

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

JAQUELINE MANZATTI DA SILVA

**Detecção sorológica e molecular do *Cassava common mosaic virus* em
mandioca na região noroeste do Paraná**

**MARINGÁ-
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011**

JAQUELINE MANZATTI DA SILVA

**Detecção sorológica e molecular do *Cassava common mosaic virus* em
mandioca na região noroeste do Paraná**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Eliezer Rodrigues de
Souto.

**MARINGÁ-
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2011**

"O esforço é a ponte que liga a realidade ao sonho. Quem se esforça, faz emergir a esperança e a esperança nasce do esforço." (Daisaku Ikeda).

Aos meus pais, que amo muito, Maria Vera Lucia Manzatti da Silva e João da Silva, pelo amor e carinho, pelo constante apoio. Ao meu irmão, Luiz Henrique, pelo apoio, amor e carinho.

À minha irmã Daniele e ao meu cunhado Ricardo pelo incentivo, pela atenção e cuidados e pela hospedagem. Nunca esquecerei o que vocês fizeram por mim.

A toda minha família que sempre me apoiou, especialmente à minha avó, Leonor.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Carlos Alberto Fugita (Beto) pelo amor, carinho e atenção e por estar sempre ao meu lado, incentivando e compartilhando minhas angústias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a vida e por guiar e iluminar os meus passos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida durante o curso de Mestrado.

Ao professor doutor Eliezer Rodrigues de Souto, pela orientação pela oportunidade, pela atenção, dedicação e disponibilidade.

À professora doutora Maria Aparecida Fernandes, por ceder as bactérias para a realização da clonagem.

Ao doutor Mario Takahashi, por realizar a coleta das amostras de folhas de mandioca da região produtora de Paranaíba e ao professor doutor Pedro Soares Vidigal Filho, por permitir as coletas de folhas de mandioca do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá.

Às minhas amigas, Patrícia e Taise, por cederam as amostras de micropropagação *in vitro* e o antissoro, contribuição indispensável para as análises dos experimentos, e pela amizade.

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório, Cassiele, Noemi, Pétria, Marcelo, Aninha, Tati e Guto, pela ajuda e contribuição para a realização desse trabalho.

Às minhas amigas de república Silvana e Ludmila e a todos os amigos que fiz durante todo o curso de mestrado.

BIOGRAFIA

JAQUELINE MANZATTI DA SILVA, nasceu em Assis Chateaubriand, estado do Paraná, aos sete dias do mês de setembro de 1987, é filha de Maria Vera Lucia Manzatti da Silva e João da Silva.

Em 1994, Iniciou o Ensino Fundamental, na Escola Municipal Dr. Luis Osiris, município de Assis Chateaubriand, Paraná, permanecendo até o ano de 1996. No mesmo ano, transferiu-se para o Colégio Estadual Novo Horizonte, em Toledo, estado do Paraná, onde concluiu o Ensino Fundamental em 2001. Na mesma Instituição de Ensino, iniciou o Ensino Médio, no ano de 2002, concluindo-o em 2004.

Em janeiro de 2009, graduou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Paranaense (Unipar), em Toledo, Paraná.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá (UEM), estado do 9Paraná.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE QUADROS..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. A cultura da mandioca | 3 |
| 2.2. Vírus que infectam a mandioca..... | 5 |
| 2.3. Família <i>Flexiviridae</i> , gênero <i>Potexvirus</i> | 6 |
| 2.4. Sintomas causados pelo CsCMV | 7 |
| 2.5. Métodos de detecção e caracterização de vírus de plantas | 9 |
| 2.5.1. Métodos sorológicos | 9 |
| 2.5.2. Métodos moleculares..... | 11 |
| 2.5.3. Imunocaptura RT-PCR | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 3.1. Origem dos materiais de mandioca avaliados..... | 13 |
| 3.2. Determinação da melhor diluição dos extratos vegetais para o teste PTA- ELISA-indireto | 14 |
| 3.3. Otimização das técnicas utilizadas | 14 |
| 3.3.1. RT-PCR (reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase) | 15 |
| 3.3.1.1. Extração do RNA total | 15 |
| 3.3.1.2. Reação de transcrição reversa (RT)..... | 15 |
| 3.3.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 16 |
| 3.3.2. Detecção sorológica do CsCMV através do PTA-ELISA-indireto | 16 |
| 3.3.3. Imunocaptura, transcrição reversa e PCR (IC-RT-PCR) | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.4. Sequenciamento dos produtos de PCR..... | 17 |
| 3.3.4.1. <i>Clonagem</i> | 17 |
| 3.3.4.2. Seleção e estoque de clones positivos..... | 19 |
| 3.3.4.3. Extração do DNA plasmidial | 19 |
| 3.3.4.4. Sequenciamento..... | 19 |
| 3.4. Análises das amostras coletadas..... | 20 |
| 3.5. Análise filogenética comparativa do CsCMV com outros <i>Potexvirus</i> | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 4.1. Determinação da melhor diluição dos extratos vegetais para o teste PTA-ELISA-indireto | 21 |
| 4.2. Detecção sorológica do CsCMV através do PTA-ELISA-indireto..... | 22 |
| 4.3. Detecção molecular do CsCMV | 29 |
| 4.4. Imunocaptura, transcrição reversa e PCR (IC-RT-PCR)..... | 30 |
| 4.5. Sequenciamento dos produtos de RT-PCR e IC-RT-PCR..... | 33 |
| 4.6. Análise filogenética comparativa do CsCMV com outros <i>Potexvirus</i> | 35 |
| 5. CONCLUSÕES | 37 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Origem das amostras, variedades e números de plantas testadas..... | 14 |
| Quadro 2 – Valores da Absorbância à 405 nanômetros das diferentes diluições testadas..... | 22 |
| Quadro 3 – Origem das amostras, variedades, números de plantas testadas pelo PTA-ELISA-indireto e porcentagem do total de plantas infectadas..... | 24 |
| Quadro 4 – Origem das amostras e resultados obtidos por meio do Teste PTA-ELISA-indireto e por meio da IC-RT PCR..... | 30 |
| Quadro 5 – Sequências de nucleotídeos obtidas no <i>GenBank</i> utilizadas no alinhamento para a construção da árvore filogenética..... | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Organização genômica do CsCMV, com comprimento de 6376 nt, incluindo a cauda poli (A), com base na sequência de nucleotídeos do RNA viral clonado..... | 7 |
| Figura 2 - Planta de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) apresentando os sintomas de mosaico causado pelo sCMV..... | 8 |
| Figura 3 – Amostras de mandioca utilizadas na detecção sorológica e molecular do CsCMV..... | 09 |
| Figura 4 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy Vector, utilizado para realizar a clonagem dos fragmentos amplificados via PCR..... | 18 |
| Figura 5 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) da variedade Baianinha coletadas na região produtora de Paranavaí-PR com diferentes diluições..... | 21 |
| Figura 6 - Placa do Teste PTA-ELISA-indireto mostrando a coloração amarela nos orifícios, indicando a reação antígeno x anticorpo apresentando resultado positivo para o CsCMV em amostras de cultura de tecidos. | 23 |
| Figura 7 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) coletadas na região produtora de Paranavaí-PR..... | 24 |
| Figura 8 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) coletadas na região produtora de Paranavaí-PR..... | 25 |
| Figura 9 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) da variedade Baianinha coletadas na região produtora de Paranavaí-PR..... | 25 |
| Figura 10 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) do Banco de Germoplasma (BG) da FEI..... | 26 |
| Figura 11 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) do Banco de Germoplasma da FEI.... | 26 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) da variedade Olho Junto micropropagadas..... | 27 |
| Figura 13 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) da variedade Olho Junto (OJ) micropropagadas <i>in vitro</i> | 28 |
| Figura 14 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) das variedades Fécula Branca (FB), Baianinha (BA), Pasquini (PA), Olho Junto (OJ) e IAC 12 micropropagadas <i>in vitro</i> | 28 |
| Figura 15 – Produto de PCR em gel de agarose a 1,2% confirmando o.. resultado da RT-PCR utilizando primers específicos para o Potexvirus..... | 29 |
| Figura 16 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para Potexvirus..... | 31 |
| Figura 17 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para Potexvirus..... | 32 |
| Figura 18 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para Potexvirus..... | 32 |
| Figura 19 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para Potexvirus..... | 33 |
| Figura 20 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para Potexvirus..... | 33 |
| Figura 21 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento dos nucleotídeos correspondente à parte da região 5'- terminal da ORF1 do gene codificador da proteína replicase do CsCMV identificado neste trabalho, com alguns <i>Potexvirus</i> relacio..... | 35 |

RESUMO

SILVA, Jaqueline Manzatti, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2011. **Detecção sorológica e molecular do *Cassava common mosaic virus* em mandioca na região Noroeste do Paraná.** Orientador: Eliezer Rodrigues de Souto. Coorientadores: Maria Aparecida Fernandes e Maria de Fátima Pires da Silva.

O vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic virus* – CsCMV) é tido como o mais frequente nas áreas produtoras do centro sul do Brasil. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi detectar e identificar o CsCMV por meio de métodos sorológicos e moleculares em plantas matrizes de mandioca, obtidas pela micropropagação *in vitro*, e realizar um levantamento da distribuição do vírus na região produtora de Paranavaí, no Noroeste do Paraná. O teste sorológico utilizado foi o PTA-ELISA-indireto com folhas de mandioca diluídas a 1/300, utilizando-se um antissoro policlonal específico para o CsCMV diluído a 1/10.000. Os testes sorológicos mostraram que, das 61 amostras coletadas na região produtora de Paranavaí-PR, apenas uma estava sadia. Das 20 amostras do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, cinco estavam livres do vírus, e das 65 amostras micropropagadas *in vitro*, 10 se apresentaram isentas do mesmo. Utilizando a técnica de imunocaptura (IC-RT-PCR), foram testadas folhas de mandioca diluídas a 1/10 com a IgG (2 µl/ml) purificada do antissoro para o CsCMV, seguido da reação de RT-PCR. As 16 amostras apontadas como livres de vírus pelo PTA-ELISA-indireto, foram testadas por IC-RT-PCR, e 10 se apresentaram infectadas. Das cinco plantas que apresentaram resultados negativos para o PTA-ELISA-indireto, todas mostraram resultados positivos para o IC-RT-PCR. Já das 10 plantas oriundas da micropropagação *in vitro*, e tidas como sadias pelo PTA-ELISA-indireto, somente cinco se mostraram livres do vírus pela IC-RT-PCR. Apenas uma das 61 amostras provenientes de Paranavaí foi confirmada como sadia pelo PTA-ELISA-indireto, como também pela IC-RT-PCR. Para confirmação da identidade do vírus detectado pelo IC-RT-PCR, foi realizada a clonagem e o sequenciamento do produto de PCR obtido em três ampliações. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as de outros *Potexvirus* depositadas no GenBank, constatando-se identidade de 87% com a sequência de uma estirpe do *Cassava*

common mosaic virus já depositada, confirmando assim que o vírus detectado é uma estirpe do *Cassava common mosaic virus*.

Palavras-chave: CsCMV, PTA-ELISA-indireto, IC-RT-PCR.

ABSTRACT

SILVA, Jaqueline Manzatti, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, February, 2011. **Serological detection and molecular of *Cassava common mosaic virus* in cassava in the northwest region of Paraná.** Adviser: Eliezer Rodrigues de Souto. Committee Members: Maria Aparecida Fernandes and Maria de Fátima Pires da Silva.

The *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) is considered to be more frequent in central and south of Brazil producing areas. From this perspective, the objective of this work was to detect and identify a virus in cassava plants from *in vitro* micropropagation, and collected in producing areas of Paranavaí, northwest of Paraná, using serological and molecular methods. Indirect-PTA-ELISA tests were used to test cassava leaves in 1/300 dilution, using a polyclonal antiserum specific for CsCMV diluted 1/10.000. From 65 samples obtained by micropropagation, 10 were healthy tested. The serological tests showed that one out of 61 samples from the producing region of Paranavaí was free of the virus. Of the 20 samples from the UEM germplasm collection, five were free of the virus. The same samples were also tested through immunocapture (IC-RT-PCR). The cassava leaves were diluted 1/10 and tested using a purified IgG specific for CsCMV. From the 16 samples identified as virus-free by indirect-PTA-ELISA, and later tested by IC-RT-PCR, 10 showed infected by the virus. Of the five plants that had presented resulted negative for the PTA-ELISA-indirect one, all had shown resulted positive for the IC-RT-PCR. Five out of 10 plants from the *in vitro* micropropagation were free of the virus. From 61 samples collected in Paranavaí field areas, only one was virus free as confirmed by indirect-PTA-ELISA and IC-RT-PCR. To confirm the identity of the virus detected by IC-RT-PCR, the amplified PCR products were cloned and sequenced. Comparing the obtained nucleotide sequences with those of other Potexvirus from GenBank, it was found 87% identity with a sequence of CsCMV, confirming the virus detected in this work represents a strain of *Cassava common mosaic virus*.

Key words: CsCMV, IC-RT-PCR, indirect-PTA-ELISA.

1. INTRODUÇÃO

A *Manihot esculenta*, popularmente conhecida como mandioca e pertencente à família *Euphorbiaceae*, é originária do continente americano (Jennings, 1976), possivelmente do Brasil, onde apresenta grande importância econômica e alimentar e destaca-se como a principal fonte de calorias para os países da América Latina, África, Sudeste da Ásia e Oceania (Roca, 1984). A mandioca é cultivada principalmente em áreas tropicais, razão pela qual está ausente da relação de plantas cultivadas na maioria dos países industrializados (Faostat, 2010).

