

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA VIROSE DO
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS CAUSADA POR *Cowpea aphid-borne
mosaic virus* EM MARACUJAZEIRO-AZEDO

Neemias da Silva
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), BRASIL
Maio de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva Santos, Neemias
DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA VIROSE
DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS CAUSADA POR Cowpea
aphid-borne mosaic virus EM MARACUJAZEIRO-AZEDO /
Neemias da Silva Santos. -- 2019.
76 f.
Orientador: Edson Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2019.

1. CABMV. 2. ELISA. 3. real time RT-PCR. 4.
Passiflora edulis. 5. epidemiologia. I. Bertolini,
Edson, orient. II. Título.

NEEMIAS DA SILVA SANTOS
Engenheiro Agrônomo - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em:07.06.2019
Pela Banca Examinadora

NOME
EDSON BERTOLINI
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

HENRIQUE BELMONTE PETRY
EPAGRI / SC

TATIANA MITUTI
Agrônoma - Laboratório de
Diagnóstico Fitossanitário

THOR VINÍCIUS MARTINS FAJARDO
EMBRAPA Uva e Vinho

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À minha família, pelo incentivo e suporte.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela qualidade do ensino.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa.

Ao Laboratório de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS e ao Laboratório Agrônômica, por disponibilizar o termociclador de PCR em tempo real.

Ao Dr. Edson Bertolini, pela orientação e amizade.

Ao Dr. Jorge Rezende, pela cessão de antissoros para CABMV.

Aos professores do curso, pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas de Pós-graduação, pela companhia.

Aos técnicos das instituições IFC, Epagri, Emater e Cidasc, pela colaboração.

Aos profissionais da área médica, pelo cuidado.

DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS CAUSADA POR *Cowpea aphid-borne mosaic virus* EM MARACUJAZEIRO-AZEDO¹

Autor: Neemias da Silva
Orientador: Prof. Edson Bertolini

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá com uma produção de aproximadamente 555.000 toneladas por ano. A produtividade está limitada por fatores de natureza fitossanitária, principalmente os vírus. O endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM) é a principal virose da cultura, que no Brasil é causada por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Potyvirus* transmitido de maneira não-persistente por afídeos. O CABMV foi relatado em Santa Catarina (SC) em 2008 e no Rio Grande do Sul (RS) em 2016. Neste estudo, foi desenvolvido e validado um protocolo de RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV, determinada a incidência do vírus em diferentes pomares do RS e de SC, realizada a caracterização molecular dos isolados virais e também realizado um ensaio de transmissibilidade do vírus por sementes. Apesar da variabilidade existente, foi possível desenhar iniciadores e sonda TaqMan específicos para o CABMV e um protocolo direto de preparação de amostras e de amplificação por RT-PCR em tempo real. Este protocolo foi comparado com a técnica PTA-ELISA e demonstrou-se 100 vezes mais sensível. O aumento da incidência do vírus foi menor em pomares onde a infecção foi detectada mais tardiamente. Os isolados de CABMV do RS foram agrupados em um cluster monofilético com valor de 78% de bootstrap e apresentaram menor distância em relação aos isolados Fernao-SP e CABMV-SP. No ensaio de transmissibilidade do vírus por sementes não se pôde evidenciar a transmissão, embora tenha se constatado que o vírus está presente na semente. Os resultados deste trabalho são importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo e redução de perdas causadas pelo CABMV.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (76f.) maio, 2019.

DETECTION, CHARACTERIZATION AND EPIDEMIOLOGY OF PASSIONFRUIT WOODINESS DISEASE CAUSED BY *Cowpea aphid-borne mosaic virus*²

Author: Neemias da Silva

Adviser: Prof. Edson Bertolini

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer and consumer of passion fruit with a production of approximately 555,000 tons per year. Productivity is limited by phytosanitary factors, especially viruses. The Passion fruit Woodiness Disease (PWD) is the main viral disease of the crop and in Brazil is caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Potyvirus* that is transmitted non-persistently by aphids. The CABMV was reported in Santa Catarina (SC) in 2008 and in Rio Grande do Sul (RS) states in 2016. In this study, a real-time RT-PCR protocol for the detection of the CABMV was developed and validated, virus incidence was determined in different orchards in SC and RS, molecular characterization of virus isolates and virus transmissibility by seed assays were performed. In spite of the existing variability, it was possible to design specific TaqMan primers and probe for the CABMV and a direct protocol of sample preparation and real-time RT-PCR amplification. This protocol was compared with the PTA-ELISA technique and proved to be 100 times more sensitive. The increase in virus incidence was lower in orchards where the infection was detected later. CABMV isolates were grouped in a monophyletic cluster with a 78% bootstrap value and were closer than the Fernao-SP and CABMV-SP isolates. In the test of virus transmissibility by seed, transmission can not be evidenced, although the virus is present in the seed. The results of this work are important for the development of management strategies and reduction of losses caused by the CABMV.

² Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (76p.) May, 2019.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A cultura do maracujazeiro	3
2.2 Doenças do maracujazeiro	6
2.2.1 O Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro.....	9
2.2.1.1 Sintomatologia.....	10
2.2.1.2 Agentes causais	10
2.2.1.3 Epidemiologia	13
2.2.1.4 Manejo e controle	14
2.3 Métodos de diagnóstico e detecção.....	16
2.3.1 Métodos biológicos	17
2.3.2 Métodos sorológicos	17
2.3.3 Métodos moleculares.....	18
2.3.3.1 RT-PCR convencional	18
2.3.3.2 RT-PCR em tempo real	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan e análise <i>in silico</i>	21
3.2 Análise <i>in vitro</i> dos iniciadores e da sonda TaqMan	22
3.3 Comparação de sensibilidade entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real	23
3.4 Concordância entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto.....	25
3.5 Incidência de CABMV em pomares de maracujazeiro em SC e RS	26
3.6 Caracterização molecular dos isolados estudados	27

	Página
3.7 Transmissão do vírus por semente.....	29
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan e análise <i>in silico</i>	31
4.2 Análise <i>in vitro</i> dos iniciadores e da sonda TaqMan.....	32
4.3 Comparação entre os métodos direto e convencional de preparação de amostras nas análises de RT-PCR em tempo real.....	32
4.4 Comparação de sensibilidade entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real.....	34
4.5 Concordância entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto.....	35
4.6 Incidência de CABMV em pomares de maracujazeiro em SC e RS.....	37
4.7 Caracterização molecular dos isolados estudados.....	38
4.8 Transmissão do vírus por semente.....	43
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Quantidade produzida e rendimento médio de maracujá por Unidade da Federação.....	3
TABELA 2. Gêneros e espécies de vírus causadores de doenças em maracujazeiro.....	8
TABELA 3. Amostragens de folha de maracujazeiro de acordo com o tempo contado a partir do plantio e estrutura da planta.....	27
TABELA 4. Sequências utilizadas na construção da árvore filogenética.	29
TABELA 5. Características dos iniciadores e da sonda TaqMan desenhados.	31
TABELA 6. Predição do produto da PCR <i>in silico</i> com os iniciadores desenhados	32
TABELA 7. Comparação de sensibilidade, tempo de leitura e métodos de preparação de amostras entre as técnicas PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real, na detecção do CABMV em diluições seriadas de extrato vegetal positivo.	35
TABELA 8. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências.....	41
TABELA 9. Resultados das análises de frutos, sementes e plântulas utilizados no ensaio de transmissão do CABMV por sementes de maracujazeiro.....	44

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1. Quadro de contingência 2x2 para avaliação do índice Kappa de Cohen.	26
QUADRO 2. Comparação de resultados entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto na detecção do CABMV em 100 amostras de maracujazeiro-azedo.....	36
QUADRO 3. Comparação dos valores de OD ₄₀₅ e ciclos de amplificação (Ct) na análise de 100 amostras para detecção do CABMV por PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real.	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Sintomas do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Mosaico em folha (b, c e d), bolhosidades em folha (b e d) e deformação em fruto (a). 10	
FIGURA 2. Partículas de CABMV vistas em microscópio eletrônico (Damiri <i>et al.</i> , 2013).....	11
FIGURA 3. Representação esquemática da organização do genoma de membro do gênero <i>Potyvirus</i> (adaptado de Adams <i>et al.</i> , 2011).	12
FIGURA 4. Elisa indireto convencional (adaptado de Cambra <i>et al.</i> , 2016).....	18
FIGURA 5. Princípio de funcionamento da sonda TaqMan (NCBI, 2019).....	20
FIGURA 6. Alinhamento de sequências de CABMV no software Geneious. ...	21
FIGURA 7. Amplificação por RT-PCR em tempo real. Curvas obtidas pelo método convencional (a) e direto (b). Vermelho: diluição 10^{-1} . Verde: diluição 10^{-2} . Azul: diluição 10^{-3} . Roxo: diluição 10^{-4} . Rosa: diluição 10^{-5}	33
FIGURA 8. Evolução da incidência do CABMV em plantas de maracujazeiro-azedo em pomares localizados nos municípios de Torres, RS e São João do Sul, SC.	37
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose sob luz UV. Amplificação de 700 pb em amostras de CABMV positivas por RT-PCR em tempo real. M: Marcador de peso molecular (1.000 pb). Colunas 1, 3 e 5: Controles negativos. Coluna 2: Isolado CABMV-tor01. Coluna 4: Isolado CABMV-sjs01. Coluna 6: Isolado CABMV-sjs02.....	38
FIGURA 10. Sequência consenso do gene da proteína capsidial das amostras de CABMV procedentes de plantas de maracujazeiro-azedo de RS e SC.	39
FIGURA 11. Análise evolutiva de sequências de CABMV, PWV e EAPV pelo método da Máxima Verossimilhança.	40
FIGURA 12. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV em frutos e sementes de maracujá.	43

1 INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro tem grande destaque econômico internacionalmente, não só por esta fruta ser componente da alimentação humana, mas também pela sua utilização na indústria e por suas propriedades medicinais. O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo; no país, a frutífera é fonte de renda em pequenas propriedades, ocupando mão de obra quase que exclusivamente familiar.

Os principais desafios encontrados pela cultura estão relacionados a sua sanidade. Há uma série de doenças e pragas associadas ao maracujá que limitam a sua produção causando perdas não somente na produtividade, mas também na qualidade dos frutos. Nas últimas décadas, a principal doença da cultura, o endurecimento dos frutos do maracujazeiro, tem sido motivo de abandono de áreas cultivadas, de substituição do cultivo por outras espécies frutíferas, e até mesmo pelo deslocamento da cultura para novas regiões do Brasil sem tradição de produção da fruta na tentativa de evasão. A doença, que é causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), já foi relatada em quase todos os estados produtores de maracujá. Por tratar-se de um patógeno de difícil controle, o diagnóstico preciso é fundamental para o estabelecimento de estratégias preventivas.

A detecção de vírus, contudo, não é uma tarefa fácil. Atualmente, a técnica sorológica ELISA é a mais utilizada para a detecção do CABMV e não há nenhum relato de técnica molecular, como a RT-PCR em tempo real (TaqMan®), associada a métodos simples de preparação de amostras, sendo utilizada em análises rotineiras para a detecção do vírus. Devido à dificuldade no diagnóstico e na detecção, muitos aspectos epidemiológicos do vírus são pouco conhecidos nas regiões sem tradição do cultivo.

Portanto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo de detecção do CABMV através de RT-PCR em tempo real, associado com métodos diretos de preparação de amostras e o cálculo de parâmetros técnicos para sua validação. São ainda objetivos deste estudo a determinação da incidência da virose em diferentes pomares, a caracterização molecular dos isolados obtidos no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, e a verificação da transmissibilidade do vírus por sementes de maracujá.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do maracujazeiro

Os principais produtores de maracujá do mundo, em 2009, foram Brasil, Equador e Indonésia (FAO, 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, com uma quantidade produzida de 554.598 toneladas, numa área plantada de 41.216 hectares, chegando a um rendimento médio da produção de 13.497 quilogramas por hectare em 2017 (IBGE, 2019).

Os principais estados produtores de maracujá no Brasil, em 2017, foram a Bahia, responsável por 31% da produção nacional, o Ceará e Santa Catarina (Tabela 1). Santa Catarina e Rio Grande do Sul somam 9% da produção nacional (IBGE, 2019).

TABELA 1. Quantidade produzida e rendimento médio de maracujá por Unidade da Federação.

Unidade da Federação	Quantidade Produzida (ton.)	Rendimento Médio (kg.ha ⁻¹)
Bahia	170.910	10.496
Ceará	94.816	17.249
Santa Catarina	46.152	21.026
São Paulo	30.387	17.129
Rio Grande do Norte	29.182	11.439
Espírito Santo	25.575	19.568
Amazonas	24.563	18.837

continuação TABELA 1. Quantidade produzida e rendimento médio de maracujá por Unidade da Federação.

Paraná	20.430	17.704
Minas Gerais	19.100	12.836
Alagoas	17.750	16.512
Pará	11.213	9.949
Pernambuco	10.713	12.443
Paraíba	8.419	9.492
Rio de Janeiro	6.418	14.075
Sergipe	5.571	8.315
Mato Grosso	5.460	15.780
Rio Grande do Sul	5.447	18.590
Distrito Federal	5.190	34.600
Roraima	4.899	8.843
Goiás	4.645	14.336
Rondônia	4.561	10.964
Acre	925	8.409
Amapá	875	6.731
Mato Grosso do Sul	622	10.032
Piauí	392	17.043
Tocantins	255	7.969
Maranhão	128	6.095

O Distrito Federal apresentou, em 2017, o maior rendimento médio da produção, seguido por Santa Catarina e Espírito Santo (Tabela 1). Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentaram rendimento médio da produção acima da média nacional (IBGE, 2019).

A cultura do maracujazeiro é predominantemente praticada em pequenas propriedades, em pomares de 3 a 5 hectares (Meletti, 2011). Em São Paulo, nas principais regiões produtoras de maracujá, em 2008/2009, a ocupação de mão de obra familiar variou entre 1,1 e 2,1 pessoas por hectare,

enquanto a contratação de trabalhadores permanentes não ultrapassou 0,9 pessoas por hectare (Bezerra *et al.*, 2016).

O maracujazeiro é uma planta tropical cujas principais espécies cultivadas são o maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), o maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* f. *edulis*) e o maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) (Gonçalves, 2016). Apesar da alta diversidade do gênero *Passiflora*, que conta com aproximadamente 520 espécies distribuídas pelas regiões tropicais da América, Ásia e África (MacDougal *et al.*, 2004), atualmente, o maracujazeiro-azedo, que tem origem nas bordas das florestas tropicais da América do Sul (Carr, 2013), é a forma mais explorada comercialmente, correspondendo a 95% da produção (Joy, 2010 *apud* Carr, 2013).

