

MARCELO DE MARINS LESSA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS DE PROPAGAÇÃO DO COWPEA
APHID-BORNE MOSAIC VIRUS, COWPEA MILD MOTTLE VIRUS E PASSIFLORA
CYTORHABDOVIRUS EM MARACUJAZEIROS**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO 2023**

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Maité Vaslin de Freitas Silva e coorientação de Alex Moura da Silva.

CIP - Catalogação na Publicação

L638a Lessa Junior, Marcelo de Marins
AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS DE PROPAGAÇÃO DO
COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS, COWPEA MILD MOTTLE
VIRUS E PASSIFLORA CYTORHABDOVIRUS EM
MARACUJAZEIROS / Marcelo de Marins Lessa Junior. --
Rio de Janeiro, 2023.
56 f.

Orientadora: Maité Vaslin de Freitas Silva.
Coorientador: Alex Moura da Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Passiflora. 2. Cowpea aphid-borne mosaic
virus. 3. Cowpea mild mottle virus. 4. Passiflora
cytorhabdovirus. 5. Aphis gossypii. I. Freitas
Silva, Maité Vaslin de, orient. II. Silva, Alex
Moura da, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): Marcelo de Marins Lessa Junior

DRE: 120034703

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luciana Jesus da Costa (Presidente)

Prof. Dr. Dirlei Nico

Prof. Dr. Iranair Assunção Miranda

Prof. Maria Teresa Villela Romanos (Suplente)

Título da Monografia: "AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS VIAS DE PROPAGAÇÃO DO COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS, COWPEA MILD MOTTLE VIRUS E PASSIFLORA CYTORHABDOVIRUS EM MARACUJAZEIROS"

Local: Sala E-44 do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 19 de dezembro de 2023 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi arguido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 7,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2023.

NOTA:

7,0

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciana Jesus da Costa (Presidente)

7,0

Prof. Dr. Dirlei Nico

7,0

Prof. Dr. Iranair Assunção Miranda

Prof. Maria Teresa Villela Romanos (Suplente)

Aluno(a):

Marcelo de Marins Lessa Junior

Orientador(a)

Prof. Dr. Maria Vastin de Freitas Silva

(e coorientador)

Coordenadora de

Prof. Maricelli Silva Lopes

TCC:

Dedico este trabalho àqueles que guardo no coração e pensamento, e que me acompanham ao longo da caminhada. Dedico-o também a todos que buscam produzir conhecimento científico apesar das adversidades enfrentadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aqueles que trazem amor à minha vida, por me permitirem perseverar nos momentos mais árduos.

Sou grato especialmente à minha mãe e pai, Angélica e Marcelo, pelo amor e zelo incondicionais. Todos os momentos que vocês abdicaram de seus desejos, e por vezes até necessidades, são alicerces para quem sou hoje. Aos familiares e amigos que somam e somaram positivamente à minha vida. Aos colegas ao longo da caminhada. Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a seus membros que agregaram a minha formação. E as agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPERJ.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas!”

(Antoine de Saint-Exupéry, 1943)

RESUMO

MARCELO DE MARINS LESSA JUNIOR

**AValiação de potenciais vias de propagação do cowpea
aphid-borne mosaic virus, cowpea mild mottle virus e Passiflora
cytorhabdovirus em maracujazeiros**

Orientadora: Maité Vaslin de Freitas Silva

Coorientador: Alex Moura da Silva

O maracujá é um fruto pertencente a plantas do grupo taxonômico *Passiflora*, gênero mais diverso da família *Passifloraceae*. O fruto possui grande relevância econômica mundial, sendo o Brasil seu maior produtor e tendo grande mercado consumidor. Ademais, o país apresenta grande diversidade de espécies de maracujá. O presente trabalho tem como objetivo analisar potenciais vias de transmissão do cowpea aphid-borne mosaic virus, cowpea mild mottle virus e do *Passiflora cytorhabdovirus*, sendo este último um novo vírus descoberto pela Vidal et al., 2023, pesquisadora da Embrapa. A fim de entender melhor como estes vírus podem estar se comportando em natureza, entendimento este que possibilita melhor controle destes agentes em campo. Foram avaliadas a transmissão desses vírus por meio de transmissão mecânica, através de vetor *Aphis gossypii* e propagação através do processo de estaquia. A análise foi feita através de diagnóstico mediado por RT-PCR de amostras coletadas de plantas de *Passiflora edulis*, uma espécie de maracujá, que foram submetidas a um dos processos de inoculação ou foram geradas a partir de estaquia. Os resultados da análise da transmissão mecânica foram positivos apenas para o cowpea aphid-borne mosaic virus. Nenhum dos vírus analisados se mostraram capazes de serem transmitidos pelo inseto vetor. Ademais, todos os vírus foram capazes de propagação por meio do processo de estaquias, apresentando diferentes graus de capacidade de transmissão por esta via.

Palavras-chave: *Passiflora*; Cowpea aphid-borne mosaic virus; Cowpea mild mottle virus; *Passiflora cytorhabdovirus*; *Aphis gossypii*; Maracujá.

ABSTRACT

MARCELO DE MARINS LESSA JUNIOR

**EVALUATION OF POTENTIAL PATHWAYS OF PROPAGATION OF COWPEA
APHID-BORNE MOSAIC VIRUS, COWPEA MILD MOTTLE VIRUS, AND
PASSIFLORA CYTORHABDOVIRUS IN PASSION FRUIT PLANTS**

Advisor: Maité Vaslin de Freitas Silva

Co-advisor: Alex Moura da Silva

Passion fruit is a fruit belonging to plants in the taxonomic group *Passiflora*, the most diverse genus in the *Passifloraceae* family. The fruit holds significant global economic importance, with Brazil being its largest producer and having a substantial consumer market. Additionally, the country exhibits a wide diversity of passion fruit species. The present study aims to analyze potential transmission pathways of the cowpea aphid-borne mosaic virus, cowpea mild mottle virus, and the *Passiflora* cytorhabdovirus, the latter being a newly discovered virus by Vidal et al., 2023, a researcher from Embrapa. The goal is to better understand how these viruses may be behaving in nature, providing insights for improved field control of these agents. The transmission of these viruses was evaluated through mechanical transmission, using the vector *Aphis gossypii*, and propagation through the process of cutting. The analysis was conducted through RT-PCR-mediated diagnosis of samples collected from *Passiflora edulis* plants, a species of passion fruit, which were either subjected to one of the inoculation processes or generated through cutting. The results of the mechanical transmission analysis were positive only for the cowpea aphid-borne mosaic virus. None of the analyzed viruses demonstrated the ability to be transmitted by the insect vector. Furthermore, all viruses were capable of propagation through the cutting process, exhibiting varying degrees of transmission capacity through this pathway.

Key-words: *Passiflora*; Cowpea aphid-borne mosaic virus; Cowpea mild mottle virus; *Passiflora cytorhabdovirus*; *Aphis gossypii*; Passion Fruit.

RESUMO PARA LEIGOS

MARCELO DE MARINS LESSA JUNIOR

Descobrimos Como Vírus Afetam o Maracujá: Uma Busca pelas Formas de Propagação desses Vilões Invisíveis

Orientadora: Maité Vaslin de Freitas Silva

Coorientador: Alex Moura da Silva

Assim como humanos podem ser acometidos por vírus levando à ocorrência de doenças como a Covid-19 ou resfriado comum, organismos vegetais também podem ser infectados por estes parasitas. As doenças causadas por vírus em plantas podem levar a diversos sintomas, como a perda da qualidade e produtividade de áreas plantadas. O que é de grande preocupação para países como o Brasil, em que a agricultura é altamente relevante. Por exemplo, quando se fala de maracujá, o Brasil além de maior produtor mundial apresenta um grande mercado consumidor. Acontece que o maracujazeiro pode ser severamente afetado por viroses, e um dos meios para protegê-los é entender como estes vírus se propagam, para buscar criar barreiras que impeçam sua transmissão. Nosso trabalho buscou entender como três vírus (cowpea aphid-borne mosaic virus, cowpea mild mottle virus e Passiflora cytorhabdovirus) são transmitidos para o maracujá. Foram testadas diferentes formas de transmissão, incluindo contato direto, por meio de insetos e criando mudas a partir de uma planta doente. Usamos amostras de plantas de maracujá para fazer nossas análises e descobrimos que só um dos três vírus testados, o cowpea aphid-borne mosaic virus, se espalha pelo contato direto. Nenhum vírus passou para as plantas de maracujá pelos insetos e todos conseguiram se transmitir por meio das mudas que fizemos, sendo que cada um deles teve uma facilidade diferente para fazer isso. Esses achados ajudam a entender como proteger as plantações de maracujá contra esses vilões invisíveis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APS Publications - do inglês: American Physiological Society Publications;
- BaCV - do inglês: bean-associated cytorhabdovirus;
- BOD - do inglês: Biochemical Oxygen Demand;
- c-DNA - do inglês: Complementary DNA;
- CABMV - do inglês: cowpea aphid-borne mosaic virus;
- CABYV - do inglês: cucurbit aphid-borne yellows virus;
- CCS - Centro de Ciências da Saúde;
- CiaRV - do inglês: citrus-associated rhabdovirus;
- CPMMV - do inglês: *cowpea mild mottle virus*;
- DNA - do inglês: Deoxyribonucleic acid;
- dNTP - do inglês: Deoxynucleotide triphosphate;
- dpi - dia pós inoculação;
- dsDNA - DNA fita dupla;
- dsRNA - RNA fita dupla;
- dT - do inglês: deoxythymine;
- EDTA - do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid;
- Embrapa - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária;
- Et al - do latim: Et alia;
- HC-Pro - do inglês: helper component proteinase;
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses;
- Kb - Quilobase;
- LVMV - Laboratório de Virologia Molecular Vegetal;
- mM - milimolar;
- mRNA - RNA mensageiro;
- NIa-Pro - do inglês: nuclear inclusion a protease;
- NIH - do inglês: National Institutes of Health
- nm - nanômetro;
- nt - nucleotídeo;

- ORFs - do inglês: (open reading frames)
- *P. edulis* - *Passiflora edulis*;
- Pb - pares de base;
- PCR - do inglês: Polymerase chain reaction;
- pH - potential of hydrogen;
- PWD - do inglês: *passion fruit woodiness disease*;
- PWV - *passion fruit woodiness virus*;
- RNA - do inglês: Ribonucleic acid;
- RNP - Ribonucleocapsídeo;
- RT - do inglês: Reverse transcriptase;
- RT viruses - vírus de transcrição reversa;
- sgRNA - RNA guia único;
- sgRNAs - do inglês: sgRNAs (RNAs subgenômicos),
- Spp - do inglês: Species;
- ssDNA - DNA fita simples;
- ssRNA - RNA fita simples;
- ssRNA(+) - RNA fita simples sentido positivo;
- ssRNA(-) - RNA fita simples sentido negativo;
- TAE - do inglês: Tris-acetate-EDTA;
- Taq - do inglês: *Thermus aquaticus*;
- TGB - Triple Gene Block;
- TMV - do inglês: *tobacco mosaic virus*;
- U - Unidade;
- UV - ultravioleta;
- Vpg - do inglês: genome-linked protein;
- °C - Grau Celsius;
- µl - microlitro;
- µM - micromolar.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Maracujazeiro.....	14
1.2	Viroses em vegetais.....	16
1.3	Propagação de viroses em vegetais.....	17
1.4	CABMV (Cowpea aphid borne mosaic virus).....	19
1.5	CPMMV (Cowpea mild mottle virus).....	22
1.6	PCV (Passiflora cytorhabdovirus).....	24
2	JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	MATERIAL e MÉTODOS.....	30
4.1	Maracujazeiros.....	30
4.2	Fonte de inóculo viral.....	30
4.3	Afídeos.....	31
4.4	Avaliação da transmissão por inoculação através de vetores.....	31
4.5	Avaliação da transmissão por inoculação mecânica.....	32
4.6	Avaliação da transmissão por estaquias.....	32
4.7	Amostras foliares.....	33
4.8	Extração de RNA total e Transcrição Reversa (RT).....	34
4.9	Polymerase chain reaction (PCR) e Eletroforese.....	35
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Avaliação de vias de propagação do PCV.....	42
5.2	Avaliação de vias de propagação do CABMV e CPMMV.....	46
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	50
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Maracujazeiro

Maracujá é um fruto produzido por plantas do gênero *Passiflora*, palavra com etimologia no latim “Passio” e “Flos”, respectivamente “paixão” e “flor”. Seu primeiro relato, feito por um biólogo espanhol, data de 1529. Pertencem à família *Passifloraceae*, composta por aproximadamente 400 gêneros, sendo *Passiflora* o maior deles. Os representantes do gênero *Passiflora* são geralmente arbustos, ervas e em sua maioria trepadeiras. Sendo encontrados ao redor do mundo em regiões de clima temperado e tropical (Sanyal et al., 2023).

O gênero abrange cerca de 500 espécies (Dhawan et al., 2004). Por volta de 50 a 60 espécies são produtoras de maracujá comestível, se destacando pela abundância e relevância econômica. A espécie *Passiflora edulis* é a mais relevante na economia e é amplamente distribuída na produção comercial do maracujá ao redor do mundo (Fonseca et al., 2022). A espécie representa cerca de 95% da produção comercial ao redor do mundo (Carr, 2014; Fonseca et al., 2022).

Aproximadamente 150 espécies são encontradas no Brasil (Fonseca et al., 2022). O país é o maior produtor mundial de maracujá. Apenas no ano de 2022, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o país abrigou cerca de 45.602 hectares destinados ao cultivo do fruto, uma produção de 697.859 toneladas e mais de R\$ 1.972,5 milhões em valor de produção, valor este que tem aumentado de maneira significativa nos últimos anos, como mostra **Figura 1**. A região nordeste se destaca nessa atividade, como pode ser visto na **Figura 2** (PRODUÇÃO Agropecuária. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acessado em 4 dez. 2023).

Espécies de *Passiflora* podem ser severamente afetadas por doenças, levando a perda de produtividade e da vida útil da planta, conseqüentemente acarretando perda econômica. Entre os vírus capazes de infectar o maracujá pode ser destacar a espécie *cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), que leva a manifestação de sintomas como mosaico, deformação e bolhosidades no tecido foliar. Com manifestações da doença que podem levar à perda superior de 50% da produtividade, classificando este agente como o mais relevante na cultura de maracujá (Fischer & Rezende, 2008).

