado da Bahia. Durante a coleta, as amostras de folhas foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório em uma caixa de isopor com gelo, e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

**Tabela 1. Localidades de coleta dos isolados deste estudo, que foram sequenciados, sua associação com o nível de sintoma encontrado e o hospedeiro.**

LOCALIDADES DE COLETA	NOME DO ISOLADO	SINTOMAS	HOSPEDEIRO
CRUZ DAS ALMAS- BA	BGM 007	Severo	Maracujá
CRUZ DAS ALMAS- BA	BGM 028	Severo	Maracujá

TAÍBA- CE	TAÍBA- CE	Ausente	Feijão- Caupi
JAGUARIBE- CE	JAGUARIBE- CE	Severo	Feijão- Caupi
MARAVILHA- AL	MARAVILHA- AL	Ausente	Feijão- Caupi
TAQUARITINGA DO NORTE- PE	TAQUARITINGA DO NORTE- PE	Ausente	Feijão- Caupi
TAQUARITINGA 2 - PE	TAQUARITINGA 2 - PE	Ausente	Feijão- Caupi

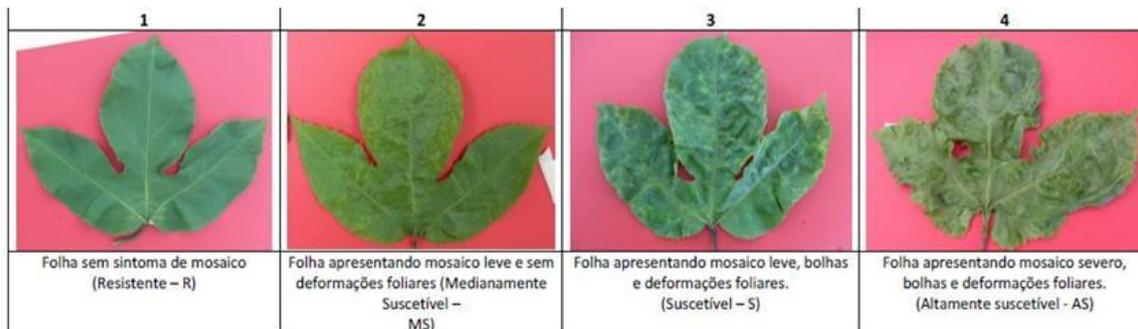
## 5.2 Testes Diagnósticos e Moleculares

Realizou-se uma avaliação sintomatológica quanto à presença e a severidade dos sintomas do CABMV, em plantas do banco de germoplasma de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, estado da Bahia. Empregou-se o método RT-PCR, para detecção e isolamento do fragmento do RNA viral.

### 5.2.1 Sintomatologia dos acessos do BAG Maracujá

Foram avaliados cinquenta e oito acessos no BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura e foi avaliada a presença e severidade de sintomas foliares do CABMV, via escala de notas proposta por Novaes & Rezende (1999), modificada: 1: Folha sem sintoma de mosaico (Resistente-R); 2: Folha apresentando mosaico leve e sem deformações foliares (Medianamente Suscetível-MS); 3: Folha apresentando mosaico leve, bolhas e deformações foliares. (Suscetível-S); 4: Folha apresentando mosaico severo, bolhas e deformações foliares. (Altamente suscetível-AS).

Foram coletadas dez folhas de cada acesso, cujas notas foram dadas pelo aspecto foliar e posteriormente foi retirada uma média aritmética para cada um dos acessos analisados. A análise sintomatológica só foi realizada com acessos de maracujazeiro, não sendo possível a análise correspondente para os acessos de feijão-caupi.



**Figura 5. Escala de notas para avaliação da presença e severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NOVAES & REZENDE, 1999) (modificada).**

### 5.2.2 RT-PCR

O RNA foi extraído por meio do protocolo de extração do TRIZOL (Invitrogen). Pesou-se 0,1g de tecido foliar e macerou-se com nitrogênio líquido e em seguida foi misturado a 1mL de Trizol (tampão de extração). Depois foram adicionados 0,2mL de clorofórmio e incubou-se as amostras por 5min a 25°C sendo centrifugadas durante 15min a 12000rpm de 2 a 8° C. Recolheu-se a fase aquosa em um novo tubo e misturou-se a 0,5mL de isopropanol, incubando a 25° C por 10 mim. As amostras foram submetidas a uma nova centrifugação, e em seguida foi removido o sobrenadante e lavado o *pellet* com 1mL de etanol, com nova centrifugação por 5 mim. O RNA total extraído foi ressuspenso em 60µL H<sub>2</sub>O livre de RNAses.

Posteriormente, o RNA total extraído foi utilizado para a síntese do cDNA viral, utilizando o kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), submetido a um ciclo de amplificação de 65°C por 10 minutos e 37°C por mais 50 minutos. As reações de PCR foram conduzidas utilizando o kit comercial Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Diferentes combinações de oligonucleotídeos foram utilizadas para amplificar fragmentos de tamanhos variados dentro do genoma do vírus e foi selecionada a combinação que amplificou o maior fragmento do CABMV. Também foram utilizados os primers EF1F e EF1R que amplificam um gene *housekeeping* da planta, conhecido como fator de alongamento celular, para verificação das condições da reação e

da qualidade do RNA extraído. Na tabela 1 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos citados.

**Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o vírus do CABMV em maracujazeiro e em feijão-caupi.**

Primer	Orientação	Sequência (5´-3´)	Referência
EF1F	Direto	TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG	Novo
EF1R	Reverso	AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC	Novo
CABMV 7011R	Reverso	ACCATTGAAGATTCTGA	Novo
CABMV 4170F	Direto	AGCCACAGCAGCACAAAG	Novo
CABMV 1673F	Direto	TTGGTTCTCTGGTCGTCC	Novo
CABMV_NEW	Direto	GTGTGRTAGACTTTGGYTTGAAAGT	Novo
Nib 2F	Direto	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA	Zheng et al. (2010)
CN48F	Direto	TCGTGIATHGANAATGG	Zheng et al. (2010)
CABMV F	Direto	TKGTGTGRTAGAYTTTGGCTTKAAAGT	Novo
CABMV1R	Reverso	ATACACAAATCTCGGTAGCTACGCGTG	Novo
CABMV2R	Reverso	GTCAYCCCMARRAGRGWRTGCAT	Novo
CABMV3R	Reverso	GCRGCAGTGTGYCTCTCWGTRTTYTC	Novo
Oligo dT	Reverso	T <sub>22</sub>	Comercial

No PCR, as amostras de cDNA foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, consistindo de uma fase de desnaturação numa temperatura de 94°C. Foram utilizadas para as combinações de primers *forward* (F) e *reverse* (R), diferentes temperaturas de anelamento de 50°C, 52°C, 57°C e 63°C. A fase de extensão numa temperatura de (72°C), de acordo com o protocolo utilizado.