O maracujazeiro é uma planta herbácea semi perene, trepadeira, com caule cilíndrico ou subanguloso, folhas trilobadas e trinervadas, subcoriáceas, flores solitárias, axilares, perfumadas e formadas quase o ano todo e frutos de cor roxa, amarela e vermelha (Lorenzi *et al.*, 2015). O maracujá é utilizado com finalidade alimentar, industrial, ornamental e medicinal (Araya *et al.*, 2017). Atualmente, no Brasil, 60% da produção é destinada ao consumo *in natura* e o restante à agroindústria (Meletti, 2011), sendo o suco seu principal produto derivado (Ferraz & Lot, 2006 *apud* Meletti *et al.*, 2011).

Na comparação com as demais cultivares, o maracujá-azedo apresenta maiores quantidades de açúcar total, ácido ascórbico, conteúdo fenólico total, ácido gálico e atividade antioxidante (Ramaiya *et al.*, 2013). Já foram identificados 13 carotenóides em maracujá-azedo, entre eles o β -caroteno, precursor da vitamina A (Mercadante *et al.*, 1998). A polpa e o extrato da casca do maracujá atuam como antioxidantes (Zeraik *et al.*, 2011). É sugerido que os

extratos possam ser usados para controlar a resposta inflamatória (Zeraik *et al.*, 2011). A parte aérea do maracujá-azedo atua como ansiolítico em baixas doses e sedativo em altas doses (Deng *et al.*, 2010).

Embora o maracujá tenha grande importância socioeconômica e possua diversas utilidades, seu cultivo tem sido afetado negativamente por problemas de natureza fitossanitária, principalmente por doenças, as quais tem contribuído para a redução na longevidade e produtividade de plantas de maracujá (Fisher & Rezende, 2008).

2.2 Doenças do maracujazeiro

As principais doenças que afetam o maracujazeiro são causadas por fungos, bactérias e vírus, destacando-se a podridão do colo, a murcha por *Fusarium*, a antracnose, a verrugose, a mancha bacteriana e o endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM) (Fisher & Rezende, 2008).

A antracnose é uma doença fúngica importante sendo considerada a principal doença de pós-colheita do maracujá-azedo no Brasil (Fisher *et al.*, 2007). Os sintomas variam de acordo com o órgão afetado. Nos frutos ocorrem lesões circulares ou irregulares pardo-claras que se tornam pardo-escuras conforme amadurecem. Nas folhas, ramos e frutos verdes ocorrem manchas aquosas verde escuras que evoluem para necrose. A depender da intensidade das lesões pode haver queda de folhas e de frutos, morte de ponteiros e secamento parcial da planta (Fischer & Rezende, 2016). A doença é causada pelos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (Anaruma *et al.*, 2010), *C. acutatum* (Guerber *et al.*, 2003) e *C. boninense* (Tozze Junior *et al.*, 2010).

A verrugose é uma doença importante que afeta a parte aérea das plantas sob condições de viveiro e de campo, sendo capaz de causar grandes perdas, sejam elas pela morte das mudas ou depreciação dos frutos (Peruch & Schroeder, 2018). A doença afeta tecidos jovens de folhas, gavinhas, ramos, botões florais, flores e frutos (Fisher & Rezende, 2008). Nas folhas surgem manchas circulares e translúcidas que evoluem para necrose, podendo haver deformação, encarquilhamento e perfurações. Os botões florais e as flores podem apresentar manchas semelhantes, enquanto em ramos e ponteiros as lesões se manifestam na forma de cancrios alongados (Fischer & Rezende, 2016). Nos frutos, formam-se lesões circulares levemente deprimidas que crescem e se tornam corticosas, salientes e pardacentas, porém não há o comprometimento da parte interna do fruto (Fischer & Rezende, 2016). A verrugose é causada por fungos de diferentes espécies, tais como: *Cladosporium herbarum* (Barbosa *et al.*, 2001), *C. oxysporum* (Parisi *et al.*, 2018) e *C. cladosporioides* (Delgado-Mendez, 2013) são os agentes causais da verrugose.

A podridão do colo e a murcha por *Fusarium* são as principais doenças fúngicas de solo que afetam o maracujazeiro, tendo sido apontadas como responsáveis pelo abandono de diversas áreas de cultivo e pela substituição do maracujá por outras espécies de frutíferas (Peruch *et al.*, 2009). O sintoma característico é a murcha decorrente da descontinuação dos vasos condutores, seguida de alteração na coloração das folhas, desfolha e morte da planta. Ocorre o anelamento na região do colo da planta e formação de rachaduras na casca (Fisher & Rezende, 2016). Os agentes causais são os

fungos *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* (Bueno *et al.*, 2014) e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Gardner, 1989).

A mancha oleosa é uma doença bacteriana considerada limitante por diversos autores, especialmente quando associada à antracnose, mas também pelas dificuldades inerentes ao controle de bacterioses em plantas (Peruch *et al.*, 2018). Os sintomas típicos incluem manchas foliares verde-escuras, encharcadas e translúcidas que progridem em tamanho e adquirem coloração marrom, coalescem e ocasionam seca e queda de folhas. Nos pecíolos e ramos formam-se caneluras longitudinais, acarretando seca, redução da frutificação e morte da planta. Nos frutos ocorrem lesões verde-escuras a pardacentas e oleosas e a formação de crostas a partir de exsudatos bacterianos que se aprofundam até as sementes (Fischer & Rezende, 2016). O agente causal da doença é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Nakatani *et al.*, 2009).

As viroses têm maior importância entre as enfermidades e, devido às dificuldades de controle, comprometem a produtividade e limitam a expansão do cultivo. A Tabela 2 contém as principais espécies de vírus que afetam o cultivo do maracujá no Brasil e no mundo.

TABELA 2. Gêneros e espécies de vírus causadores de doenças em maracujazeiro.

Espécie	Gênero	Referência
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)	<i>Potyvirus</i>	Nascimento <i>et al.</i> , 2006
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	Gioria <i>et al.</i> , 2002
<i>East Asian Passiflora virus</i> (EAPV)	<i>Potyvirus</i>	Chong <i>et al.</i> , 2018
<i>Passion flower little leaf mosaic virus</i> (PLLMV)	<i>Begomovirus</i>	Alves, 2008
<i>Passion fruit green spot virus</i> (PGSV)	<i>Cilevirus</i>	Luizon, 2009
<i>Passion fruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)	<i>Begomovirus</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 2010

Continuação TABELA 2. Gêneros e espécies de vírus causadores de doenças em maracujazeiro.

<i>Passion fruit vein clearing virus</i> (PVCV)	<i>Rhabdovirus</i>	Kitajima & Crestani, 1985
<i>Passion fruit woodiness virus</i> (PWV)	<i>Potyvirus</i>	Wylie & Jones, 2011
<i>Passion fruit yellow mosaic virus</i> (PaYMV)	<i>Tymovirus</i>	Crestani <i>et al.</i> , 1986
<i>Purple granadilla mosaic virus</i> (PGMV)	Não atribuído	Chagas <i>et al.</i> , 1984
<i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV)	<i>Begomovirus</i>	Alves, 2012
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> (SiMAV)	<i>Begomovirus</i>	Mituti <i>et al.</i> , 2019
<i>Sida mottle virus</i> (SiMoV)	<i>Begomovirus</i>	Alves, 2012
<i>Lettuce chlorosis virus</i> (LCV)	<i>Crinivirus</i>	Vidal <i>et al.</i> , 2021

Destas, 12 já foram relatadas no Brasil: CABMV, CMV, PGSV, PVCV, PaYMV, PGMV, PLLMV, PSLDV, SimMV, SiMAV, SiMoV e LCV.

2.2.1 O Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM) foi detectado pela primeira vez em pomares da Austrália no início do século XX (Coob, 1901 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014). A causa da doença foi atribuída ao vírus PWV (Taylor & Greber, 1973 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

No final dos anos 1970, houve a ocorrência da doença pela primeira vez no Brasil, no município de Feira de Santana, na Bahia (Yamashiro & Chagas, 1979 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 1981 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014). A doença se dispersou para outros estados nos anos subsequentes, sendo reportada em Pernambuco em 1983 (Loreto & Vital, 1983 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014), em Sergipe e Ceará em 1986 (Kitajima *et al.*, 1986 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014), em São Paulo (Chagas *et al.*, 1992 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014) e Minas Gerais em 1994 (São José *et al.*, 1994 *apud* Cerqueira-

Silva *et al.*, 2014), em Santa Catarina em 2008 (Colariccio *et al.*, 2008) e recentemente no Rio Grande do Sul em 2017 (Zanini *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Sintomatologia

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro se caracteriza por apresentar sintomas de mosaico severo (Figura 1b, 1c e 1d), rugosidade e distorção nas folhas (Figura 1b e 1d), redução do desenvolvimento das plantas e endurecimento e deformação dos frutos (Figura 1a) (Fisher & Rezende, 2008).

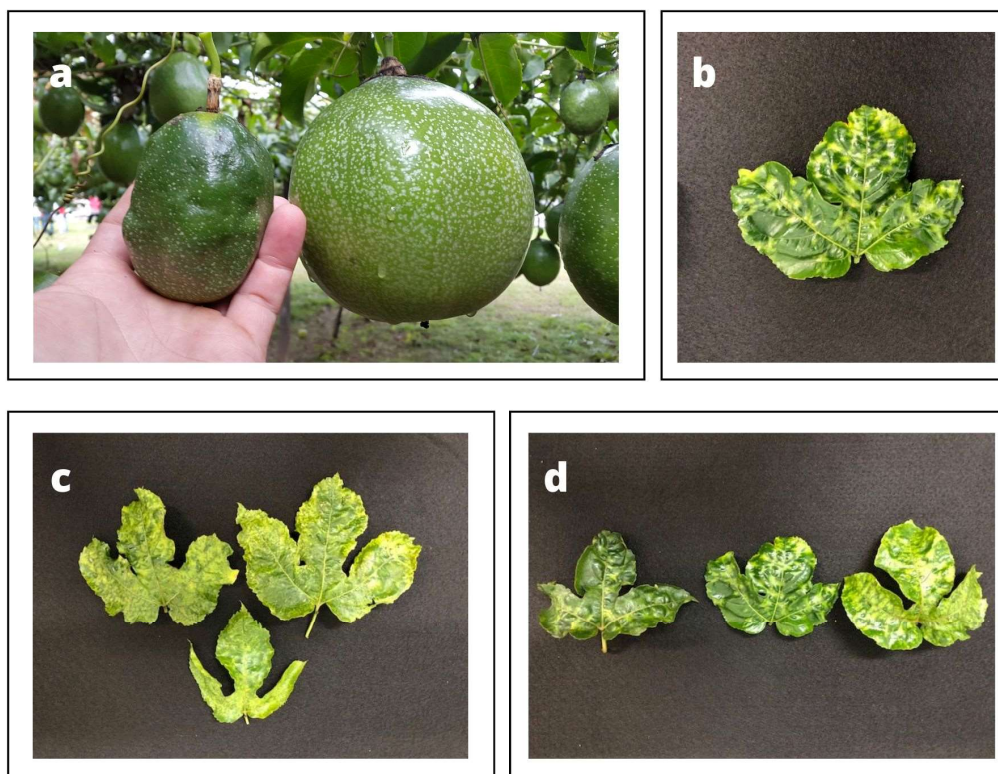


FIGURA 1. Sintomas do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Mosaico em folha (b, c e d), bolhosidades em folha (b e d) e deformação em fruto (a).

2.2.1.2 Agentes causais

Inicialmente, o agente causal no Brasil foi identificado como o vírus PWV, com base na observação dos sintomas, realização de testes moleculares

e determinação da gama de hospedeiros (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014). Porém, a disponibilidade de técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento genético, na década de 1990, viabilizou a correta identificação e reclassificação do agente causal do EFM (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014). Considera-se o vírus CABMV o agente causal da doença no Brasil (Santana *et al.*, 1999 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2006). No entanto, mundialmente, o EFM tem sido associado a outros *Potyvirus* que, embora possuam propriedades biológicas e sorológicas similares às do CABMV, são geneticamente distintos deste (Barros, 2007 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014). São eles, os vírus PWV (Taylor & Greber, 1973 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014), presente na Austrália, EAPV (Iwai *et al.*, 2006 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014), presente nos países asiáticos, e Ugandan passiflora virus (UPV) (Ochwo-Ssemakula *et al.*, 2012 *apud* Cerqueira-Silva *et al.*, 2014), presente em Uganda.

As partículas do CABMV, como de outros *Potyvirus*, são alongadas e flexuosas e medem, em média, 750 nm de comprimento por 15 nm de diâmetro (Silva, 2012) (Figura 2).

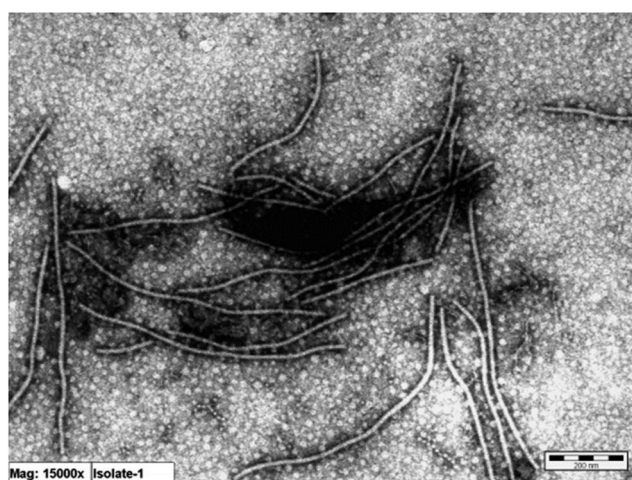


FIGURA 2. Partículas de CABMV vistas em microscópio eletrônico (Damiri *et al.*, 2013).

O genoma viral consiste numa fita simples de RNA de sentido positivo com aproximadamente 10.000 nucleotídeos e duas fases abertas de leitura (ORF): uma principal que codifica uma poliproteína com massa aproximada de 345 kDa e outra menor, denominada PIPO, com cerca de 60 códons (Silva, 2012; Chung *et al.*, 2008). Na Figura 3, se observa a organização do genoma do *Tobacco etch virus* (TEV), membro do gênero *Potyvirus*.

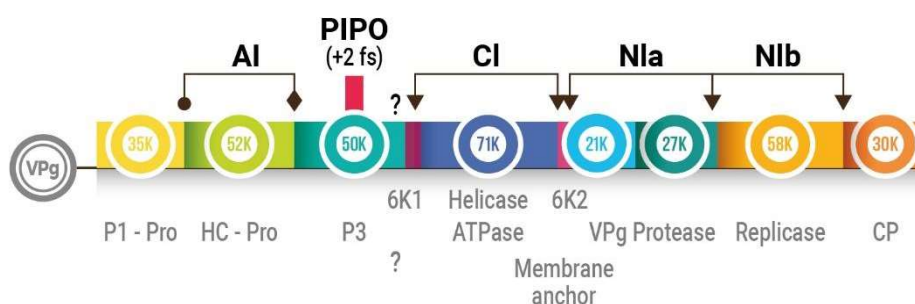


FIGURA 3. Representação esquemática da organização do genoma de membro do gênero *Potyvirus* (adaptado de Adams *et al.*, 2011).