A maior parte de sua produção é destinada à alimentação humana, por meio do consumo de suas raízes. Para um grande número de países é o alimento predominante na dieta diária, como fonte de carboidrato. No entanto, é também empregada na nutrição animal, sob forma de farelos obtidos da parte aérea. Na indústria, pode ser utilizada como matéria prima, na produção de amido (McMahon, 1995).

A mandioca tem propagação tipicamente agâmica por meio de segmentos caulinares, denominados ramas ou manivas (Rodrigues et al., 2008). Segundo os autores, a utilização de manivas de boa qualidade exerce influência direta no aumento da produtividade, a qual pode atingir 30% na produção de raiz sem a recorrência de outras práticas culturais ou aplicação de insumos. Essa forma de propagação apresenta inconvenientes como a disseminação de doenças sistêmicas através das gerações sucessivas, tal como ocorre com as causadas por vírus, que podem causar a degeneração das manivas (Costa e Kitajima, 1972; Iwanaga e Iglesias, 1994).

Diversos vírus provocam doenças na cultura da mandioca, porém o mais frequente e importante no Brasil é o vírus do mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV), família *Flexiviridae* e gênero *Potexvirus* (Soares et al., 2009). Além deste, há relatos da ocorrência de mais dois vírus no país: o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV), família *Caulimoviridae* e gênero *Cavemovirus*, e o vírus do couro de sapo da mandioca (*Cassava frogskin disease*, CFSD) com etiologia não definida. O CsCMV não possui vetor conhecido, e sua disseminação ocorre através de práticas culturais (Costa e Kitajima, 1972).

A disseminação do CsCMV no Brasil ocorre em todas as regiões produtoras do Sul e Sudeste, infectando todas as variedades cultivadas, embora aparentemente não provoque sintomas severos no campo. No entanto, quando ocorre a manifestação severa da doença em variedades suscetíveis, pode haver perdas de produção entre 10 a 20%. O vírus também prejudica a qualidade dos produtos, causando reduções nos teores de amido que variam entre 10 a 50% (Fukuda, 1993).

A doença é caracterizada por sintomas de clorose na lâmina foliar e retorcimento dos bordos das folhas, principalmente em folhas em formação. Durante o desenvolvimento das folhas tem-se observado em alguns casos o desaparecimento por completo dos sintomas, notadamente quando as condições ambientais tornam-se adversas para o desenvolvimento da doença (Fukuda, 1993). O CsCMV causa infecção que prejudica as variedades cultivadas, interferindo na fotossíntese, comprometendo o crescimento das raízes e influenciando negativamente na produtividade da cultura (Costa e Kitajima, 1972).

A cultura da mandioca tem apresentado o mesmo nível de produtividade durante anos, por causa da ausência de investimento da parte da iniciativa privada para o aumento de tecnologia. Alguns problemas têm causado prejuízos ao setor e diminuição na área plantada, ocasionados por doenças, pragas, manejo inadequado dos solos, baixa fertilidade, cultivares pouco produtivas e com baixos teores de amido nas raízes, a falta de incentivo tecnológico, entre outros. O aparecimento recente de viroses na mandioca, que não costumavam ser frequentes, está se agravando devido à propagação vegetativa da espécie (Colariccio et al., 2009).

Este trabalho visa detectar e identificar o CsCMV por meio de métodos sorológicos e moleculares e avaliar a eficiência da limpeza clonal em plantas matrizes de mandioca, obtidas por meio de micropropagação *in vitro*, e realizar um levantamento da distribuição do vírus na região produtora de Paranavaí, no Noroeste do Paraná, onde se concentra o maior e mais moderno complexo agroindustrial de mandioca do Estado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta tropical, perene e lenhosa, cultivada tradicionalmente em solos de baixa fertilidade e com pouco uso de insumos (Viana et al., 2002). A cultura apresenta a capacidade de se adaptar aos mais diferentes agroecossistemas e condições edafoclimáticas (FUKUDA et al., 2006). É considerada uma das fontes mais importante de carboidratos nos trópicos, o que a torna uma cultura bastante difundida e importante, principalmente por ser constituinte da base alimentar de populações carentes da América Latina, África e Ásia (Oliveira et al., 2001).

No Brasil, a mandioca é cultivada em toda sua extensão sendo destinada para o consumo *in natura* na alimentação humana e animal e para a industrialização (Soares et al., 2009). Suas raízes tuberosas são ricas em carboidratos e correspondem à porção de maior valor econômico da planta (Ceballos e Cruz, 2002). Na indústria é utilizada como matéria-prima na extração de amido e na produção de farinha. Na nutrição animal, pode ser fornecida sob a forma de farelos (McMahon et al., 1995).

Popularmente, as variedades de mandioca são classificadas em dois grupos, ou seja, mansas ou de mesa e bravas ou de indústria, de acordo com a toxicidade e palatabilidade de suas raízes. As mandiocas de mesa apresentam sabor mais adocicado enquanto as de indústria sabor mais amargo. O sabor amargo se deve aos teores elevados de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica, presente nas raízes, e por esse motivo essas variedades não são utilizadas para o mercado de mesa (Pereira e Pinto, 1962). As mandiocas bravas são utilizadas na indústria para a produção de farinha, amido e outros produtos, podendo ser consumidos somente após algum tipo de processamento industrial com efeito desintoxicante, pois o alto potencial cianogênico oferece riscos de intoxicação aos consumidores (Valle et al., 2004).

A cultura da mandioca representa metade da produção mundial de raízes e tubérculos, permitindo a sobrevivência de cerca de 10% da população mundial

(Vilpoux et al., 2007). Nas regiões tropicais, ela representa a quarta fonte de calorias, depois do arroz, do trigo e do milho e a oitava no mundo (Brujin e Fresco, 1989).

No Brasil, em 2010, a produção de mandioca obtida foi de 25,8 milhões de toneladas em uma área plantada de 1,8 milhão de hectares e, para o ano de 2011, estima-se uma produção de 27,2 milhões de toneladas, uma variação 5,4% em relação ao ano anterior (IBGE, 2010a). Em 2007, as exportações de fécula de mandioca *in natura* chegaram a representar US\$ 6,9 milhões em receita para o país, equivalendo a 12,8 mil toneladas e, no mesmo ano, as exportações de amidos modificados renderam US\$ 26,3 milhões, equivalendo a 32,7 mil toneladas (ABAM, 2010a, 2010b).

A cultura da mandioca é considerada de baixo valor agregado, destinada ao processamento de alimentos baratos para camadas mais pobres da população no Brasil, passou por profunda mudança desde os anos 2000. A mandioca, impulsionada pela produção de fécula nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e São Paulo, associou-se à criação de empregos no meio rural, com possível reversão do êxodo característico de muitas regiões do interior do Brasil (Vilpoux, 2010).

Os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul formam um complexo agroindustrial, produzindo e processando cerca de 5 milhões de toneladas de raízes tuberosas de mandioca destinadas a produção de farinha e amido (IBGE, 2010b). O Paraná possui o maior e mais moderno complexo industrial do país, formado pelas regiões de Paranavaí, Cianorte, Campo Mourão e Umuarama (Takahashi e Gonçalo, 2001).

A mandioca tem propagação tipicamente agâmica por meio de segmentos caulinares, denominados ramas ou manivas (Rodrigues et al., 2008).

A produção brasileira de mandioca é baixa devido ao cultivo, geralmente, em terras marginais de baixa fertilidade e com problemas climáticos, como a seca, e também por não serem adotadas práticas agrônômicas de controle de pragas e doenças (Fukuda, 1993). Porém, uma grande proporção de variedades de mandioca são tolerantes à seca, produzem em solos degradados, sendo naturalmente tolerante a solos ácidos e oferecendo a flexibilidade conveniente de poderem ser colhidas de acordo com a precisão dos agricultores (Ceballos et al., 2004).

A cultura da mandioca é afetada por vários patógenos que podem causar perdas consideráveis, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da região onde

está sendo cultivada. No Brasil, as doenças mais frequentes encontradas na cultura são a podridão radicular causada por diferentes fungos (*Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, e outros); a ferrugem (*Uromyces* spp.); as manchas foliares, como a mancha parda (*Cercosporidium henningsii*) e a mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*); a queima das folhas (*Cercopsora vicosae*); o superalongamento (*Sphaceloma manihoticola*); o superbrotamento (fitoplasma); a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *manihotis*); a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*) e as viroses (Ceballos et al., 2004).

2.2. Vírus que infectam a mandioca

Diversos são os vírus que atacam a cultura da mandioca, causando danos de grande importância econômica, porém o mais frequente e importante no Brasil é o vírus do mosaico comum (CsCMV) (Soares et al., 2009).

O CsCMV causa infecção que prejudica as variedades cultivadas, interferindo na fotossíntese, comprometendo o crescimento das raízes e influenciando negativamente na produtividade da cultura. Outros vírus importantes, porém de distribuição global, são: *African cassava mosaic virus* (ACMV), família *Geminiviridae* e gênero *Begomovirus* e *Cassava brown streak virus* (CBSaV), família *Potyviridae* e gênero *Ipomovirus*, na África; *Cassava green mottle virus* (CGMV), família *Comoviridae* e gênero *Nepovirus*, nas ilhas do Pacífico; *Cassava virus X* (CsVX), família *Flexiviridae* e gênero *Potexvirus* e *Cassava colombian virus* (CCV), família *Flexiviridae* e gênero *Potexvirus*, na Colômbia; *Cassava caribbean mosaic virus* (CCMV), família *Flexiviridae* e gênero *Potexvirus*, na América Central; *Indian cassava mosaic virus* (ICMV), família *Geminiviridae* e gênero *Begomovirus*, na Índia (Costa e Kitajima, 1972).

A manifestação severa do CsCMV em variedades suscetíveis pode ocasionar perdas de produção entre 10 a 20%. O vírus também prejudica a qualidade dos produtos, causando reduções nos teores de amido que variam entre 10 a 50% (Fukuda, 1993). Porém, Costa e Kitajima (1972) relataram que as perdas na produção induzidas por infecções virais podem ser de 30% ou mais e sugerem a necessidade de seleção de manivas saudáveis para a propagação de plantas livres de vírus.

2.3. Família *Flexiviridae*, gênero *Potexvirus*

A família *Flexiviridae* é uma nova família de vírus de plantas que foi aprovada recentemente pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Seu nome é baseado no fato de seus membros serem formados por partículas flexuosas. São incluídos nessa família os gêneros já existentes: *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Vitivirus*, *Trichovirus*, além do novo gênero *Mandarivirus*, juntamente com alguns vírus relacionados, não atribuídos a nenhum gênero.

A família é justificada a partir de análises filogenéticas das sequências da polimerase e da proteína capsidial (CP). Para ajudar a definir critérios adequados para a demarcação molecular de espécies, um conjunto completo de comparações pareadas foram feitas usando as sequências de nucleotídeo (nt) e aminoácidos (aa) de cada gene completamente sequenciado de cada acesso, disponível na família. Com base na distribuição e na inspeção dos dados, concluiu-se que, como regra geral, as espécies distintas têm menos de 72% de nt idênticos ou 80% de aa idênticos entre a CP completa ou o gene da proteína de replicação (Adams et al., 2004).

O gênero *Potexvirus*, ao qual o vírus X da batata é o membro tipo, possui atualmente 54 espécies possíveis e definitivas (Van Regenmortel et al., 2000) e muitas apresentam importância agrônômica considerável (Van Der Vlugt e Berendsen, 2002).

O CsCMV é classificado como um *Potexvirus* com base na morfologia das partículas, sorologia e corpos de inclusão (Calvert et al., 1996). O vírus possui partículas alongadas semiflexuosas de 15 x 495 nm (Kitajima et al., 1965). O genoma consiste em uma espécie de RNA de fita simples de senso positivo (+ssRNA) com 2×10^6 Da, e uma única capa protéica de peso molecular de 21 kDa (Nolt et al., 1991).

O genoma dos *Potexvirus* contém cinco fases abertas de leitura (*open reading frame*, ORF); são poliadenilados na extremidade 3' e contém uma estrutura m^7Gppp cap em sua extremidade 5' (Figura 1) (Mentaberry e Orman, 1995). A ORF 1 codifica uma proteína envolvida na replicação viral a RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), as ORFs 2 a 4 são geralmente referidas com o "bloco triplo de genes" (*triple gene block*, TGB). Os produtos desses genes codificados estão

envolvidos no movimento célula a célula viral e a ORF 5 codifica proteínas da capa protéica do vírus (CP) (Van Der Vlugt e Berendsen, 2002).

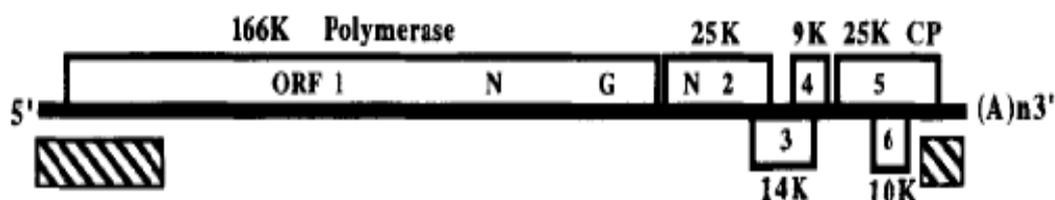


Figura 1 - Organização genômica do CsCMV, com comprimento de 6376 nt, incluindo a cauda poli (A), com base na sequência de nucleotídeos do RNA viral clonado. As caixas representam as ORFs 1, 2, 3, 4 e 5, e o tamanho das proteínas estão escritos acima ou abaixo das caixas, segundo Calvert et al. (1996).