Os produtos das amplificações foram analisados sob luz UV, em géis de agarose 1,0%, preparados em tampão TBE, pH 8,0, e corados com brometo de etídio (1,2 µl para cada 100mL de Gel). As bandas contendo o tamanho do fragmento do vírus foram retiradas do gel com auxílio de um estilete de aço inoxidável e purificadas utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega). Os fragmentos virais purificados foram então clonados com o kit P-Gen- T easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

As células competentes foram descongeladas e adicionou-se 5µL da reação de ligação, e incubou-se no gelo por 20 min. Depois os tubos foram submetidos ao choque térmico a 42°C por 50 segundos. Foi novamente levado ao gelo por 2 min, e misturou-se com 600µL de LB (10g/L cloreto de sódio; 5g/L

extrato de levedura; 10g/L peptona) líquido, permanecendo na estufa (37°C) por uma hora. Espalhou-se o conteúdo em placas de Petri contendo 25mL de meio LB (com ágar), 25µL de ampicilina, 40µL de X-Gal e IPTG. As placas foram incubadas na estufa a 37°C overnight.

Procedeu-se a retirada das colônias de coloração branca, que foram inoculadas em 4mL de meio LB líquido e 4µL de ampicilina, e mantidas em agitação constante a 37°C durante 14 horas. Posteriormente o DNA plasmidial foi extraído com o Kit Plasmid DNA Purification (MACHEREY-NAGEL), e digerido uma alíquota com a enzima de restrição Eco-R1. Os isolados foram encaminhados para o sequenciamento pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

### **5.3 Análise das sequências**

Os nucleotídeos (nt) e as sequências de aminoácidos (aa) obtidas do sequenciamento foram alinhadas usando o programa ClustalW. A análise filogenética foi realizada com o programa Mega 5.1 e dois modelos estatísticos, o Maximum-Likelihood e o Neighbor-Joining foram testados, no entanto, não foi observado diferença entre as árvores geradas. Por esta razão optou-se pelo método de Maximum-Likelihood para construção da árvore filogenética com 1000 bootstrap de repetições. Este estudo foi realizado para comparar individualmente as sequências de nucleotídeos e aminoácidos com isolados anteriormente relatados da mesma espécie ou com os isolados do mesmo gênero (sequências recuperadas do GenBank) para determinar a relação entre isolados de CABMV.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Comportamento sintomatológico de acessos do BAG Maracujá da Embrapa à infecção pelo vírus do endurecimento dos frutos**

Os acessos de maracujazeiro do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura apresentaram valores diversos de comportamento à infecção pelo

endurecimento dos frutos, que variaram de 1,1 até 3,3 (Tabela 3). Verifica-se que a maioria dos acessos do BAG Maracujá analisados, se mostraram suscetíveis ao endurecimento dos frutos.

A severidade dos sintomas nem sempre pode ser considerada diretamente proporcional à concentração das partículas virais, que pode depender tanto da resistência da planta, como também do patógeno, cuja variabilidade nos sintomas provavelmente esteja relacionada às diferenças entre os isolados de CABMV (RESENDE *et al.*, 2000). Em virtude disso, é importante ressaltar que num programa de melhoramento para resistência a doenças, além do conhecimento do nível de tolerância do hospedeiro é importante conhecer a variabilidade genética ou fisiológica do patógeno (LEITE JR., 2002).

Os isolados de CABMV da Bahia, BGM 007 e BGM 028 deste estudo, que foram sequenciados e caracterizados, são provenientes dos acessos BGM 007 e BGM 028, respectivamente, e apresentaram notas de 2,9 e 2,2, e foram considerados acessos suscetíveis à doença do endurecimento dos frutos, porém não foi possível correlacionar o nível de severidade dos sintomas apresentados por esses acessos com os níveis de variabilidade dos isolados.

Análises que correlacionem as sequências do genoma dos vírus com respostas sintomatológicas do hospedeiro devem ser realizadas a fim de se fazer uma melhor associação entre essas variáveis.

**Tabela 3. Avaliação dos acessos do BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura quanto à presença e severidade de sintomas foliares do CABMV.**

Resistente (1) 1,0 - 1,9			Medianamente Suscetível (2) 2,0 - 2,9			Suscetível (3) 3,0 - 3,9		
1	BGM 292	1,1	1	BGM 216	2,0	1	BGM 227	3,0
2	BGM 322	1,2	2	BGM 215	2,1	2	BGM 311	3,0
3	BGM 237	1,3	3	BGM 208	2,1	3	BGM 051	3,2
4	BGM 242	1,3	4	BGM 168	2,2	4	BGM 041	3,3
5	BGM 290	1,3	5	GA3(BL3)	2,2			
6	BGM 278	1,4	6	BGM 028	2,2			
7	BGM 238	1,4	7	BGM 016	2,2			
8	BGM 272	1,6	8	BGM 009	2,2			
9	BGM 312	1,6	9	BGM 033	2,3			
10	BGM 188	1,6	10	BGM 121	2,3			
11	BGM 140	1,6	11	GA (BL 1)	2,3			
12	BGM 053	1,7	12	BGM 029	2,3			
13	BGM 268	1,7	13	BGM 094	2,3			