Nascimento *et al.* (2006) realizaram um estudo objetivando caracterizar o vírus CABMV. Foram coletadas amostras em sete estados (BA, ES, MG, PB, PE, SE e SP) e no Distrito Federal. No total, foram obtidos 14 isolados, os quais foram capazes de infectar vários hospedeiros da família Fabaceae. Todos os isolados causaram infecção em caupi, espécie considerada como não hospedeira do vírus PWV. Estes mesmos isolados foram sorologicamente relacionados entre si e ao CABMV. Na comparação entre as sequências nucleotídicas da proteína capsial dos isolados e de outros *Potyvirus* verificou-se identidade de 54 a 70% com isolados de PWV e 85 a 94% com isolados de CABMV. Filogeneticamente, os isolados brasileiros foram agrupados em um cluster monofilético com isolados de CABMV. Isso permitiu a

reclassificação de isolados brasileiros de CABMV previamente descritos como PWV.

Maia *et al.* (2017) desenvolveram um estudo, cujo objetivo foi determinar as relações biológicas entre isolados de CABMV do biótipo C (CABMV-C) obtidos de feijoeiro caupi e isolados de CABMV do biótipo P (CABMV-P) obtidos de maracujazeiro em hospedeiros comuns. Foram testadas 25 espécies de plantas e somente *Canavalia ensiformis* e *Macroptilium lathyroides* foram hospedeiros sistêmicos comuns a todos os isolados. Foi detectada proteção cruzada unilateral entre os isolados CABMV-P Severo e CABMV-C For em *C. ensiformes*, mas o isolado CABMV-P Fraco não protegeu o maracujazeiro contra o isolado CABMV-P Severo. De acordo com os autores, os isolados de CABMV-P não infectam caupi, enquanto os isolados de CABMV-C não infectam maracujá, além de haver diferenças biológicas entre isolados de CABMV-P e CABMV-C.

2.2.1.3 Epidemiologia

O CABMV é transmitido por várias espécies de afídeos de forma não-circulativa e não-persistente, tais como *Myzus nicotianae* (Inoue *et al.*, 1995), *M. persicae*, *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. craccivora*, *Toxoptera citricidus* e *Uroleucon ambrosiae* (Costa *et al.*, 1995 *apud* Garcêz *et al.*, 2015), sendo esta sua principal via de transmissão. A transmissão do tipo não-persistente se caracteriza por apresentar um período de aquisição e inoculação que varia de segundos a minutos e de retenção que varia de minutos a horas (Ng & Perry, 2004; Pirone & Perry, 2002 *apud* Ng & Perry, 2004).

O CABMV pode também ser transmitido mecanicamente através de extrato tamponado (Maia *et al.*, 2017). Considera-se que a seiva possa transmitir o vírus, por ela veiculado, durante operações de poda, mediante o uso de instrumentos cortantes como facas e tesouras, ou mesmo das unhas (Fischer & Rezende, 2008).

A gama de hospedeiros de CABMV é bastante ampla e abrange diversas espécies de interesse econômico, tais como: *Passiflora edulis* e *P. alata* (Maciel *et al.*, 2009), *Vigna unguiculata* (Nascimento *et al.*, 2004), *Arachis hypogaea* (Pio-Ribeiro *et al.*, 2000), *Crotalaria juncea* (Freitas *et al.*, 2002) e *Phaseolus vulgaris* (Nascimento *et al.*, 2004). Há ainda outras espécies de menor relevância econômica, mas que atuam como hospedeiras alternativas do vírus no ambiente, desempenhando papel importante na epidemiologia da doença (Silva *et al.*, 2012).

Em relação às sementes, atualmente considera-se que esta não é uma via de transmissão do vírus CABMV em *Passiflora* spp., conclusão esta baseada em experimentos nos quais as plantas foram avaliadas visualmente e testadas através de ELISA e de inoculação em plantas indicadoras (Narita *et al.*, 2011; Taylor & Greber, 1973 *apud* Narita *et al.*, 2011).

2.2.1.4 Manejo e controle

Não existe um método de controle específico desta doença, logo, recorre-se a uma série de medidas culturais, tais como: renovação anual das plantas (Narita, 2007), uso de mudas saudáveis com pelo menos 80 cm de altura produzidas sob telado anti-afídeos (Rodrigues *et al.*, 2016), cuidados nas operações de poda (Fisher & Rezende, 2008), adoção de vazios sanitários,

eliminação de restos culturais e espécies hospedeiras alternativas do vírus (Cerqueira-Silva et al., 2014; Fisher & Rezende, 2008) e erradicação sistemática de plantas sintomáticas ou positivas para o vírus (Cerqueira-Silva et al., 2014).

Dentre as medidas mencionadas anteriormente, o uso de mudas sadias e a erradicação de plantas infectadas são consideradas como fundamentais para manejar adequadamente a virose. Para isto, entretanto, é necessária a implementação de técnicas de detecção, que sejam sensíveis, específicas e precisas e que permitam analisar grandes quantidades de amostras de forma rápida e a baixo custo.

O uso de inseticidas é ineficiente no controle de vírus transmitidos de maneira não-persistente (Fisher & Rezende, 2008). Alguns trabalhos demonstram que o uso de tais produtos, inclusive, pode incrementar a transmissão ao aumentar a atividade vetorial dos pulgões (Ferrerres & Moreno, 2011). Por outro lado, estão sendo utilizados óleos minerais e vegetais em diversos cultivos para o controle de vírus transmitidos de maneira não-persistente (Vidal *et al.*, 2013; Boquel *et al.*, 2013). Embora o modo exato de ação ainda não esteja elucidado, sabe-se que estes óleos influenciam os processos de aquisição e inoculação do vírus (Vidal *et al.*, 2010).

Há também estudos com indutores de resistência sendo desenvolvidos, como o realizado por Silva *et al.* (2016). De acordo com esses autores, foi obtida redução na severidade e na expressão de sintomas do EFM e aumento de peroxidase e polifenoloxidase, proteínas relacionadas à patogênese (PRs), após aplicação de ácido salicílico (AS).

Nos últimos anos, foram obtidos avanços na identificação de genótipos de maracujazeiro resistentes ao CABMV, inclusive, da espécie

Passiflora edulis (Gonçalves *et al.*, 2017) e de híbridos interespecíficos de *P. edulis* e *P. setacea* (Santos *et al.*, 2015). Há evidência que a espécie *P. suberosa* seja imune ao CABMV (Maciel *et al.*, 2009). Portanto, o uso destes materiais em programas de melhoramento deve resultar em variedades comerciais resistentes ao vírus num futuro próximo.

Outra via possível de se obter resistência ao vírus é a transgenia. Neste sentido, recentemente foram obtidas plantas transgênicas de *P. alata* contendo um fragmento do gene da proteína capsidial (CP) do CABMV. Foram selecionados três clones assintomáticos de três diferentes linhagens transgênicas, onde a replicação do vírus não foi detectada (Correa, 2014). Em outro experimento, com plantas transformadas com o gene Nlb e a região 5' terminal do gene CP do isolado CABMV-MG1, observou-se resistência ao mesmo isolado viral (Alfenas *et al.*, 2005).

2.3 Métodos de diagnóstico e detecção

A detecção é extremamente importante para se estabelecer estratégias de prevenção e controle. Logo, são necessários métodos confiáveis e precisos, capazes de detectar o vírus em material assintomático. Neste contexto, nos últimos anos, aumentaram de forma considerável o número, a precisão e a confiabilidade de técnicas e protocolos disponíveis. Apesar de avanços quanto à rapidez, sensibilidade, especificidade, precisão, capacidade de uso massivo e redução de custos, outras variáveis, tais como, a amostragem, o processamento de amostras e a falta de validação de reagentes e protocolos, mediante cálculo de parâmetros de diagnóstico e testes intra ou inter

laboratórios, ainda são problemas que necessitam de solução (Cambra *et al.*, 2016).

Os métodos de detecção podem ser classificados em biológicos, sorológicos e moleculares, a seguir apresentados.

2.3.1 Métodos biológicos

Os métodos biológicos fundamentam-se no uso de plantas indicadoras e foram os primeiros testes utilizados na diagnose de vírus. Baseiam-se na transmissão mecânica do vírus para hospedeiros herbáceos, ou, ainda, pela utilização de enxertia no caso de indicadoras lenhosas. Estes métodos são altamente sensíveis, porém pouco específicos, e devido a isso seus resultados são de baixa confiabilidade, além de pouco reprodutíveis. Tais testes apresentam longo período até o resultado, tempo necessário para a expressão dos sintomas, e alto custo, devido à mão de obra e infraestrutura necessárias.

Logo, os métodos biológicos são pouco utilizados para a detecção, sobretudo quando se necessita analisar um grande número de plantas de maneira rotineira.

2.3.2 Métodos sorológicos

O “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), adaptado para uso em amostras vegetais, é, atualmente, o teste sorológico padrão mais utilizado em nível mundial para detecção de vírus de plantas. O teste baseia-se numa reação antígeno-anticorpo detectável através de reações enzimáticas.

Há basicamente dois tipos de ELISA: o direto, no qual o antígeno é imobilizado numa fase sólida e detectado diretamente com anticorpo específico;

e o indireto, no qual o anticorpo específico, não marcado, é primeiro ligado ao antígeno immobilizado numa fase sólida, e então detectado indiretamente por um segundo anticorpo marcado, um anti-anticorpo, ou por um conjugado de proteína A (Figura 4). São dois os tipos de anticorpos: policlonais, que reagem com vários epítomos do antígeno; ou monoclonais, que se ligam somente a um epítopo de uma única forma.



FIGURA 4. Elisa indireto convencional (adaptado de Cambra *et al.*, 2016).

O ELISA tem sido utilizado para a detecção do CABMV no Brasil (Garcêz *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016). Contudo, os testes sorológicos apresentam relativa baixa especificidade, quando são usados anticorpos policlonais, e relativa baixa sensibilidade, o que pode comprometer a detecção quando o título viral é baixo na planta.

2.3.3 Métodos moleculares

2.3.3.1 RT-PCR convencional

A RT-PCR convencional (RT-PCR) é uma técnica molecular baseada na multiplicação exponencial de ácidos nucleicos, mediante a síntese prévia de

cDNA a partir do RNA viral. Com esta técnica, são amplificados segmentos do genoma viral para fins de detecção e caracterização. Kilalo-Ngeranwa (2012) utilizou esta técnica para identificar o vírus CABMV em maracujá com sintomas do EFM no Quênia. A RT-PCR embora bastante sensível pode apresentar limitações, tais como aquelas decorrentes da presença de inibidores das reações enzimáticas, o que faz com que seja necessária uma etapa de purificação de ácidos nucleicos, além dos problemas de contaminação, devido ao manuseio pós-PCR para a detecção dos produtos da reação.

2.3.3.2 RT-PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) é uma variante da RT-PCR convencional que tem por base a detecção e a quantificação simultânea da fluorescência emitida por fluoróforos ao longo do processo de amplificação. Os resultados da RT-qPCR são obtidos na fase exponencial da reação, onde a variação é menor e a precisão é maior, enquanto os da RT-PCR convencional são obtidos na fase de platô.

A detecção é realizada paralelamente à amplificação, permitindo o monitoramento da reação em tempo real. A análise é realizada mediante algoritmos que eliminam o ruído de fundo, normalizam os valores e podem, também, calcular a concentração inicial do molde.

Existem basicamente dois tipos de RT-qPCR: os que usam intercalantes de DNA (“SYBR green”, o mais conhecido; intercala no DNA de fita dupla e emite fluorescência) e os que usam sondas de hidrólise (formadas por um par de fluoróforos, o “reporter” e o “quencher”, que quando separados pela reação emitem fluorescência; conhecido como sonda TaqMan) (Figura 5).



FIGURA 5. Princípio de funcionamento da sonda TaqMan (NCBI, 2019).

Além de extremamente sensível, a RT-qPCR pode, no caso da sonda TaqMan, ser altamente específica e capaz de ser utilizada sem a necessidade de purificação de ácidos nucleicos, uma vantagem em relação a algumas técnicas moleculares disponíveis atualmente (Bertolini *et al.*, 2008; Capote *et al.*, 2009). A RT-PCR em tempo real é a técnica “gold standard” para o diagnóstico e a detecção de vários vírus de plantas em protocolos internacionais (Zerbini & Alfenas-Zerbini, 2016; Cambra *et al.*, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan e análise *in silico*

Foram obtidas sequências nucleotídicas de isolados de CABMV a partir da base de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). As sequências foram alinhadas com o uso do software Geneious e analisadas quanto à presença de regiões conservadas (Figura 6). Foi utilizado o software Primer Express (Applied Biosystems) e a sequência do gene da proteína capsidial do isolado brasileiro de maracujazeiro Lns 10 (acesso/versão KF725715.1) para desenhar os iniciadores e a sonda TaqMan.



FIGURA 6. Alinhamento de sequências de CABMV no software Geneious.

Os iniciadores foram testados *in silico* por meio do programa FastPCR (PrimerDigital) em relação a isolados de CABMV, PWV e EAPV. Os números dos acessos/versões das sequências de CABMV, PWV e EAPV de diferentes

hospedeiros disponíveis no GenBank e utilizados na análise foram: KF725715.1 (CABMV), JF833422.1 (CABMV), HQ880242.1 (CABMV), NC_014790.2 (PWV), KX577780.1 (PWV), AB761400.1 (PWV), MH488901.1 (EAPV), MH488899.1 (EAPV) e MH488896.1 (EAPV).

3.2 Análise *in vitro* dos iniciadores e da sonda TaqMan

Extratos vegetais de controles positivos comerciais (Agdia e Bioreba) dos vírus CABMV, *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Plum pox virus* (PPV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Alfafa mosaic virus* (AMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), *Banana bract mosaic virus* (BBMV), *Peanut stunt virus* (PSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV) foram usados para avaliar a especificidade dos iniciadores e da sonda TaqMan para a detecção do CABMV.

Folhas de maracujazeiro-azedo da cultivar SCS 437 Catarina com sintomas típicos da virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foram coletadas em novembro de 2016 por técnicos da EMATER/RS em pomar localizado no município de Três Cachoeiras (lat 29°27'.01.37"; lon 49°55'43.99") e enviadas ao Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia da UFRGS para confirmação da presença do vírus CABMV. Todo o material vegetal coletado foi mantido em bolsas de plástico acondicionadas em geladeira, a aproximadamente, 5 °C, até ser processado.