Kitajima e Costa (1966) encontraram massas de partículas filamentosas no citoplasma de plantas infectadas com CsCMV. Estas inclusões fibrosas possuíam forma alongada, fusiforme, dispendo seu eixo maior paralelamente à parede celular. A ocorrência destas inclusões era muito maior nas áreas amarelas das folhas do que nas áreas verdes. Tais inclusões chegavam a atingir 15-20 μm de comprimento por 3-5 μm de largura e as partículas contidas nessas inclusões tinham cerca de 10-15 μm de comprimento.

2.4. Sintomas causados pelo CsCMV

As plantas infectadas pelo CsCMV apresentam sintomas de clorose da lâmina foliar e retorcimento dos bordos das folhas em formação. Durante o desenvolvimento, os sintomas desaparecem completamente, notadamente quando as condições ambientais tornam-se adversas para o desenvolvimento da doença (Fukuda, 1993). As folhas das plantas infectadas pelo vírus apresentam áreas verdes escuras e verdes claras delimitadas por nervuras caracterizando o sintoma de mosaico (Figura 2). Durante períodos relativamente frios, os sintomas são mais graves e as áreas subtropicais da América do Sul são as mais afetadas pela doença. Em condições frias as plantas afetadas apresentam perdas de rendimentos que podem ser de até 60% (Costa e Kitajima, 1972).



Figura 2 - Planta de mandioca (*Manihot esculenta*) apresentando os sintomas de mosaico causado pelo CsCMV.

O CsCMV, assim como todos os vírus que pertencem ao gênero Potexvirus, não possui vetor conhecido, portanto, sua disseminação ocorre através de prática culturais, nos procedimentos de podas, no preparo das manivas e através do material de propagação, quando houver infecção viral (Colariccio et al., 2009).

Os métodos de controle recomendam a utilização de materiais de plantio provenientes de culturas saudáveis e a desinfecção de ferramentas utilizadas no preparo das manivas (Lorenzi; Dias, 1993), assim como a eliminação de plantas que apresentarem sintomas nas primeiras folhas. A seleção do material de plantio é um dos cuidados que podem ajudar a erradicar ou reduzir a doença a um nível econômico secundário significativo (Calvert e Thresh, 2002).

Porém, existe a dificuldade de erradicação do vírus. Assim, a micropropagação *in vitro* ou cultura de tecidos com meristemas ou ápices, torna-se uma ferramenta

utilizada para realizar a limpeza clonal produzindo plantas livres de vírus (Carnelossi, 2010).

2.5. Métodos de detecção e caracterização de vírus de plantas

Os métodos de detecção e caracterização de vírus são importantes pelo fato de as plantas infectadas poderem apresentar sintomatologia complexa e infecção mista, além da possibilidade das características da doença poderem ser confundidas com deficiência nutricional, devendo também ser considerada a ocorrência de infecção latente. Plantas com infecção latente propiciam a disseminação do vírus quando estas são utilizadas como matrizes (Lima, 2009).

Uma diagnose aprimorada, com uma identificação correta do agente causal da doença, é essencial para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. Assim métodos sorológicos e moleculares vêm sendo utilizados na detecção e caracterização de vírus de plantas (Lima, 2009).

2.5.1. Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos são caracterizados por utilizarem anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais, sendo o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) o método sorológico mais utilizado na detecção de vírus em material vegetal (Lima, 2009). O primeiro registro da utilização deste método na detecção de vírus de plantas foi com Clark e Adams (1977).

O método ELISA baseia-se no princípio clássico da sorologia que forma o complexo antígeno-anticorpo, onde o antígeno é reconhecido pelo anticorpo (Imunoglobulina), associado a propriedades colorimétricas (Almeida, 2001)

O ELISA é considerado um teste que também serve para identificar e quantificar vírus de plantas. Porém, sua eficácia dependerá, além de outros fatores, da qualidade do antissoro produzido contra um antígeno específico, do suporte físico utilizado, da preparação do conjugado, das concentrações adequadas dos reagentes e do extrato vegetal que contém o vírus. Esse extrato vegetal, às vezes, pode conter substâncias que interferem nos resultados podendo apresentar falsos positivos, mesmo em plantas sadias (Almeida, 2001).

Para a detecção viral são produzidos anticorpos contra a proteína capsial de um determinado vírus. O extrato utilizado como antígeno na reação é preparado mediante a maceração de tecido vegetal infectado em tampão (Lima, 2009).

O teste ELISA possui diversas variações, mas todas elas necessitam de um princípio básico que é a aderência de macromoléculas a vários tipos de suportes físicos. Esse teste pode ser basicamente classificado em ELISA direto e indireto. No ELISA direto utiliza-se a Imunoglobulina (IgG) e o conjugado produzido em apenas um animal; já no ELISA indireto, utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferente espécie de animal que reconhece e se liga à primeira IgG (Almeida, 2001).

O ELISA apresenta resultados determinados por uma reação enzimática que ocorre devido à ação de determinada enzima sobre um substrato cromogênico. Esta enzima é conjugada à imunoglobulina.

Segundo Clark e Bar-Joseph (1984), várias são as enzimas citadas para a obtenção de conjugados, mas a fosfatase alcalina e a peroxidase são as mais utilizadas na diagnose de vírus de plantas. A fosfatase alcalina apresenta a vantagem de se ligar facilmente à Ig através do gluteraldeído e sua reação cinética com o substrato é linear. Quando a enzima conjugada à Ig é a fosfatase alcalina, o substrato utilizado é o p-nitrofenilfosfato dissódico que, ao ser transformado pela enzima em p-nitrofenilfosfato, torna a solução amarela (Almeida, 2001). A avaliação é feita por meio da leitura da absorbância em uma leitora de placas com filtro de 405 nm. São consideradas positivas as amostras que apresentarem leitura pelo menos duas vezes superior ao extrato de planta sadia utilizado como controle negativo (Lima, 2009).

As vantagens apresentadas por esse método incluem: a rapidez, possibilidade de obtenção de resultados em um período curto, entre 24 a 48 horas; ser sensível e na avaliação poder ser utilizado um grande número de amostras. Porém, esse método apresenta limitações, como o fato de não serem produzidos anticorpos específicos para todos os vírus que infectam plantas (Lima, 2009).

2.5.2. Métodos moleculares

O método molecular baseia-se na detecção de ácido nucléico, por meio da transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (Mullis et al., 1986). A amplificação e detecção de material genético do vírus são realizadas através da RT-PCR no caso de vírus de RNA ou apenas PCR para vírus de DNA (Lima, 2009).

A detecção de vírus em amostras por PCR não é dependente apenas da técnica de PCR em si, mas também da eficiência do processo empregado na extração dos ácidos nucléicos a partir do material vegetal. A sensibilidade da detecção pode ser reduzida por inibidores que podem estar presentes no extrato dos ácidos nucléicos. Devido a sua alta sensibilidade, a transcrição reversa acoplada ao PCR (RT-PCR) é o método molecular mais utilizado na detecção de vírus de plantas (Lopez et al., 2003).

2.5.3. Imunocaptura RT-PCR

Muitos métodos de detecção e caracterização de vírus de plantas vêm sendo desenvolvidos. Dentre estes métodos, está a Imunocaptura-RT-PCR (IC-RT-PCR) que é um teste de alta especificidade e sensibilidade que combina os métodos ELISA e RT-PCR e consiste em utilizar anticorpo específico para “capturar” partículas virais do extrato da planta infectada. Essa combinação entre as duas técnicas elimina a necessidade de se purificar ácidos nucléicos a partir da planta, o que, particularmente para algumas plantas é um fator que dificulta a aplicação de RT-PCR em sua forma tradicional. Esta técnica combina a captura de vírus por anticorpo específico com amplificação posterior por RT-PCR ou PCR. Os vírus capturados pelo anticorpo por meio das proteínas capsidiais liberam os ácidos nucléicos, por ação de calor, os quais são posteriormente amplificados por RT-PCR ou PCR empregando-se primers específicos (Miyai, 2006).

A IC-RT-PCR é útil para concentrar partículas virais de espécies de plantas onde o título é muito baixo, ou onde compostos que inibem a PCR estão presentes (Webster et al., 2004).

De acordo com Barry et al. (1996) a IC-RT-PCR é de 10 a 100 vezes mais sensível que o ELISA. A técnica de imunocaptura apresenta alta especificidade, pois combina a eficiência dos anticorpos e dos primers empregados. A metodologia pode

ser mais facilmente aplicada quando a quantidade de amostras é elevada pelo fato de não requerer a purificação de ácidos nucleicos (Miyai, 2006).

Segundo Wetzel et al. (1992), a IC-RT-PCR é um teste sensível, com base na reação em cadeia da polimerase do cDNA sintetizado a partir do RNA viral de partículas virais capturadas por anticorpos. A técnica permite a utilização de grandes volumes de amostras e pelo fato de purificar as partículas virais aumenta drasticamente a sensibilidade do ensaio. A IC-RT-PCR tem diversas aplicações para a detecção de uma série de vírus e agentes patogênicos quando estão disponíveis antissoros específicos e dados de sequências.

Jansen et al. (1990) foram os primeiros a utilizar este método para a detecção do vírus da Hepatite A em espécimes fecais obtidas de macacos e pacientes com Hepatite A da Carolina do Norte, Estados Unidos, com a obtenção de bons resultados, os autores consideraram que a técnica possui elevado potencial para diagnóstico laboratorial devido à redução do número de passos quando comparada com a PCR.

Wetzel, et al. (1992) utilizaram pela primeira vez a técnica de imunocaptura para a detecção de um *Potyvirus* que ataca a ameixeira, onde demonstrou a alta sensibilidade e a sua superioridade para a detecção de baixas concentrações deste vírus presentes em amostras teciduais de árvores infectadas, quando comparada com o diagnóstico realizado pelo teste ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos materiais de mandioca avaliados

Utilizaram-se amostras de folhas de plantas de mandioca de diferentes origens (Quadro 1): plantas de mandioca das variedades Olho Junto, Fécula Branca, Baianinha, IAC 12 e um material identificado como “Pasquini” previamente obtidas por micropropagação *in vitro* visando à limpeza clonal (Figura 3A); plantas de mandioca das variedades Olho Junto, Fécula Branca, IAC 90, Baianinha, LDA 92, 118-95, IVAR e Cascuda coletadas ao acaso na região produtora de Paranavaí-PR, por técnicos do IAPAR; e amostras foliares de plantas das variedades Fécula Branca, IAC 576-70 e amostras de variedades não identificadas, também coletadas ao acaso do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, mantido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) (Figura 3B). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná.

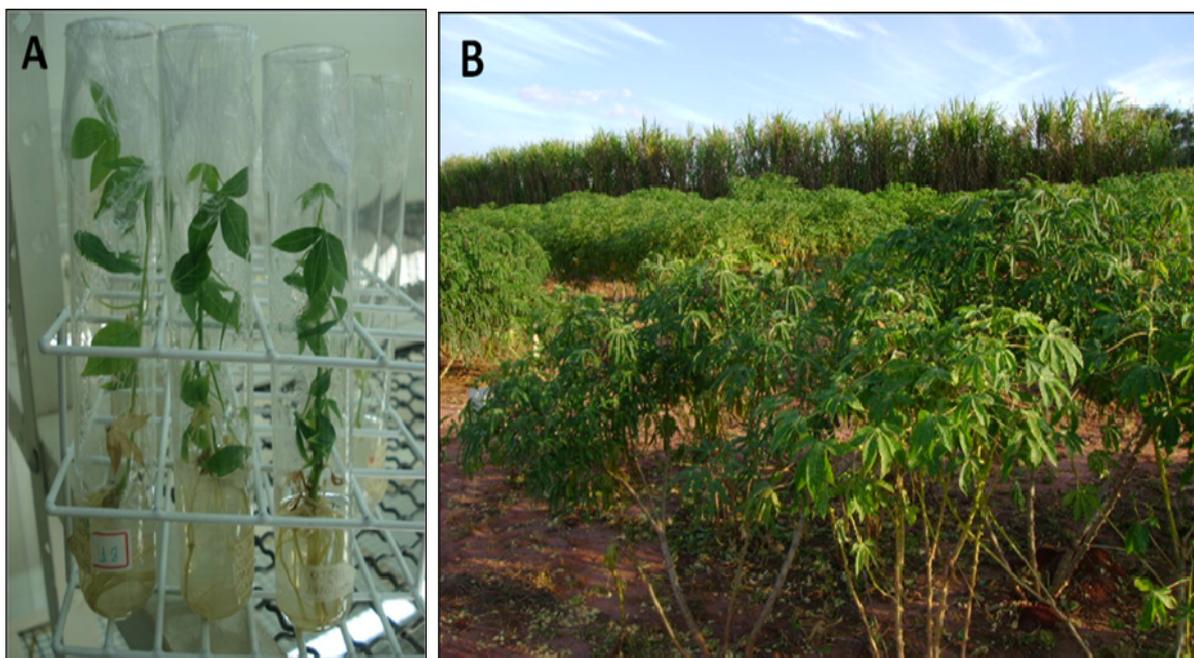


Figura 3 – Amostras de mandioca utilizadas na detecção sorológica e molecular do CsCMV. (A) Plântulas de mandioca micropropagadas *in vitro*. (B) Plantas de

mandioca do Banco de Germoplasma da UEM, mantido na Fazenda experimental de Iguatemi.