14	BGM 158	1,9	14	BGM 071	2,4			
15	BGM 123	1,9	15	BGM 078	2,4			
16	BGM 187	1,9	16	BGM 169	2,4			
			17	BGM 186	2,4			
			18	BGM 274	2,4			
			19	BGM 023	2,5			
			20	BGM 017	2,5			
			21	BGM 025	2,5			
			22	BGM 181	2,5			
			23	BGM 229	2,5			
			24	BGM 185	2,6			
			25	BGM 079	2,6			
			26	BGM 022	2,6			
			27	BGM 064	2,6			
			28	BGM 277	2,7			
			29	BGM 205	2,7			
			30	BGM 044	2,7			
			31	BGM 049	2,8			
			32	BGM 034	2,8			
			33	BGM 222	2,8			
			34	BGM 043	2,8			
			35	BGM 048	2,8			
			36	BGM 048	2,8			
			37	BGM 007	2,9			
			38	BGM 092	2,9			

## 6.2 Análise pelo RT-PCR e Caracterização Molecular do CABMV

A qualidade das reações de RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos de alongamento celular EF1R/EF1F foi confirmada, amplificando um fragmento de DNA de aproximadamente 300pb (Figura 6b). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose e apresentou fragmentos correspondentes às subunidades ribossomais (Figura 6a). Os primers mencionados na reação de PCR foram validados, e somente os pares CABMV2R/CABMV F com um amplicon de 997pb, numa temperatura de anelamento de 50°C e o CABMV7011R/CABMV\_NEW com amplicon de 1200pb, numa temperatura de 63°C, foram capazes de amplificar um fragmento do genoma do vírus, que fosse adequado para as análises de variabilidade genética (figura 7a).

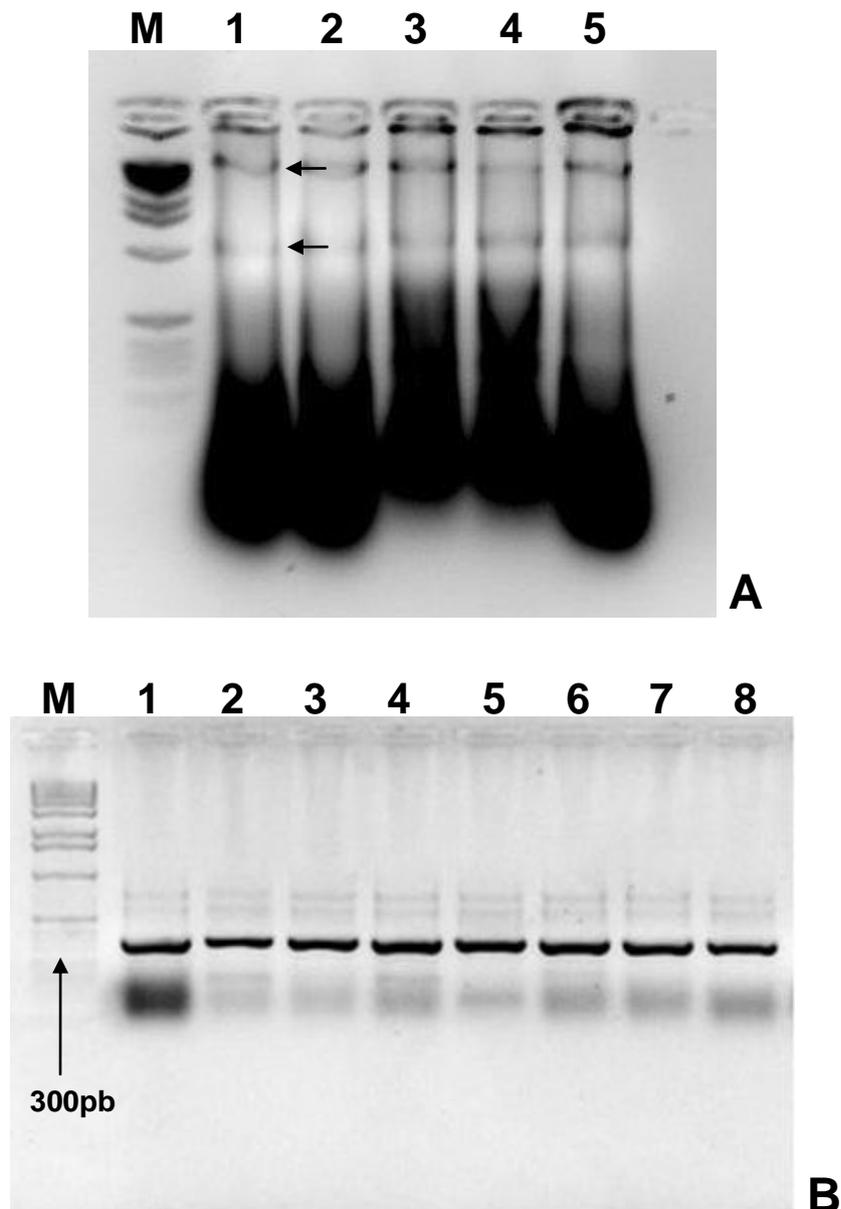
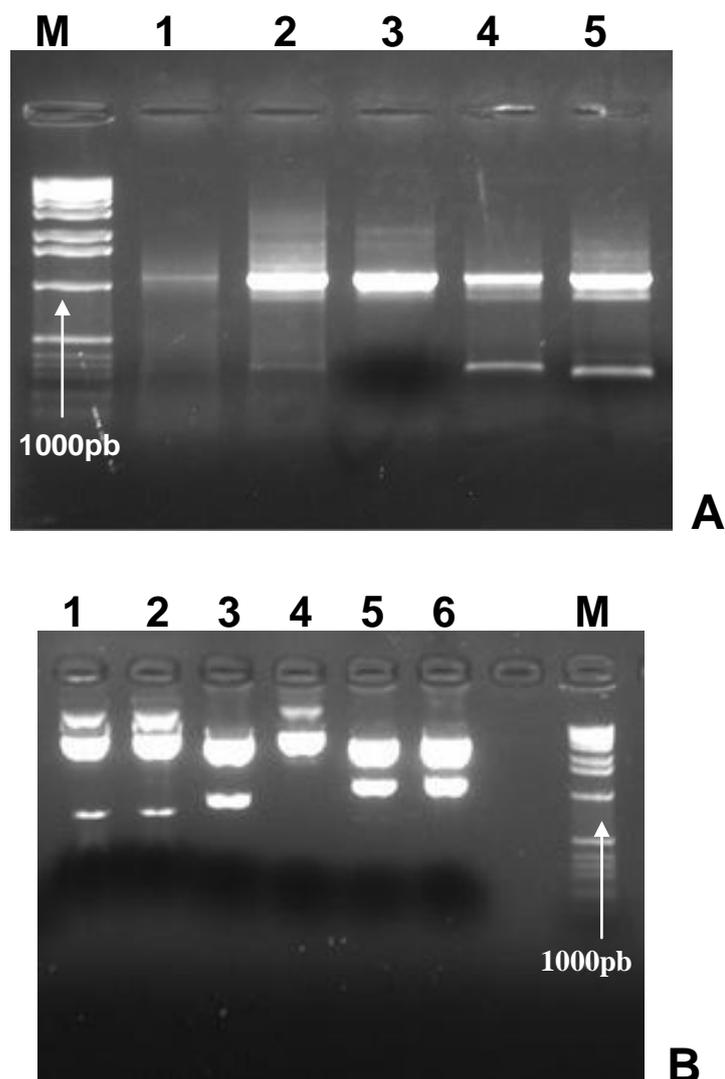