Série histórica (BR) - Maracujá - Valor da produção

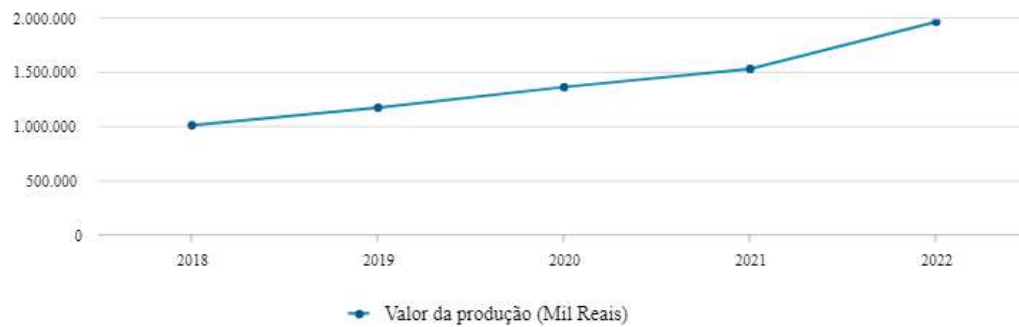


Figura 1 - Gráfico indicativo do valor de produção anual de maracujá no Brasil. O gráfico ilustra na escala de mil reais o valor de produção do maracujá anualmente no Brasil entre os anos de 2018 a 2022. (PRODUÇÃO Agropecuária. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acessado em 4 dez. 2023).

Mapa (BR) - Maracujá - Valor da produção (Mil Reais)

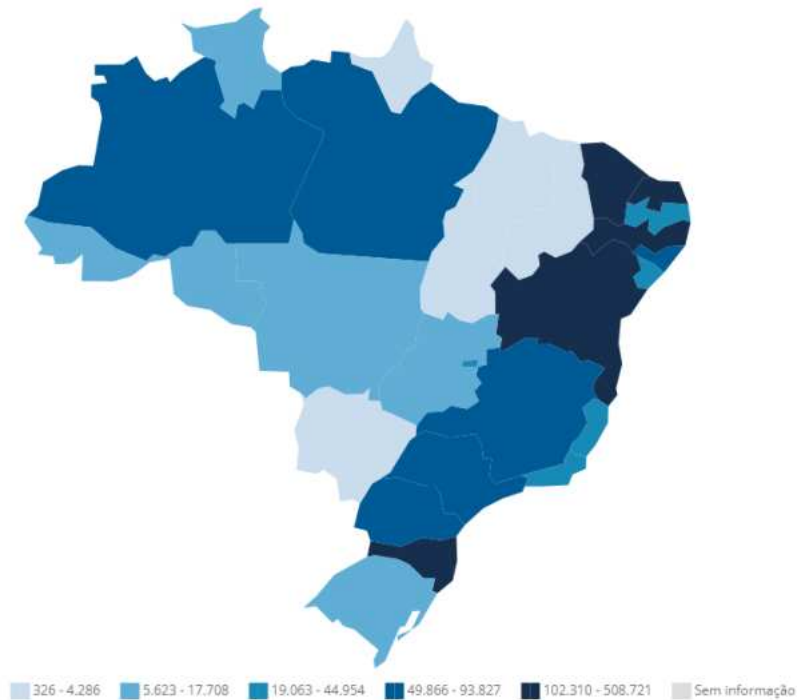


Figura 2 - Mapa do Brasil, distribuição do valor anual de maracujá. A imagem ilustra a estimativa anual do valor de produção de maracujá em cada Estado brasileiro no ano de 2022, na escala de mil reais de acordo com a legenda por cor. (PRODUÇÃO Agropecuária. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acessado em 4 dez. 2023).

1.2 Viroses em vegetais

Em plantas, a parede celular constitui uma barreira física que dificulta a entrada de vírus. Para ultrapassar esta primeira barreira, vírus que infectam plantas utilizam vetores para facilitar sua entrada na célula sem necessariamente quebrar ou remodelar a parede celular, se valendo, por exemplo, do comportamento alimentar de insetos vetores, fungos ou nematóides. Ainda são capazes de tirar proveito de fatores abióticos como chuva e vento, além de danos mecânicos, como causados por ferramentas de cultivo ou passagem de animais (Navarro et al., 2019).

Quando já se encontram na célula hospedeira, os vírus utilizam da interligação citosólica célula a célula da célula vegetal para o transporte de seu genoma, não necessitando liberar partículas no meio extracelular. O transporte intracelular pode ser feito através da modificação do diâmetro de estruturas nomeadas plasmodesmas, que ligam células vegetais vizinhas, criando pontes citoplasmáticas. Outro método é através da remodelação do endoplasma e invasão da continuidade do retículo endoplasmático entre células adjacentes. Após alcançar as células adjacentes, os vírus se movimentam através do sistema vascular, em especial o floema, a fim de chegar às partes distais do hospedeiro (Navarro et al., 2019).

Vírus estão entre os patógenos de maior importância afetando plantas. Sendo capazes de levar a uma grande perda de áreas cultivadas, levando desde a queda da qualidade do produto até perda total da planta. Outro fator importante para locais de cultivo é que embora alguns vírus apresentam especificidade altamente restrita, outros podem afetar vários hospedeiros diferentes (RODRIGUES *et al*, 2009). O tobacco mosaic virus (TMV), o primeiro vírus descoberto, trazendo o termo “virus” do latim para nomear essas entidades, por exemplo, é capaz de infectar mais de 350 espécies de plantas (JIYU PENG *et al*, 2017).

1.3 Propagação de viroses em vegetais

Um dos métodos apresentados por vírus com hospedeiros vegetais é a transmissão mediada por insetos vetores, como representantes das ordens taxonômicas Hemiptera e Thysanoptera. Esta via de propagação é amplamente difundida entre os vírus de planta, sendo necessária para cerca de 80% destes (Shi et al., 2021).

A transmissão através de vetores insetos pode ser dividida em quatro categorias: Não-persistente, em que após se alimentar de uma planta infectada, o vírus fica retido no estilete do inseto. Quando este inseto volta a se alimentar, as partículas virais podem ser transmitidas para a planta da qual se alimenta. Esta via de propagação apresenta funcionalidade em um período que varia de minutos a horas; Na transmissão semi-persistente, os vírus são capazes de se aderir ao revestimento intestinal, mas não demonstram capacidade de penetrar o tecido. O inseto neste estado, pode transmitir a infecção por um período entre horas e dias; Na transmissão circulativa não-propagativa, as partículas virais são capazes de atravessar o intestino do inseto, a hemolinfa e as membranas da glândula salivar, para que seja possível a transmissão. No entanto, o vírus não se replica no tecido do inseto. O vetor pode transmitir a infecção por um período de dias ou até o restante de sua vida; Na transmissão circulativa-propagativa, o vírus apresenta capacidade de replicação no inseto e invasão sistêmica dos tecidos do vetor. Tornando o animal capaz de transmitir a infecção pelo restante de sua vida (Dietzgen et al., 2016; Shi et al., 2021).

A interligação co-evolutiva entre os vírus com hospedeiros vegetais com vírus que infectam outros hospedeiros eucarióticos, ilustrada na **Figura 3**, é um dos motivos pelos quais estes agentes conseguem se replicar em um organismo não vegetal, como no caso da transmissão circulativa-propagativa, ou a razão pela qual alguns vírus são capazes de causar alterações fenotípicas na planta que levam a modulação do comportamento do inseto vetor, podendo favorecer a propagação da infecção (Mas et al., 2014).

Outro método de propagação é a transmissão mecânica, onde material biológico contendo vírus de uma planta infectada, como seiva, entra em contato com células vivas de uma planta saudável, geralmente por meio de lesões ou abrasões, que podem ser causadas por exemplo por animais, materiais de corte ou movimento de animais. Ademais, a infecção pode ser capaz de se propagar à progênie da planta, através do processo de estaquia, enxertia ou brotamento (Singh et al., 2020).

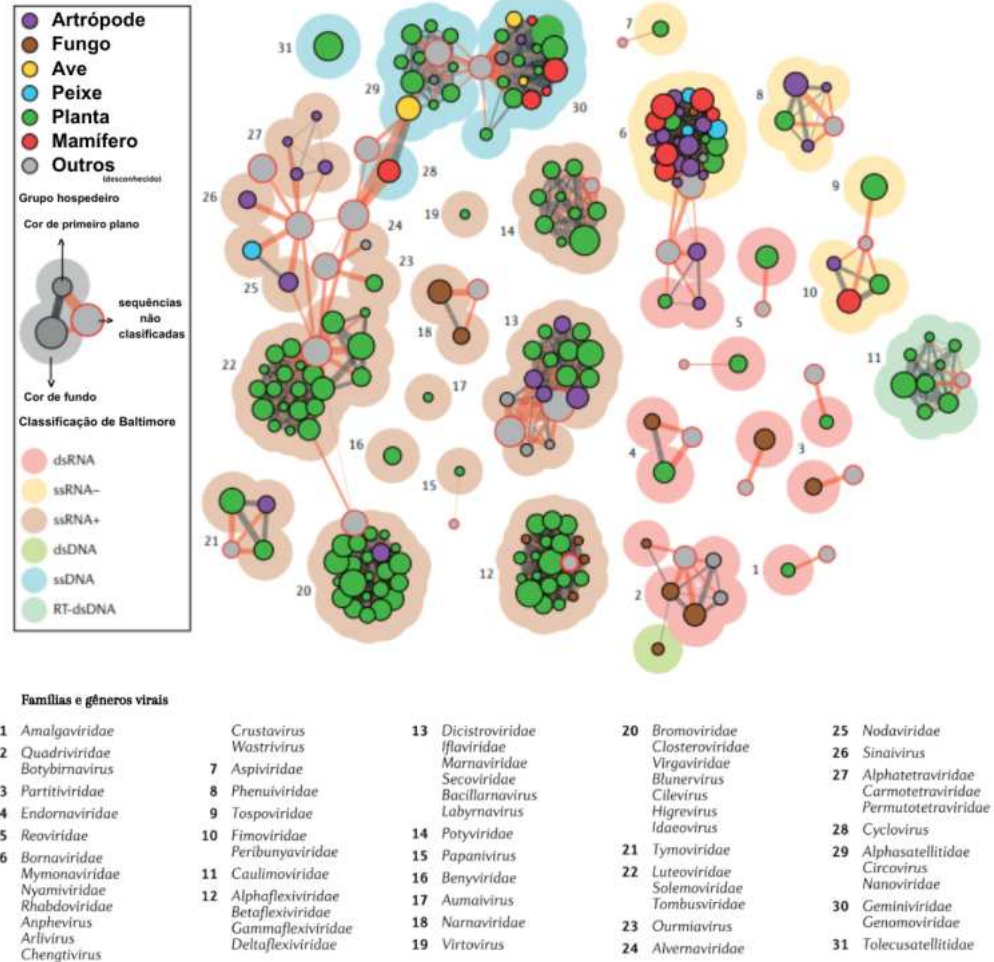


Figura 3 - As muitas origens dos vírus de planta. A imagem retrata a relação entre vírus com hospedeiros vegetais e vírus com demais hospedeiros, se considerando a relação entre as proteínas expressas. Os gêneros virais são apresentados como nós que variam de tamanho de acordo com as sequências gênicas disponíveis no banco de dados. A coloração dos nós é dada pela classe de hospedeiro mais frequente, segundo a legenda à esquerda da figura, em que a sequência foi isolada. A cor de fundo divide os vírus de acordo com seu material genético, seguindo a Classificação de Baltimore. Grupos que abrigam gêneros com semelhanças significativas são interligados por linhas, cuja largura cresce à medida da similaridade proteica. Todos os gêneros mostrados contêm vírus de plantas ou vírus que expressam proteínas com conteúdo com semelhança substancial com aqueles expressos por vírus vegetais. Como tendência geral se nota o agrupamento de vírus de plantas com vírus fúngicos ou artrópodes, nós marrons e roxos, respectivamente. Alguns aglomerados, representando um gênero, apresentam apenas vírus que infectam plantas, enquanto outros, apresentam vírus capazes de infectar hospedeiros de Reinos distintos. A adição de vírus recém descobertos por meio das Ciências Ômicas (nós cinzas com borda vermelha) permitiu a ligação de agrupamentos anteriormente aparentemente não relacionados (ligação identificada por linhas vermelhas). Essas novas sequências são agrupadas por seus padrões semelhantes de compartilhamento de gene, no entanto, essas sequências ainda não classificadas representam novos gêneros ou famílias Adaptado de Lefevre *et al.*, 2019.

1.4 CABMV (*Cowpea aphid borne mosaic virus*)

O *cowpea aphid-borne mosaic virus* é um potyvirus da família Potyviridae. O gênero não apresenta envelope e tem conformação filamentosa flexível com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro, e simetria helicoidal com 3,4 nm em uma volta completa. A **Figura 4** apresenta uma micrografia de partículas de *Plum pox virus*, um representante do gênero *Potyvirus*, apresentando a morfologia dos potyvirus. O genoma do gênero é organizado como um segmento único, formado por uma molécula linear de RNA fita simples polaridade positiva $\text{ssRNA}(+)$. O tamanho é de 9,7-11Kb, com a presença da cauda poli (A) no terminal 3' e uma Vpg (*genome-linked protein*) ou proteína ligada ao genoma no extremo 5'. A **Figura 5** mostra o genoma do potyvirus *potato virus Y*, um membro típico do gênero, exemplificando a organização característica do genoma dos potyvirus. (Genus: Potyvirus | ICTV. (n.d.). <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus>. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

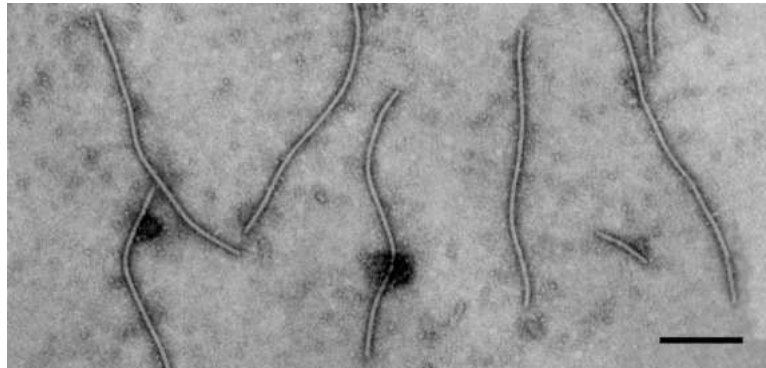


Figura 4 - Micrografia eletrônica de contraste negativo de partículas do potyvirus *Plum pox virus*. Microscopia corada com Ácido fosfotúngstico, em pH 6,0. A barra no canto inferior direito representa 200 nm (Potyviridae | ICTV. https://ictv.global/report_9th/RNApos/Potyviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

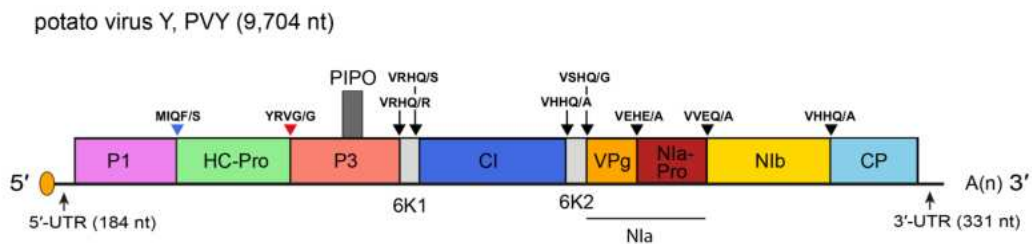


Figura 5 - Organização genômica do potato virus Y, um representante típico do gênero *Potyvirus* (Genus: Potyvirus | ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus>. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

Após penetrar na célula vegetal hospedeira, o potyvirusse descapsida liberando seu RNA genômico no citoplasma. Esta sequência é traduzida em uma poliproteína que é processada pelas proteases virais, P1, HC-Pro (do inglês: helper component proteinase) e NIa-Pro (do inglês: nuclear inclusion a protease. Este processamento produz proteínas funcionais, dentre elas a RNA polimerase RNA dependente (RdRp do inglês: RNA-dependent RNA polymerase), que atua na replicação do genoma (Shen et al., 2020).