Quadro 1 – Origem das amostras, variedades e números de plantas testadas

| Origem das amostras | Variedades | Nº de plantas testadas |
|---|--------------------|------------------------|
| Plantas coletadas em áreas produtoras de Paranaíba-PR | Olho Junto (OJ) | 22 |
| | Fécula Branca (FB) | 7 |
| | IAC 90 | 5 |
| | Baianinha (BA) | 22 |
| | LDA 92 | 2 |
| | 118-95 | 1 |
| | IVAR | 1 |
| | Cascuda | 1 |
| | Total | 61 |
| Plantas obtidas por micropropagação <i>in vitro</i> | Olho Junto (OJ) | 58 |
| | Fécula Branca (FB) | 2 |
| | Baianinha (BA) | 3 |
| | Pasquini | 1 |
| | IAC 12 | 1 |
| | Total | 65 |
| Plantas do Banco de Germoplasma da UEM | Fécula Branca (FB) | 2 |
| | IAC 576-70 | 1 |
| | Não identificadas | 17 |
| | Total | 20 |
| Número total de amostras | - | 146 |

3.2. Determinação da melhor diluição dos extratos vegetais para o teste PTA-ELISA-indireto

Os extratos vegetais de plantas infectadas foram testados previamente por Plate Trapped Antigen - Enzyme-linked immunosorbent assay - indireto (PTA-ELISA-indireto) em três diluições (1/10, 1/100 e 1/300) para determinar qual a diluição que apresentaria o melhor resultado na detecção do CsCMV.

3.3. Otimização das técnicas utilizadas

Realizaram-se previamente a otimização das técnicas, nas quais amostras de folhas de mandioca apresentando sintomas foram submetidas ao RT-PCR para verificar a eficiência dos primers, ao teste PTA-ELISA-indireto para verificar a eficiência do antissoro, e à IC-RT-PCR para a otimização de protocolo para a mandioca. Também foi realizado o sequenciamento dos fragmentos obtidos por meio

da RT-PCR para a confirmação de que o vírus encontrado realmente se referia ao CsCMV.

3.3.1. RT-PCR (reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase)

Utilizaram-se folhas de mandiocas da variedade Baianinha apresentando sintomas de infecção pelo CsCMV.

3.3.1.1. Extração do RNA total

A extração do RNA total foi conduzida mediante a obtenção de 100 g de folhas frescas de mandioca apresentando sintomas, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, que foi depositado em microtubos plásticos de 1,5 mL, adicionando-se 1 mL de Trizol e homogeneizando as amostras no vortex por um minuto. A seguir, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos. Adicionou-se após 200 µL de clorofórmio, homogeneizando em vortex por 15 segundos e centrifugando a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo, sendo adicionados 500 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de álcool 75% homogeneizando em vortex seguido de uma centrifugação a 7.500 rpm por cinco minutos a 4°C. O pellet foi seco por 10 minutos e em seguida dissolvido em 20 µL de água DEPC e incubado à 55°C por 10 minutos.

3.3.1.2. Reação de transcrição reversa (RT)

A RT-PCR foi realizada em termociclador, utilizando-se de cada amostra, 4 µL do RNA total, 4 µL do primer randômico, 2 µL da dNTPmix e 3 µL de água DEPC (Diethyl pyrocarbonate) As amostras foram aquecidas a 65°C por cinco minutos e imediatamente resfriadas em gelo por um minuto. A esse conteúdo foram adicionados 4 µL de First-Strand Buffer 5x, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de DTT 0,1 e 1 µL de RNase OUT. A reação foi submetida a uma temperatura de 25 °C durante dois minutos. Logo após foi adicionado 1 µL de Transcriptase reversa (M-MLV-RT - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) e submeteu-se a um ciclo de 25°C, por 10 minutos, e um ciclo de 42°C durante 50 minutos.

3.3.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando uma alíquota de 5 µL do cDNA, 5 µL de PCR Buffer 10x, 3 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM, 2 µL do Primer Potex 1 (5'- CAY CAR CAR GCX AAR GAY SA-3'), 2 µL do Primer Potex 2 (5'- TCD GTR TTD GCR TCR AAD GT -3'). Os primers foram descritos por Van Der Vlugt e Berendsen (2002), 1 µL da Taq DNA polimerase e 30 µL de água DEPC. As amplificações foram realizadas em termociclador programado com um ciclo de 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por três minutos, 51,5°C por 1,5 minutos, 72°C por um minuto e com um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Os resultados das amplificações foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado em solução de brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

3.3.2. Detecção sorológica do CsCMV através do PTA-ELISA-indireto

O teste PTA-ELISA-indireto foi realizado segundo a metodologia proposta por Clark e Adams (1977), utilizando folhas de mandioca apresentando sintomas de infecção viral. As amostras de folhas foram maceradas na presença de tampão de cobertura (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 0,2 g de NaN₃, pH 9,6) na diluição 1/10 (g/mL). Após a maceração, o extrato foi diluído em 1/300 e, então, aplicou-se 100 µL de cada amostra nos orifícios da placa, utilizando três repetições por amostra.

A placa foi incubada a 4°C, por 18 horas, dentro de um saco plástico com papel toalha umedecido com água destilada e, após esse período, foram realizadas três lavagens sucessivas com intervalos de três minutos cada lavagem com PBS (tampão fosfato salino) 1X-Tween (tampão PBS 10X – 80 g de NaCl, 2,0 g de KH₂PO₄, 11 g de NaHPO₄, 2,0 g de KCL, pH 7,4 – diluído para 1X, acrescido de 0,5 mL de Tween 20%). Em seguida, 100 µL do antissoro (IgG produzida em coelho), específico para o CsCMV, diluído a 1/10.000 em PBS 1X, foi aplicado em cada orifícios. A placa foi novamente incubada, agora, a 37°C por duas horas em estufa e, depois, submetida a três lavagens consecutivas. Então, 10 µL da Imunoglobulina G (anti-IgG, preparada em cabra - Sigma®), conjugada à enzima fosfatase alcalina diluída 1/9000 em tampão PBS 1X, foi aplicada a cada orifício, promovendo,

novamente, a incubação e lavagem. Logo após, a placa foi incubada mais uma vez a 37°C por duas horas em estufa igualmente com três lavagens sucessivas.

Decorrido esse tempo, 100 µL do substrato p-nitrofenilfosfato (Agdia®), diluído em tampão substrato (97 mL de dietanolamina e 0,2 g de NaN₃, pH 9,8) foi aplicado nos orifícios. Por fim, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e realizou-se a leitura em leitor de ELISA VERSA max tunable, Microplate reader (Molecular Devise®) com um comprimento de onda de 405 nm.

3.3.3. Imunocaptura, transcrição reversa e PCR (IC-RT-PCR)

Folhas de mandiocas foram maceradas em tampão de cobertura (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 0,2 g de NaN₃, pH 9,8) , diluídas A 1/10 para a obtenção do extrato vegetal.

O método utilizado para a imunocaptura foi o proposto por Dovas et al. (2001) com algumas modificações. Microtubos de 0,2 µL foram revestidos com 50 µL de IgG purificada, específica para o CsCMV (2 µg / mL), Sendo posteriormente incubadas em estufa por três horas à 37°C e em seguida lavados três vezes com PBS-Tween. Posteriormente, adicionou-se 50 µL do extrato vegetal e incubou-se a 6°C overnight, seguido de duas lavagens com PBS-Tween e uma lavagem com água DEPC (Diethyl pyrocarbonate). Logo após, foi realizada a reação de RT-PCR (itens 3.3.1.2 e 3.3.1.3).

3.3.4. Sequenciamento dos produtos de PCR

3.3.4.1. Clonagem

Os fragmentos amplificados obtidos da PCR, realizada com as amostras infectadas com CsCMV, foram utilizados para a ligação com o vetor de clonagem do Kit pGem®-T Easy Vector Systems (Promega) (Figura 4), na proporção de 1 µL de água DEPC, 5 µL de 2x Rapid Ligation Buffer, 2 µL do PCR, 1 µL de pGem®-T Easy Vector (50 ng) e 1 µL de T4 DNA Ligase com volume final de 10 µL. A reação foi incubada à temperatura ambiente por uma hora. Os plasmídios foram então inseridos em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α mediante transformação por choque térmico. Dessa forma, 2 µL da reação de ligação foram inseridos em 50 µL de bactérias competentes, mantidos em gelo por 30 minutos,

transferidos para o banho-maria a 42°C por dois minutos e colocados no gelo imediatamente por dois minutos, sob câmara de fluxo laminar. Em todos os tubos, foram adicionados 450 µL de meio SEC (1 mL de meio LB (Luria Broth Base, Invitrogen) líquido, 10 µL de MgCl₂ 1 M, 10 µL de MgSO₄ 1 M, 20 µL de glicose 1 M). As células foram mantidas em agitador a 37°C e agitação de 65 rpm por uma hora para reestruturação das células competentes.

Adicionou-se 50 µL da cultura de células em placas contendo meio LB sólido (20 mL de meio LB sólido, 40 µL de X-gal 20 mg/mL, 200 µL de ampicilina 5 mg/mL e 7 µL de IPTG 20 mg/mL) e estas foram colocadas em estufa a 37°C por 16 horas.

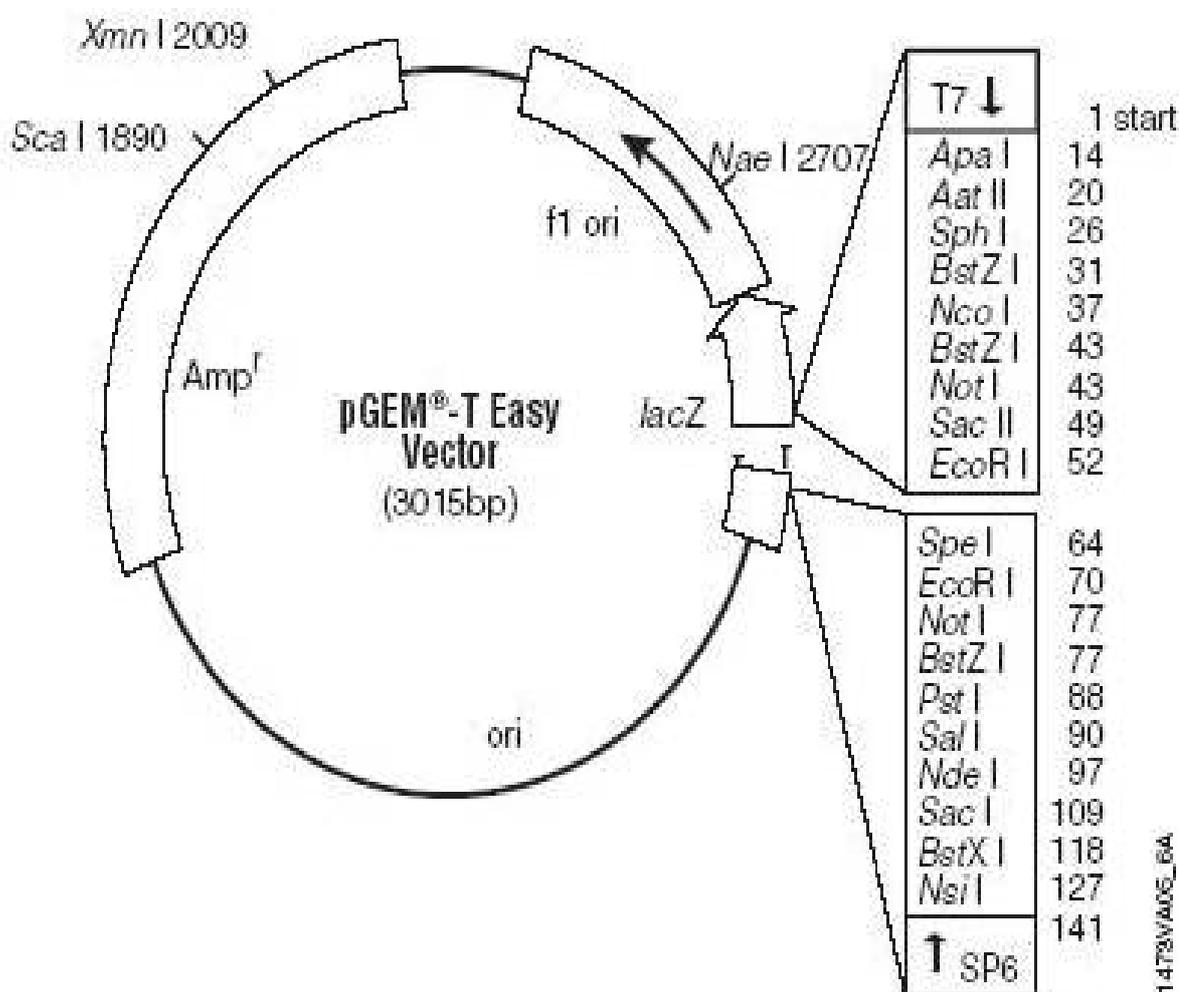


Figura 4 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy Vector, utilizado para realizar a clonagem dos fragmentos amplificados via PCR.

3.3.4.2. Seleção e estoque de clones positivos

As colônias foram escolhidas levando em consideração a sua coloração. Os clones que apresentaram coloração branca (indicativo da presença do inserto no plasmídeo) foram coletados com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e transferidos para tubos falcon contendo 5 mL de meio LB líquido e 50 µL de ampicilina (5 mg/mL). Os tubos foram mantidos a 37°C por 16 horas sob agitação para a multiplicação das células. Para o estoque dos clones positivos adicionaram-se em microtubos 150 µL de glicerol e 850 µL da cultura que foram estocados em freezer -80°C. Com o restante da cultura realizou-se a extração do DNA plasmidial.