O coquetel da RT-PCR em tempo real contou com os seguintes reagentes: 2 µl de água, 5 µl de 2x MasterMix (GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR System), 0,2 µl de RT-Mix (GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR System), 0,2 µl do iniciador F a 25 µM, 0,2 µl do iniciador R a 25 µM, 0,3 µl de sonda TaqMan a 5 µM, 0,1 µl de Rox e 2 µl de amostra, totalizando 10 µl por reação. A amplificação foi realizada no termociclador 7300 - Real time PCR System (Thermo Fisher) nas seguintes condições: um ciclo a 45 °C por 15 min (transcrição reversa); um ciclo a 95 °C por 2 min; e 40 ciclos a 95 °C por 15 s (desnaturação) e a 62 °C por 45 s (pareamento e extensão). As curvas de amplificação e os respectivos valores de Ct foram obtidos por meio do software 7500. Cada amostra foi analisada em duplicata.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS e no Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria.

3.3 Comparação de sensibilidade entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real

Para o estudo comparativo das técnicas de detecção do CABMV, foi realizada coleta no pomar de São João do Sul, em maio de 2017. Foram coletadas folhas de plantas de maracujazeiro-azedo da cultivar SCS 437 Catarina naturalmente infectadas com sintomas típicos da doença. As amostras de folhas coletadas também foram utilizadas nas análises de RT-PCR e ELISA como controle positivo e nos testes de especificidade dos iniciadores e sonda TaqMan.

As amostras coletadas foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (código: A486194).

O preparo das amostras foi feito mediante a maceração de 1 g de tecido vegetal de folha, pedúnculo ou semente em bolsas plásticas individuais na presença de tampão de extração [PBS buffer (pH 7,2) + 2% polivinilpirrolidona (PVP) e 0,2% dietil ditiocarbamato de sódio (DIECA)] na proporção 1:10 (p:v). Alíquotas de 1,5 ml foram transferidas para microtubos (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C.

Foram preparadas diluições seriadas decimais 1:10 a 1:10⁵ (v:v) em água estéril e em extrato de folhas sadias. A purificação de RNA dos extratos e as subseqüentes diluições foram realizadas com o kit SV Total RNA Isolation System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Todas as etapas de preparo das amostras foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Para a realização do PTA-ELISA foi utilizado anticorpo policlonal anti-CABMV cedido pelo Professor Jorge Rezende da ESALQ/USP. Uma etapa prévia de adsorção de antissoro foi executada, durante na qual, foi adicionado 1 µl de antissoro em 1 ml de extrato de folhas sadias diluído na proporção 1:10 (p:v), obtendo uma diluição final de 1:1.000 (v:v). O antissoro diluído foi submetido a incubação por 1 h a 37 °C, centrifugação por 2 min a 5.000 rpm e recuperação do sobrenadante. Esta etapa tem por objetivo diminuir a reação cruzada com o extrato da planta.

Foram executadas as seguintes etapas do protocolo PTA-ELISA (Clark & Adams; 1977): adição de 100 µl do antígeno (extrato vegetal) ao suporte sólido, incubação a 4 °C durante 12 h, três lavagens sucessivas com tampão de lavagem (PBS + tween 20 a 1%), adição de 100 µl do antissoro previamente adsorvido, incubação por 3 h a 37 °C, três lavagens sucessivas com tampão de lavagem, adição do conjugado Anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich) ligado à enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:30.000 (v:v), incubação por 2 h a 37 °C, três lavagens sucessivas com tampão de lavagem e adição de 100 µl de substrato p-nitrofenol fosfato (PNP) substrate tablets (Agdia). A leitura da absorbância (A) foi realizada em 405 nm, 1 e 2 h após a adição do substrato em leitor de microplacas.

As análises, em duplicata, foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

3.4 Concordância entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto

Para o estudo comparativo das técnicas de detecção do CABMV, foi realizada coleta em pomar localizado em Santa Rosa do Sul (lat 29°6'.47.48"; lon 49°45'1.26"), SC, com área de 0,7 hectares em novembro de 2018. Foi coletada uma folha de cada planta, de um total de 100 plantas de maracujazeiro-azedo da cultivar SCS 437 Catarina escolhidas de forma aleatória, sujeitas a infecção natural. As amostras foram processadas conforme descrito no item 3.2. A RT-PCR em tempo real e o PTA-ELISA foram realizados nas mesmas condições descritas nos itens 3.2 e 3.3.

Para a comparação das técnicas PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real foi calculado o índice Kappa de Cohen, dividindo-se a subtração entre coincidência observada e coincidência esperada por um menos coincidência esperada, onde a coincidência observada é $a+d/N$ e a coincidência esperada $[(a+b) \times (a+c) + (c+d) \times (b+d)] / N \times N$. N é igual a $a+b+c+d$ (Tabela 4).

QUADRO 1. Quadro de contingência 2x2 para avaliação do índice Kappa de Cohen.

		RT-PCR em tempo real		
		Positivo	Negativo	
PTA-ELISA	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	c+d
		a+c	b+d	N

3.5 Incidência de CABMV em pomares de maracujazeiro em SC e RS

Para o monitoramento da incidência do vírus CABMV, foram selecionados três pomares de maracujazeiro-azedo localizados nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS). Os dois pomares localizados em SC pertencem aos municípios de Araquari, no nordeste do estado (lat 26°23'43.98"; lon 48°44'2.88"), e de São João do Sul, no sudeste do estado (lat 29°10'16.03"; lon 49°48'52.24"), com áreas plantadas de 1,0 e 0,7 hectares, respectivamente. O pomar localizado no RS pertence ao município de Torres, nordeste do estado (lat 29°17'05.13"; lon 49°51'56.28") e tem área plantada de 2,5 hectares.

Em cada pomar, foram identificadas ao acaso 50 plantas de maracujazeiro-azedo da cultivar SCS 437 Catarina. Destas plantas, foram

coletadas folhas, de acordo com o tempo contado a partir do plantio (Tabela 3). O número de folhas coletadas variou também em função da estrutura das plantas, sendo assim, plantas em haste única tiveram apenas uma folha coletada, enquanto plantas com ramificações primárias tiveram mais folhas coletadas de forma proporcional. A frequência das coletas foi mensal e ocorreram entre setembro de 2017 e abril de 2018. Após dezembro, foram realizadas amostragens em janeiro, em São João do Sul, e em abril, em Araquari e Torres, totalizando cinco amostragens em cada área.

TABELA 3. Amostragens de folha de maracujazeiro de acordo com o tempo contado a partir do plantio e estrutura da planta.

Coleta	Tempo (dias)	Ramos primários	Amostragem (f./pl.) ¹
1 ^a	0 a 30	0	1
2 ^a	30 a 60	1 a 2	1 a 2
3 ^a	60 a 90	2 a 3	2 a 3
4 ^a em diante	Acima de 90	Acima de 3	4

¹ Folhas por planta.

A diluição 1:10³ (v:v) em água estéril foi usada para determinar a incidência do vírus CABMV por RT-PCR em tempo real, conforme descrito no item 3.2. As análises das amostras usadas na determinação da incidência foram realizadas de maneira composta, de 10 em 10 plantas, e somente quando o resultado foi positivo, foram analisadas individualmente.

3.6 Caracterização molecular dos isolados estudados

Para a realização da RT-PCR convencional foram usados como reagentes 5 µl de água, 12,5 µl de 2x MasterMix (GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR System), 0,5 µl de RT-Mix (GoTaq® Probe 1-step RT-qPCR System), 1 µl

do iniciador JF1 (5'- TAGTTCTTCAGGACAACACTAGTTCCACG -3') a 25 µM, 1 µl do iniciador JR1 (5'- AAGCCTTTACTGCCCATGCGTCAT -3') a 25 µM, e 5 µl de RNA purificado, totalizando 25 µl por reação. As sequências dos iniciadores foram publicadas por Kilalo-Ngeranwa (2012).

A reação foi realizada no termociclador C-1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad) nas seguintes condições: um ciclo a 45 °C por 30 min (transcrição reversa), um ciclo a 95 °C por 3 min (desativação da transcriptase reversa e ativação da Hot Start DNA Polymerase), 40 ciclos a 95 °C por 30 s (desnaturação), a 55 °C por 30 s (pareamento) e a 60 °C por 1 min (extensão) e uma extensão final a 60 °C por 10 min. Os amplicons gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (130 V por 1h) e visualizados sob luz UV. Os amplicons foram submetidos à purificação por meio do GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) e submetidos ao sequenciamento.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Virologia Vegetal e de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS e no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

O método de sequenciamento utilizado foi o Sanger. Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do software Geneious. As sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas a uma comparação "Blast", utilizando o programa Megablast, para verificar a identidade entre os isolados virais. Foi gerada uma árvore filogenética com os isolados da tabela 4, utilizando-se o método da máxima verossimilhança e o modelo de substituição Jones-Taylor-Thornton (JTT), com o auxílio do software Mega. O sequenciamento foi realizado no Laboratório ACTgene Análises Moleculares.

TABELA 4. Sequências utilizadas na construção da árvore filogenética.

Acesso/Versão	Organismo	Estirpe/Isolado	Hospedeiro
1. KC777404.1	CABMV	Alvinlandia-SP	Maracujá
2. KC777403.1	CABMV	Fernao-SP	Maracujá
3. KC777401.1	CABMV	Adamatina-SP	Maracujá
4. AY433950.1	CABMV	CABMV-SP	Maracujá
5. KC777402.1	CABMV	Jacupiranga-SP	Maracujá
6. AY253911.1	CABMV	SE1	Maracujá
7. KC777405.1	CABMV	GARCA-SP	Maracujá
8. AY434454.1	CABMV	CABMV-M3	Maracujá
9. AY505342.1	CABMV	F-144	Maracujá
10. AY433951.1	CABMV	F-101	Maracujá
11. AY433952.1	CABMV	CABMV-M2	Maracujá
12. JF427623.1	PWV	BuW-1	Maracujá
13. MG650164.1	EAPV	AO	Maracujá
14. CABMV-sjs01	CABMV	SJS01	Maracujá
15. CABMV-sjs02	CABMV	SJS02	Maracujá
16. CABMV-sjs03	CABMV	SJS03	Maracujá
17. CABMV-tor01	CABMV	TOR01	Maracujá
18. CABMV-tor02	CABMV	TOR02	Maracujá
19. CABMV-tor03	CABMV	TOR03	Maracujá
20. M76485.1_CTV	CTV	T36	Citros

3.7 Transmissão do vírus por semente

Para o teste de transmissão do CABMV por sementes, foram coletados oito frutos sintomáticos em São João do Sul, em abril de 2018. Três frutos sem sintomas foram coletados em pomar sem a presença do vírus e utilizados para obtenção de sementes livres do vírus.

As sementes foram retiradas de frutos sintomáticos e assintomáticos, lavadas em água corrente até eliminar toda a mucilagem (arilo) e secadas ao ar

(temperatura ambiente). Após a secagem, as sementes foram armazenadas em tubos tipo Falcon, à temperatura ambiente até a semeadura. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas de 128 células contendo substrato para plantas (Carolina Soil). As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento por 30 dias sob condições 12 h de luz de e 25 °C. Toda a plântula originada a partir das sementes foi coletada e agrupada em amostras compostas de 10 plântulas para preparação do extrato em tampão PBS. Alíquotas de 1,5 ml foram transferidas para microtubos (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C para posterior análise por RT-PCR em tempo real.

4 RESULTADOS

4.1 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan e análise *in silico*

A partir do alinhamento realizado entre as sequências nucleotídicas de CABMV foi possível determinar uma região conservada que possibilitou o desenho dos oligonucleotídeos desejados. A escolha do par de iniciadores e da sonda TaqMan foi baseada em critérios descritos em bibliografia (Thornton & Basu, 2011), e dos parâmetros estabelecidos no programa Primer Express (Tabela 5). O produto da amplificação é de 75 pares de bases (pb).

TABELA 5. Características dos iniciadores e da sonda TaqMan desenhados.

Oligo ¹	Sequência 5'-3'	Tm	%GC	Início ²	nt
Primer-F	GATGATGACAAGATGGGTGTTATCA	59	40	382	25
Primer-R	CACATCGGGTGAAGTTCCATT	58	48	456	21
Probe	AACGGGTTTCATGGTTTGGTGCATTG	68	48	409	25

¹Oligonucleotídeo;

²Início 5' em relação ao acesso/versão KF725715.1.

A PCR *in silico* demonstrou a especificidade dos iniciadores em relação ao vírus CABMV. O produto da PCR foi predito apenas para as sequências de isolados de CABMV, independentemente do hospedeiro do qual o vírus foi isolado (Tabela 6).

TABELA 6. Predição do produto da PCR *in silico* com os iniciadores desenhados.

Acesso/Versão	Organismo	Estirpe/Isolado	Hospedeiro	Amplicon (pb)
KF725715.1	CABMV	Lns10	Maracujá	75
JF833422.1	CABMV	SLMCP2	Feijão-caupi	75
HQ880242.1	CABMV	BR1	Amendoim	75
MH488901.1	EAPV	EAPV-AO/DC1	Maracujá	0
MH488899.1	EAPV	EAPV-AO/LS18	Maracujá	0
MH488896.1	EAPV	EAPV-AO/DC38	Maracujá	0
NC_014790.2	PWV	PWV-MU2	Maracujá	0
KX577780.1	PWV	SW8	Maracujá	0
AB761400.1	PWV	Gld-1	Maracujá	0

4.2 Análise *in vitro* dos iniciadores e da sonda TaqMan

A análise *in vitro* evidenciou a especificidade dos iniciadores e da sonda TaqMan em relação ao CABMV, indo ao encontro dos resultados obtidos *in silico*. O teste com 19 espécies de vírus (AMV, ACLSV, ApMV, ASPV, BBMV, CABMV, CPSMV, CMV, LMV, PSV, PPV, PVX, PVY, PDV, TMV, TRSV, TSV, ToRSV e TSWV), incluindo membros do gênero *Potyvirus*, resultou unicamente na detecção do CABMV.

4.3 Comparação entre os métodos direto e convencional de preparação de amostras nas análises de RT-PCR em tempo real

Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real foram obtidas tanto utilizando como amostra o RNA total purificado, (método convencional) como extrato vegetal diluído (diluição) (Figura 7). As curvas obtidas pelo método convencional apresentaram um traçado típico, com fase exponencial bem definida (Figura 7a). Já as curvas obtidas pelo método direto apresentam ligeiras

alterações na pendente e na fase exponencial (Figura 7b). Extratos vegetais sadios e RNA total purificado, a partir desses, não apresentaram curvas de amplificação. A linha base, que separa amostras positivas e negativas, foi estabelecida na fase exponencial das curvas sobre o ruído de fundo.