O CABMV é transmitido de maneira não-persistente, podendo também ser transmitido mecanicamente por uso de ferramentas contaminadas ou enxertia (Santos Mesquita, 2020. https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8771903. Acesso em 12 de dezembro de 2023).

Maracujazeiros infectados pelo CABMV apresentam sintomas como mosaico, enrugamento, deformação foliar, bolhosidade e redução na quantidade e qualidade de frutos, alguns destes sintomas estão representados na **Figura 6** (Sacoman *et al*, 2018). A infecção pelo CABMV pode evoluir até a manifestação da doença do endurecimento do fruto do maracujá (PWD - “Passion fruit Woodiness disease”). PWD é uma doença de grande relevância para os maracujazeiros, sendo a mais relevante de origem viral. Isso se deve a sua capacidade de levar a uma enorme perda de produtividade, podendo fazer com que ela caia em até mais que 50% (JIMÉNEZ, 2022).

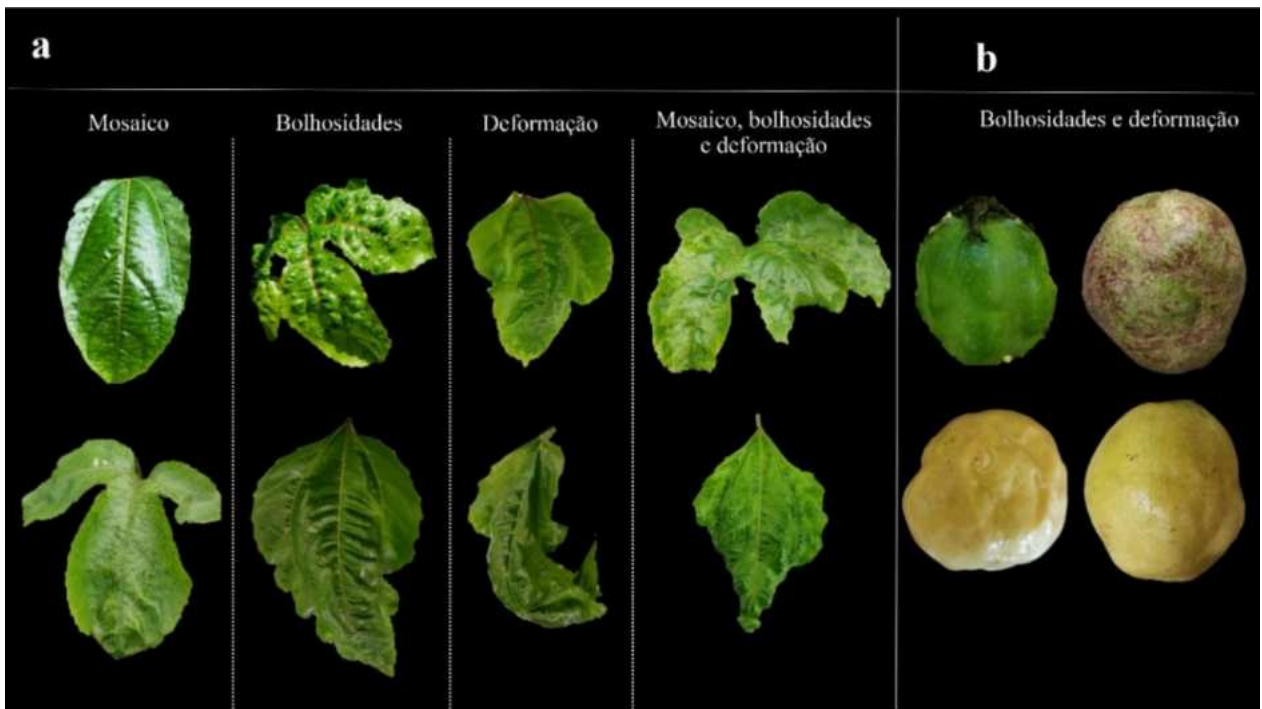


Figura 6 - Tecidos sintomáticos infectados por cowpea aphid-borne mosaic virus. A imagem apresenta sintomas clássicos da infecção por CABMV em folhas (a) e frutos (b) de maracujazeiro. Adaptado de Santos Jiménez, 2021.

A PWD foi constatada pela primeira vez no território brasileiro em pomares de *Passiflora edulis* e *Passiflora alata* no Estado da Bahia no final da década de 70, sendo relatado posteriormente em diversas outras localidades (Giória, 2015). No período de relato, se acreditava que a doença era causada pelo *passion fruit woodiness virus* (PWV).

1.5 CPMMV (*Cowpea mild mottle virus*)

O *cowpea mild mottle virus* é um carlavírus da família *Betaflexiviridae*. Os membros do gênero *Carlavirus* apresentam morfologia filamentosa flexível, com simetria helicoidal. Geralmente com 12-15 nm de diâmetro. O comprimento varia de 610 a 700 nm. O gênero não apresenta envelope. A **Figura 7** apresenta uma micrografia de partículas isoladas de Carnation latent virus, aludindo à estrutura das partículas virais dos carlavírus. O genoma do gênero é formado por uma molécula linear de ssRNA(+), com tamanho estimado de 8,3-8,7 Kb. Com terminal 3' poliadenilado e a porção 5' apresentando cap. Algumas espécies também apresentam dois sgRNAs (RNAs subgenômicos). Na **Figura 8** se apresenta o genoma do *potato virus M*, um carlavírus, a fim de caracterizar a organização genômica do gênero (*Betaflexiviridae* | ICTV. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

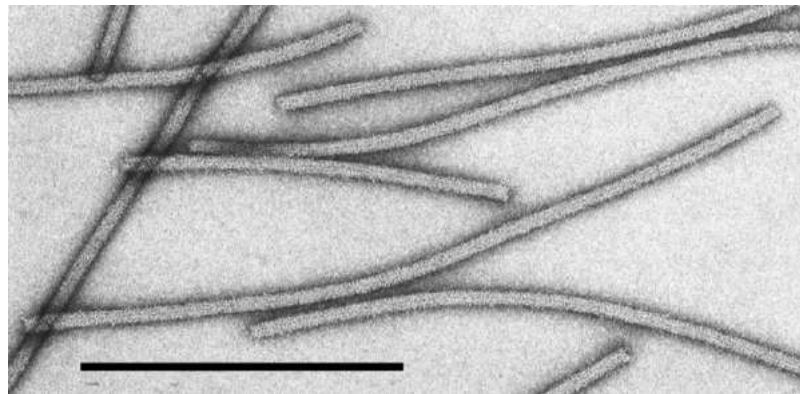


Figura 7 - Micrografia de partículas isoladas de Carnation latent virus. A barra representa 100 nm (Adams, M., Candresse, T., Hammond, J., & Yoshikawa, N. (2011). Family *Betaflexiviridae*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/285699196_Family_Betaflexiviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

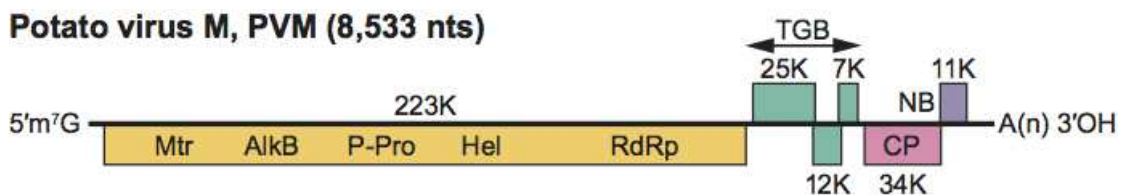


Figura 8 - Organização genômica do potato virus M, mostrando posições relativas das ORFs (open reading frames) e seus produtos de expressão (*Betaflexiviridae* | ICTV. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

O genoma do CPMMV codifica seis ORFs, algumas proteínas que se destacam são a RNA polimerase RNA dependente, atuante na replicação, e as proteínas relativas ao TGBs (triple gene block), atuantes no movimento célula-célula e a longa distância (Wei et al., 2021).

Os sintomas variam de acordo com o hospedeiro, alguns deles são mosaico e nanismo. Sua transmissão pode ocorrer de maneira mecânica ou através da mosca branca, *Bemisia tabaci*, de maneira não-persistente. No entanto, alguns estudos apontam que a transmissão semi-persistente também pode ocorrer em alguns hospedeiros (Wei et al., 2021; Portal Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132674/cowpea-mild-mottle-virus-e-transmitido-de-modo-semipersistente-para-o-feijoeiro-comum>. Acesso: 27 de novembro de 2023).

1.6 PCV (*Passiflora cytorhabdovirus*)

Estimulados por relatos de infecções por citrus-associated rhabdovirus (CiaRV) em maracujazeiros na China, o grupo da Dra. Simone Ribeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), realizou um estudo coletando um total de 114 plantas de maracujá, entre os anos de 2016 e 2021 em distintas regiões do Brasil buscando outro membro da família *Rhabdoviridae*, o *Bean-associated cytorhabdovirus* (BaCV), e também o CPMMV, a fim de checar se estes estavam presentes em cultivos de maracujá no país. O BaCV foi identificado em grande parte das amostras e presente em coinfeções com o CPMMV. O estudo realizado foi capaz de compilar diversas informações sobre plantas apresentando coinfeções, algumas dessas com sintomas como bolhosidade, deformação foliar, clorose e amarelamento das folhas, como visto na **Figura 9** (Vidal *et al.*, 2023).

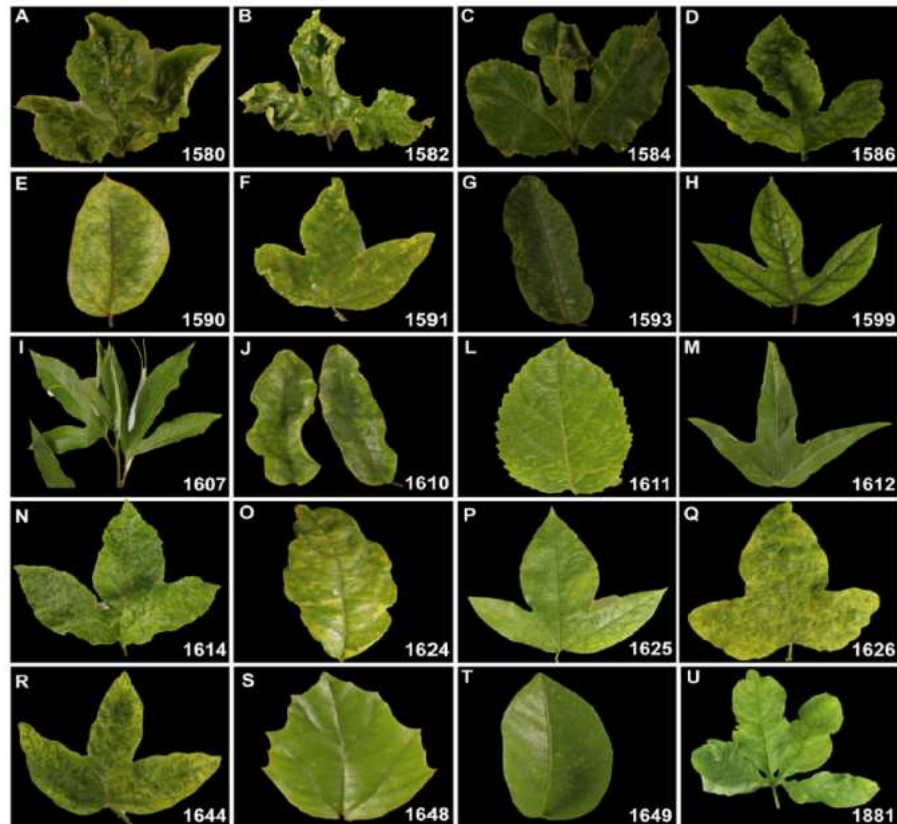


Figura 9 - Sintomas foliares encontrados por Vidal *et al.*, 2023. As fotos ilustram características de folhas sintomáticas de *Passiflora spp.* e plantas híbridas analisadas por Vidal *et al.*, 2023. Adaptado de Vidal *et al.*, 2023.

Durante o desenvolvimento da pesquisa, ocorreu a identificação de um novo vírus infectando espécies de *Passiflora*, nomeado de *Passiflora cytorhabdovirus* ou PCV. Essa descoberta trouxe diversas perguntas sobre o novo agente atuante em maracujás. O ponto de partida para se buscar compreender esse novo agente foi a partir de sua taxonomia, se baseando em conhecimentos prévios sobre o gênero e famílias aos quais pertence.

O *Passiflora cytorhabdovirus* pertence ao gênero *Cytorhabdovirus* da família *Rhabdoviridae*. Os cytorhabdovirus apresentam partícula envelopada e com formato de “bala de revólver”. Seu comprimento é de 200 a 350 nm com diâmetro de 60-75 nm. A **Figura 10** exibe uma micrografia eletrônica de contraste negativo de partículas de *vesicular stomatitis Indiana virus*, membro da família *Rhabdoviridae*, ilustrando o formato característico da família. O genoma dos cytorhabdovirus é formado por uma molécula linear de RNA de sentido negativo com 9,8 a 14,5 Kb, como ilustra a **Figura 11** (Genus: *Cytorhabdovirus* | ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/cytorhabdovirus>. Acesso: 27 de novembro de 2023).