3.3.4.3. Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) segundo recomendações do fabricante. Transferiu-se 600 µL da cultura de bactéria em meio LB para um microtubo de 1,5 mL, onde adicionou-se 100 µL de Cell Lysis Buffer invertendo o tubo por seis vezes.

A seguir, foram adicionados de 350 µL de Neutralization Solution, sendo posteriormente centrifugados a 14.000 rpm por três minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para uma microcoluna acoplada a um novo tubo, seguido de uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos. Descartou-se o que efluiu da microcoluna e adicionou-se 200 µL de Endotoxin Removal Wash procedendo a uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos. A seguir, adicionou-se 400 µL de Column Wash solution e centrifugadas a 14.000 por 30 segundos. A microcoluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL de Elution Buffer. Após, incubou-se à temperatura ambiente por um minuto, seguido de uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos para eluir o DNA plasmidial.

3.3.4.4. Sequenciamento

O sequenciamento automático foi realizado a partir de fragmentos clonados em pGem®-T Easy Vector. Para cada seqüenciamento, foram utilizados 5 µL de DNA plasmidial e 2 µL do Primer Potex 1 ou Potex 2.

O sequenciamento foi realizado pelo Setor de Sequenciamento de DNA, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de

São Paulo - USP. O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando o ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o bigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (código 4337456). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analyses 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

O programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi utilizado para analisar a identidade por comparação com sequências de outros *Potexvirus* encontradas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.4. Análises das amostras coletadas

Após a otimização das técnicas foram iniciadas as análises com as amostras, onde todas as amostras obtidas de micropropagação *in vitro*, coletadas na região produtora de Paranaíba e no Banco de Germoplasma, foram submetidas ao teste de detecção sorológica por meio de PTA-ELISA-indireto (item 3.3.2). As amostras que apresentaram resultados negativos para o teste PTA-ELISA-indireto foram submetidas à técnica de IC-RT-PCR (item 3.3.3). Logo após, foram realizados os sequenciamentos (item 3.3.4) de fragmentos obtidos da reação de RT-PCR de uma amostra da variedade Baianinha, coletada na região produtora de Paranaíba, e de fragmentos obtidos por meio da IC-RT-PCR das amostras BG 168 e BG 51 do Banco de Germoplasma.

3.5. Análise filogenética comparativa do CsCMV com outros *Potexvirus*

As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências de *Potexvirus* relacionados disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Os alinhamentos múltiplos foram obtidos por meio do programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw). A árvore filogenética foi construída a partir dos alinhamentos utilizando-se o programa Mega (www.megasoftware.net). As filogenias para cada conjunto de dados foram construídas pelo método vizinho mais próximo. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da melhor diluição dos extratos vegetais para o teste PTA-ELISA-indireto

O teste PTA-ELISA-indireto detectou a presença do CsCMV nas três diluições (1/10, 1/100 e 1/300), com base nas leituras dos valores de absorvância a 405 nm, superiores a duas vezes o valor encontrado para o controle negativo (Figura 5). A melhor diluição foi obtida a partir das leituras de maior absorvância, sendo determinada a de 1/300 (Quadro 2).

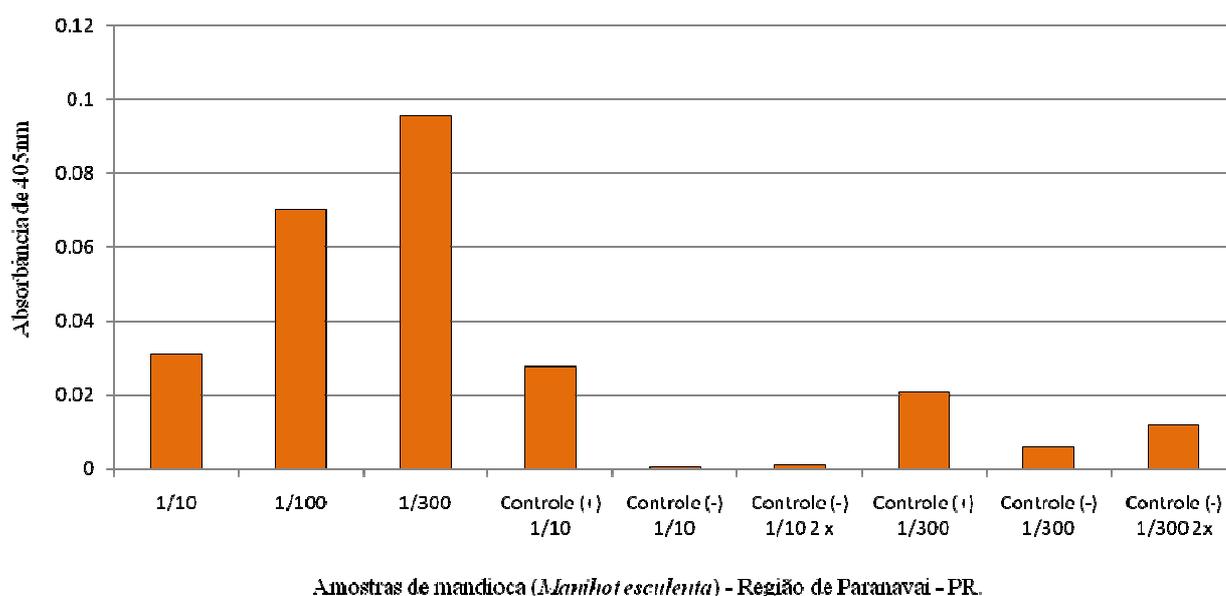


Figura 5 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca da variedade Baianinha coletadas na região produtora de Paranavaí-PR com diferentes diluições. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

Usta et al. (2005), trabalhando com *Prunus Necrotic Ringspot Virus* (PNRSV), pertencente à Família *Bromoviridae*, testaram limites de detecção com diferentes diluições das amostras, apresentando limite de detecção de 1/80 pelo ELISA, após 2 horas da leitura.

Quadro 2 – Valores da absorbância a 405 nanômetros das diferentes diluições testadas com leitura após 30 minutos de incubação

| Diluições | Absorbância (405nm) |
|-----------------------|---------------------|
| 1/10 | 0,0310 |
| 1/100 | 0,0702 |
| 1/300 | 0,0956 |
| Controle (+) 1/10 | 0,0275 |
| Controle (-) 1/10 | 0,0004 |
| Controle (-) 1/10 2x | 0,0009 |
| Controle (+) 1/300 | 0,0206 |
| Controle (-) 1/300 | 0,0059 |
| Controle (-) 1/300 2x | 0,0119 |

4.2. Detecção sorológica do CsCMV através do PTA-ELISA-indireto

Os resultados obtidos por meio do teste PTA-ELISA-indireto com o antissoro para o CsCMV na diluição 1/10.000 demonstraram que, das 61 amostras coletadas na região produtora de Paranaíba-PR, 60 estavam infectadas com o CsCMV, correspondendo a 98,3% das plantas. Apresentarem leituras com valores de absorbância a 405 nm, superiores a duas vezes o valor encontrado para o controle negativo, na diluição testada de 1/300 (Quadro 3). Por outro lado, das 20 amostras coletadas no Banco de Germoplasma da FEI, 15 estavam infectadas, ou seja, 75% apresentaram a presença do vírus (Figura 6). Estes dados são similares aos encontrados por Carnellosi (2010), que observou por meio do método PTA-ELISA-indireto que todas as variedades de mandioca testadas, as quais foram Olho Junto, Baianinha, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13 e IAC 14, estavam infectadas com o CsCMV.

Na análise, 65 amostras foliares obtidas de plantas provenientes da micropropagação *in vitro*, 55 estavam infectadas com o CsCMV, ou seja 84,6% (Quadro 3). Os valores elevados de infecção viral nestas plantas ocorrem devido à dificuldade de se obter explantes meristemáticos de um tamanho ideal para produzir plantas livres de vírus. De acordo com Murashige e Skoog (1962), para a obtenção de plantas livres de vírus, um fator importante se refere ao tamanho do explante meristemático retirado, variando entre 0,1 a 1 mm, pois, quanto menor o explante

retirado, maior a chance de se obter plantas saudias, porém maior é a dificuldade de sua regeneração.



Figura 6 - Placa do Teste PTA-ELISA-indireto mostrando a coloração amarela, indicando a reação antígeno x anticorpo apresentando resultado positivo para o CsCMV em amostras de cultura de tecidos.

Comparando as leituras de absorvância das plantas coletadas no campo da região produtora de Paranaíba-PR com as leituras de absorvância das plantas do Banco de Germoplasma da FEI, os maiores valores foram das amostras de Paranaíba, que variaram entre 0,033 a 0,625 nm, caracterizando-se como as plantas de maior concentração viral (Figura 7, 8 e 9). A alta concentração do vírus nas plantas provenientes do campo se deve provavelmente às práticas culturais da mandioca, pois a utilização de manivas de mesma origem em plantios sucessivos favorece o acúmulo de vírus, facilitando a disseminação deste ao longo dos ciclos de plantio, conforme sugerido por Costa e Kitajima (1972).

As plantas do Banco de Germoplasma apresentaram leituras de absorvância com valores menores, variando de 0,011 a 0,119nm, indicando uma menor concentração viral do que as plantas coletadas na região produtora de Paranaíba-PR (Figura 10 e 11). No entanto, devemos considerar que os materiais analisados não foram exatamente os mesmos, sendo as variedades cultivadas na região de Paranaíba destinadas à indústria, enquanto as variedades do Banco de

Germoplasma da UEM são predominantemente de origem domiciliar, com predominância de variedades de mandioca de mesa.

Quadro 3 – Origem das amostras, variedades, números de plantas testadas pelo PTA-ELISA-indireto e porcentagem do total de plantas infectadas

| Origem das amostras | Variedades | N° de plantas testadas | N° de plantas Infectadas | % de plantas Infectadas |
|---|-------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Plantas coletadas em áreas produtoras de Paranaíba-PR | Olho Junto | 22 | 21 | 98,3% |
| | Fécula Branca | 7 | 7 | |
| | IAC 90 | 5 | 5 | |
| | Baianinha | 22 | 22 | |
| | LDA 92 | 2 | 2 | |
| | 118-95 | 1 | 1 | |
| | IVAR | 1 | 1 | |
| | Cascuda | 1 | 1 | |
| | Total | 61 | 60 | |
| Plantas obtidas por micropropagação <i>in vitro</i> | Olho Junto | 58 | 50 | 84,6% |
| | Fécula Branca | 2 | 2 | |
| | Baianinha | 3 | 2 | |
| | Pasquini | 1 | 1 | |
| | IAC 12 | 1 | 0 | |
| | Total | 65 | 55 | |
| Plantas do Banco de Germoplasma da UEM | Fécula-Branca | 2 | 2 | 75% |
| | IAC 576-70 | 1 | 1 | |
| | Não identificadas | 17 | 12 | |
| | Total | 20 | 15 | |

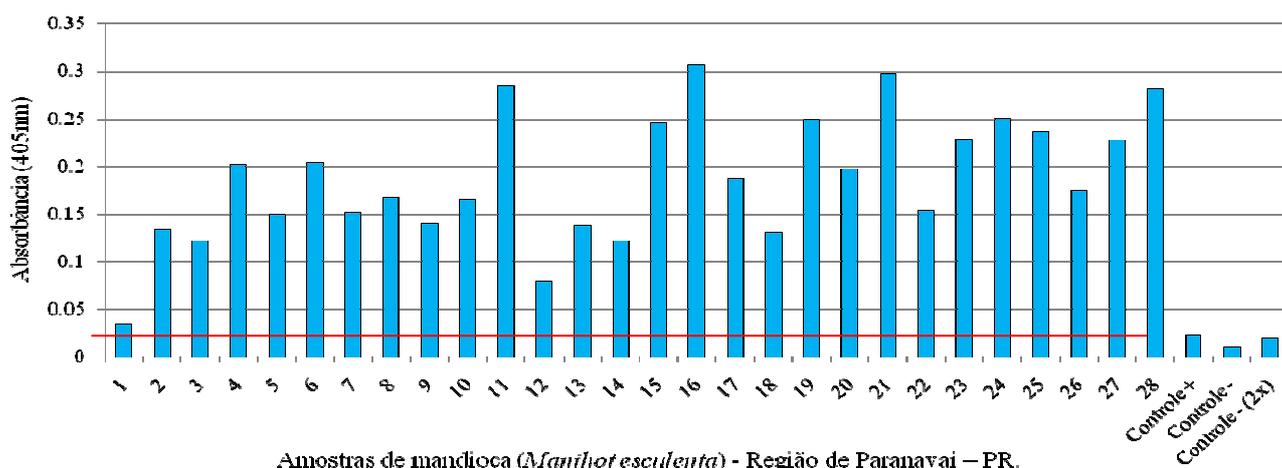


Figura 7 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca coletadas na região produtora de Paranaíba-PR. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