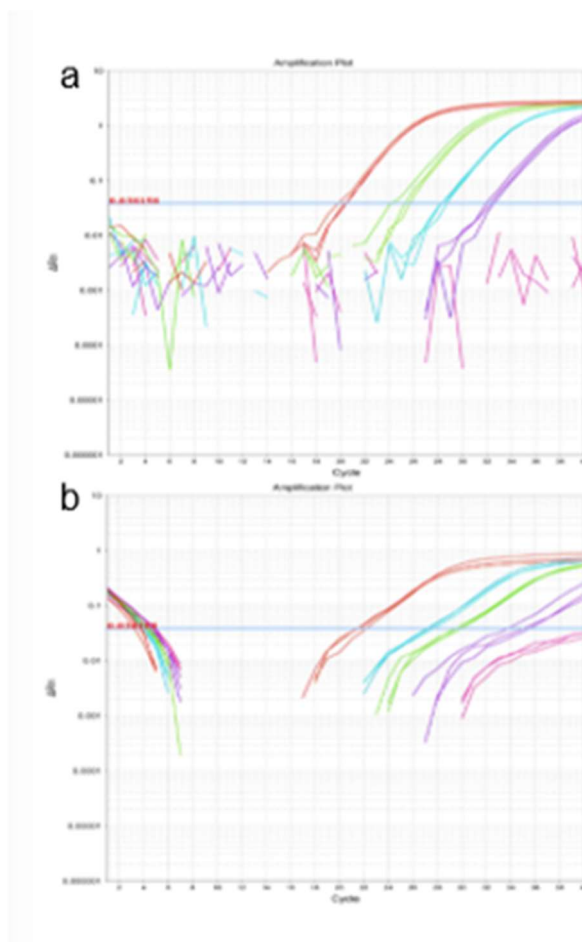


FIGURA 7. Amplificação por RT-PCR em tempo real. Curvas obtidas pelo método convencional (a) e direto (b). Vermelho: diluição 10^{-1} . Verde: diluição 10^{-2} . Azul: diluição 10^{-3} . Roxo: diluição 10^{-4} . Rosa: diluição 10^{-5} .

Na comparação de sensibilidade da RT-PCR em tempo real na detecção do CABMV, usando os métodos direto e convencional de preparação de amostras se observou que, de modo geral, ambos os métodos possibilitaram a detecção do CABMV até a diluição seriada 10^{-4} de um extrato positivo (Tabela 6). Os valores de Ct variaram de 23,62 a 37,12, quando se usou o método direto e de 21,33 a 33,36, quando usado o método convencional. Para as mesmas

diluições, os valores de Ct foram ligeiramente mais altos (menor sensibilidade) no método direto. As diluições (método direto) apresentaram valores de Ct mais altos que a extração de RNA, exceto na diluição 10^{-3} . O valor de Ct foi maior nas amostras mais diluídas, exceto na diluição 10^{-3} do método direto, que teve valor de Ct inferior ao da diluição 10^{-2} . Todas as amostras positivas por extração de RNA total foram também positivas por diluição (método direto).

4.4 Comparação de sensibilidade entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real

Na comparação de sensibilidade entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real, foram realizadas, no teste sorológico, leituras de 1h e 2h e para RT-PCR em tempo real os métodos direto de preparação de amostras e extração de RNA total do teste molecular (método convencional). No teste ELISA, para que uma amostra/diluição fosse considerada positiva, o valor da OD_{405} nm deveria ser 2 vezes o valor da OD_{405} nm do controle negativo. O tempo de leitura do teste PTA-ELISA de 1 h demonstrou ser suficiente para a detecção do vírus e foi o tempo estabelecido para todas as demais leituras realizadas. Para ambos os tempos de leitura, até a diluição 10^{-2} foi considerada positiva, assim esta diluição (10^{-2}) foi estabelecida como o limite de detecção do PTA-ELISA (Tabela 7). Quando analisadas por RT-PCR em tempo real, as amostras apresentaram valores de Ct variando de 23,62 a 37,12 quando foi utilizado o extrato diluído, e de 21,33 a 33,36 quando foi utilizado o RNA total purificado. Em ambos os casos, o limite de detecção foi a diluição 10^{-4} , porém o valor de Ct usando extrato diluído (37,12) foi maior que o da extração de RNA total (33,36) (Tabela 7). A diluição 10^{-5} não apresentou amplificação com nenhum dos métodos de preparação de

amostras. Os controles negativos não apresentaram amplificação em nenhuma das repetições realizadas.

TABELA 7. Comparação de sensibilidade, tempo de leitura e métodos de preparação de amostras entre as técnicas PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real, na detecção do CABMV em diluições seriadas de extrato vegetal positivo.

Diluição	PTA-ELISA (OD ₄₀₅)		RT-PCR em tempo real (Ct)	
	1h	2h	Método direto	Extração de RNA total
10 ⁻¹	0,815	1,740	23,62	21,33
10 ⁻²	0,540	1,100	31,87	26,12
10 ⁻³	0,292	0,394	29,43	29,56
10 ⁻⁴	0,241	0,248	37,12	33,36
10 ⁻⁵	-	-	Indet ¹	Indet
Controle	0,213	0,254	Indet	Indet

¹ indeterminado (ausência de curva de amplificação).

4.5 Concordância entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto

A comparação entre a técnica PTA-ELISA e a técnica RT-PCR em tempo real pelo método direto na detecção do CABMV em 100 amostras, naturalmente infectadas, mostrou concordância de resultados em 94 amostras (Quadro 2). Doze amostras foram positivas e 82 foram negativas por ambas as técnicas. A RT-PCR em tempo real foi capaz de detectar a presença do CABMV em seis amostras que deram resultado negativo pela técnica PTA-ELISA. Não houve nenhuma amostra com resultado negativo por RT-PCR em tempo real e positiva por PTA-ELISA. Com estes dados, o índice Kappa calculado foi de 0,7664, demonstrando uma alta concordância entre as técnicas de detecção.

QUADRO 2. Comparação de resultados entre PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real pelo método direto na detecção do CABMV em 100 amostras de maracujazeiro-azedo.

		RT-PCR em tempo real		
		Positivo	Negativo	
PTA-ELISA	Positivo	12	0	12
	Negativo	6	82	88
		18	82	100

Os valores de OD₄₀₅ e os valores correspondentes ao Ct são mostrados no Quadro 3. Os valores de Ct das amostras positivas por RT-PCR em tempo real ficaram entre 25 e 35, e os valores de OD₄₀₅ das amostras positivas por PTA-ELISA ficaram entre 1,501 e 3,0. A maioria das amostras com alta OD₄₀₅ apresentou os menores valores de Ct e vice-versa. Das seis amostras positivas unicamente por RT-PCR em tempo real, quatro apresentaram valores de Ct entre 32 e 35 e duas entre 29 e 31.

QUADRO 3. Comparação dos valores de OD₄₀₅ e ciclos de amplificação (Ct) na análise de 100 amostras para detecção do CABMV por PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real.

OD PTA-ELISA	Número de plantas			
1,501-3,0	6 ^a	5 ^a	1 ^a	
0,751-1,5		2 ^b	3 ^b	36 ^a
0-0,75			1 ^b	46 ^a
Ct RT-PCR em tempo real	25-28	29-31	32-35	>36

^a Resultados coincidentes (94%);

^b Positivo apenas por RT-PCR em tempo real usando diluição como método de preparo de amostras (6%).

4.6 Incidência de CABMV em pomares de maracujazeiro em SC e RS

O monitoramento da incidência do CABMV em plantas de maracujazeiro-azedo revelou diferenças na incidência do vírus entre os pomares estudados. No pomar localizado em São João do Sul (SC), a incidência variou de 6 % a 100 % entre setembro e janeiro (Figura 8). Neste pomar, logo no primeiro mês de plantio, foram detectadas três plantas com a presença do vírus. A infecção viral alcançou 100 % das plantas analisadas em menos de cinco meses.

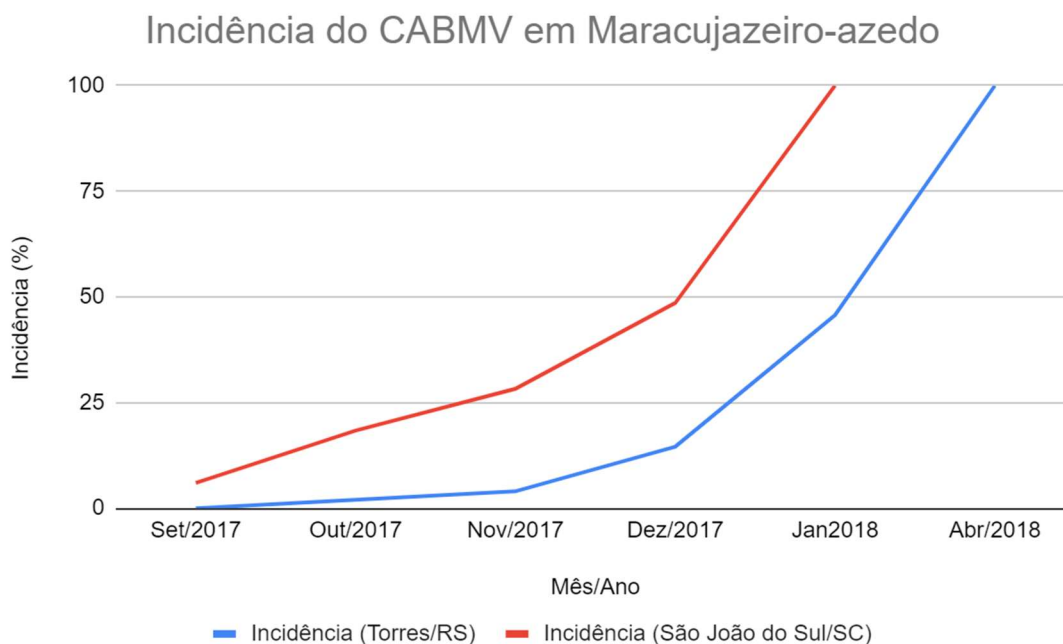


FIGURA 8. Evolução da incidência do CABMV em plantas de maracujazeiro-azedo em pomares localizados nos municípios de Torres, RS e São João do Sul, SC.

No pomar localizado em Torres (RS), a incidência variou de 0 % a 14 % entre setembro e dezembro e alcançou 100 % de incidência em abril (Figura 8).

Não foram avaliadas as plantas que morreram nem as que foram erradicadas durante a realização do levantamento. No pomar localizado no município de Araquari, norte do estado de Santa Catarina, não se detectou a presença do CABMV durante os 8 meses de monitoramento das plantas.

4.7 Caracterização molecular dos isolados estudados

Para a caracterização molecular dos isolados de CABMV detectados no Rio Grande do Sul e no sul de Santa Catarina, amostras positivas por RT-PCR em tempo real foram submetidas à RT-PCR convencional usando iniciadores específicos para a amplificação parcial do gene da proteína capsidial do CABMV. Estes iniciadores amplificaram fragmentos de aproximadamente 700 pb (Figura 9).

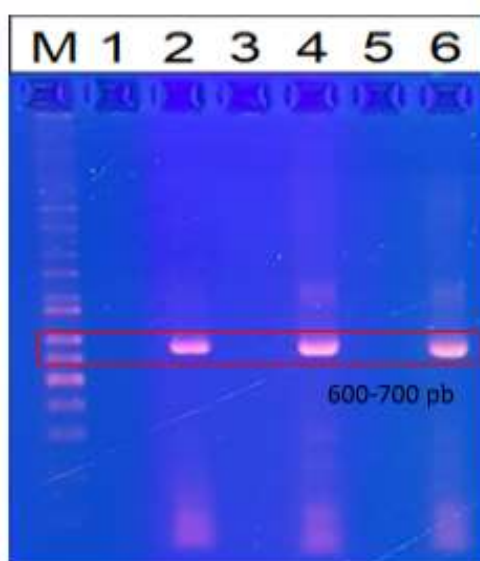


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose sob luz UV. Amplificação de 700 pb em amostras de CABMV positivas por RT-PCR em tempo real. M: Marcador de peso molecular (1.000 pb). Colunas 1, 3 e 5: Controles negativos. Coluna 2: Isolado CABMV-tor01. Coluna 4: Isolado CABMV-sjs01. Coluna 6: Isolado CABMV-sjs02.

As sequências resultantes do sequenciamento dos amplicons obtidos por RT-PCR convencional foram submetidas a um alinhamento múltiplo. A sequência consenso possui 539 nucleotídeos com 536 (99,4%) de identidade.