Figura 6. (A) Gel de Agarose 1%, mostrando o padrão de bandas (subunidades ribossomais) das amostras de RNA de maracujá analisadas (1 à 5). (B) Amplificação do fator de alongamento celular (Primers EF1F/EF1R) em amostras de maracujá com o vírus do endurecimento dos frutos. M (Marcador de 1kb).



**Figura 7. (A) Amplificação por RT-PCR do fragmento viral do Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV) a partir do RNA total extraído de plantas com o endurecimento dos frutos (1 à 5). (B) Confirmação da clonagem realizada através da clivagem com a enzima de restrição Eco RI, liberando o fragmento amplificado (6 à 11). M (marcador 1kb).**

Foram coletadas trinta e cinco amostras, provenientes do Banco ativo de Germoplasma de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, estado da Bahia. As coletas das amostras de feijão-caupi foram realizadas em oito unidades federativas do território brasileiro, que incluem Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, totalizando cinquenta amostras.

Apenas dez amostras de feijão-caupi coletadas e previamente identificadas quanto à presença do CABMV, foram escolhidas para a extração do RNA total, clonagem e sequenciamento do fragmento genômico dos possíveis isolados, juntamente com as amostras de maracujá.

No entanto, só foi possível sequenciar sete isolados para a caracterização e estudo de diversidade genética, dentre estes, cinco provenientes do feijão-caupi e dois isolados do maracujá. As sequências de 997pb obtidas dos sete isolados foram caracterizadas somente uma região de 838pb de todos os isolados, corresponderam à sequência codificante de parte da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e da sequência parcial do gene da proteína 6K2, comprovando a identidade desses isolados como sendo estirpes do CABMV.

**Tabela 4. Porcentagem de identidade de nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos (diagonal abaixo) a partir da análise das sequências do fragmento genômico de 838pb provenientes dos sete isolados de CABMV, e isolados disponíveis no GenBank.**

	TAQ	TAQ2	MAR	JAG	TAI	BG7	BG28	ZIM	MG	BR1
TAQ		95	99	95	93	84	84	88	93	93
TAQ2	96		95	99	94	84	84	89	93	93
MAR	99	97		95	93	84	84	88	93	93
JAG	97	99	97		94	84	84	89	93	93
TAI	96	97	96	98		85	85	89	93	93
BG7	91	91	91	92	92		99	85	84	84
BG28	91	91	91	92	92	99		85	84	84
ZIM	94	95	94	94	94	92	92		89	89
MG	95	96	95	96	96	92	92	95		100
BR1	95	96	95	96	96	92	92	95	100	

TAQ: Taquaritinga do Norte-PE; TAQ2: Taquaritinga2-PE; MAR: Maravilha-AL; JAG: Jaguaribe-CE; TAI: Taiba-CE; BG7: BAG Maracujá 07 Cruz das Almas -BA; BG28: BAG Maracujá 28 Cruz das Almas-BA; ZIM: Isolado de feijão-caupi Zimbabwe; MG: Isolado de Maracujá-Brasil; BR1: Isolado de Amendoim-Brasil.

As sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) dos sete isolados revelaram identidade elevada, variando de 84 a 99% de nt e 91 a 99% de aa (Tabela 4). O nível de identidade para demarcação de espécies de *Potyvirus* foi proposto em 76% para sequências de nucleotídeos, e 82% para sequências de aminoácidos (ADAMS *et al.*, 2005). Em relação aos isolados de maracujá, o nível de identidade de nt e aa foi de 99% para ambos, e os isolados de feijão-caupi apresentaram nível de identidade variando de 93 a 99% (nt) e 96 a 99% (aa) (Tabela 4). Esse fato revelou que isolados provenientes do mesmo hospedeiro apresentam baixos níveis de variabilidade, porém quando essa comparação é realizada entre isolados provenientes de diferentes hospedeiros, o nível de variabilidade genética aumenta.

A identidade entre os isolados de Pernambuco e Alagoas foi de 99% entre as sequências de nt e aa, revelando um alto índice de identidade entre estes dois isolados, porém quando comparamos a identidade entre os isolados do Ceará com os de Pernambuco e Alagoas, estes valores foram menores, variando de 93 a 95% de nt e 96 e 97% de aa, respectivamente (Tabela 4). De acordo com essa circunstância, pode-se inferir a existência de correlação geográfica associada a baixos níveis de variabilidade genética encontrada entre os isolados. Nascimento *et al.* (2006) observou em um estudo, uma baixa variabilidade genética entre os isolados de CABMV de maracujá que são próximos geograficamente.

Um fato interessante mostrou que um isolado coletado em Pernambuco (Taquaritinga2) apresentou 99% de identidade (nt/aa) com o isolado de Jaguaribe, coletado no Ceará, mostrando que a correlação geográfica nem sempre é determinante para explicar os níveis de variabilidade. Um recente estudo a partir da sequência completa do gene da CP, mostrou que a variabilidade genética de isolados de CABMV de maracujazeiro que são próximos geograficamente, nem sempre apresentam índices de variabilidade maiores quando comparados com alguns isolados que são distantes geograficamente (NICOLINI *et al.*, 2011).