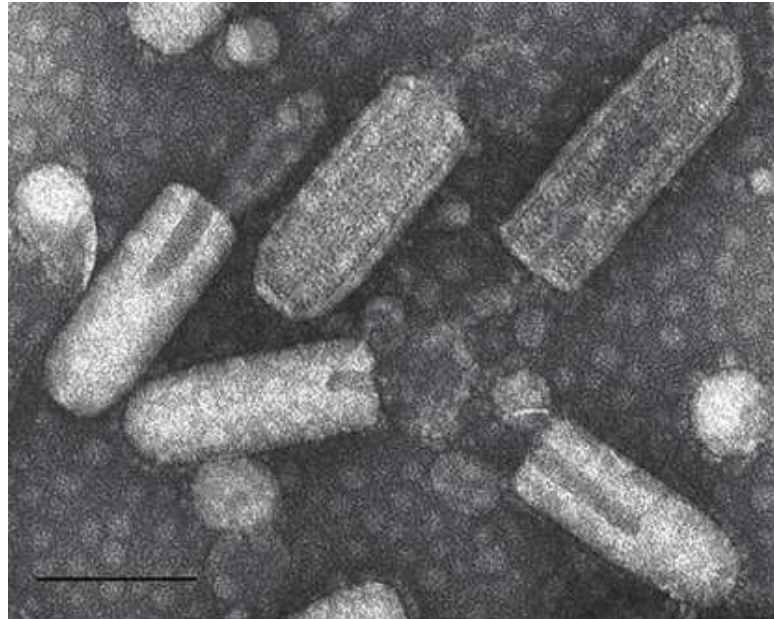


Figura 10 - Micrografia eletrônica de contraste negativo de partículas de *vesicular stomatitis Indiana virus*. A barra representa 100 nm (Walker, P., Blasdell, K. R., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Kondō, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Vasilakis, N., & Whitfield, A. E. (2018). ICTV virus taxonomy profile: *Rhabdoviridae*. *Journal of General Virology*, 99(4), 447–448. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001020>. Acesso: 12 de dezembro de 2023).

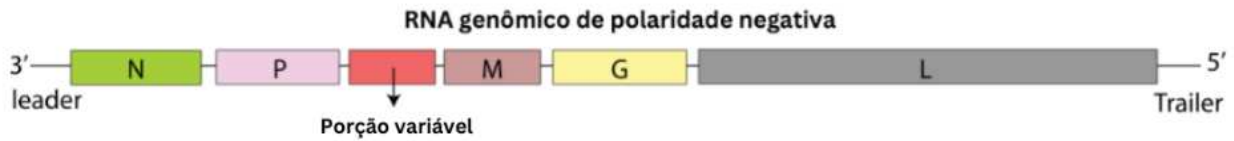


Figura 11 - Ilustração da estrutura do genoma de vírus pertencentes ao gênero *Cytorhabdovirus*. Adaptado de Le Mercier et al., ViralZone. Expasy.org. Acesso: 27 de novembro de 2023, <https://viralzone.expasy.org/77>.

Sua transmissão ocorre através de insetos vetores, nos quais o vírus é capaz de se replicar, tornando seu vetor virulífero pelo resto de sua vida, caracterizando uma transmissão persistente: circulativo propagativo (Embrapa, 2019. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107832/transmissao-de-virus-e-controle-de-viroses-em-plantas>. Acesso: 27 de novembro de 2023).

O ciclo dos Rhabdovirus vegetais em insetos tem início quando este é obtido pelo artrópode ao este se alimentar de uma planta infectada, através de seus aparelhos bucais perfurantes e sugadores. Após a ingestão, as partículas virais passam a infectar o intestino médio, e os vírus invadem as camadas de células epiteliais do intestino, provavelmente por meio de receptores pH-dependentes. A glicoproteína de membrana é essencial para a interação do vírus com as células do hospedeiro (Hogenhout et al., 2003).

No final da replicação, ocorre o brotamento pela membrana plasmática das células do inseto, permitindo que as partículas recém formadas a bicamada lipídica, formando novos vírions. Após deixar as células intestinais, os rhabdovirus vegetais geralmente se espalham para outros órgãos. Embora ainda não seja esclarecida como este movimento ocorra, as informações contidas na literatura e dados atuais indicam que as partículas virais se movem através do sistema nervoso e/ou hemolinfa do inseto, até se alojar na glândula salivar do animal, estes possíveis caminhos estão ilustrados na **Figura 12** (Hogenhout et al., 2003). Quando este inseto vier a se alimentar de uma planta suscetível, ele estará apto a transmitir o vírus, que uma vez dentro da célula vegetal, pode se propagar para as células vizinhas por meio do plasmodesma.

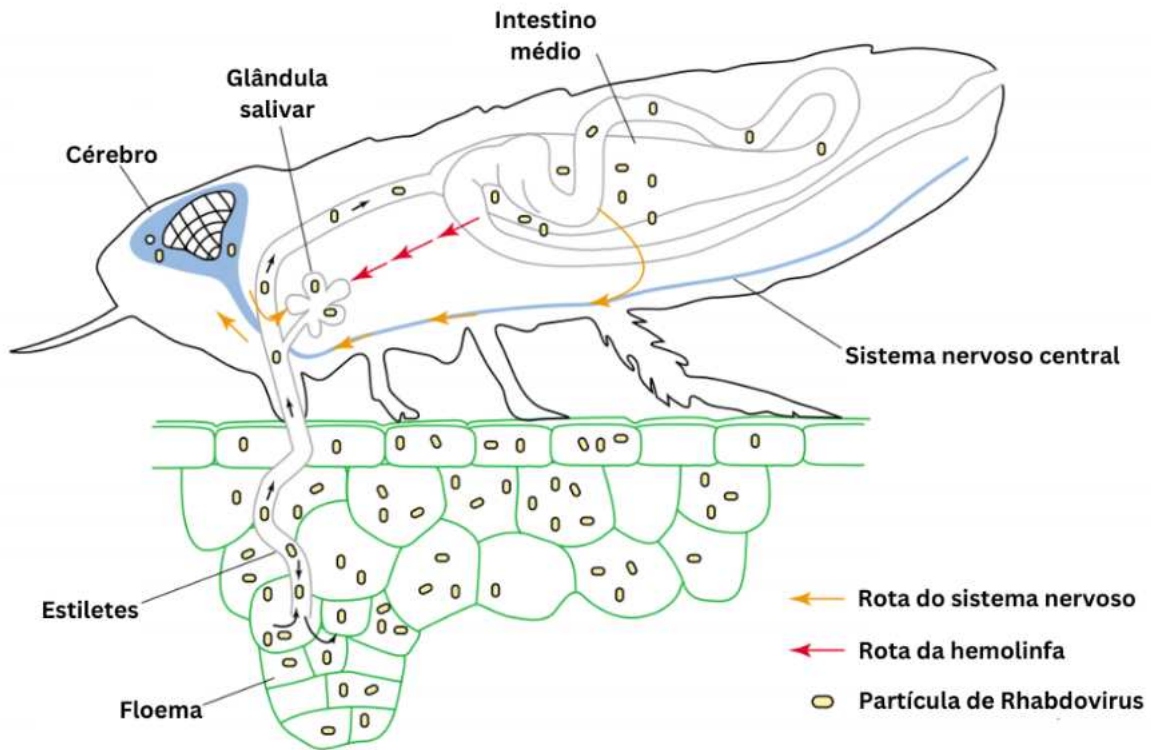


Figura 12 - Ilustração dos caminhos de transmissão propagativa persistente de um Rhabdovirus vegetal em uma cigarrinha. As partículas virais são obtidas através do herbivorismo de células vegetais infectadas. Os vírus entram pelo estilete e se movem do lúmen do intestino médio através da camada de células epiteliais para a hemolinfa e/ou células nervosas e cérebro. Após infectarem diferentes tecidos do inseto, eles chegam às glândulas salivares e são introduzidos em novas plantas hospedeiras através do canal salivar durante a alimentação do animal (Hogenhout et al., 2003).

Os rhabdovirus que apresentam plantas como hospedeiros e material genético não segmentado foram separados em dois gêneros, *nucleorhabdovirus* (atualmente distribuído em *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus* e *Gammanucleorhabdovirus*) e os próprios *cytorhabdovirus*. As espécies de ambos os gêneros são transmitidas de maneira persistente por alguns vetores, dentre eles ácaros brevipalpus e fungos do filo quitrídios, além de insetos da ordem Hemiptera, como cigarrinhas e afídeos (Dietzgen et al., 2016).

Os sintomas causados pelo PCV no maracujá ainda não estão esclarecidos. Podendo se levar em conta a possibilidade dele se manifestar com sintomas prodrômicos como manchas foliares amarelas e manchas de clorose com amarelamento, como visto em maracujazeiros infectados pelo citrus-associated rhabdovirus (Zhang et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

O trabalho realizado pela Embrapa, em que nosso grupo é colaborador (Vidal et al., 2023), levantou questões. Como a busca por entender o mecanismo de transmissão desse novo vírus, PCV. É importante entender quais são seus possíveis mecanismos de propagação, a fim de exercer um possível controle de seu espalhamento. Neste sentido, este projeto visa analisar as possíveis vias de transmissão desse vírus para o maracujazeiro.

Além disso, estudos recentes têm mostrado que há um conjunto de vírus presentes em plantas infectadas com o CABMV. Originalmente pensava-se tratar de infecções simples, mas amostras de campo estudadas por Vidal et al., 2023 e Pinheiro-Lima et al., 2020, observa-se que há também a presença de outros membros de famílias virais distintas, especialmente o CPMMV e o PCV. Faz-se necessário, portanto, buscar entender como a transmissão deste trio de vírus encontrados em coinfeções se dá em maracujazeiro, formando estas infecções mistas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa avaliar possíveis vias de transmissão das infecções por CABMV, CPMMV e PCV em *Passiflora spp.*

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a transmissão do CABMV, CPMMV e PCV pelo processo de estaquia;
2. Avaliar a transmissão mecânica do CABMV, CPMMV e PCV;
3. Avaliar a transmissão do CABMV, CPMMV e PCV através do afídeo *Aphis gossypii*;

4 MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Maracujazeiros

Sementes de plantas saudáveis de *Passiflora edulis* foram germinadas na casa de vegetação do Laboratório de Virologia Molecular Vegetal (LVMV). Foram utilizadas sementes comerciais sadias, da marca Isla. As sementes foram inseridas em pequenos potes, de base quadrada de 4 cm por 4 cm e altura de 5 cm, a cerca de 0,8 centímetro abaixo do substrato, que é composto por três quartos de substrato Mec Plant Co. e um quarto de vermiculita. Posteriormente o solo é regado abundantemente e passa a ser monitorado e a receber irrigação ao passar do tempo. Após a germinação, quando atingem o tamanho apropriado das raízes e apresentam folhas verdadeiras, as mudas são transplantadas para potes maiores, com 6 cm de raio e 14 cm de altura, contendo o mesmo substrato e passando pela mesma manutenção em relação à irrigação. Essas plantas foram usadas no protocolo de transmissão viral.

4.2 Fonte de inóculo viral

O reservatório viral para o protocolo de inoculação por vetores foi uma planta de maracujá coletada da estação experimental da Embrapa em Seropédica, Rio de Janeiro. Ela se encontra na casa de vegetação do LVMV, e foi designada com os códigos 2646 e pelo código S0. O maracujazeiro foi diagnosticado em colaboração com a equipe da Dra. Simone Ribeiro, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargem).

Para o protocolo de inoculação mecânica, a fonte de inóculo foi outra planta de maracujá, também coletada da estação experimental da Embrapa em Seropédica, Rio de Janeiro. Esta planta foi denominada de 16d, e foi previamente diagnosticada, também em colaboração com a equipe da Dra. Simone Ribeiro.

4.3 Afídeos

Afídeos da espécie *Aphis gossypii* foram mantidos na casa de vegetação do LVMV, no prédio do Centro de Ciências da Saúde (CCS). Esta casa de vegetação que conta com iluminação natural, isolamento do ambiente externo e temperatura controlada. Os insetos foram mantidos em plantas de algodão dentro de gaiolas de PVC e malha, que impedem a saída ou entrada de insetos. Dentro da estrutura se encontram plantas saudáveis de algodão, da espécie *Gossypium hirsutum*. Esses animais foram usados como possíveis vetores para os vírus testados, devido a familiaridade do LVMV com a espécie e sua alta capacidade descrita na literatura de atuar como vetor viral.

4.4 Avaliação da transmissão por inoculação através de vetores

Foram coletados pulgões saudáveis de plantas de algodão, estes insetos foram realocados na planta 2646, sendo esta isolada por gaiola contra entrada ou saída de insetos. Os pulgões ficaram nessa condição durante um período pré determinado denominado tempo de aquisição, sendo mantidos em temperatura ambiente. Após o término do tempo de aquisição, alguns afídeos foram selecionados para serem transplantados para jovens plantas saudáveis (**Figura 13**).



Figura 13 - Ilustração do protocolo de inoculação através de vetores. A primeira parte da imagem mostra pulgões avirulíferos mantidos em plantas de algodão, *Gossypium hirsutum*. Estes insetos são transplantados para planta de maracujá infectada e isolada por gaiola de voal, segunda parte da imagem. A última porção da imagem ilustra o transplante dos pulgões da fase anterior, após o tempo de aquisição, para plantas saudáveis de maracujá, que serão submetidas a diagnóstico posterior para os vírus. Criado com BioRender.com, 2023.

4.5 Avaliação da transmissão por inoculação mecânica

Folha da planta de maracujá 16d, oriunda de Seropédica, Rio de Janeiro, coletada e cedida pela Embrapa foi utilizada como fonte de inóculo. O tecido foi macerado em um cadinho juntamente com tampão fosfato. Esse extrato foi espalhado na superfície foliar de plantas saudáveis na casa de vegetação. A esquematização deste processo pode ser vista na **Figura 14**. A inoculação foi feita ao aplicar a solução do macerado manualmente na folha da planta alvo, manipulando diretamente a solução com a mão, utilizando-se luva de nitrílica, realizando fricção entre a folha e a luva, simulando condições que podem ocorrer em campo, como atrito causado pela proximidade entre folhas, por movimentação animal ou atividade humana.



Figura 14 - A imagem ilustra o protocolo de inoculação mecânica adotado durante o atual projeto. Os itens mostrados são, da esquerda para direita, a “Folha destacada da planta sintomática” (16d), “Tampão fosfato”, “Cadinho e pistilo” autoclavados e um “Maracujá jovem saudável!”. Criado com BioRender.com, 2023.