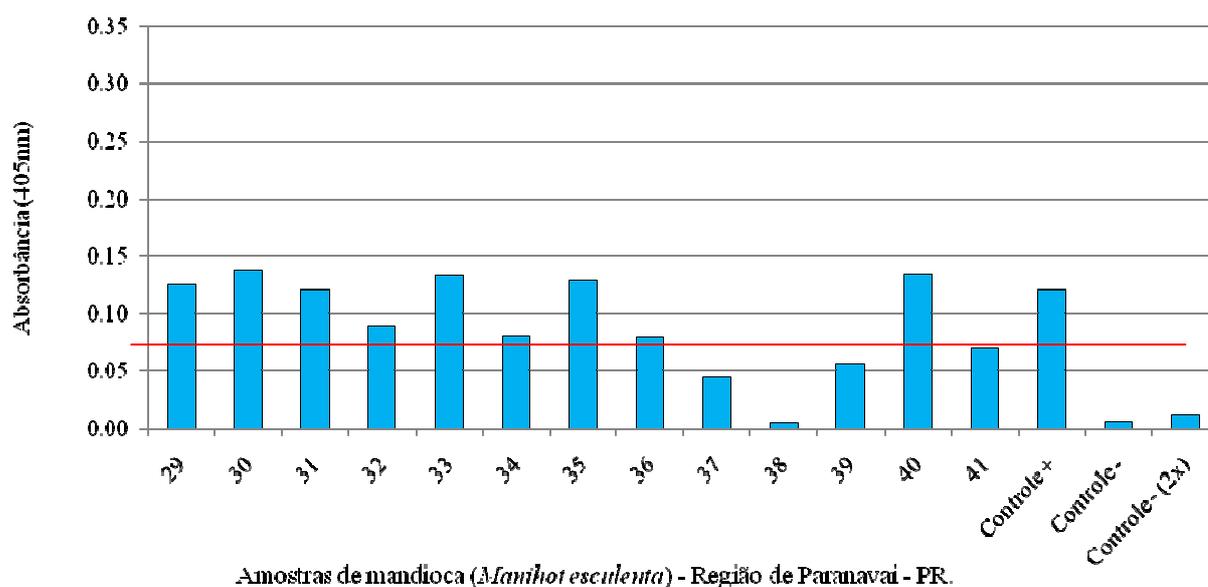


Figura 8 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca coletadas na região produtora de Paranavaí-PR. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

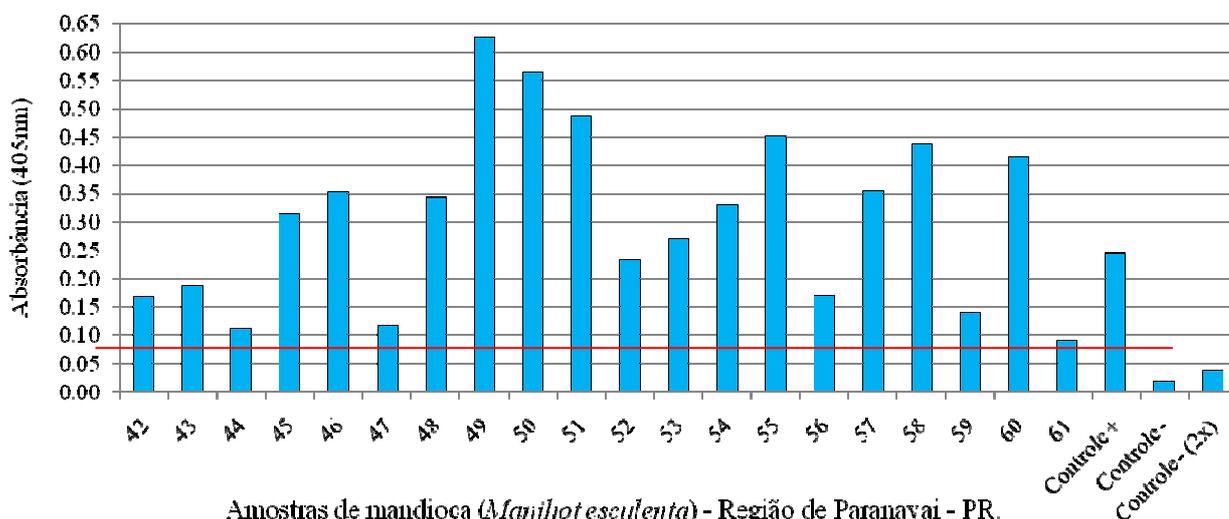
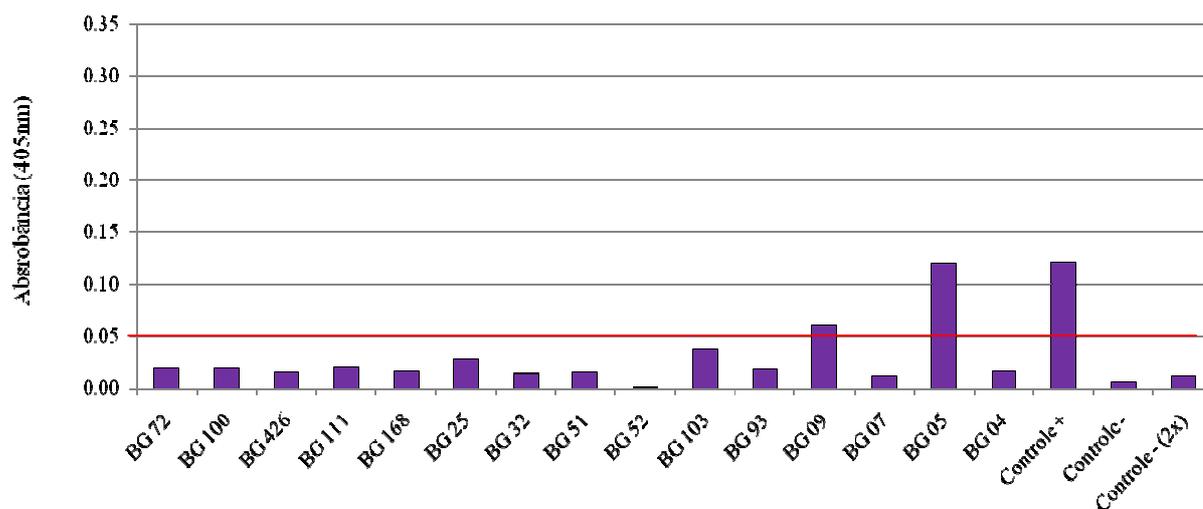
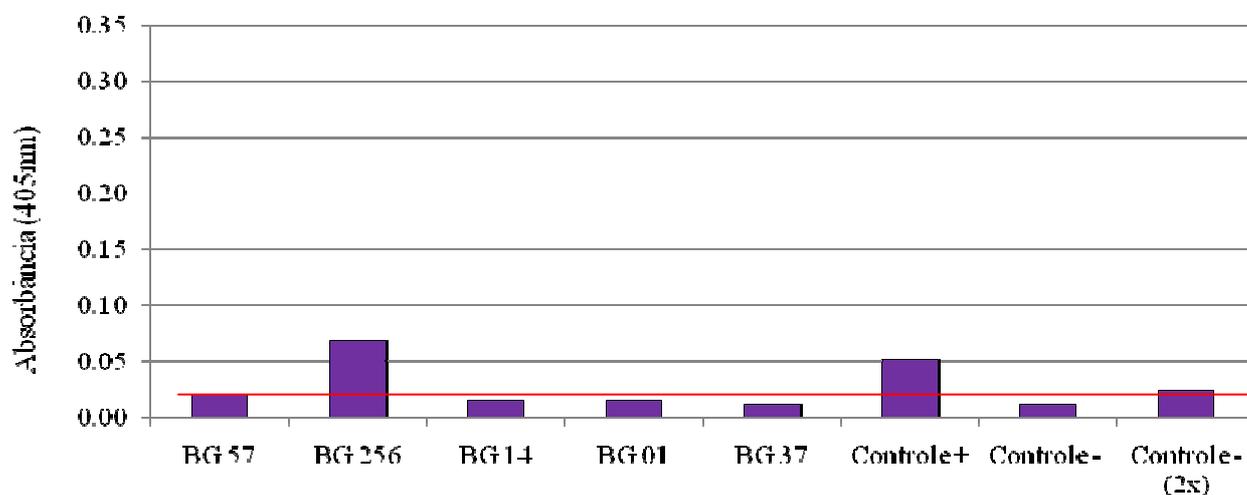


Figura 9 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca da variedade Baianinha coletadas na região produtora de Paranavaí-PR. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.



Amostra de mandioca (*Manihot esculenta*) - Banco de Germoplasma (BG) - UEM

Figura 10 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca do Banco de Germoplasma (BG) da UEM. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.



Amostras de mandioca (*Manihot esculenta*) - Banco de Germoplasma (BG) - UEM

Figura 11 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca do Banco de Germoplasma da UEM. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

Os valores de absorvância encontrados nas amostras obtidas pela micropropagação *in vitro* (0,027 a 0,193nm) (Figura 12, 13 e 14) foram maiores do que os obtidos nas amostras provenientes do Banco de Germoplasma da UEM. Isso talvez possa estar relacionado ao fato de que as plantas utilizadas na micropropagação *in vitro* tenham sido provenientes de áreas produtoras antigas, onde as manivas são originárias de cultivos anteriores e nem sempre produzidas com as recomendações fitossanitárias mais indicadas. Enquanto as plantas do Banco de Germoplasma são materiais de introdução mais recente, provenientes de cultivos domiciliares, os quais não foram submetidos ao mesmo regime cultural, como cortes sucessivos para a produção de manivas, o que facilitaria o maior acúmulo de vírus no material de propagação.

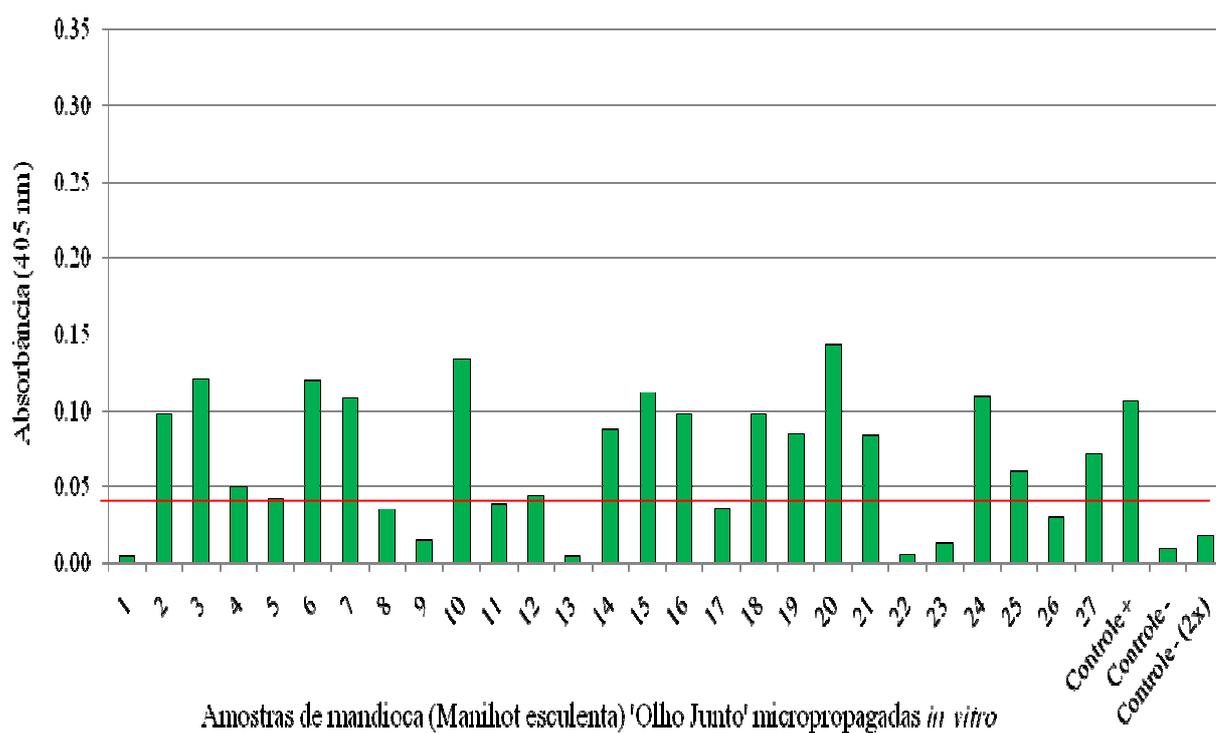


Figura 12 – Valores de absorvância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca da variedade Olho Junto micropropagadas *in vitro*. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

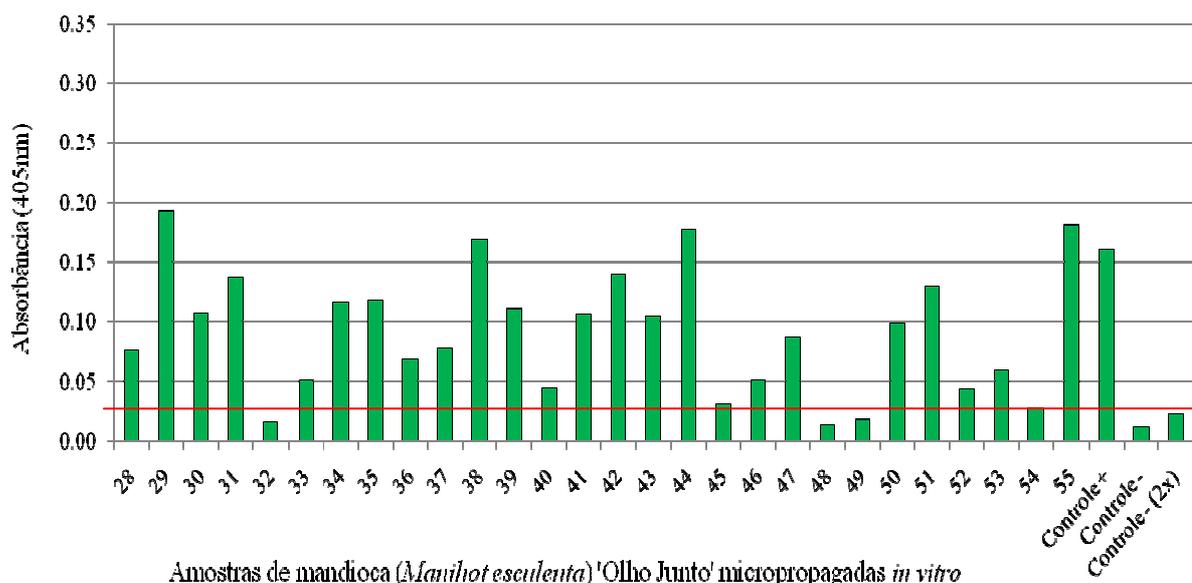


Figura 13 – Valores de absorbância do teste ELISA-indireto em amostras de mandioca da variedade Olho Junto (OJ) micropropagadas *in vitro*. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