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
GTA CTTCTCA A TTTGGATCA CTTGATAGA ATATAAGCCAGCGCAAATTGA
TCTATACAACACCAGAGCTTCAAAGACACAGCTCAGCAAATGGTTTGAAG
CCATTAAAGAAGAGTACGAGCTGGACGAAGACAAGATGGGTGTTATCATG
AATGGGTTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGA ACTTCACCTGATGTGAA
TGGAGTGTGGACAATGATGGATGGGGACGAGCAAGTGG AATTTCCGCTCA
AGCCCATCGTGGAAAACGCAAACCCACACTTAGACAAATTATGCACCAC
TTCTCAGACGCAGCCGAAGCGTATATTGAGATGAGAAATTCTGAAGGGTT
CTACATGCCTAGGTACGGACTGCTGAGGAATTTAAGAGACAAGAGCTTAG
CAAGGTATGCTTTTCGATTTCTATGAAGTCACGTCTAAGACTTCTGATAGA
GCAAGGGAAGCAATAGCGCAAATGAAGGCTGCAGCTCTCGCCAACGTTAA
CACCAGGATGTTTGGCCTGGATGGGAATGTGGCAACAAC

```

FIGURA 10. Sequência consenso do gene da proteína capsidial das amostras de CABMV procedentes de plantas de maracujazeiro-azedo de RS e SC.

Com base em suas sequências de aminoácidos, os isolados CABMV-sjs01, CABMV-sjs02, CABMV-sjs03, CABMV-tor01, CABMV-tor02 e CABMV-tor03 foram agrupados em um cluster, o qual também inclui isolados de CABMV de diferentes regiões geográficas, do isolado PWV BuW-1 da Austrália e da estirpe EAPV AO da China (Figura 11).

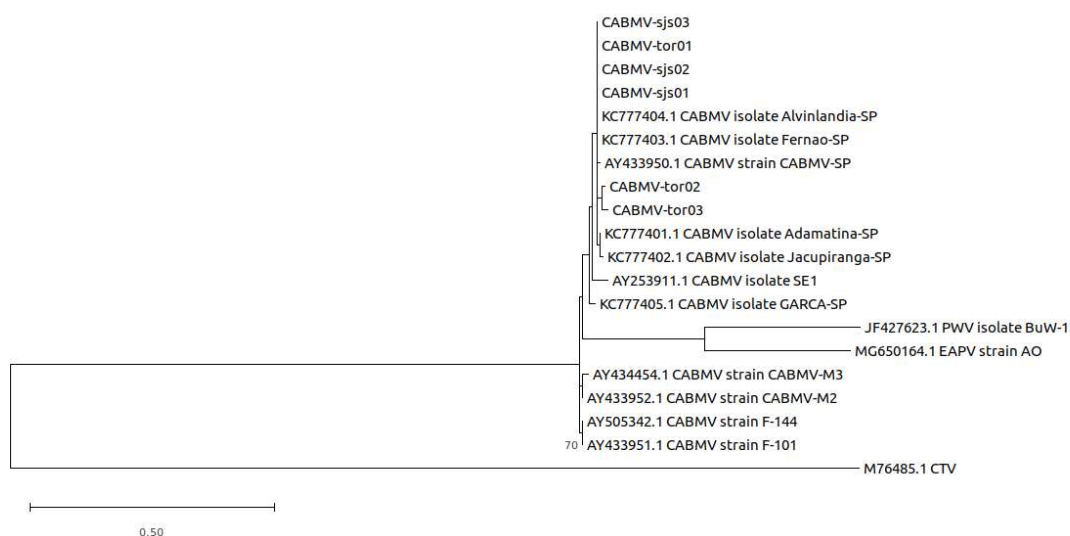


FIGURA 11. Análise evolutiva de sequências de CABMV, PWV e EAPV pelo método da Máxima Verossimilhança.

Os isolados CABMV-sjs01, CABMV-sjs02, CABMV-sjs03, CABMV-tor01, CABMV-tor02 e CABMV-tor03 apresentaram menor distância em relação aos isolados Alvinlandia-SP e Fernao-SP (Tabela 8).

TABELA 8. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências.

Acesso/Versão, Organismo e Estirpe/Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. KC777404.1_CABMV_isolate_Alvinlandia-SP		0,0000	0,0064	0,0063	0,0087	0,0148	0,0109	0,0148	0,0122	0,0122
2. KC777403.1_CABMV_isolate_Fernao-SP	0,0000		0,0064	0,0063	0,0087	0,0148	0,0109	0,0148	0,0122	0,0122
3. KC777401.1_CABMV_isolate_Adamatina-SP	0,0065	0,0065		0,0090	0,0061	0,0165	0,0107	0,0152	0,0136	0,0136
4. AY433950.1_CABMV_strain_CABMV-SP	0,0065	0,0065	0,0130		0,0109	0,0163	0,0132	0,0165	0,0142	0,0142
5. KC777402.1_CABMV_isolate_Jacupiranga-SP	0,0131	0,0131	0,0065	0,0197		0,0180	0,0121	0,0139	0,0124	0,0124
6. AY253911.1_CABMV_isolate_SE1	0,0334	0,0334	0,0404	0,0403	0,0475		0,0193	0,0223	0,0204	0,0204
7. KC777405.1_CABMV_isolate_GARCA-SP	0,0197	0,0197	0,0195	0,0264	0,0262	0,0545		0,0160	0,0147	0,0147
8. AY434454.1_CABMV_strain_CABMV-M3	0,0331	0,0331	0,0335	0,0400	0,0267	0,0689	0,0337		0,0116	0,0116
9. AY505342.1_CABMV_strain_F-144	0,0263	0,0263	0,0330	0,0330	0,0263	0,0614	0,0332	0,0197		0,0000
10. AY433951.1_CABMV_strain_F-101	0,0263	0,0263	0,0330	0,0330	0,0263	0,0614	0,0332	0,0197	0,0000	
11. AY433952.1_CABMV_strain_CABMV-M2	0,0330	0,0330	0,0399	0,0398	0,0331	0,0686	0,0400	0,0131	0,0065	0,0065
12. JF427623.1_PWV_isolate_BuW-1	0,7628	0,7628	0,7563	0,7465	0,7412	0,8419	0,7423	0,7716	0,7335	0,7335
13. MG650164.1_EAPV_strain_AO	0,7219	0,7219	0,7382	0,7387	0,7231	0,7679	0,7704	0,7637	0,7132	0,7132
14. CABMV-sjs01	0,0000	0,0000	0,0065	0,0065	0,0131	0,0334	0,0197	0,0331	0,0263	0,0263
15. CABMV-sjs02	0,0000	0,0000	0,0065	0,0065	0,0131	0,0334	0,0197	0,0331	0,0263	0,0263
16. CABMV-sjs03	0,0000	0,0000	0,0065	0,0065	0,0131	0,0334	0,0197	0,0331	0,0263	0,0263
17. CABMV-tor01	0,0000	0,0000	0,0065	0,0065	0,0131	0,0334	0,0197	0,0331	0,0263	0,0263
18. CABMV-tor02	0,0065	0,0065	0,0131	0,0131	0,0198	0,0405	0,0265	0,0401	0,0331	0,0331
19. CABMV-tor03	0,0130	0,0130	0,0197	0,0196	0,0264	0,0474	0,0332	0,0470	0,0399	0,0399
20. M76485.1_CTV	5,1902	5,1902	5,0428	5,2609	5,2378	5,9067	5,0840	5,3838	5,2693	5,2693

continuação TABELA 8. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências.

Acesso/Versão, Organismo e Estirpe/Isolado	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. KC777404.1_CABMV_isolate_Alvinlandia-SP	0,0144	0,1137	0,1168	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0063	0,0087	1,2441
2. KC777403.1_CABMV_isolate_Fernao-SP	0,0144	0,1137	0,1168	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0063	0,0087	1,2441
3. KC777401.1_CABMV_isolate_Adamatina-SP	0,0159	0,1122	0,1188	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064	0,0090	0,0110	1,1912
4. AY433950.1_CABMV_strain_CABMV-SP	0,0162	0,1117	0,1177	0,0063	0,0063	0,0063	0,0063	0,0089	0,0107	1,2686
5. KC777402.1_CABMV_isolate_Jacupiranga-SP	0,0147	0,1109	0,1173	0,0087	0,0087	0,0087	0,0087	0,0109	0,0125	1,2650
6. AY253911.1_CABMV_isolate_SE1	0,0220	0,1281	0,1241	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0166	0,0182	1,5383
7. KC777405.1_CABMV_isolate_GARCA-SP	0,0169	0,1124	0,1218	0,0109	0,0109	0,0109	0,0109	0,0127	0,0142	1,1925
8. AY434454.1_CABMV_strain_CABMV-M3	0,0088	0,1182	0,1243	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0165	0,0173	1,3123
9. AY505342.1_CABMV_strain_F-144	0,0066	0,1121	0,1167	0,0122	0,0122	0,0122	0,0122	0,0142	0,0146	1,2638
10. AY433951.1_CABMV_strain_F-101	0,0066	0,1121	0,1167	0,0122	0,0122	0,0122	0,0122	0,0142	0,0146	1,2638
11. AY433952.1_CABMV_strain_CABMV-M2		0,1149	0,1195	0,0144	0,0144	0,0144	0,0144	0,0163	0,0168	1,2859
12. JF427623.1_PWV_isolate_BuW-1	0,7503		0,1280	0,1137	0,1137	0,1137	0,1137	0,1107	0,1139	1,5795
13. MG650164.1_EAPV_strain_AO	0,7299	0,8178		0,1168	0,1168	0,1168	0,1168	0,1123	0,1201	1,6682
14. CABMV-sjs01	0,0330	0,7628	0,7219		0,0000	0,0000	0,0000	0,0063	0,0087	1,2441
15. CABMV-sjs02	0,0330	0,7628	0,7219	0,0000		0,0000	0,0000	0,0063	0,0087	1,2441
16. CABMV-sjs03	0,0330	0,7628	0,7219	0,0000	0,0000		0,0000	0,0063	0,0087	1,2441
17. CABMV-tor01	0,0330	0,7628	0,7219	0,0000	0,0000	0,0000		0,0063	0,0087	1,2441
18. CABMV-tor02	0,0400	0,7451	0,7048	0,0065	0,0065	0,0065	0,0065		0,0108	1,2388
19. CABMV-tor03	0,0468	0,7729	0,7440	0,0130	0,0130	0,0130	0,0130	0,0197		1,2633
20. M76485.1_CTV	5,3247	5,9050	6,0956	5,1902	5,1902	5,1902	5,1902	5,1835	5,2316	

¹ Número de substituições de base por sítio entre sequências (abaixo da diagonal).

² Erro padrão obtido por procedimento de bootstrap com 1000 réplicas (acima da diagonal);

4.8 Transmissão do vírus por semente

Todos os frutos de maracujá com sintomas de EFM coletados em pomar comercial para realizar o teste de transmissão do vírus por sementes, foram testados por RT-PCR em tempo real e foram positivos para o CABMV. Os valores de Ct variaram de 22,94 a 31,36 (Figura 12 e Tabela 9). Os frutos assintomáticos foram negativos para o CABMV. Apenas as sementes dos frutos 6, 8, 9 e 11 foram positivas para o CABMV, e os valores de Ct variaram de 30,28 a 37,02 (Tabela 9).

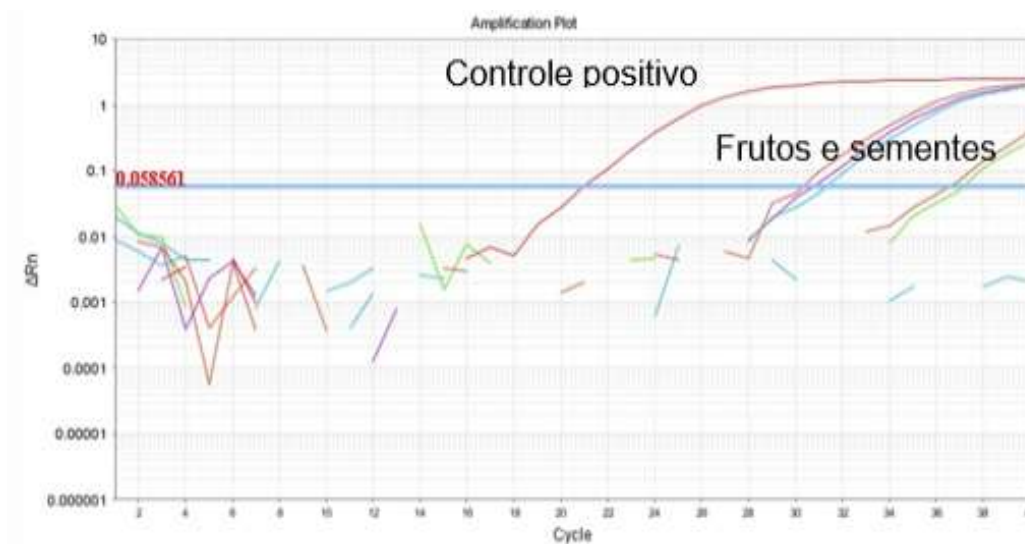


FIGURA 12. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV em frutos e sementes de maracujá.

As sementes dos diferentes frutos apresentaram percentuais de germinação, que variaram de 8% a 98%. Os frutos 7 e 10 foram os que apresentaram os menores índices de germinação, 55% e 8% respectivamente (Tabela 9).

TABELA 9. Resultados das análises de frutos, sementes e plântulas utilizados no ensaio de transmissão do CABMV por sementes de maracujazeiro.

Frutos	Sintomas	RT-PCR (Ct/fruto)	RT-PCR (Ct/semente)	% germinação	Plântulas positivas por RT-PCR
1	-	Indet. ¹	Indet.	93	0
2	-	Indet.	Indet.	NT ²	0
3	-	Indet.	Indet.	NT	0
4	+	29,21	Indet.	96	0
5	+	31,36	Indet.	98	0
6	+	29,81	35,77	95	0
7	+	24,46	Indet.	55	0
8	+	23,06	32,56	97	0
9	+	28,75	30,28	98	0
10	+	28,56	Indet.	8	0
11	+	22,94	37,02	98	0

¹ Indeterminado (curva de amplificação ausente);

² Não testado.

No total, germinaram 822 plântulas das 1.024 sementes procedentes dos oito frutos com sintomas. As 822 plântulas foram coletadas e analisadas em grupos de dez, totalizando 82 amostras compostas, que foram analisadas por RT-PCR em tempo real pelo método direto de preparação de amostras. Nenhuma das amostras compostas apresentou amplificação para o CABMV (Tabela 9). Estes resultados refletem ausência de evidência da transmissão do CABMV por sementes de maracujazeiro-azedo.

5 DISCUSSÃO

A história relata que a convivência com os vírus ocorre desde as primeiras civilizações e, mesmo antes que se pudesse suspeitar de sua natureza biológica como entidades capazes de parasitar os seres vivos, seus efeitos já eram observados na forma de interferências no funcionamento normal dos organismos. Os vírus são armas admiráveis de destruição massiva, um paradigma de simplicidade biológica que os situa na fronteira da vida (Murillo, 2016). São a causa frequente de doenças de elevado impacto econômico e de difícil controle, o que se deve a sua enorme capacidade de disseminação e adaptação evolutiva (Murillo, 2016). No contexto agrônomo, os vírus desempenham um papel importante como agentes causais de doenças em vegetais. Eles ocupam o segundo lugar, superados apenas pelos fungos, como patógenos de maior importância agrícola, e são responsáveis por perdas agronômicas e econômicas nos mais variados cultivos.

A globalização impôs uma realidade ainda mais desafiadora, uma vez que facilitou o fluxo de material propagativo, possibilitando a veiculação de microrganismos e, conseqüentemente, a dispersão de patógenos de relevância agrônoma. Neste sentido, protocolos de detecção são essenciais para o controle preventivo de doenças, especialmente de viroses, uma vez que não

existem, até o presente momento, medidas curativas disponíveis para este grupo de patógenos.

Atualmente, está disponível em bases de dados um número considerável de sequências nucleotídicas e de aminoácidos de diferentes proteínas dos mais diversos organismos, incluindo os vírus. Devido à disponibilidade destas informações, é possível, mediante o uso de ferramentas de bioinformática, desenhar oligonucleotídeos para a detecção de patógenos por meio de técnicas moleculares. Consequentemente, isso tem possibilitado, cada vez mais, o desenvolvimento de novos protocolos de PCR em tempo real para a detecção de vírus de plantas (Boonham *et al.*, 2014). Recentemente tem se observado a preferência pela utilização da PCR em tempo real em relação à PCR convencional. Isso se deve a uma série de vantagens da primeira, tais como: a possibilidade de quantificação em tempo real do patógeno na amostra, a redução do risco de contaminação pela manipulação de amplicons e a não necessidade de se empregar eletroforese em gel de agarose, hibridização ou detecção colorimétrica como análise do produto final da reação. O método ainda proporciona uma economia de reagentes e tempo, além de permitir estudos ao longo do processo de detecção, como a quantificação da população-alvo original, a detecção de várias variantes de um patógeno ou mutações pontuais em um gene (López *et al.*, 2009).

Neste trabalho foram desenhados iniciadores e sonda TaqMan e foi otimizado um protocolo de RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV, agente causal do EFM no Brasil. As sequências de nucleotídeos de CABMV disponíveis no banco de dados do NCBI apresentaram alta identidade na região genômica utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos, o que permitiu obter

iniciadores e uma sonda universal, isto é, capazes de amplificar todos os isolados de CABMV cujas sequências já foram depositadas nesta base de dados. Os parâmetros que nortearam a escolha dos iniciadores foram aqueles previamente definidos por Thornton & Basu (2011). O desenho dos iniciadores e da sonda para o ensaio de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan foi realizado sob critérios específicos do software Primer Express.

A avaliação da especificidade ocorreu em duas etapas, uma *in silico* e a outra *in vitro*. Os testes demonstraram o funcionamento adequado dos iniciadores e da sonda TaqMan em ambas as etapas, nas quais apenas sequências dos isolados de CABMV foram amplificadas e nenhuma sequência das 19 espécies de vírus testados *in vitro* apresentou sinal de amplificação. Osman *et al.* (2007) desenvolveram ensaios de RT-PCR em tempo real para a detecção específica de *Grapevine leafroll associated viruses 1-5* e *9* (GLRaV-1-5 e -9) e obtiveram resultados similares a este trabalho. Conforme estes autores, a RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan não apenas foi mais sensível que a RT-PCR convencional, como também detectou isolados não detectados por essa última técnica.

Dentre as vantagens de se utilizar a PCR em tempo real para a detecção de patógenos está a possibilidade de combinar a técnica com métodos diretos e simplificados de preparação de amostras, os quais são adaptados para uso em larga escala devido à sua robustez, ao menor custo e aos riscos reduzidos de contaminação quando comparados com métodos onde é necessária a purificação de ácidos nucleicos (Bertolini *et al.*, 2014). Devido a sua simplicidade, estes métodos diretos foram usados para processamento e preparo de amostras para a detecção de patógenos, incluindo vírus, bactérias e

fitoplasmas em espécies lenhosas para posteriores análises por PCR em tempo real (Osman & Rowhani, 2006).

Neste trabalho foi comparado um método direto (diluição) com um método que requer purificação do RNA total na detecção do CABMV. Apesar dos valores de Ct obtidos com o método direto serem mais altos (menor sensibilidade), a eficiência obtida foi equiparada com a purificação de RNA total. Isto porque as comparações em diluições seriadas mostraram a mesma sensibilidade (mesmo limite de detecção). Capote *et al.* (2009) realizaram um estudo com métodos diretos de preparação de amostras para a detecção de PPV por RT-PCR em tempo real. Na comparação de sensibilidade, a RT-PCR em tempo real pelos métodos diretos (spot e diluição) apresentou menor sensibilidade que pelo método de purificação do RNA total. Este resultado difere daquele encontrado no presente trabalho, o que pode ser explicado pela diferença entre os kits de purificação de RNA total utilizados nos dois ensaios. É importante considerar que Capote *et al.* (2009), ao analisar amostras de campo, observou em 405 amostras, 196 verdadeiros positivos por purificação de RNA total e 188 verdadeiros positivos por spot, obtendo, portanto, uma alta concordância entre os dois procedimentos. Acrescenta-se ainda que o número de falsos positivos foi maior por purificação de RNA, provavelmente devido à contaminações, e o número de falsos negativos foi maior por spot, provavelmente pela menor sensibilidade. Teresani *et al.* (2014) também compararam a sensibilidade da PCR em tempo real utilizando o método direto (spot) e a purificação de DNA total para a detecção da bactéria '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' e observaram que, apesar de a sensibilidade ser maior com a purificação de DNA total, o método direto tinha eficiência similar ao

analisar amostras naturalmente infectadas. Capote *et al.* (2009) observaram que a utilização de extratos vegetais sem diluição inibia a amplificação por RT-PCR em tempo real. A causa provável para isto é a presença na reação de elevadas quantidades de inibidores de origem vegetal, tais como polissacarídeos e compostos fenólicos que costumam ser eliminados durante a purificação de RNA total (Minsavage *et al.*, 1994 *apud* López *et al.*, 2009; Hartung *et al.*, 1996 *apud* López *et al.*, 2009; Wilson, 1997 *apud* López *et al.*, 2009; Munford *et al.*, 2006 *apud* López *et al.*, 2009).