4.6 Avaliação da transmissão por estaquias

Foram cortados galhos de aproximadamente 40 cm da planta original. Foram então retiradas as folhas dessas estruturas, que após essa correção foram colocadas em um recipiente com água, até ocorrer a formação de raízes do tamanho desejável. Após o crescimento adequado das raízes, cerca de 6 cm, as estacas foram plantados em solo (**Figura 15**).

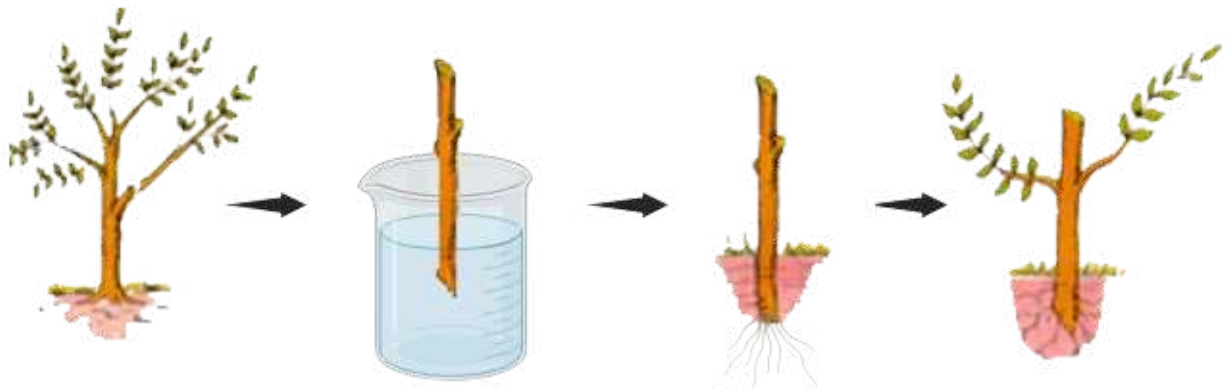


Figura 15 - A imagem ilustra o protocolo de estaquia adotado no presente projeto. Setas marcam a passagem de uma etapa do processo para a seguinte. Iniciando no corte do ramo desejado da “planta mãe”, seguido pela retirada das folhas do ramo e alojamento deste em recipiente com água. A terceira etapa é o plantio do ramo em solo quando esse já apresenta raízes de tamanho satisfatório. A última etapa é o desenvolvimento de novos tecidos a partir deste ramo. Adaptado de Conheça algumas técnicas de propagação | HM Jardins - Floricultura e Jardinagem. (2021, December 22). <https://hmjardins.com.br/tecnica-alporquia/>. Acesso: 27 de novembro de 2023. Criado com BioRender.com, 2023.

4.7 Amostras foliares

Para realizar as análises moleculares das plantas envolvidas no experimento, foi utilizado seu tecido foliar. As folhas coletadas foram embrulhadas em papel alumínio, identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido até serem guardadas em freezer -80°C .

4.8 Extração de RNA total e Transcrição Reversa (RT)

Utilizando de cadinho e pistilo autoclavados, as folhas coletadas eram maceradas até se formar um pó de cor esbranquiçada e 100 mg do pó era transferido para tubos Eppendorf. Ao pó, era adicionado 1 ml de TRIzol (Invitrogen). Essa mistura permanecia 5 minutos em temperatura ambiente, depois foi adicionado 200 µl de clorofórmio gelado, a solução passava por vórtex e era deixada à temperatura ambiente por 3 minutos. Após essa etapa, a solução era centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4° C. Após isso, foram formadas três fases. A fase aquosa, em que se encontra o RNA total, era recuperada e transferida para outro tubo Eppendorf. Para a precipitação do RNA foi utilizado isopropanol, 500 µl, e a nova solução ficou por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois, os tubos eram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, tendo sido antes agitada em vórtex. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado. O pellet de RNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 75% gelado, seguido de centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. Após isso, o sobrenadante era descartado e o Eppendorf permanecia aberto por cerca de 10 minutos para que o etanol evaporasse por completo. Para a ressuspensão do RNA, foram adicionados de 40 µl de água *Milli Q* nos tubos Eppendorf já secos e estes permaneciam em termobloco por 15 minutos a 55 °C. O RNA extraído era armazenado em freezer -80 °C para seguir as próximas etapas. A etapa seguinte foi a aplicação da DNase, foi utilizada a *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), com o objetivo de degenerar qualquer DNA que esteja presente na amostra extraída. Foram adicionados 8 µl do RNA extraído, 1µl de *RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer*, e por fim, 1 µl de *RQ1 RNase-Free DNase* a 1 U/µl. Essa solução foi incubada por 30 minutos em 37 °C. Após isso, nela foi adicionado 1 µl *RQ1 DNase Stop Solution*. A solução resultante foi incubada a 65 °C por 10 minutos, para inativar a DNase. Para a Transcrição Reversa foi utilizada a enzima SuperScript IV (*Thermo Fisher Scientific*). Foi feito o primeiro mix contendo: 0,5µl de Oligo (dT) a 50 µM, 0,5µl de *random primer* a 50 µM, 1 µl de dNTP a 10 µM e os 11 µl de RNA gerados após a etapa de DNase. Essa solução foi misturada e centrifugada rapidamente e depois direcionada ao termobloco por 5 minutos a temperatura de 65°C. Terminado o tempo, a amostra foi imediatamente para o gelo, por no mínimo 1 minuto.

Após isso, foi feito um segundo mix apresentando: 4 µl de 5x *SSIV Buffer*, 1 µl de DTT a 100mM, 1 µl de RNase OUT e 1 µl da *SuperScript IV* a 200 U/µl. Esse mix foi adicionado ao primeiro, gerando um volume total de 20 µl que serão processados em um termociclador, passando por 23°C por 10 minutos, seguido de 40 minutos em 53°C e 80°C/10min finais,

finalizando a formação do cDNA que deve ser armazenado em -20°C . Após a RT foi utilizada a RNase A a 10 mg/ml (*Thermo Fisher Scientific*), e a amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos com 0,5 μl do reagente, para degradar o RNA na amostra.

4.9 Polymerase chain reaction (PCR) e Eletroforese

Para os testes de PCR para CPMMV e PCV, foi usada a *Taq* DNA Polymerase, Recombinant 5 U/ μL (*Thermo Fisher Scientific* - Catalog number: EP0402). A reação de PCR foi realizada utilizando-se 1 μl de c-DNA, 16,9 μl de água *Milli Q*, 2,5 μl de 10X Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [750 mM Tris-HCl; 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.1% (v/v) Tween 20] (*Thermo Fisher Scientific* - Catalog number: B33), 2 μl de MgCl_2 25 mM, 0,5 μl de dNTP mix 10 mM, 1 μl de Primer forward a 10 μM , 1 μl de primer reverse a 10 μM e 0,1 μl da enzima *Taq*. Em um volume total de reação de 25 μl .

Para a PCR de detecção do CABMV, exceto na amostra controle positivo, foi usada a Platinum *Taq* DNA Polymerase a 5 U/ μl (*Thermo Fisher Scientific* - Catalog number: 15966005). A reação utilizou 1,5 μl de c-DNA, 16,2 μl de água *Milli Q*, 2,5 μl de 10 X *Taq* DNA Polymerase PCR Buffer [200 mM Tris HCl; 500 mM KCl] (*Thermo Fisher Scientific* - Catalog number: 18067017), 2 μl de MgCl_2 25 mM, 0,5 μl de dNTP mix 10 mM, 1 μl de Primer forward a 10 μM , 1 μl de primer reverse a 10 μM e 0,3 μl da enzima *Taq*. Em um volume total de reação de 25 μl .

As reações de PCR foram realizadas em termociclador nas condições descritas para cada par de primers, as sequências de cada primer estão descritas na **Tabela 1**. As condições para os primers para CABMV, específicos para o gene de seu capsídeo e com amplicon esperado de 1311 nt (nucleotídeos), se encontram na **Tabela 2**. As condições para os primers para CPMMV, específicos para o gene de seu capsídeo e com amplicon esperado de cerca de 500 nt, se encontram na **Tabela 3**. As condições para os primers para PCV, específicos para o gene de sua nucleoproteína e com amplicon esperado de 1488 nt, se encontram na **Tabela 4**.

Após a finalização a reação de PCR, a revelação do *amplicon* foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Cada poço do gel recebeu 10 μl da reação de PCR homogeneizada com 1 μl de *BlueJuice Gel Loading Buffer* (10X) (*Thermo Fisher Scientific*). A corrida de eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X.

Todos os primers e as condições dos PCRs utilizados neste trabalho foram desenvolvidos no laboratório coordenado pela Dra. Simone Ribeiro na EMBRAPA CENARGEN, Brasília, DF.

Tabela 1: Sequências de primers usados para a realização da PCR.

Primer	Sequência (5'-3')
CPMMV-4000F	AACTGGCCTTAGTGAACCTACA
CPMMV-4500R	ATTAGCTCTGTCCTGGGGT
CABMV_M1MX3726F	GAGACACAAGCCAAAACACAAAATC
CABMV_M1MX5029R	CGTTGCTACAAATTCTGGTATCTCC
PCV-Bag-N-182F	GCAGAACAGCATTCTGTGATCA
PCV-Bag-N-1648R	CAGCCTTCTTTGCCTTATCGTT

Tabela 2: Condições de termociclagem para os primers específicos utilizados para o CABMV.

CABMV

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1X
Desnaturação	95°C	15 segundos	35X
Anelamento	60°C	1 minuto	
Extensão	72°C	1 minutos e 40 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1X

Tabela 3: Condições de termociclagem para os primers específicos utilizados para o CPMMV.**CPMMV**

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1X
Desnaturação	94°C	30 segundos	35X
Anelamento	60°C	30 segundos	
Extensão	72°C	40 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1X

Tabela 4: Condições de termociclagem para os primers específicos utilizados para o PCV.**PCV**

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1X
Desnaturação	94°C	30 segundos	35X
Anelamento	60°C	30 segundos	
Extensão	72°C	1 minutos e 50 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1X

5 RESULTADOS

Os diagnósticos para as infecções virais foram realizadas por meio de técnica de RT-PCR para os vírus alvo, cowpea aphid-borne mosaic virus (cabmv), cowpea mild mottle virus (CPMMV) e do *Passiflora cytorhabdovirus* (PCV). Foram utilizadas amostras de tecido foliar para análise. Foram testadas a viabilidade da transmissão mediada pelo vetor *Aphis gossypii*, transmissão mecânica e propagação da infecção após processo de estaquia. Como fonte de inóculo viral, foram utilizadas plantas coletadas de campo em Seropédica, Rio de Janeiro. Estas plantas de maracujá, da espécie *Passiflora edulis*, foram analisadas pelo LVMV em colaboração com a equipe da Dra. Simone Ribeiro, Embrapa Cenargen. Como reservatório viral para o protocolo de inoculação mediada por vetor, foi escolhida a planta 2646, também nomeada no atual trabalho como S0. Sua análise (**Figura 16**) apresentou diagnóstico positivo para a presença dos vírus CABMV e PCV, e resultado negativo para presença do CPMMV e CABYV (cucurbit aphid-borne yellows virus), este último não sendo alvo de experimentação no atual projeto.

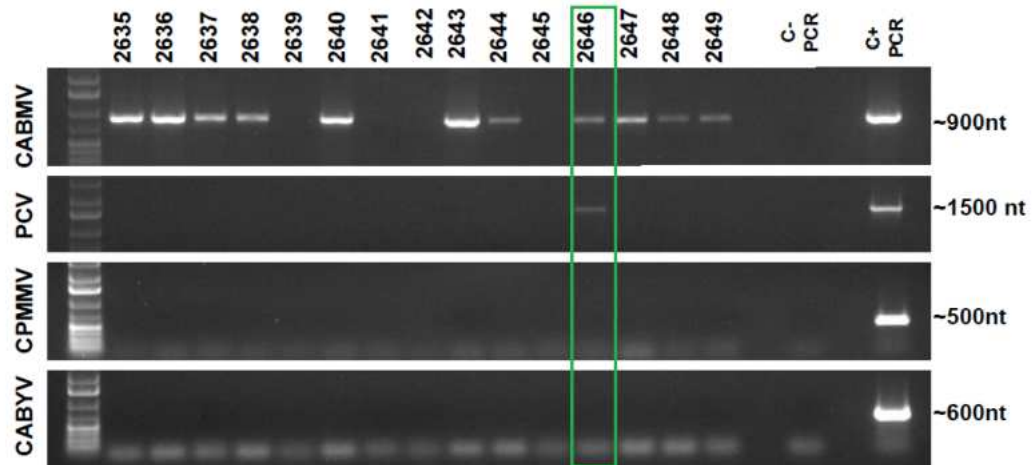


Figura 16 – Foto de quatro géis de eletroforese mostrando amplicons obtidos por RT-PCR para os vírus CABMV (painel superior) com amplicon esperado de aproximadamente 900 nt, PCV (2º painel) com amplicon esperado de aproximadamente 1500 nt, CPMMV (3º painel) com amplicon esperado de aproximadamente 500 nt e CABYV (painel inferior) com amplicon esperado de aproximadamente 600 nt. Os resultados da planta de código 2646 estão delimitados na imagem pelo retângulo verde. Experimento realizado por colaboração LVMV e Andreza H. Vidal (EMBRAPA Cenargen).

Devido a seu diagnóstico positivo para dois dos três vírus de interesse, a planta S0 foi selecionada para ser utilizada como fonte de inóculo para os testes de transmissão viral. Na realização do primeiro experimento, cerca de cem insetos foram colocados na planta S0 e isolados com um voal. Após os tempos estipulados de 2, 5 e 7 dias (tempo de aquisição) estes insetos seriam transplantados para plantas saudáveis. No entanto, no decorrer de dois dias os pulgões desapareceram da planta em que foram colocados. Transplantar diretamente os pulgões do algodão para o maracujá ainda foi testado mais três vezes, todas resultando no desaparecimento dos insetos em cerca de dois dias. Uma possibilidade levantada foi a resistência deles em se alimentar do maracujá, levando os mesmos a abandonarem a planta para o solo, onde posteriormente morreram.

Em função da dificuldade da manutenção dos afídeos nas plantas de maracujá, adotamos uma nova metodologia. Realizamos um período pré aquisição, em que os pulgões coletados das plantas de algodão, eram mantidos isolados em uma placa de Petri vazia por duas horas, para ficarem com maior apetite, tornando o maracujá mais aprazível (**Figura 17**). Após esse intervalo, os pulgões foram realocados em uma placa contendo uma folha destacada da planta S0, como visto na **Figura 18**. No pecíolo destacado foi colocado um algodão úmido para aumentar a durabilidade da folha. Durante esses espaços de tempo a placa era mantida em uma câmara de crescimento BOD (Biochemical Oxygen Demand), com temperatura de 24°C e iluminação artificial ativada. Após o tempo de aquisição desejado os pulgões foram transplantados para plantas saudáveis de maracujá, onde se observou sua permanência no vegetal, o que foi entendido como uma adequação ao novo estilo de alimentação.