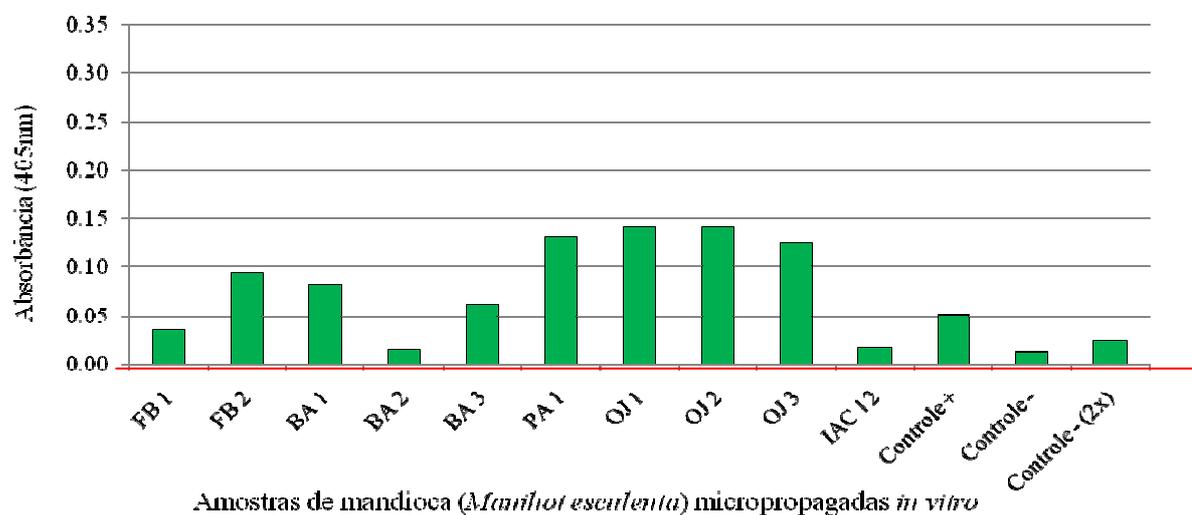


Figura 14 – Valores de absorbância do teste PTA-ELISA-indireto em amostras de mandioca das variedades Fécula Branca (FB), Baianinha (BA), Pasquini (PA), Olho Junto (OJ) e IAC 12 micropropagadas *in vitro*. Controle (+) planta de *Nicotiana benthamiana* inoculada com o CsCMV. Controle (-) planta sadia de *Nicotiana benthamiana*; Controle (-) 2x – valores de *Nicotiana benthamiana* sadia multiplicadas por 2.

4.3. Detecção molecular do CsCMV

As amostras infectadas com o CsCMV apresentaram fragmentos específicos de $\cong 750$ pb em gel de agarose após amplificação por RT-PCR utilizando os primers Potex 1 e Potex 2, o que, segundo Gibbs et al. (1998), correspondem à parte da região 5'- terminal da ORF1 do gene codificador da proteína replicase dos *Potexvirus* (Figura 15).

A PCR é uma ferramenta diagnóstica bem estabelecida e altamente sensível, mostrando-se superior para determinados vírus de plantas sobre os métodos sorológicos comumente utilizados (Vunsh et al., 1990). E, segundo Mekuria et al. (2003), a técnica de RT-PCR tem a vantagem adicional de o material vegetal poder ser testado a qualquer momento durante o período vegetativo.

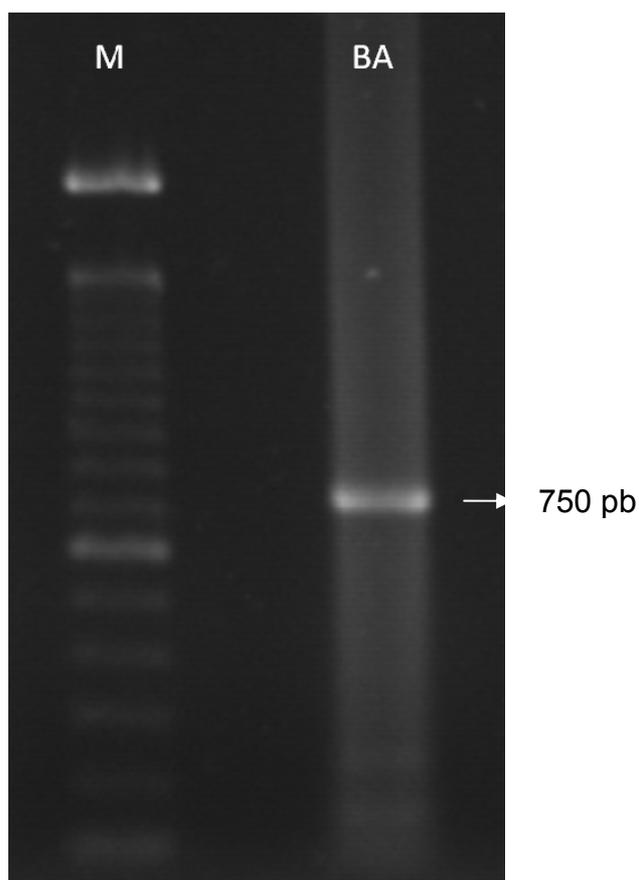


Figura 15 – Produto de PCR em gel de agarose a 1,2% confirmando o resultado da RT-PCR utilizando primers específicos para o *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); BA: Amostra da variedade Baianinha coletada na região de Paranavaí – PR infectada com CsCMV.

4.4. Imunocaptura, transcrição reversa e PCR (IC-RT-PCR)

A técnica de IC-RT-PCR foi realizada apenas nas amostras que apresentaram resultado negativo para o PTA-ELISA-indireto (Quadro 4).

As vantagens da imunocaptura em relação a outros métodos de detecção de vírus bem estabelecidos, como o ELISA ou o RT-PCR, residem no fato de que a IC-RT-PCR combina características do ELISA, como sua boa adaptação à análise automática e de rotina, com a sensibilidade superior apresentada pelo PCR, na amplificação de ácidos nucleicos, evitando-se a necessidade das etapas de purificação dos mesmos, quando se utiliza a imunocaptura (Mansilla et al, 2003).

A imunocaptura apresenta a vantagem de usar extrato vegetal bruto que simplifica o procedimento de preparação das amostras, contornando a extração de ácidos nucleicos que é um processo trabalhoso (Dovas et al., 2001).

Quadro 4 – Origem das amostras e resultados obtidos por meio do Teste PTA-ELISA-indireto e por meio da IC-RT-PCR

| Origem das amostras | Nº de plantas livres do vírus pelo PTA-ELISA-indireto | Nº de plantas livres do vírus pela IC-RT-PCR |
|---|---|--|
| Plantas coletadas em áreas produtoras de Paranaíba-PR | 1 | 1 |
| Plantas obtidas por micropropagação <i>in vitro</i> | 10 | 5 |
| Plantas do Banco de Germoplasma da UEM | 5 | 0 |

James (1999), ao estudar o vírus *Apple stem grooving virus* (ASGV), também pertencente a Família *Flexiviridae*, que infecta a macieira, relatou que a IC-RT-PCR foi quatro vezes mais sensível que a RT-PCR para o ASGV, e por isso se apresenta como um método muito sensível, e que requer técnicas rigorosas para evitar resultados falsos positivos.

Estudos realizados por Jacobi et al. (1998), com vírus da Família *Tobamovirus*, na detecção de *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV) em raízes coníferas e em extrato bruto da planta pelo IC-RT-PCR, afirmaram também que esse método é pelo menos 104 vezes mais sensível que o ELISA quando apenas um vírus está presente na planta.

A imunocaptura foi capaz de detectar a presença do vírus em todas as plantas analisadas do Banco de Germoplasma da UEM que se apresentaram livres do vírus pelo teste PTA-ELISA-indireto (Figura 16). Por outro lado, nas plantas micropropagadas *in vitro* a presença do vírus foi detectada nas amostras OJ 1, 9 e 13, IAC 12 e BA 2, mas o vírus não foi detectado nas amostras OJ 22, 23, 32, 48 e 49 por meio do IC-RT-PCR (Figura 17, 18 e 19), assim como na única amostra da região de Paranavaí que havia apresentado resultado negativo no PTA-ELISA-indireto (Figura 20). A IC-RT-PCR, se mostrou eficaz na detecção direta do CsCMV a partir de folhas de mandioca, demonstrando ser mais sensível que o ELISA.

Wetzel et al. (1992) utilizaram pela primeira vez a técnica de imunocaptura na detecção de um *Potyvirus* de ameixeiras, demonstrando a sua alta sensibilidade e superioridade para a detecção de baixas concentrações deste vírus, quando comparado com o diagnóstico realizado pelo teste ELISA.

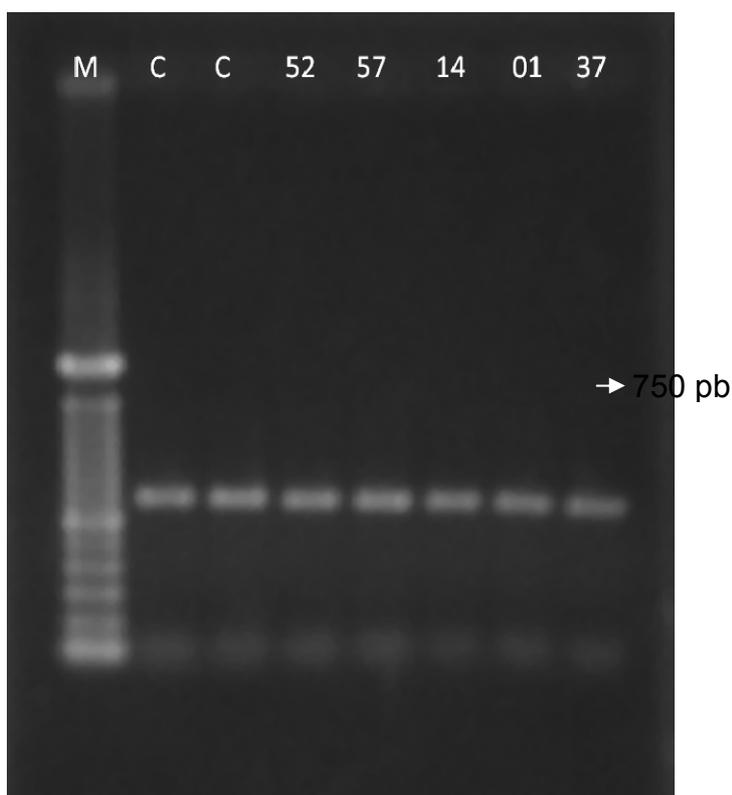


Figura 16 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); C: controle positivo; 52, 57, 14, 01 e 37: Amostras do Banco de Germoplasma da UEM infectada com CsCMV.

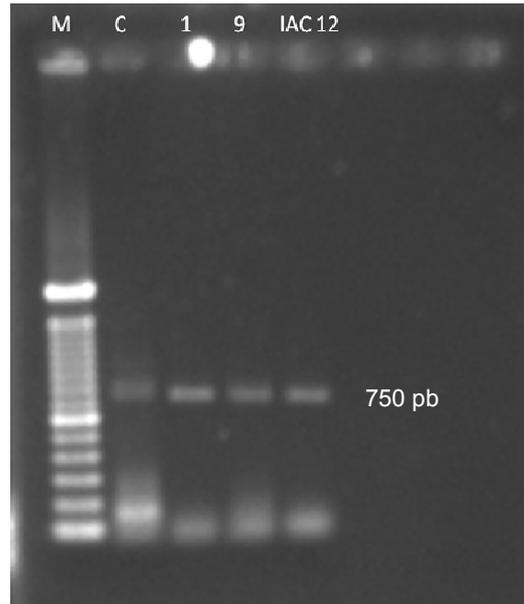


Figura 17 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); C: controle positivo; OJ 1, 9 e IAC 12: Amostras da micropropagação *in vitro* infectada com CsCMV.

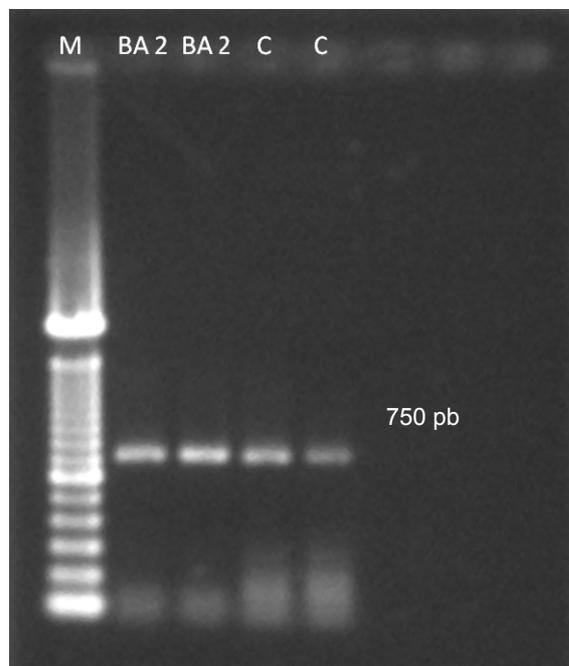


Figura 18 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); BA 2: Amostra da variedade Baianinha da micropropagação *in vitro* infectada com CsCMV, C: controle positivo.