No Brasil, uma técnica muito utilizada para a detecção do CABMV é o PTA-ELISA com anticorpo policlonal específico para o CABMV (Rodrigues *et al.*, 2016; Garcêz *et al.*, 2015). O uso de anticorpos policlonais frequentemente apresenta problemas de especificidade, embora o ELISA tenha revolucionado a diagnose de doenças virais, tornando viável a análise de grande número de amostras, simplificando a análise, por ser mais barato e, ainda assim, sendo altamente sensível, quando comparado com técnicas tradicionais (López *et al.*, 2009; Kohler & Milstein, 1975 *apud* López *et al.*, 2009; Terrada *et al.*, 2000 *apud* López *et al.*, 2009). Outra limitação da técnica PTA-ELISA na detecção do CABMV é a indisponibilidade de um antissoro comercial, o que restringe o uso desta técnica a trabalhos acadêmicos. Em contrapartida, a RT-PCR em tempo real é a técnica “gold standard” para a detecção precoce de patógenos, além de ser uma ferramenta fundamental em laboratórios de pesquisa (Mirmajlessi *et al.*, 2015).

Neste trabalho foram comparadas as técnicas PTA-ELISA e RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV em maracujazeiro. O ensaio de sensibilidade demonstrou que a técnica RT-PCR em tempo real foi 100 vezes

mais sensível que a técnica PTA-ELISA. Estes resultados foram similares aos obtidos por Capote *et al.* (2009) ao comparar as técnicas DAS-ELISA e RT-PCR em tempo real usando métodos diretos de preparação de amostras na detecção do PPV em *Prunus*. Além disso, a RT-PCR em tempo real usando purificação do RNA total, foi 100.000 vezes mais sensível que a técnica DAS-ELISA.

O índice Kappa de Cohen, utilizado para medir a concordância entre as duas técnicas (RT-PCR em tempo real e PTA-ELISA), foi calculado em 0,7664 e classificado como “substancial”. Índices similares foram obtidos por Capote *et al.* (2009), Vidal *et al.* (2012) e Bertolini *et al.* (2014) na comparação entre RT-PCR em tempo real, usando métodos diretos de preparação de amostras, e outras técnicas de detecção, validando-se os protocolos desenvolvidos. Isso indica a adequação do protocolo de RT-PCR em tempo real usando a diluição como método direto de preparo de amostras para a detecção do CABMV.

O protocolo de RT-PCR em tempo real desenvolvido foi usado para avaliar a incidência do CABMV em pomares de maracujazeiro-azedo nos municípios de Araquari (SC), São João do Sul (SC) e Torres (RS). Em São João do Sul, a incidência inicial foi de 6%, enquanto em Araquari e em Torres, a incidência inicial foi de 0%. Esta diferença se deve basicamente à condição de produção das mudas adquiridas pelos produtores de São João do Sul. A ausência de tela antiafídica e a proximidade com plantações de maracujá levaram a infecção de algumas mudas, que ao serem levadas a campo, serviram de fonte de inóculo do vírus para plantas saudáveis. A dispersão do CABMV ocorreu de forma rápida no pomar de São João do Sul. Quatro meses após o plantio (em dezembro), cerca de 50% das plantas já haviam sido infectadas pelo vírus, enquanto em Torres a incidência era inferior a 20%. No quinto mês após o

plântio, 100% das plantas já estavam infectadas pelo CABMV em São João do Sul. Já em Torres, somente oito meses (em abril) após o plântio, a incidência alcançou 100%.

Rodrigues *et al.* (2016) relataram que em São Paulo, em pomar estabelecido com mudas de 80 cm de altura, isentas de CABMV, somente após, aproximadamente, sete meses a incidência atingiu 50%, e, depois de, cerca de 13 meses atingiu 100%. Segundo Rodrigues *et al.* (2016), a expressão dos sintomas da virose ocorre com atraso em relação ao momento em que normalmente é realizada a primeira detecção do vírus na planta. Estes resultados sugerem que o uso de mudas infectadas no plântio é um fator determinante para a rápida dispersão do vírus e que, quanto mais tarde ocorrer a infecção primária, menor será o impacto da doença na produção e na qualidade dos frutos.

Em Araquari, apesar de terem sido relatados sintomas similares aos do EFM, o vírus não foi detectado nas plantas analisadas através do protocolo desenvolvido. É possível que os sintomas observados tenham sido confundidos com outra doença ou deficiência nutricional. A não detecção do CABMV em Araquari pode ser indício de que há menos fontes do vírus na região estudada, o que encontra respaldo na recente retomada do plântio de maracujá no município. Práticas como a renovação anual do plântio e o vazio sanitário devem ser vistas como estratégicas para reduzir o inóculo do vírus de uma safra para a outra.

Amostras do CABMV obtidas em São João do Sul e em Torres foram amplificadas por RT-PCR, purificadas e sequenciadas. As sequências obtidas foram analisadas computacionalmente e revelaram existir alta identidade de

nucleotídeos do gene da proteína capsidial entre os isolados de CABMV do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina e isolados de CABMV de São Paulo (acima de 99%), bem acima do limite estabelecido para demarcação de espécie do gênero *Potyvirus* (entre 76% e 77%) (Adams *et al.*, 2005).

Os isolados CABMV-sjs e CABMV-tor são mais próximos dos isolados Alvinlandia-SP e Fernao-SP e mais distantes de isolados de PWV e EAPV (Figura 12). Nascimento *et al.* (2004 e 2006) também observaram o agrupamento entre isolados de CABMV de maracujá, sendo estes mais distantes de isolados de PWV. Considerando-se o histórico de ocorrência da doença no Brasil, é possível que o vírus encontrado atualmente nos litorais norte do RS e no sul de SC tenha origem em São Paulo, e que tenha se estabelecido primeiramente em território catarinense, trazido em mudas infectadas, posteriormente chegando ao território gaúcho através de insetos vetores.

No ensaio de avaliação da transmissão do CABMV por sementes de maracujazeiro, não houve evidências desse tipo de transmissão. Todos os frutos com sintomas foram positivos na indexagem, e sementes de quatro deles também apresentaram amplificações em RT-PCR em tempo real, comprovando a presença do vírus nestes materiais. Porém, em mais de 800 plântulas analisadas, em nenhum caso foi detectada a presença do vírus.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com relatos de Taylor & Greber (1973) *apud* Narita *et al.* (2011), Inoue (1995) e Narita *et al.* (2011) que também realizaram estudos de transmissibilidade do CABMV por sementes de maracujá. Embora haja diferenças metodológicas, todos os trabalhos são unânimes quanto à não transmissibilidade do vírus por esta via. Entretanto, por ter se verificado que o CABMV é transmitido através de sementes

de feijoeiro caupi a uma taxa de 5% (Damiri *et al.*, 2013), optou-se por reavaliar este aspecto da epidemiologia.

Segundo Sastry (2013), nem sempre a presença do vírus na semente (seja na capa, cotilédones ou embrião) levará à infecção de plântulas. É aceito, de modo comum, que, para haver verdadeira transmissão por sementes, o vírus deve entrar e sobreviver no embrião. De acordo com Sastry (2013), existem duas razões para haver falha na transmissão por sementes: inabilidade do vírus em infectar o embrião e inabilidade do vírus em sobreviver no embrião. A inabilidade do vírus para infectar o embrião pode ser devida à descontinuidade protoplasmática, o que impediria a translocação do vírus dos tecidos maternos adjacentes para os óvulos em desenvolvimento. Outra possibilidade é a de que o vírus não se multiplicaria no embrião, local de atividade metabólica muito intensa e, assim, provavelmente o vírus seria inativado por citocininas naturais. Há também que se considerar a própria resistência dos gametas à infecção por vírus (Sastry, 2013). Já a inabilidade do vírus para sobreviver no embrião pode ser devida ao processo de dessecação pelo qual passa a semente até sua maturação fisiológica (Sastry, 2013).

A presença ou ausência do vírus não parece ter afetado a germinação das sementes. De fato, as menores taxas de germinação ocorreram em lotes de sementes testadas negativas para o vírus. Uma possível explicação para as menores taxas de germinação das sementes dos frutos 7 e 10 é que estes eram os frutos com menor índice de maturação fisiológica.

As estratégias propostas por Berger (1977), tais como, a eliminação ou a redução do inóculo inicial ou o atraso em seu aparecimento, a diminuição da taxa de desenvolvimento da doença e o encurtamento do período de

exposição da cultura ao patógeno são adequadas a quase todos os tipos de doenças infecciosas e devem ser aplicadas também no enfrentamento do EFM. Neste sentido, o uso de mudas saudáveis de 80 cm de altura produzidas sob telado anti-afídeos (Rodrigues *et al.*, 2016) e a proibição do plantio de espécies do gênero *Passiflora* em determinadas épocas (Petry *et al.*, 2022) associada a eliminação de hospedeiros alternativos e ao “roguing” (Spadotti *et al.*, 2019) são medidas indispensáveis para reduzir o inóculo inicial (y_0), retardar a infecção primária e, conseqüentemente, o desenvolvimento da epidemia, implicando menor incidência nos primeiros meses de cultivo, conforme demonstrado no levantamento realizado e menor severidade da doença em fases mais avançadas do ciclo (Rodrigues *et al.*, 2016). Considerando que, após três dias da infecção, as plantas já atuam como fonte de inóculo e, somente aos oito dias, passam a expressar os primeiros sintomas da doença (Spadotti *et al.*, 2019), possivelmente se obtenha uma definição de forma mais ágil para a tomada de decisão em relação a necessidade de erradicação de plantas infectadas adotando o protocolo de detecção desenvolvido neste trabalho, o qual se mostrou mais sensível que a técnica PTA-ELISA na detecção do CABMV em maracujazeiro-azedo. As curvas obtidas com base na proporção entre plantas infectadas e total de plantas, isto é, a taxa média de infecção (r), remetem a forma de um “J” ou exponencial, que é típica de doenças policíclicas, conforme descrito por Vanderplank (1963) e demonstrado por Spadotti *et al.* (2019) especificamente em relação ao CABMV. Tal qual sugerem Fisher & Rezende (2018), medidas de controle que visem a redução de r , por exemplo, a pulverização de partes aéreas da planta, a resistência horizontal e a premunização biológica ou química podem apresentar um desempenho mais

satisfatório em relação aos demais métodos de controle. Moritz *et al.* (2021) demonstram que a pulverização de partes aéreas da planta com óleos vegetais reduz a aquisição do CABMV por *A. gossypii* Glover, afídeo predominante em pomares estudados em Santa Rosa do Sul (SC) e Torres (RS) e, conseqüentemente, a transmissão do vírus às plantas. Silva *et al.* (2016) observaram redução na severidade e na expressão de sintomas do EFM e aumento de peroxidase e polifenoloxidase, proteínas relacionadas à patogênese (PRs), após aplicação de ácido salicílico, conhecido indutor de resistência. Nos últimos anos, foram obtidos avanços na identificação de genótipos de maracujazeiro resistentes ao CABMV, inclusive, da espécie *Passiflora edulis* (Gonçalves *et al.*, 2017) e de híbridos interespecíficos de *P. edulis* e *P. setacea* (Santos *et al.*, 2015). Gonçalves *et al.* (2017) consideraram resistentes os genótipos BGP014, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170, BGP238, BGP077 e BGP413 pertencentes às espécies *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. setacea* e *P. cincinnata*, para os quais o índice médio da doença observado aos 55 dias após a inoculação artificial foi de 0%, tendo estes, potencial para uso em programas de melhoramento convencional ou molecular. Já o genótipo BGP188 pertencente à espécie *P. edulis* apresentou índice igual a 0,56% após o mesmo período de observação. Santos *et al.* (2015), por sua vez, selecionaram 25 genótipos resistentes de híbridos interespecíficos de *Passiflora edulis* e *P. setacea* H1 (1), H1 (8), H1 (20), H2 (2), H2 (18), H2 (20), H3 (9), H3 (10), H3 (11), H4 (2), H4 (9), H5 (1), H5 (12), H5 (14), H5 (21), H6 (6), H6 (27), H7 (11), H7 (12), H8 (13), H8 (47), H8 (55), H9 (11), H9 (56) e H9 (57), além de três progenitores *P. setacea* Ps (4), Ps (365) e Ps (367), utilizando como parâmetro a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e

confirmando a infecção através de PTA-ELISA com antissoro específico. Os valores estimados de herdabilidade (0,99) e acurácia (0,99) permitem inferir que a resistência ao CABMV dentro da população avaliada era altamente hereditária, permitindo alta eficiência seletiva (Santos *et al.*, 2015). Tentativas prévias de premunização com estirpes fracas do vírus não tiveram êxito devido à provável baixa concentração e distribuição irregular nas folhas das plantas. Isso cria condições propícias para o desenvolvimento de estirpes mais fortes do vírus, como destacado por Novaes & Rezende (2003) e Maia *et al.* (2017). Os resultados deste estudo têm implicações importantes no desenvolvimento de estratégias de manejo e redução das perdas causadas pelo CABMV. Ao compreender melhor a incidência, distribuição e características genéticas do vírus, os agricultores e pesquisadores podem tomar medidas mais eficazes para controlar a disseminação e minimizar o impacto do CABMV na produção de maracujá.

6 CONCLUSÕES

Os iniciadores e sonda TaqMan desenvolvidos se mostraram específicos para a detecção do CABMV.

A técnica RT-PCR em tempo real foi otimizada, empregando-se a diluição do extrato vegetal como método direto de preparo de amostras.

O protocolo de RT-PCR em tempo real desenvolvido foi mais sensível que a técnica PTA-ELISA para a detecção do CABMV.

A concordância entre o protocolo de RT-PCR em tempo real desenvolvido e a técnica PTA-ELISA na detecção do CABMV foi alta.

Os isolados CABMV-sjs e CABMV-tor são mais próximos evolutivamente dos isolados Alvinlandia-SP e Fernao-SP e são distantes dos vírus PWV e EAPV.

No pomar onde o vírus ocorreu precocemente, a incidência alcançou nível máximo ainda no início do ciclo da cultura.

Não há evidências de transmissão do CABMV através de sementes de maracujazeiro, embora o vírus tenha sido detectado na semente.

REFERÊNCIAS

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

ADAMS, M. J. *et al.* Family potyviridae. *In*: KING, A. M. Q. *et al.* (ed.). **Virus taxonomy**: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Oxford: Elsevier, 2011. p. 1069-1071.

ALFENAS, P. F. *et al.* Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2005.

ALVES, A. C. C. N. **Passion flower little leaf mosaic begomovirus**: reação de espécies de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ALVES, A. C. C. N. **Identificação de isolados do *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. 2012. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ANARUMA, N. D. *et al.* Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.

ARAYA, S. *et al.* Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 1, [art.] 549, 2017.

BARBOSA, M. A. G. *et al.* Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 98-104, 2001.