Torna-se apropriado salientar que no presente trabalho utilizou-se o gene da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) ao invés do gene da CP para correlacionar a identidade entre os isolados de CABMV. Adams *et al.*, (2005)

constatou que na ausência da ORF completa para discriminação taxonômica de espécies da família *Potyviridae*, pode-se utilizar o gene da CI para um diagnóstico mais preciso. Esse novo critério de classificação de novas espécies de vírus da família *Potyviridae* tem sido bem aceito no Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2011).

### **6.3 Caracterização *in silico* das sequências de aminoácidos do CABMV**

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos dos sete isolados de CABMV permitiu mapear os domínios conservados presentes nas diferentes proteínas produzidas quando a planta é infectada por *Potyvirus* (Figura 8). Na região codificante da proteína de inclusão cilíndrica (CI) foi mapeado o motivo conservado TNI em todos os isolados de CABMV de feijão e maracujá (Figura 8). Ele está relacionado com o sítio de ligação de ATP (MLOTSHWA *et al.*, 2002).

Em seguida detectou-se nos sete isolados de CABMV o sítio de clivagem da CI/6K2, NTVCLQ/S (MLOTSHWA *et al.*, 2002). Entretanto, nos isolados de maracujá ocorre uma substituição pontual do aminoácido asparagina (N), pelo aminoácido Treonina (T), mas, provavelmente essa mutação não afeta o reconhecimento da sequência pela protease NIa-Pro, visto que ambos os aminoácidos apresentam características físico-químicas semelhantes (Figura 8). Todavia, estudos posteriores de clones infecciosos e a utilização de mutagênese podem investigar se os diferentes aminoácidos verificados na sequência dos isolados de CABMV de maracujá tem alguma função na diferenciação biológica existente entre os isolados de maracujá e caupi (ABREU, 2012).

```

Taquaritinga-PE      LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAASALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPKFLRES 60
Maravilha-AL         LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAASALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPKFLRES 60
Taquaritinga2-PE    LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAANALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPKFLRES 60
Jaguaribe-CE        LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAANALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPKFLRES 60
Taiba-CE             LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAASALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPKFLRES 60
BAGmaracujá28-BA    LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAASALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEVHKLLKPKFLRES 60
BAGmaracujá07-BA    LPVTTQNVTNNILSKCTVQQAASALNFELTPFFTFHFVKYDGSMPHPEVHKLLKPKFLRES 60
*****.*****.*****

Taquaritinga-PE      EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCNEQVQLPFYVNGIPDKLFEALWEAVSKY 120
Maravilha-AL         EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCNEQVQLPFYVNGIPDKLFEALWEAVSKY 120
Taquaritinga2-PE    EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCNERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKY 120
Jaguaribe-CE        EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCNERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKY 120
Taiba-CE             EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCNERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKY 120
BAGmaracujá28-BA    EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVKEYRRLGIQIGCNERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKY 120
BAGmaracujá07-BA    EMVMNKKAIPIYQYVNQWISVKEYRRLGIQIGCNERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKY 120
**.*.....*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Taquaritinga-PE      RYDAGFGRISSASSTKISYTLSTEPTAVPTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
Maravilha-AL         RYDAGFGRISSASSTKISYTLSTEPTAVPTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
Taquaritinga2-PE    RYDAGFGRISSASSTKISYTLSTEPTAVPTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
Jaguaribe-CE        RYDAGFGRISSASSTKISYTLSTEPTAVPTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
Taiba-CE             RYDAGFGRISSTSTKISYTLSTEPTAVPTVAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
BAGmaracujá28-BA    RYDAGFGRISSTSTKISYTLSTEPAAIPRTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
BAGmaracujá07-BA    RYDAGFGRISSTSTKISYTLSTEPAAIPRTIAIIDHLISEEMMKKNHFDTVASSLTGHS 180
*****.*.....*:*:*:*:*:*:*:*:*

Taquaritinga-PE      FLSGIAEGIRKCYLRDYSTQNIETLQARASQLLEFNNSNVVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
Maravilha-AL         FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARASQLLEFNNSNVVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
Taquaritinga2-PE    FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARAQLLEFNNSNVVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
Jaguaribe-CE        FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARAQLLEFNNSNVVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
Taiba-CE             FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARAQLLEFNNSNVVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
BAGmaracujá28-BA    FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARASQLLELDSNTVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