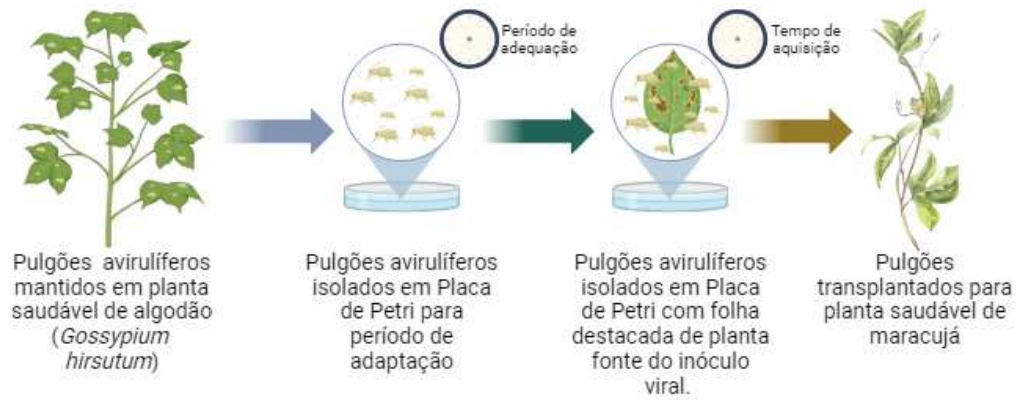


Figura 17 - A imagem ilustra o protocolo de avaliação da inoculação através de vetores. As setas indicam o progresso entre as diferentes etapas. A seta azul denota a passagem de pulgões livres de vírus, mantidos na planta de algodão, para uma placa de Petri vazia, se dando início ao período de pré-aquisição. A seta verde, mostra a passagem dos pulgões da etapa anterior para uma placa de Petri contendo uma folha destacada que servirá como fonte de inóculo. A seta marrom indica o transplante dos pulgões, da fase anterior, para uma planta de maracujá saudável. Criado com BioRender.com, 2023.

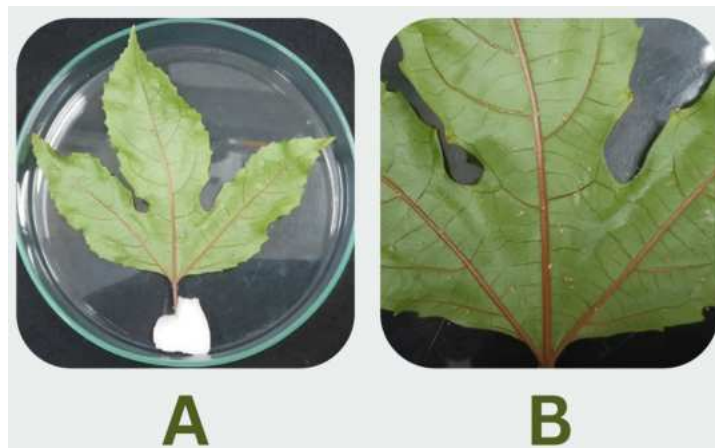


Figura 18 - Estabelecimento de método de adaptação de pulgões *Aphis gossypii* ao maracujazeiro. Em “A”, podemos ver a folha destacada da planta 2646 em uma Placa de Petri, juntamente com pulgões. Em “B”, está apresentada uma imagem mais próxima da organização presente em “A” para melhorar a percepção da presença dos insetos. Acervo pessoal, 2023.

Para o protocolo de transmissão mecânica, foi utilizada como fonte de inóculo viral a planta de maracujá 16d coletada em Seropédica, Rio de Janeiro. Diagnosticada através de colaboração LVMV e Embrapa Cenargem, ela foi diagnosticada positiva para CABMV, CPMMV e PCV, e teve diagnóstico negativo para o CABYV, como pode ser visto na **Figura 19**.

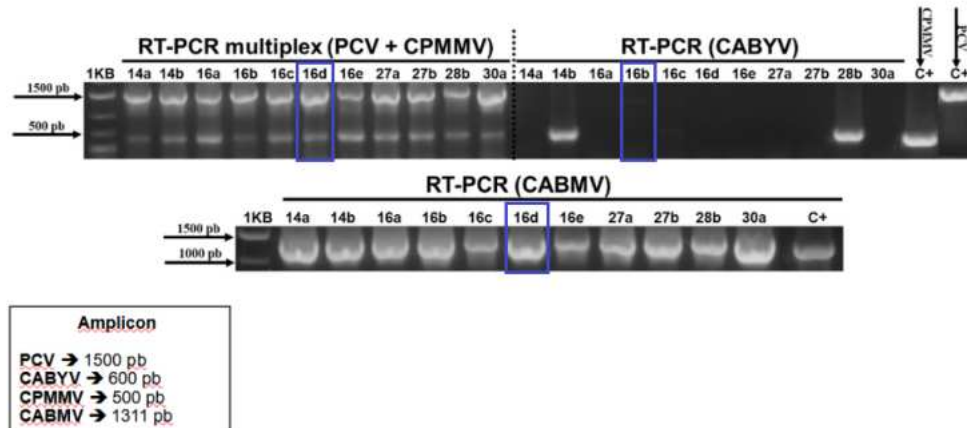


Figura 19 – Foto de três géis de eletroforese mostrando amplicons obtidos por RT-PCR para os vírus CABMV, PCV, CPMMV e CABYV, com tamanhos de amplicon esperados de aproximadamente 1311 nt, 1500 nt, 500 nt e 600 nt, respectivamente. Os resultados da planta de código 16d estão delimitados na imagem pelos retângulos azuis. Experimento realizado por colaboração LVMV e Andreza H. Vidal (EMBRAPA Cenargem).

5.1 Avaliação de vias de propagação do PCV

Os primeiros tempos de aquisição testados após o estabelecimento do novo protocolo de inoculação mediada por vetor foram de 6 e 10,5 horas. Trinta pulgões foram retirados das placas após cada período de aquisição. Cada grupo de trinta insetos foi dividido em três partes iguais, e transplantado para plantas saudáveis de maracujá. Amostras foliares dessas plantas foram coletadas em diferentes dias pós inoculação (dpi). Uma amostra coletada em cerca de dois meses e meio, 77 dpi, de uma planta que recebeu pulgões de 6 horas de tempo de aquisição, foi testada para a presença do PCV, o produto de RT-PCR desta amostra foi denominada “A 6h”, quarta coluna da **Figura 20**. Além disso, foi analisado material oriundo de uma planta de maracujá que recebeu inoculação mecânica, esta amostra foi denominada M0, segunda coluna da **Figura 20**. Como controle positivo para PCV, foi utilizado o produto da PCR de uma miniprep cedida pela equipe da Dra. Simone Ribeiro, gerando a banda esperada de aproximadamente 1500 nt.

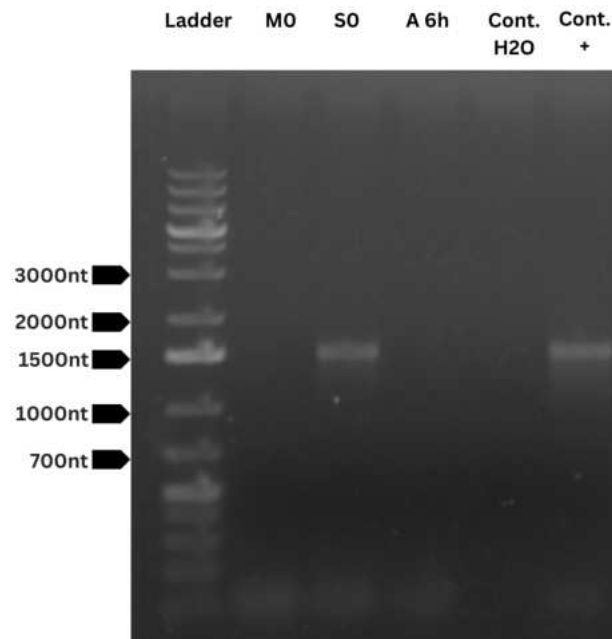


Figura 20 - Revelação em gel de eletroforese de amplicons de RT-PCR para PCV. Primeira coluna: peso molecular (Ladder); Segunda coluna: M0, produto de RT-PCR de amostra extraída de planta submetida ao protocolo de inoculação mecânica; Terceira coluna: produto de RT-PCR de amostra S0; Quarta coluna: A 6h, produto de RT-PCR de amostra extraída de planta submetida ao protocolo de inoculação por vetores, se adotando o tempo de aquisição de 6 horas; Quinta coluna: controle água; Sexta coluna: produto de PCR do controle positivo. As setas pretas indicam o tamanho das bandas do peso molecular (Ladder). O amplicon esperado tem cerca de 1500 nt.

Em outro experimento, foram analisadas plantas que receberam pulgões com diferentes tempos de aquisição: 24, 48 e 121 horas. Cada planta analisada recebeu 24 pulgões. Três plantas de maracujá foram utilizadas para cada tempo de aquisição. Folhas sistêmicas, que não entraram em contato direto com os pulgões, foram coletadas de cada planta, após: 5, 10, 15, 20 e 30 dias. Trinta dias após o contato com os pulgões, RNA total de três plantas, dois maracujás com pulgões 48 horas de aquisição e outro com 121 horas de aquisição foram obtidos. Após a extração do RNA das três amostras, a fim de preservar reagentes, foi feito um *pool* de RNA contendo RNA de duas plantas independentes que receberam pulgões de 48 horas de aquisição e RNA de uma planta com afídeos que passaram 121 horas em contato com a folha infectada. O produto do RT-PCR para detecção do PCV deste *pool* foi submetido a eletroforese, e foi identificado como “Pool 48h 121h” que pode ser vista na **Figura 21**.

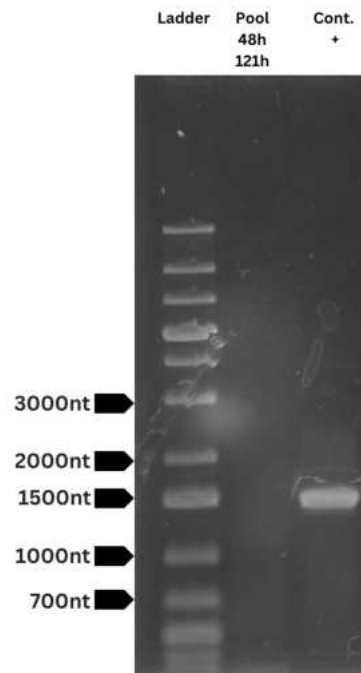


Figura 21 - Revelação em gel de eletroforese de amplicons de RT-PCR para PCV. Primeira coluna: peso molecular (Ladder); Segunda coluna: produto de RT-PCR de pool de RNAs (POOL) de 3 plantas independentes de maracujá que foram inoculadas com pulgões após tempos de aquisição do PCV de 48 e 121 horas; Terceira coluna: controle positivo (Controle +); As setas pretas indicam o tamanho das bandas do peso molecular (Ladder). O amplicon esperado tem cerca de 1500 nt.

Como pode ser visto na **Figura 21**, o controle positivo apresentou a banda esperada, indicando que o PCR ocorreu da maneira desejada, no entanto, o *pool* não apresentou a banda de 1.5 Kb, ou seja, em nenhuma das três amostras presentes nele, estava presente o vírus. Caso contrário, seria feito um teste individual em cada uma das amostras a fim de identificar por qual(is) tempo(s) de aquisição o vírus foi passível de ser transmitido pelo afídeo. O resultado foi negativo, sendo necessário mais análises para se compreender se existe ou não a atuação deste afídeo com o ciclo de transmissão do PCV.

Na validação da transmissão do PCV por estaquia, 6 estacas foram usadas como amostras. As estacas M1, M2 e M3, foram originadas da planta M0. As estacas S3, S4 e S5, foram geradas a partir da planta S0. Tanto as “plantas mãe” como as estacas geradas apresentaram sintomas de deformação foliar, bolhosidades, desenvolvido foliar bastante alterado e mosaico, mostrados na **Figura 22**.

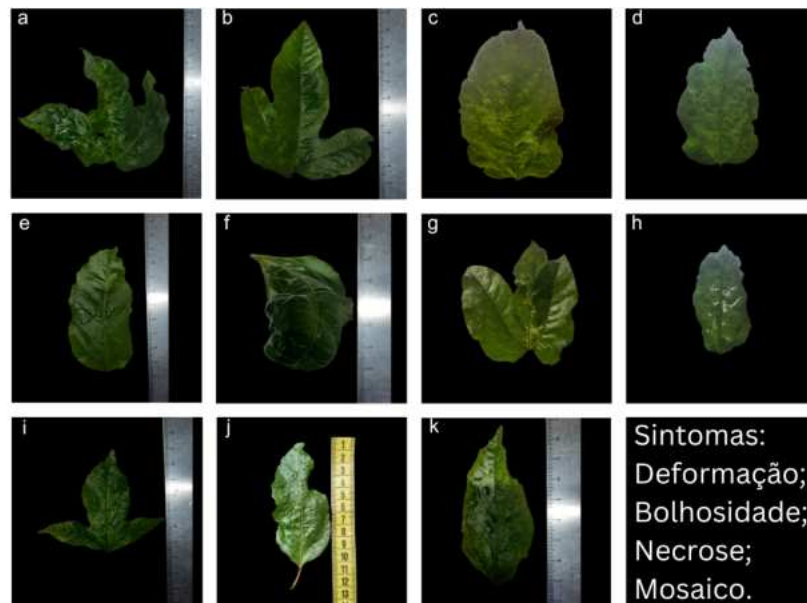


Figura 22 - Exemplificação de sintomas identificados durante o atual projeto. Os principais sintomas apresentados foram: deformação, bolhosidade, necrose e mosaico. (a) folha da planta M0; (b) folha da planta M1; (c) folha da planta M1; (d) folha da planta M2; (e) folha da planta M2; (f) folha da planta M3; (g) folha da planta M3; (h) folha da planta S1; (i) folha da planta S3; (j) folha da planta S4; (k) folha da planta S5.