- BARROS, D. R. *et al.* Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, n. 6, p. 1085-1091, 2011.
- BERGER, R. D. Application of epidemiological principles to achieve plant disease control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 15, n. 1, p. 165-181, 1977.
- BERTOLINI, E. *et al.* Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, n. 2, p. 177-188, 2008.
- BERTOLINI, E. *et al.* Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of 'Candidatus Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 1149-1158, 2014.
- BEZERRA, L. M. C.; FREDO, C. E.; MELETTI, L. M. M. Cultivo de maracujá-amarelo no estado de São Paulo: principais características a partir do levantamento das Unidades de Produção Agropecuária, ano-safra 2007/2008. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 35-46, 2016.
- BOONHAM, N. *et al.* Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. **Virus Research**, Amsterdam, v. 186, p. 20-31, 2014.
- BOQUEL, S. *et al.* Effect of mineral oil on *Potato virus Y* acquisition by *Rhopalosiphum padi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 148, n. 1, p. 48-55, 2013.
- BORGES, A. L.; LIMA, A. A. Passion-fruit. *In*: CRISÓSTOMO, L. A.; NAUMO, A.; JOHNSTON, A. E. **Fertilizing for high yields and quality: tropical fruits of Brazil**. Horgen: International Potash Institute, 2007. p. 164-178.
- BUENO, C. J. *et al.* *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 382-389, 2014.
- CAMBRA, M. Diagnóstico y detección. *In*: AYLLÓN, M. A.; CAMBRA, M.; LLAVE, C. **Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides**. Madrid: Sociedade Española de Fitopatología, 2016. p. 93-125.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Barcelona, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.
- CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims): a review. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 49, n. 4, p. 585-596, 2013.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. *et al.* A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian

- passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, n. 2, p. 261-270, 2014.
- CHAGAS, C. M. *et al.* Mosaico do maracujá roxo, uma nova virose no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, p. 241-247, 1984.
- CHONG, Y. H. *et al.* The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian passiflora virus*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 84, n. 3, p. 208-220, 2018.
- CHUNG, B. Y. W. *et al.* An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.
- CLARK, M. F. *et al.* Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2010.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.
- COLARICCIO, A. *et al.* O endurecimento dos frutos do maracujazeiro associado a severas perdas no litoral norte de Santa Catarina. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Resumos** [...]. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. p. 300.
- CORREA, M. F. **Reação de plantas transgênicas de *Passiflora alata* à infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus***. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- CRESTANI, O. A. *et al.* Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, n. 9, p. 951-955, 1986.
- DAMIRI, B. V. *et al.* Identification and characterization of *cowpea aphid-borne mosaic virus* isolates in Saudi Arabia. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 95, n. 1, p. 79-85, 2013.
- DELGADO-MENDEZ, C. G.; CASTAÑO-ZAPATA, J.; VILLEGAS-ESTRADA, B. Caracterización del agente causante de la roña del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) en Colombia. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Bogotá, v. 37, n. 143, p. 215-227, 2013.
- DENG, J. *et al.* Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 218, n. 1, p. 148-153, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Tropical fruits compendium**. Rome: FAO, 2011. 32 p.

FERERES, A.; MORENO, A. Integrated control measures against viruses and their vectors. *In*: CARANTA, C. *et al.* **Recent advances in plant virology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p. 237-262.

FERREIRA, S. S. *et al.* Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passion fruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 221-230, 2010.

FISCHER, I. H. *et al.* Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no Centro Oeste Paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 254-259, 2007.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do Maracujazeiro. *In*: AMORIM, L. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 535-543.

FISHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Diseases of passionflower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, Isleworth, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2008.

FREITAS, D. S. *et al.* Molecular characterisation and evolutionary relationships of a potyvirus infecting *Crotalaria* in Brazil. **Archives of Virology**, Wien, v. 147, n. 2, p. 411-417, 2002.

GARCÊZ, R. M. *et al.* Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread Cowpea aphid-borne mosaic virus in a subtropical region of Brazil. **SpringerPlus**, [Switzerland], v. 4, [art.] n. 537, p. 1-12, 2015.

GARDNER, D. E. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflore* to Banana Poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, n. 6, p. 476-478, 1989.

GIORIA, R. *et al.* Limited movement of cucumber mosaic virus (CMV) in yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 127-133, 2002.

GONÇALVES, Z. S. **Reação de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) à virose do endurecimento dos frutos**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.

GONÇALVES, Z. S. *et al.* Methodological approaches to assess passion fruit resistance (*Passiflora* spp.) to passionfruit woodiness disease. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 6, p. 1441-1451, 2017.

GUERBER, J. C. *et al.* Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lancaster, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA**: produção agrícola municipal 2017. [Banco de Dados SIDA]. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acesso em: 16 abr. 2019.

INOUE, A. K. *et al.* Characterization of *Passion fruit woodiness virus* isolates from Brasília and surrounding region, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 3, p. 479-487, 1995.

KILALO-NGERANWA, D. C. **Molecular detection of viruses associated with passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) woodiness disease, monitoring and management of aphid vectors in Kenya**. 2012. 123 f. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) – University of Nairobi, Nairobi, 2012.

KITAJIMA, E. W.; CRESTANI, O. A. Association of a rhabdovirus with passionfruit vein clearing in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, p. 681-688, 1985.

LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Molecular Biology**, Wymondham, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.

LORENZI, H.; LACERDA, M. T. C.; BACHER, L. B. **Frutas no Brasil: nativas e exóticas: (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2015. 768 p.

LUIZON, R. A. **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**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. Systematics. *In*: ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: passionflowers of the world**. Portland: Timber Press, 2004. p. 27-31.

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

MAIA, L. M. *et al.* Biological differences and unilateral cross-protection between biotypes of Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 310-317, 2017.

- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011. Número Especial.
- MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998.
- MIRMAJLESSI, S. M. *et al.* Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis: a review. **Plant Protection Science**, Prague, v. 51, n. 4, p. 177-190, 2015.
- MITUTI, T.; SPADOTTI, D. M. A.; NARITA, N. *et al.* First report of sida mottle Alagoas virus infecting *Passiflora edulis* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 103, n. 1, p. 169, 2019.
- MORITZ, D. R. *et al.* Effect of vegetable oil on the efficiency of transmission of cowpea aphid-borne mosaic virus by *Aphis gossypii* glover in passion fruit plants. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 47, p. 298–302, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00476-8>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- MURILLO, J. Prólogo. *In*: AYLLÓN, M. A.; CAMBRA, M.; LLAVE, C. **Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides**. Madrid: Sociedade Española de Fitopatología, 2016. p. 21-23.
- NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.
- NARITA, N. **Epidemiologia do Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV) em maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP**. 2007. 54 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- NARITA, N.; YUKI, V. A.; PAVAN, M. A. Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 221-221, 2011.
- NASCIMENTO, A. V. S. *et al.* Análise filogenética de Potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 4, p. 378-383, 2004.
- NASCIMENTO, A. V. S. *et al.* Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Wien, v. 151, n. 9, p. 1797-1809, 2006.
- NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Real-Time qRT-PCR**. Bethesda, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>. Acesso em: 17 abr. 2019.

NG, A. J. C. K.; PERRY, K. L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 505-511, 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**, Berlin, v. 160, n. 2, p. 82-87, 2012.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Selected mild strains of Passion fruit woodiness virus (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 699-708, 2003.

OSMAN, F. *et al.* Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 22-29, 2007.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 133, n. 2, p. 130-136, 2006.

OSORIO, D. V. B. **Detecção de Tobacco streak virus em *Nicotiana tabacum* e tripes vetores por meio de RT-PCR em tempo real e respostas quimiotáticas de *Orius insidiosus* ao complexo *N. tabacum*, *Myzus persicae* e fitormônios**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

PARISI, João José *et al.* Pathogenicity and transmission of fungi detected on *Passiflora alata* seeds. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 85, [art.] e0702017, [p. 1-8], 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/212033>. Acesso em: 30 ago. 2023.

PERES, N. A. R. *et al.* Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, 2002.

PERUCH, L. A. M. *et al.* **Doenças do maracujazeiro amarelo**. Florianópolis: Epagri, 2009. 99 p. (Boletim técnico, 145).

PERUCH, L. A. M.; SCHROEDER, A. L. (org.). **Maracujazeiro-azedo: polinização, pragas e doenças**. Florianópolis: Epagri, 2018. 220 p.

PETRY, H. B. *et al.* Manejo da virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro-azedo em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 35, n. 3, p. 18–21, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.52945/rac.v35i3.1561>. Acesso em: 30 ago. 2023.

PIO-RIBEIRO, G. *et al.* Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 7, p. 760-766, 2000.

RAMAIYA, S. D. *et al.* Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 93, n. 5, p. 1198-1205, 2013.
Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5876>. Acesso em: 30 ago. 2023.

RODRIGUES, L. K. *et al.* Epidemiological aspects of the transmission and management of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in a passion fruit orchard. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 98, n. 3, p. 531-539, 2016.

SANTOS, E. A. *et al.* Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 1, p. 85-98, 2015.

SASTRY, K. S. Mechanism of seed transmission. *In*: SASTRY, K. S. **Seed-borne plant virus diseases**. [Índia]: Springer, 2013. p. 85-100.

SILVA, L. S. ***Cowpea aphid-borne mosaic virus* na cultura do maracujazeiro: avaliação da tolerância de acessos avançados e efeito nutricional**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2012.

SILVA, M. S. *et al.* Exogenous application of salicylic acid in yellow passion fruit for the control of fruit woodiness virus. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, [art.] e0082015, [p. 1-7], 2016.

SPADOTTI, D. M. A. *et al.* Long-lasting system-atic roguing for effective management of CABMV in passionflower orchards through maintenance of separated plants. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 7, p. 1259–1267, 2019.
Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppa.13054>. Acesso em: 30 ago. 2023.

TERESANI, G. R. *et al.* Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with a vegetative disorder of celery in Spain and development of Real-Time PCR methods for its detection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 8, p. 804-811, 2014.

THORNTON, B.; BASU, C. Laboratory exercise Real-Time (qPCR) primer. Design using free online softwares. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, New York, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.

TOZZE JUNIOR, H. J. *et al.* First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 70-72, 2010.

VAN DER PLANK, J. E. **Plant disease: epidemics and control**. New York: Academic Press 1963. 349 p.

VELAME, K. V.; LARANJEIRA, F. F. Germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de maracujá em função da temperatura e do período

de melhoramento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 122-122, 2005.

VIDAL, E. *et al.* Susceptibility of *Prunus* rootstocks to natural infection of *Plum pox virus* and effect of mineral oil treatments. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 157, n. 3, p. 447-457, 2010.

VIDAL, E. *et al.* Estimation of the accuracy of two diagnostic methods for the detection of *Plum pox virus* in nursery blocks by latent class models. **Plant Pathology**, Oxford v. 61, n. 2, p. 413-422, 2012.

VIDAL, E. *et al.* Horticultural mineral oil treatments in nurseries during aphid flights reduce *Plum pox virus* incidence under different ecological conditions. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 162, n. 3, p. 299-308, 2013.

VIDAL, A. H. *et al.* Occurrence of lettuce chlorosis virus in *Passiflora* spp. in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 443-447, 2021.

WYLIE, S. J.; JONES, M. G. K. The complete genome sequence of *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, n. 3, p. 479-482, 2011.

ZANINI, F. *et al.* Desenvolvimento de protocolo de RT-PCR em tempo real para detecção de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 7., 2017, Balneário Arroio do Silva. **Anais** [...]. Urussanga, SC: Epagri, 2017. p. 63.

ZERAIK, M. L. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, Barking, v. 128, n. 2, p. 259-265, 2011.

ZERBINI, F. M.; ALFENAS-ZERBINI, P. Métodos em virologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2016. p. 297-353.