BAGmaracujá07-BA    FLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQARASQLLEYDSNTVDVNLKHEYEDLGILNTVCI 240
*****.*.....*:*:*:*:*:*:*:*

Taquaritinga-PE      QSKQEVAKYLGKKGWDGKRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 279
Maravilha-AL         QSKQEVAKYLGKKGWDGKRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 279
Taquaritinga2-PE    QSKQEVAKYLGKKGWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 279
Jaguaribe-CE        QSKQEVAKYLGKKGWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 279
Taiba-CE             QSKQEVAKYLGKKGWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 279
BAGmaracujá28-BA    QSKHEVAKYLGKKGWDGKRLRNDLLLVFTIIGGGGLM 279
BAGmaracujá07-BA    QSKHEVAKYLGKKGWDGKRLRNDLLLVFTIIGGGGLM 279
**.*.....*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figura 8. Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos da proteína Inclusão Cilíndrica (CI) e parte da proteína 6K2 codificada pelo genoma dos isolados de CABMV provenientes de caupi e maracujá coletados em diferentes regiões produtoras no Nordeste Brasileiro. O sítio de clivagem CI/6K2 está indicado em verde. Os motivos conservados na região codificadora da proteína CI estão indicados em vermelho. As mutações presentes na região de clivagem CI/6K2 e nas demais regiões estão marcadas em azul. Os asteriscos indicam posições conservadas de aminoácido entre os isolados.

#### 6.4 Estudo de variabilidade genética do CABMV

A análise filogenética mostrou que os isolados brasileiros de CABMV deste estudo são consideravelmente próximos do isolado de CABMV encontrado no Zimbábue, se estabelecendo um grande clado à parte dos

demais vírus da família *Potyviridae* (Figura 9). O isolado de PWV que, juntamente com o CABMV, causa o endurecimento dos frutos no Brasil, apresentou uma distância genética muito ampla em relação aos isolados de CABMV desse estudo, permanecendo separado em único clado (Figura 9).

Em uma análise complementar dos fragmentos parciais de RNA, pôde-se observar um enraizamento único do isolado Taíba-CE, e revelou-se que a distribuição geográfica tem uma relação intrínseca com a separação entre os isolados de Taquaritinga-PE e Maravilha-AL que possuem um enraizamento separado dos demais isolados brasileiros (Figura 9).

No entanto, os isolados Taquaritinga2-PE e Jaguaribe-CE não demonstraram agrupamento baseado na região geográfica, mais foram agrupados juntos em consequência do grau de identidade existente entre eles (Figura 9). É possível que o sequenciamento de um número maior de isolados possibilite uma melhor compreensão das relações entre isolados e suas respectivas regiões geográficas (DALTRO, 2010). Para os isolados provenientes de *Passiflora*, a distância filogenética entre os isolados de caupi foi ainda maior. A robustez da filogenia resultante foi avaliada através da análise de bootstrap com 1000 repetições.

Nicolini *et al.*, (2011) analisando a diversidade genética entre os diferentes isolados de CABMV sequenciados usando a região da CP e tentando correlacionar essa diversidade com adaptações evolutivas do patógeno aos diferentes hospedeiros, observaram uma clara separação entre os isolados, de acordo com o hospedeiro em que o vírus foi encontrado, formando clados à parte em relação aos demais.

Em divergência a esses resultados Barros e colaboradores (2011), analisando o genoma de dois isolados de CABMV provenientes de diferentes hospedeiros, mostrou que a distância genética não está relacionada à gama de hospedeiros do qual este vírus é encontrado e sim a sua origem geográfica.

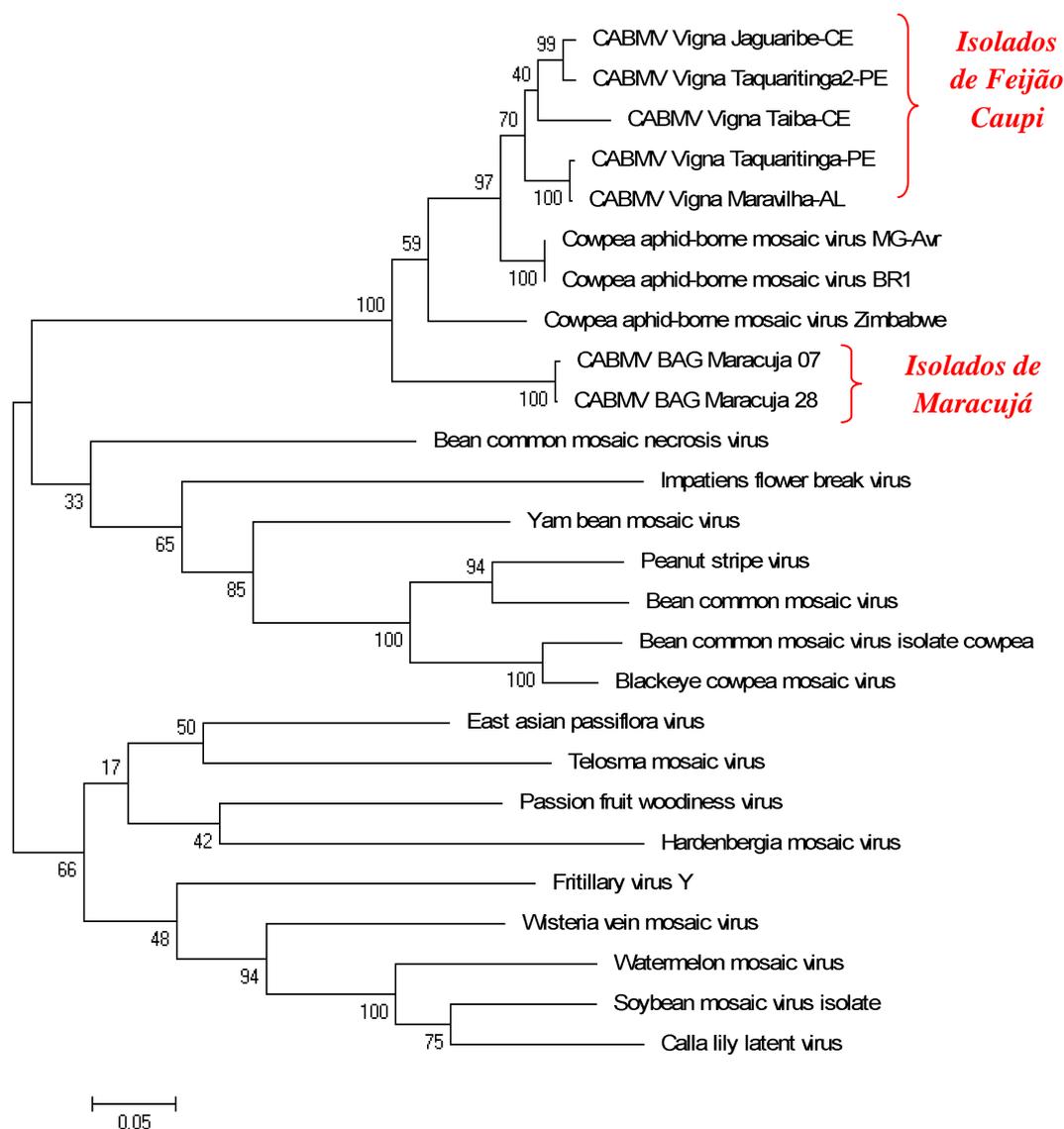
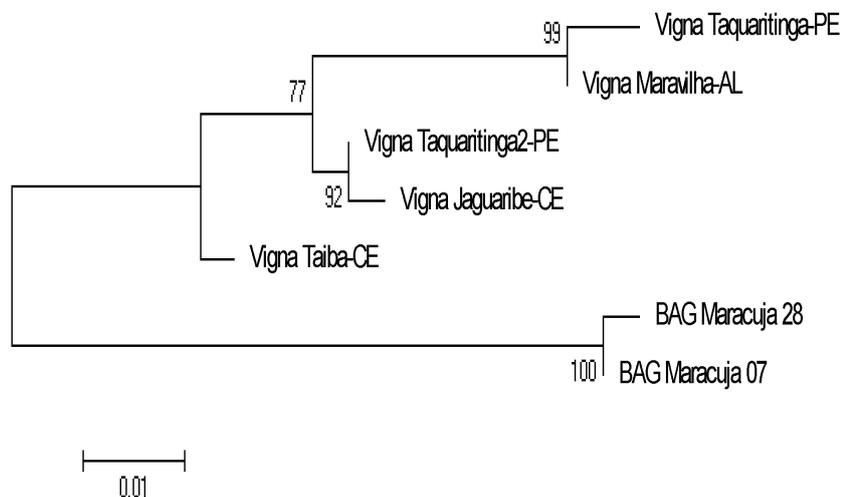


Figura 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de *Cowpea aphid borne mosaic virus* e espécies do gênero *Potyvirus* baseado em um fragmento do genoma de 838 nt do RNA viral. As sequências correspondentes às espécies de *Potyvirus* foram retiradas do banco de dados (GenBank): HQ880243 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* MG Avr), HQ880242 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Br1), AF348210 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Zimbabwe) AY864851 (*Impatiens flower break virus*), NC\_016441 (*Yam mosaic virus*) PSU05771 (*Peanut stripe virus*), EU761198 (*Bean common mosaic virus*), AJ312437 (*Bean common mosaic virus*- Isolate cowpea), AY575773 (*Blackeye cowpea mosaic virus*), HQ229994 (*Bean common mosaic necrosis virus*), HQ122652 (*Passion fruit woodiness virus*), AB246773 (*East asian passiflora virus*), DQ851493 (*Telosma mosaic virus*), HQ161080 (*Hardenbergia mosaic virus*), AY656816 (*Wisteria vein mosaic virus*), JF273466 (*Watermelon mosaic virus*), FJ640973 (*Soybean mosaic virus*), EF105298 (*Calla lily latente*)

*virus*), AM039800 (*Fritillary virus Y*). Os valores de Bootstrap foram gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós.



**Figura 10.** Árvore filogenética corresponde a um consenso proveniente de uma sequência parcial de aminoácido deduzida de um fragmento genômico que codifica a proteína CI e um fragmento pequeno da proteína 6K2 de sete isolados brasileiros de CABMV.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados, em relação à avaliação sintomatológica, verifica-se que a maioria dos acessos do BAG Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, mostraram suscetibilidade ao endurecimento dos frutos. Os isolados de CABMV da Bahia que foram caracterizados (BGM 007 e BGM 028) apresentaram notas de 2,9 e 2,2, respectivamente, sendo considerados acessos suscetíveis à doença do endurecimento dos frutos.

A identidade dos isolados desse estudo como sendo estirpes do CABMV foi comprovada, pela caracterização de uma região de 838pb, e essa região correspondeu à sequência codificante de parte da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e da sequência parcial do gene da proteína 6K2.

As sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) dos sete isolados revelaram identidade elevada, variando de 84 a 99% de nt e 91 a 99% de aa, demonstrando uma baixa variabilidade genética entre os isolados deste estudo. Em relação a análise dos isolados, constatou-se que isolados provenientes do mesmo hospedeiro apresentam baixos níveis de variabilidade, sendo que o nível de variabilidade é maior, em isolados de diferentes hospedeiros.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

É incontestável a necessidade de desenvolver estratégias de clonagem e sequenciamento de regiões cada vez maiores de um grande número de isolados de CABMV ou até mesmo espécies filogeneticamente próximas, possibilitando a disponibilização de sequências de regiões diferentes e um conhecimento mais amplo do genoma desse vírus. É importante também aprimorar os estudos taxonômicos e classificação das espécies de vírus filogeneticamente relacionadas, a partir das sequências obtidas de novas regiões comumente não disponibilizadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho irão auxiliar nos estudos epidemiológicos e diversidade genética entre os isolados de CABMV. Além disso, este trabalho fornece informações que serão a base para o desenvolvimento de estratégias para a geração de linhagens resistentes duráveis ao CABMV.

## 9. BIBLIOGRAFIA

ABREU, E. F. M. **Variabilidade genética do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) no Brasil.** Teses de doutorado. Brasília, 2012.

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

AGÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO E EXTENSÃO RURAL, [http://www.agraer.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=167&id\\_comp=1759&id\\_reg=136460&voltar=home&site\\_reg=167&id\\_comp\\_orig=1759](http://www.agraer.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=167&id_comp=1759&id_reg=136460&voltar=home&site_reg=167&id_comp_orig=1759). Mato Grosso do Sul, 2011.

ALLISON, R. F., JOHNSTON, R. E. & DOUGHERTY, W. G. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. **Virology** 154, 1986.

BARBOSA, F. F. L. Pesquisa, Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia na Passicultura: Desafios e Perspectivas, com Ênfase para o Estado da Bahia. Cruz das Almas. Bahia, 2004.

BARROS D. R.; et al. Comparative analysis of the genomes of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Achives of Virology**, v. 156, p.1–7, 2011.

BERGUER, P. H.; WYATT, S.D.; SHIEL, P. J.; SILBERNAGEL, M. J.; DRUFFEL, K; MINK, G. I. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume- infecting potyviruses. **Achives of Virology**, v. 142, 1997.

BERNACCI, L.C. *Passifloraceae*. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RIMA, FAPESP, v.3, p. 247-248, 2003.

BESERRA JUNIOR, J.E.A.; ANDRADE, E.C.; CAMARÇO, R.F.R.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; LIMA, J.A.A. Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.121-124, 2011.

BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A.; XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 553-560, 1995.

BOCK, K. R.; CONTI, M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Kew: CMI/AAB, 5p. (CMI/AAB **Descriptions of Plant Viruses**, 134), 1974.

BRAZ, P. C.; GONÇALVES, L. O.; BOARI, A. DE J.; OLIVEIRA, A. DOS, S.; FILHO, E. F. F. Incidência da virose endurecimento do frutos do maracujazeiro no Estado de Sergipe. Anais CBO, 2005.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHE, R, E. J. **Plant Viruses online: descriptions and lists from the Vide Database**. 1996. Versão: 20/08/1997.

CALDER, V.L.; INGERFELD, M. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. **Journal of Structural Biology**, v. 105, p. 62-66, 1990.

CARRINGTON, J. C; FREED, D. D.; OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal of Structural Biology**, v. 9. P 1347-1353, 1990.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 259-268, 1981.

DALTRO, C. B. **Estudo da variabilidade genética do vírus do amarelo letal ("Papaya lethal yellowing virus", PLYV) e do vírus da meleira do mamoeiro, ("Papaya meleira virus", PMEV)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2010.

ELLIS, P., STACE-SMITH, R. & De VILLIERS, G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease** 81:481-484. 1997.

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

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SANTOS, A. A. Cultivares de caupi para região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 67-88. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28), 2000.

GHORBANI, S. G. M.; SHAHRAEIN, N.; ELAGINIA, S. A. Serodiagnose of cowpea (*Vigna unguiculata*) viruses in Guilan province, Iran. **Iranian Journal Virology**, v. 01, n. 1, p. 28-31, 2008.

[http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/pin/pdf/p\\_01.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/pin/pdf/p_01.pdf) Acesso em 01 de agosto de 2012.