Após 45 dias parcialmente imersas em água, as estacas geraram raízes do tamanho desejado e foram transplantadas para solo. As folhas que começaram a se desenvolver durante o período de 45 dias, foram retiradas antes do transplante. Depois de 33 dias, foram coletadas as novas folhas desenvolvidas por estas estacas. Essas amostras foliares foram analisadas por RT-PCR para a presença de PCV, o produto do RT-PCR foi revelado em eletroforese (**Figura 23**). As amostras M0, M1 e M2 tiveram diagnóstico negativo, ao não apresentarem banda aproximada de 1500nt, esperada como indicativo para presença do PCV. Porém, todas as amostras de estacas geradas a partir da planta S0, (S3, S4 e S5), assim como ela própria se mostraram positivas para a presença do PCV, ao apresentarem a formação característica de banda. A sexta coluna, amostra M3, teve seu diagnóstico julgado como inconclusivo, por apresentar uma banda de baixíssima intensidade. Para esclarecer esta análise, a amostra M3 foi submetida a uma nova eletroforese, que teve seu resultado negativo. Indicando que, possivelmente, na análise anterior (**Figura 23**) ocorreu o extravasamento do produto do sétimo poço para o sexto, gerando a aparição da banda que levou a dificuldade de diagnóstico da amostra M3.

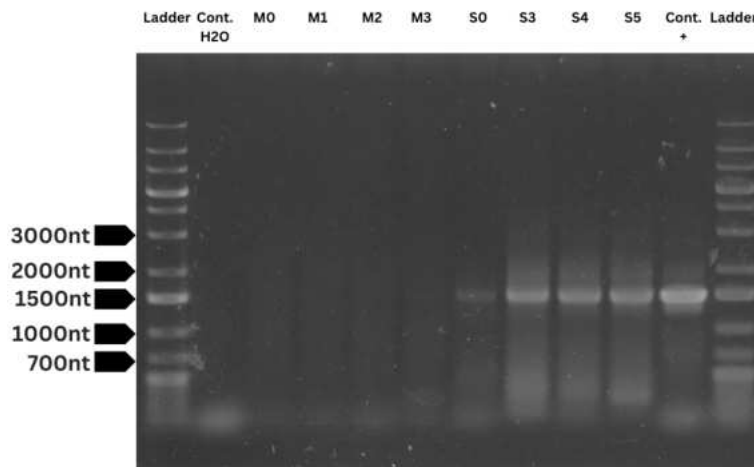


Figura 23 - Revelação em gel de eletroforese de amplicons de RT-PCR para PCV. Primeira coluna: peso molecular (Ladder); Segunda coluna: controle água; Terceira coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M0; Quarta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M1; Quinta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M2; Sexta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M3; Sétima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S0; Oitava coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S3; Nona coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S4; Décima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S5; Décima primeira coluna: produto de PCR do controle positivo, produto de miniprep cedido pela equipe da Dra. Simone Ribeiro; Décima segunda coluna: peso molecular (Ladder). As setas pretas indicam o tamanho das bandas do peso molecular (Ladder). O amplicon esperado tem cerca de 1500 nt.

5.2 Avaliação de vias de propagação do CABMV e CPMMV

As amostras de c-DNA utilizadas para realizar o último experimento descrito acima, referente a **Figura 23**, foram usadas em reação de PCR para diagnóstico de CABMV e CPMMV. Além das amostras usadas no teste anterior, se acrescentou a amostra “Pool 48h 121h”.

A revelação do gel de eletroforese dos produtos de RT-PCR para CABMV destas amostras pode ser vista na **Figura 24**. Com banda esperada indicativa para presença do CABMV de aproximadamente 1300 nt, as amostras M0, M1, M2, M3, S3 e S5, apresentaram resultado positivo. Enquanto as amostras S0 e S5, apresentaram resultado negativo. O produto de RT-PCR de uma planta de maracujá pertencente a outro projeto do LVMV foi utilizado como controle negativo.

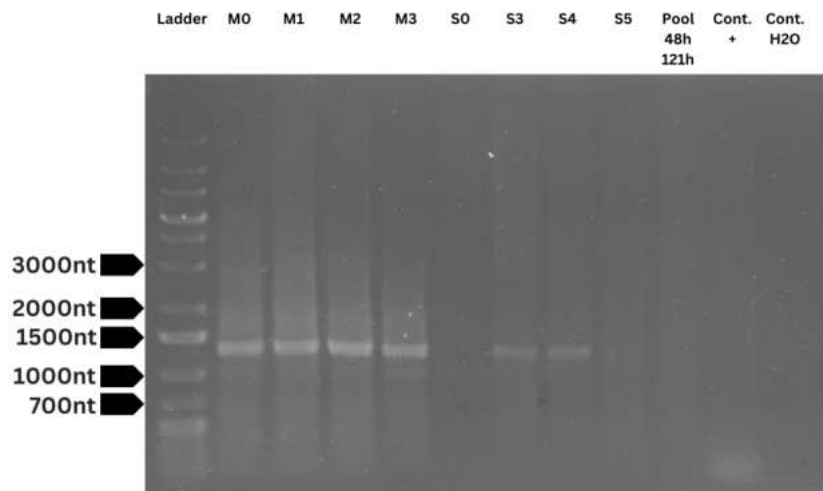


Figura 24 - Revelação em gel de eletroforese de amplicons de RT-PCR para CABMV. Primeira coluna: peso molecular (Ladder); Segunda coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M0; Terceira coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M1; Quarta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M2; Quinta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M3; Sexta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S0; Sétima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S3; Oitava coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S4; Nona coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S5; Décima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta Pool 48h 121h; Décima primeira coluna: produto de RT-PCR do controle positivo; Décima segunda coluna: controle água. As setas pretas indicam o tamanho das bandas do peso molecular (Ladder). O amplicon esperado tem cerca de 1300 nt.

A revelação do gel de eletroforese dos produtos de RT-PCR para CPMMV das amostras M0, M1, M2, M3, S0, S3, S4, S5 pode ser vista na **Figura 25**. A banda esperada para o amplicon indicativo para o CPMMV é de cerca de 500nt. A amostra utilizada como controle positivo foi uma eluição de DNA fornecida pela equipe da Dra. Simone Ribeiro. A amostra S4 apresentou banda positiva para a presença do CPMMV, enquanto as demais amostras apresentaram resultado negativo.

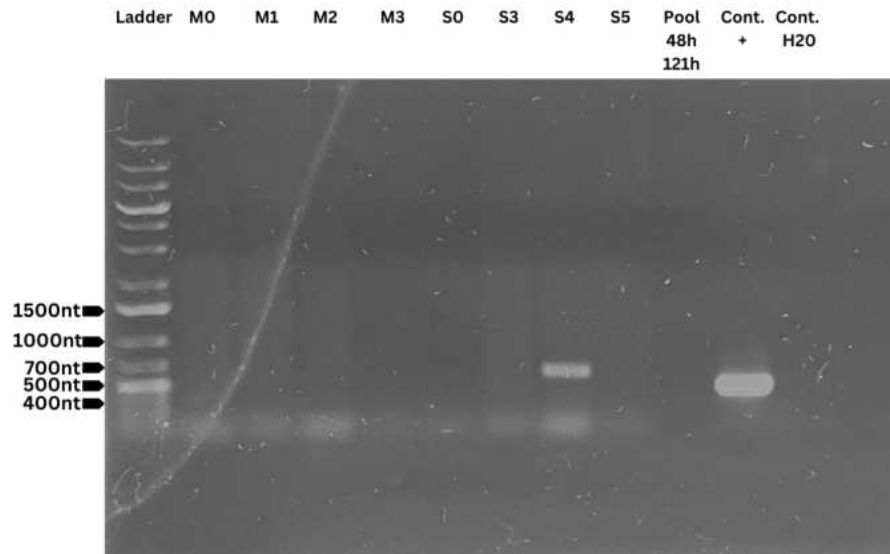


Figura 25 - Revelação em gel de eletroforese de amplicons de RT-PCR para CPMMV. Primeira coluna: peso molecular (Ladder); Segunda coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M0; Terceira coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M1; Quarta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M2; Quinta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta M3; Sexta coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S0; Sétima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S3; Oitava coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S4; Nona coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta S5; Décima coluna: produto de RT-PCR de amostra extraída da planta Pool 48h 121h; Décima primeira coluna: produto de RT-PCR do controle positivo; Décima segunda coluna: controle água. As setas pretas indicam o tamanho das bandas do peso molecular (Ladder). O amplicon esperado tem cerca de 500 nt.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho se observou uma dificuldade de manutenção dos pulgões transplantados da planta de algodão para o maracujazeiro. Embora o afídeo seja reconhecido por causar dano a plantações de maracujá, por meio de herbivorismo ou por sua atuação como vetor viral, a maioria dos dados não os classifica como colonizadores de maracujá (Di Piero et al., 2006). Isto indica possível falta de predileção do inseto para a planta de maracujá. Além disso, o inseto se encontrava em uma alimentação restrita ao algodão, planta com a qual apresenta afinidade, provavelmente gerando uma maior dificuldade na adaptação com outro tipo de alimentação. Se fazendo necessária a adoção do período de adequação.

Nos experimentos de transmissão mediado por vetor, todos os resultados foram negativos para transmissão do CABMV, CPMMV e PCV através do vetor em potencial *Aphis gossypii*. A interação vírus-vetor apresenta especificidade, sendo um possível motivo pelo qual o CPMMV e o PCV não foram transmitidos por esta espécie de inseto (Ng & Falk, 2006). Por outro lado, o CABMV apresenta dados de sua transmissão por meio deste afídeo como vetor, indicando que o resultado negativo pode ser resultado de uma carga viral menor do vírus na planta que serviu como fonte de inóculo (Santos Jiménez, 2021).

O CABMV foi o único agente a apresentar resultado positivo para transmissão mecânica. O que corrobora com o conhecimento presente na literatura sobre a capacidade deste agente de se propagar desta maneira (Colariccio et al., 2020). Ademais, o vírus foi capaz de se manter nas estacas geradas a partir da planta de maracujá que recebeu o inóculo mecânico.

Em relação ao diagnóstico das estacas originadas da planta 2646, o PCV foi mantido em todas as estacas, tendo resultado positivo nestas, assim como na planta original. Por outro lado, o CABMV, foi capaz de se manter em duas das três estacas, o que sugere uma eficiência menor para propagação por estaquia que o PCV. No entanto, a planta original apresentou resultado negativo para o mesmo. Este resultado possivelmente se deve a uma diferença na carga viral do tecido retirado para amostra da planta original em relação às estacas. Possivelmente o tecido foliar coletado da planta original apresentava uma menor presença viral, devido a sua maior idade, podendo apresentar um maior número de células em senescência, e um menor número de partículas virais em replicação.

O mesmo princípio de carga viral se aplica ao controle positivo do CABMV, que apresentou resultado negativo na análise realizada, possivelmente, por ser oriundo de uma amostra com menor carga viral, pelo mesmo fator de idade, por exemplo. Outra possibilidade, é o período em que o tecido foliar macerado usado para esta análise ficou armazenado em -80 °C, o que possibilita a degradação do material.

As estacas geradas a partir da planta 2646, apresentaram um único resultado positivo para a presença do CPMMV, o que indica que dentre os três vírus analisados, este apresenta a menor aptidão para realizar propagação através de estacas. Outro ponto relevante é a planta 2646 ter dado resultado negativo para a presença de CPMMV. A princípio, este resultado pode ser devido, assim como na análise do CABMV, à coleta de uma amostra com menor carga viral, possivelmente pela idade desta. No entanto, se destaca o fato da planta 2646, na análise realizada pela Embrapa, ter apresentado resultado negativo para o CPMMV, o que indica uma maior dificuldade na análise molecular deste vírus, necessitando de análises mais sensíveis para seu diagnóstico correto.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A. O *Aphis gossypii* não apresentou predisposição a se alimentar em planta de maracujá, sendo necessário um período de adequação;
- B. Os agentes CABMV, CPMMV e PCV não foram capazes de se propagar através do *Aphis gossypii* nas análises realizadas no presente estudo;
- C. Os agentes CPMMV e PCV não demonstraram capacidade de transmissão mecânica no decorrer do presente estudo;
- D. O CABMV apresentou capacidade de propagação mecânica;
- E. Os agentes CABMV, CPMMV e PCV demonstraram capacidade de propagação através do processo de estaquia, em diferentes graus de proficiência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (Adams, M., Candresse, T., Hammond, J., & Yoshikawa, N. (2011). Family Betaflexiviridae. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/285699196_Family_Betaflexiviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).
- A agricultura brasileira - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/vii-plano-diretor/a-agricultura-brasileira>. Acesso: 27 de novembro de 2023
- Alves-Freitas, D. M. T., Pinheiro-Lima, B., Faria, J. C., Lacorte, C., Ribeiro, S. G., & Melo, F. L. (2019). Double-Stranded RNA High-Throughput sequencing reveals a new cytorhabdovirus in a bean golden mosaic Virus-Resistant common bean transgenic line. *Viruses*, 11(1), 90. <https://doi.org/10.3390/v11010090>
- Ammar, E., Tsai, C., Whitfield, A. E., Redinbaugh, M. G., & Hogenhout, S. A. (2009). Cellular and Molecular Aspects of Rhabdovirus Interactions with Insect and Plant Hosts. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 447–468. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090454>
- Awasthi, S., Chauhan, R., & Narayan, R. K. (2016). Plant Viruses: History and Taxonomy. In Springer eBooks (pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-981-10-1406-2_1
- Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Da Silva Passos, I. R., & Meletti, L. M. M. (2008). *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira De Fruticultura*, 30(2), 566–576. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452008000200053>
- BetaFlexiviridae | ICTV. (n.d.). https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023).
- Carr, M. K. V. (2014). Passion fruit. In Cambridge University Press eBooks (pp. 252–264). <https://doi.org/10.1017/cbo9781139584012.014>
- Chai, M., Wu, X., Liu, J., Fang, Y., Luan, Y., Cui, X., Zhou, X., Wang, A., & Cheng, X. (2020). P3N-PIPO Interacts with P3 via the Shared N-Terminal Domain To Recruit Viral Replication Vesicles for Cell-to-Cell Movement. *Journal of Virology*, 94(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.01898-19>
- Chen, J., Doyle, C., Qi, X., & Zheng, H. (2012). The endoplasmic reticulum: a social network in plant cells. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(11), 840–850. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01176.x>
- Colariccio, A., Rodrigues, L. K., De Fátima Ramos, A., Chaves, A. L. R., Eiras, M., Harakava, R., & Peruch, L. a. M. (2020). Characterization of Cowpea aphid-borne mosaic virus in *Passiflora edulis* ‘Catarina’ in the southern coast of Santa Catarina State, Brazil. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 87. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000682019>
- Colson, P., La Scola, B., Levasseur, A., Caetano-Anollés, G., & Raoult, D. (2017). Mimivirus: leading the way in the discovery of giant viruses of amoebae. *Nature Reviews Microbiology*, 15(4), 243–254. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.197>
- Conheça algumas técnicas de propagação | HM Jardins - Floricultura e Jardinagem. (2021, December 22). Disponível em: <https://hmjardins.com.br/tecnica-alporquia/>. Acesso: 27 de novembro de 2023
- Cowpea Mild Mottle Virus é transmitido de modo semipersistente para o feijoeiro-comum. - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132674/cowpea-mild-mottle-virus-e-transmitido-de-modo-semipersistente-para-o-feijoeiro-comum>
- Deteção molecular do Cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV) em *Passiflora edulis* - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/978904/deteccao-molecular-do-cowpea-aphid-borne-mosaic-virus-cabmv-em-passiflora-edulis>

Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>

Di Piero, R. M., Rezende, J. a. M., Yuki, V. A., Pascholati, S. F., & Delfino, M. A. (2006). Transmissão do Passion fruit woodiness Virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology*, 35(1), 139–140. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2006000100019>

Dietzgen, R. G., Mann, K. S., & Johnson, K. N. (2016). Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential future research Directions. *Viruses*, 8(11), 303. <https://doi.org/10.3390/v8110303>

Disponível em:
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012872_10X_Taq_Buffer_with_NH4_2SO4_UG_.pdf. Acesso: 27 de novembro de 2023.