<http://www.cpa0.embrapa.br/portal/artigos/artigos/artigo15.html> Acesso em 24 de setembro de 2012.

<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=78767>. Acesso em 29 de outubro de 2012.

<http://www.ufrgs.br/alimentus/feira/mpfruta/maracuja/cabot.htm> Acesso em 08 de maio de 2012.

[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html) Acesso em 30 de abril de 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Maracujá. Brasília:Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 23 de abril de 2012.

KITAJIMA, E.W. , CHAGAS, C.M. & CRESTANI, O. A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. 409-432, 1986.

LEITE, Jr. R. P. Bacteriose do maracujazeiro e estratégias para seu controle. In:BRUCKNER, C. H. et al. Anais da III Reunião Técnica de Pesquisa em maracujazeiro. Viçosa, MG: UFV, DFT, p. 97-98, 2002.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE, v. 19, 2007.

LIMA, A. de A. (Ed.). Maracujá produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa. **Informação Tecnológica**, p.9, 2002.

LIMA, J.A.A, et al. *Crotalaria paulinea* new natural host of the *Cowpea severe mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.4, p. 429-433, 2005.

MARTINS, L. et al. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* SIMS F. flavicarpa DEG). **Revista Brasileira de Sementes**. Brasil, v. 27, n. 1, p. 183-188, 2005.

MCKERN, N. M.; STRIKE, P. M.; BARNETT, O. W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. *Cowpea aphid borne mosaic virus*-Morocco and South African *Passiflora* virus are strains of the same *Potyvirus*. **Archives of Virology**. v. 136, p. 207-217, 1994.

MEISSNER FILHO, P.E. **Vírus X do Patchuli. Caracterização biológica e molecular**. 172p. Dissertação (Tese de Doutorado) - Universidade de Brasília. Brasília, 1996.

MELETTI, L.M.M; MAIA, M.L. Maracujá: produção e comercialização. Campinas: Instituto Agrônomo, 64 p. (Boletim Técnico, 181), 1999.

MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Maracujá. Jaboticabal: FUNEP, (**Série Frutas Nativas 6.**), 2010.

MLOSTSHWA, S.; VERVER, J.; NIANG-SITHOLE, I.; KAMPEN, T. V.; KAMMEN, A. K. & WELLINK, J. The genomic sequence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and its similarities with other potyviruses. **Archives of Virology** 5:1043-1052, 2002.

MURPHY, J.F.; JARLFORS, U.; SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in *Potyvirus*-infected protoplasts. **Phytopathology**, v. 81, p. 371-374, 1991.

NARITA, N. **Epidemiologia do “Cowpea aphid borne mosaic virus” (cabmv) em maracujazeiro na região produtora da alta paulista, SP.** Tese (Doutorado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp. Botucatu, 2007.

NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIORIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**. v. 151, p. 1797-1809, 2006.

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 378-383, 2004.

NICOLINI, C.; et al. Possible Host Adaptation as an Evolution Factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* Deduced by Coat Protein Gene Analysis. **Journal of Phytopathology**. p.1439-0434, 2011.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao “passionfruit woodiness virus”. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.76-79, 1999.

OLIVEIRA, J.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura de maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. 1991.

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

SEQUEIRA, J.C. Técnicas sorológicas e biomoleculares de diagnóstico de vírus e de viróides em plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 18, p. 79-110, 1992.

SHUKLA, D.D. & WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the *potyvirus* group. **Journal of General Virology** 69:2703-2710, 1988.

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

SILVA, F.M.; CORREA, L. de S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. dos. Enxertia de mesa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.27, n.1, p.98, 2005.

SHUKLA, D.D. & WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the *potyvirus* group. **Journal of General Virology** 69:2703-2710, 1988.

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

SMARTT, J. Grain legumes: evolution and genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, p333, 1990.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: São Paulo: Instituto *Plantarum*, p. 640, 2005.

TAMURA K.; et al **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**; v.4, p.1-9, 2011.

TREVISAN, F. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba. São Paulo, 2005.

VAM REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Eds.). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 7., 2000, New York. Report. New York: Academic Press, p. 985, 2000.

VIANA, C. A. dos S. **Resistência de genótipos de maracujá-azedo á bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* PV. *Passiflorae*) e a virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*)**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2007

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

ZERBINI, F.M. & ZAMBOLIM, E.M. **A família Potyviridae**, Segunda parte. Revisão Anual de Patologia de Plantas 8:225-265. 2000.

ZERBINI, F.M.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. **Princípios e Técnicas de Diagnose aplicados em Fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. p. 95-124., 2001.