Dti, U.-S. e. C. ([s.d.]). Plataforma Sucupira. Gov.br. Recuperado 4 de dezembro de 2023, de https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8771903

EMBRAPA Mandioca e Fruticultura - Portal Embrapa. Disponível em: https://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf. Acesso em: 4 dez. 2023.

Family: Rhabdoviridae | ICTV. (n.d.). <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae>. Acesso: 27 de novembro de 2023

Fischer, I., Bullet, & Rezende, J. (2008). Diseases of Passion flower (*Passiflora* spp.). ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/228483390_Diseases_of_Passion_flower_Passiflora_spp

Fonseca, A., Geraldí, M. V., Maróstica, M. R., Silvestre, A. J. D., & Rocha, S. M. (2022). Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects. *Food Research International*, 160, 111665. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111665>

Fontenele, R. S., Abreu, R. A., Lamas, N. S., Alves-Freitas, D. M. T., Vidal, A. H., Poppiel, R. R., Melo, F. L., Lacorte, C., Martin, D. P., Campos, M. A., Varsani, A., & Ribeiro, S. G. (2018). Passion fruit chlorotic mottle virus: molecular characterization of a new divergent geminivirus in Brazil. *Viruses*, 10(4), 169. <https://doi.org/10.3390/v10040169>

Genus: Alphanucleorhabdovirus | ICTV. (n.d.). <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/alphanucleorhabdovirus>. Acesso: 27 de novembro de 2023

Genus: Cytorhabdovirus | ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/cytorhabdovirus>. Acesso: 27 de novembro de 2023

Genus: Potyvirus | ICTV. (n.d.). <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus>. Acesso: 27 de novembro de 2023

Genus: Potyvirus | ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus>. Acesso: 12 de dezembro de 2023

Giória, R. (2015). Caracterização biológica, serológica e molecular de uma estirpe do Passion Fruit Woodiness Virus (PWV) que infecta sistemicamente algumas cucurbitáceas. <https://doi.org/10.11606/t.11.2003.tde-20102003-162447>

Hamelin, F., Allen, L. J. S., Prendeville, H. R., Hajimorad, M. R., & Jeger, M. (2016). The evolution of plant virus transmission pathways. *Journal of Theoretical Biology*, 396, 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.02.017>

- Hogenhout, S. A., Ammar, E., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Hogenhout, S. A., Redinbaugh, M. G., & Ammar, E. (2003). Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. *Trends in Microbiology*, 11(6), 264–271. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00120-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00120-3)
- Huang, A., Gu, P., Wang, Y., Li, J., Yang, Z., & Long, Y. (2022). Simultaneous detection and differentiation of four viruses in passion fruit plants by a multiplex RT-PCR. *Tropical Plant Pathology*, 48(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00538-5>
- Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. M., Bragg, J., & Deng, M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 623–660. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136>
- Junghans, T. G. (2022). Espécies de maracujazeiro: uma riqueza do Brasil. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1148411>
- Lan, H., Lai, B., Zhao, P., Xu, D., Wei, W., Ye, Y., & Wu, Z. (2020). Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103828. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103828>
- Le Mercier et al., ViralZone. Expasy.org. Acesso: 27 de novembro de 2023, <https://viralzone.expasy.org/77>
- Lecoq, H. (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? *Comptes Rendus Biologies*, 324(10), 929–933. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(01\)01368-3](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(01)01368-3)
- Lefevre, P., Martin, D. P., Elena, S. F., Shepherd, D. N., Roumagnac, P., & Varsani, A. (2019). Evolution and ecology of plant viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(10), 632–644. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3>
- Louten, J. (2016). Virus structure and classification. In Elsevier eBooks (pp. 19–29). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800947-5.00002-8>
- Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., & Wutke, E. B. (2010). Transmissão do Cowpea mild mottle virus pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. *Summa Phytopathologica*, 36(2), 158–160. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052010000200009>
- Mas, F., Vereijssen, J., & Suckling, D. M. (2014). Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. *Journal of Chemical Ecology*, 40(11–12), 1197–1202. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0518-x>
- Mauck, K. E., Chesnais, Q., & Shapiro, L. R. (2018). Evolutionary determinants of host and vector manipulation by plant viruses. In *Advances in Virus Research* (pp. 189–250). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>
- Mimiviridae | ICTV. (n.d.). https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Mimiviridae. Acesso: 27 de novembro de 2023
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2013). Viruses: Definition, Structure, Classification. In Springer eBooks (pp. 17–30). https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_2
- Nascimento, A. V. S. D., De Santana, E. N., Braz, A. S. K., Alfenas, P. F., Pio-Ribeiro, G., De Andrade, G. P., Carvalho, M. G., & Zerbin, F. M. (2006). Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of Virology*, 151(9), 1797–1809. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0755-6>
- Navarro, J. A., Sánchez-Navarro, J. A., & Pallás, V. (2019). Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. In *Advances in Virus Research* (pp. 1–64). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>

Ng, J., & Falk, B. W. (2006). Virus-Vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>

O Gênero Passiflora: diversidade, conservação e uso. - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1124044/o-genero-passiflora-diversidade-conservacao-e-uso>. Acesso: 27 de novembro de 2023

Pathania, S., Rawal, R. K., & Singh, P. K. (2022). RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): A key target providing anti-virals for the management of various viral diseases. *Journal of Molecular Structure*, 1250, 131756. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131756>

Peng, J., Song, K., Zhu, H., Kong, W., Liu, F., Shen, T., & He, Y. (2017). Fast detection of tobacco mosaic virus infected tobacco using laser-induced breakdown spectroscopy. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44551>

Pinheiro-Lima, B., Pereira-Carvalho, R. C., Alves-Freitas, D. M. T., Kitajima, E. W., Vidal, A. H., Lacorte, C., Godinho, M., Fontenele, R. S., Faria, J. C., Abreu, E. F. M., Varsani, A., Ribeiro, S. G., & Melo, F. L. (2020). Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses*, 12(9), 1028. <https://doi.org/10.3390/v12091028>

Potviridae | ICTV. https://ictv.global/report_9th/RNApos/Potviridae. Acesso: 12 de dezembro de 2023

Puustinen, P., Rajamäki, M., Ivanov, K. I., Valkonen, J. P. T., & Mäkinen, K. (2002). Detection of the potyviral Genome-Linked protein VPG in virions and its phosphorylation by host kinases. *Journal of Virology*, 76(24), 12703–12711. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12703-12711.2002>

Rantalainen, K., Uversky, V. N., Permi, P., Kalkkinen, N., Dunker, A. K., & Mäkinen, K. (2008). Potato virus A genome-linked protein VPg is an intrinsically disordered molten globule-like protein with a hydrophobic core. *Virology*, 377(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.025>

Ray, S., & Casteel, C. L. (2022). Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell*, 34(5), 1514–1531. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>

Rodrigues, S. P., Lindsey, G. G., & Fernandes, P. M. B. (2009). Biotechnological approaches for plant viruses resistance: from general to the modern RNA silencing pathway. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 795–808. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132009000400002>

Roossinck, M. J. (2013). Plant virus ecology. *PLOS Pathogens*, 9(5), e1003304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003304>. Acesso: 27 de novembro de 2023.

Sacoman, N. N., Viana, A. P., Carvalho, V. S., Santos, E. A., & Rodrigues, R. (2018). Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus in in vitro germinated genotypes of *Passiflora setacea*. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 40(1). <https://doi.org/10.1590/0100-29452017607>

Sader, M., Dias, Y., Costa, Z. P., Munhoz, C. F., Penha, H. A., Bergès, H., Vieira, M. L. C., & Pedrosa-Harand, A. (2019). Identification of passion fruit (*Passiflora edulis*) chromosomes using BAC-FISH. *Chromosome Research*, 27(4), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09614-0>

Santas Jiménez, José Leonardo. Bioestimulação e indução de defesa em diferentes genótipos de maracujá sob condições de casa de vegetação e de campo. 2021. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Rio de Janeiro, 2021.

Santos-Jiménez, J. L., De Barros Montebianco, C., Vidal, A. H., Ribeiro, S. G., Barreto-Bergter, E., & Vaslin, M. F. S. (2021). A fungal glycoprotein mitigates passion fruit woodiness disease caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in *Passiflora edulis*. *BioControl*, 67(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10114-6>

Sanyal, R., Pandey, S., Nandi, S., Mondal, R., Samanta, D., Mandal, S., Manokari, M., Mishra, T., Dhama, K., Pandey, D. K., Shekhawat, M. S., & Dey, A. (2023). Biotechnology of *Passiflora edulis*: role of *Agrobacterium* and endophytic microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(18), 5651–5668. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12667-1>

Segre, J. ([s.d.]). Virus. Genome.gov. Acesso: 5 de dezembro de 2023, de <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Virus>

Shen, W., Shi, Y., Dai, Z., & Wang, A. (2020). The RNA-Dependent RNA Polymerase N1b of Potyviruses Plays Multifunctional, Contrasting Roles during Viral Infection. *Viruses*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.3390/v12010077>

Shi, X., Zhang, Z., Zhang, C., Zhou, X., Zhang, D., & Liu, Y. (2021). The molecular mechanism of efficient transmission of plant viruses in variable virus–vector–plant interactions. *Horticultural Plant Journal*, 7(6), 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.04.006>

Singh, S., Awasthi, L. P., & Jangre, A. (2020). Transmission of plant viruses in fields through various vectors. In Elsevier eBooks (pp. 313–334). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00024-4>

Society, M. (n.d.). Keeping up with virus taxonomy: reverse-transcribing viruses. Microbiology Society. <https://microbiologysociety.org/blog/keeping-up-with-virus-taxonomy-reverse-transcribing-viruses.html>

Tavasoli, M., Shahraeen, N.-., & Qorbani, S. (2009). Serological and RT-PCR detection of Cowpea mild mottle Carlavirus infecting soybean. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/228500022_Serological_and_RT-PCR_detection_of_Cowpea_mild_mottle_Carlavirus_infecting_soybean

Tecnologia, I. (n.d.). PIB-Agro/CEPEA: Com avanço de 24,3% no ano, PIB agro alcança participação de 26,6% no PIB brasileiro em 2020. Centro De Estudos Avançados Em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. <https://cepea.esalq.usp.br/br/releases/pib-agro-cepea-com-avanco-de-24-3-no-ano-pib-agro-alcanca-participacao-de-26-6-no-pib-brasileiro-em-2020.aspx>

Tolerância ao Cowpea mild mottle virus e sua concentração relativa em soja. - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/469211/tolerancia-ao-cowpea-mild-mottle-virus-e-sua-concentracao-relativa-em-soja>

Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas. - Portal Embrapa. (n.d.). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107832/transmissao-de-virus-e-controle-de-viroses-em-plantas>

Vidal, A. H., Felix, G. P., Abreu, E. F. M., Pinheiro-Lima, B., Vianna, M. J. X., Nogueira, I., Abreu, A. C. R., Sanches, M. M., Jiménez, J. L. S., Rosa, R. C. C., Vaslin, M. F. S., Faleiro, F. G., Lacorte, C., Melo, F. L., Varsani, A., & Lefevre, P. (2023). Occurrence of bean-associated cytorhabdovirus and cowpea mild mottle virus infecting cultivated and wild *Passiflora* spp. in Brazil. *Crop Protection*, 168, 106236. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106236>

Vidal, A. H., Lacorte, C., Sanches, M. M., Alves-Freitas, D. M. T., Abreu, E. F. M., Pinheiro-Lima, B., Rosa, R. C. C., De Jesus, O. N., Campos, M. A., Felix, G. P., Abreu, A. C. R., Santos, Y. S., Lacerda, A. L. M., Varsani, A., Melo, F. L., & Lefevre, P. (2023). Characterization of Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus (CABYV) from Passion Fruit in Brazil: Evidence of a Complex of Species within CABYV Isolates. *Viruses*, 15(2), 410. <https://doi.org/10.3390/v15020410>

Vista do Doenças do maracujazeiro amarelo. (n.d.). <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BT/article/view/1612/1480>. Acesso: 27 de novembro de 2023.

- Walker, P., Blasdell, K. R., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Kondō, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Vasilakis, N., & Whitfield, A. E. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *Journal of General Virology*, 99(4), 447–448. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001020>. Acesso: 12 de dezembro de 2023
- Wei, Z., Mao, C., Jiang, C., Zhang, H., Chen, J., & Sun, Z. (2021). Identification of a new genetic clade of cowpea mild mottle virus and characterization of its interaction with soybean mosaic virus in co-infected soybean. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650773>
- Wei, Z., Mao, C., Jiang, C., Zhang, H., Chen, J., & Sun, Z. (2021). Identification of a new genetic clade of cowpea mild mottle virus and characterization of its interaction with soybean mosaic virus in co-infected soybean. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650773>
- Zanardo, L. G., Silva, F. N., Lima, A. T. M., Milanesi, D. F., Castilho-Urquiza, G. P., Almeida, A. M. R., Zerbini, F. M., & Carvalho, C. M. (2013). Molecular variability of cowpea mild mottle virus infecting soybean in Brazil. *Archives of Virology*, 159(4), 727–737. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1879-0>
- Zaspel, J. M. (2016). The Insects: An Outline of Entomology, 5th Edition. *American Entomologist*, 62(2), 129–130. <https://doi.org/10.1093/ae/tmw008>
- Zhang, S., Huang, A., Zhou, X., Li, Z., Dietzgen, R. G., Zhou, C., & Cao, M. (2021). Natural defect of a plant rhabdovirus glycoprotein gene: A case study of Virus–Plant Coevolution. *Phytopathology*, 111(1), 227–236. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-20-0191-fi>