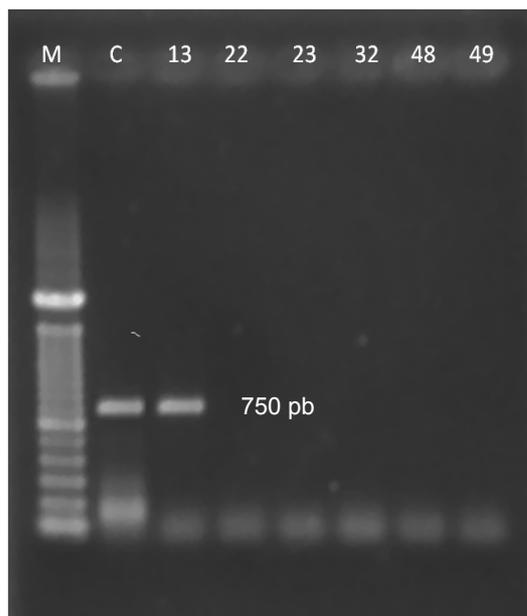


Figura 19 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); C: controle positivo; OJ 13, 22, 23, 32, 48 e 49: Amostras da variedade Olho Junto da micropropagação *in vitro* infectada com CsCMV.

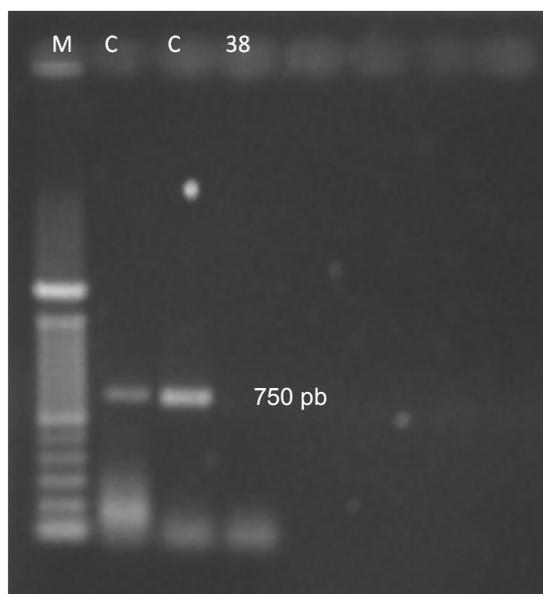


Figura 20 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% confirmando o resultado de IC-RT-PCR utilizando os primers específicos para *Potexvirus*. M: Marcador molecular Ladder 100 pb (Invitrogen); C: controle positivo; 38: Amostra coletada na região de Paranavaí – PR não apresentando infecção pelo CsCMV.

4.5. Sequenciamento dos produtos de RT-PCR e IC-RT-PCR

As sequências obtidas por meio do sequenciamento foram analisadas e comparadas com as sequências disponíveis no GenBank utilizando-se a função

BLAST, que fornece as sequências similares àquelas de nucleotídeos consultadas (Quadro 5).

Quadro 5 – Sequências de nucleotídeos obtidas no GenBank utilizadas no alinhamento para a construção da árvore filogenética

| Espécie | Hospedeiro | Origem | Número do acesso |
|--------------------------------|--|-----------------|------------------|
| Cassava commom mosaic virus | Mandioca | Brasil | U23414 |
| Plantago asiatica mosaic virus | * | * | AB360796 |
| Nadina mosaic virus | * | EUA | AY800279 |
| Tulip virus X | * | * | AB066288 |
| Mint virus X | * | * | AY789138 |
| Hydrangea ringspot virus | Hortência | República Checa | GQ265901 |
| Foxtail mosaic virus | * | * | EF630360 |
| Bamboo mosaic virus | * | * | AF018156 |
| Allium virus X | Alho | Holanda | FJ670570 |
| Clover yellow mosaic virus | * | * | D29630 |
| Cactus virus X | Pitaia vermelha | * | AF308158 |
| Schlumbergera virus X | * | * | AY366207 |
| Papaya mosaic virus | * | * | D13957 |
| Potato virus X | Batata | China | EF423572 |
| Lettuce virus X | Alface | Iran | AM745758 |
| Pepino mosaic virus | Tomate | Chile | DQ000985 |
| Alternanthera mosaic virus | Phlox stolonifera cv. Sherwood Purple | EUA | AY863024 |

*Dados não encontrados.

As sequências que foram comparadas através da função Blast apresentaram aproximadamente 87% de homologia com a sequência de um isolado brasileiro do *Cassava common mosaic virus* (U23414.1). Portanto, o vírus identificado neste trabalho é uma estirpe do CsCMV, conforme os critérios taxonômicos adotados para os *Potexvirus*, os quais consideram como sendo da mesma espécie isolados virais que apresentarem identidade na sequência de nucleotídeos superiores a 72% (Adams et al., 2004).

4.6. Análise filogenética comparativa do CsCMV com outros *Potexvirus*

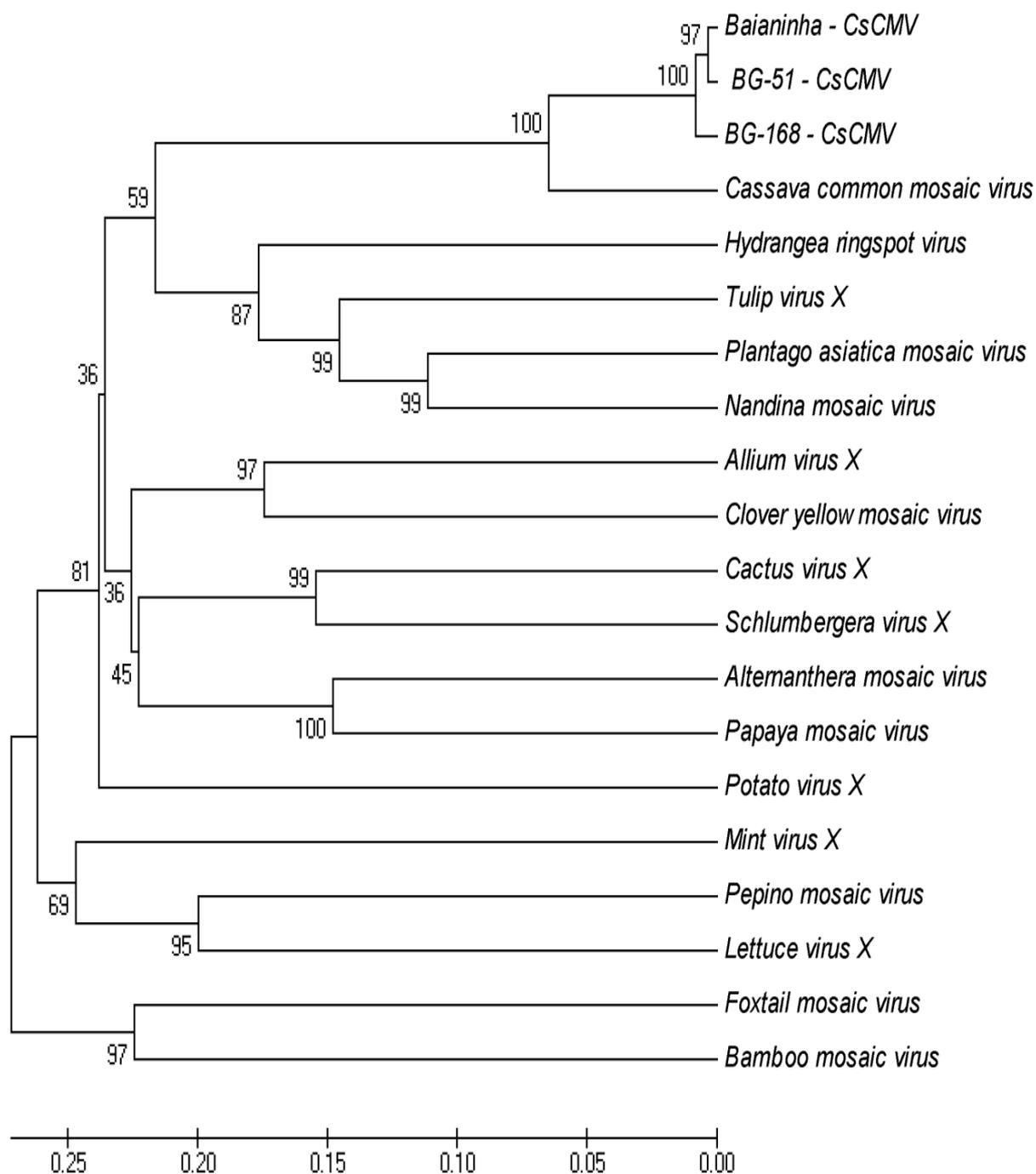


Figura 21 - Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento dos nucleotídeos correspondente à parte da região 5'- terminal da ORF1 do gene codificador da proteína replicase do CsCMV identificado neste trabalho, com alguns *Potexvirus* relacionados. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições obtidas nas análises de *bootstrap* (1.000 repetições).

De acordo com a árvore filogenética obtida a partir das sequências de nucleotídeos que correspondem à parte da região 5'- terminal da ORF1 do gene codificador da proteína replicase de *Potexvirus*, com o CsCMV identificado neste trabalho, verificou-se que o CsCMV do Paraná agrupou no mesmo ramo de outro isolado do CsCMV (Figura 21), também do Brasil, clonado e sequenciado por Calvert et al. (1996) obtido no Genbank (U23414).

5. CONCLUSÕES

A IC-RT-PCR foi mais sensível que o teste PTA-ELISA-indireto, na detecção do CsCMV e, portanto, deve ser utilizada sempre que possível como teste de indexação complementar, para confirmação dos resultados sorológicos obtidos.

O resultado do sequenciamento demonstrou que o vírus detectado em mandioca no Paraná é o CsCMV.

A limpeza clonal *in vitro* do CsCMV não se mostrou totalmente eficiente na erradicação do vírus das plantas micropropagadas, enfatizando a necessidade da indexação viral, por métodos sorológicos e moleculares, dos materiais utilizados na propagação da mandioca.

Por meio dos resultados, pode-se concluir que o CsCMV está presente nas regiões produtoras de mandioca no Noroeste do Paraná, infectando todas as variedades cultivadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM-Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Evolução das exportações brasileiras de fécula de mandioca - em mil t/ano**. 2007. Disponível em: <http://abam.com.br/expo_fecula.php>. Acesso em: 24, novembro, 2010a.

ABAM-Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Exportação - Amidos Modificados**. 2007. Disponível em: <http://abam.com.br/expo_amido.php>. Acesso em: 24, novembro, 2010b.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A.A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G.D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G.; ZAVRIEV, S.K.; FAUQUET, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, 149:1045-1060, 2004.

ALMEIDA, A.M.R. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. (eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em Fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p. 63-94.

BARRY, K.; HU, J.S.; KUEHNLE, A.R.; SUGHII, N. Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in Hawaiian orchids. **Journal Phytopathology**, 144:179-186, 1996.

BRUIJN, G.H.; FRESCO, L.O. The importance of cassava in world food production. **Netherland Journal of Agriculture Science**, 37:21-34, 1989.

CALVERT, L.A.; CUERVO M.I.; OSPINA, M.D.; FAUQUET, C.M.; RAMIREZ, B.C. Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species; Short communication. **Journal of General Virology**, 77:525-530, 1996.

CALVERT, L.A.; THRESH, J.M. The Viruses and Virus Diseases of Cassava. In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A.C. (Eds.). **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 237-260.

CARNELOSSI, P.R. **Limpeza clonal de variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e produção de antissoro para o vírus do mosaico comum da mandioca**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 106p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

CEBALLOS, H.; CRUZ, G.A.A. Taxonomia e morfologia de la yuca. In: OSPINA B.; CEBALLOS, H. (eds.). **La Yuca en el tercer milenio**. Cali- Colombia: CIAT, 2002. p. 1-13.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C.A.; PEREZ, J.C.; DIXON, A.G.O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, 56:503-516, 2004.

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**, 34:475-483, 1977.

CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme linked immunosorbent assay in plant virology. **Methods in Virology**, 7:51-85, 1984.

COLARICCIO, A.; PERUCH, L.A.M.; PEREIRA, L.S.; POLA, A.C.; NEUBERT, E. Primeiro relato do mosaico comum da mandioca em Santa Catarina. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, Botucatu, 2009. **Resumos...** Botucatu: CERAT/UNESP, 2009. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/compendio/artigos.html>>. Acesso em: 10, novembro, 2010.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W. *Cassava common mosaic virus*. CMI/AAB. **Description Plant Viruses**, 90:4, 1972.

DOVAS, C.I.; HATZILOUKAS, E.; SALOMON, R.; BARG, E.; SHIBOLETH, Y.; KATIS, N.I. Comparison of Methods for Virus Detection in *Allium* spp. **Journal Phytopathology**, 149:731-737, 2001.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 1, fevereiro, 2010.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA - Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura. **Instruções práticas para o cultivo de mandioca**. Cruz das Almas, 1993, p. 53-56.

FUKUDA, W. M. G.; FUKUDA, C.; DIAS, M. C.; XAVIER, J. J. B. N.; FIALHO, J. F. Variedades. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p. 433-454.

GIBBS, A.; ARMSTRONG, J.; MACKENZIE, A.M.; WEILLER, G.F. The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridization-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. **Journal of Virological Methods**, 74:67-76, 1998.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**. Comparativo entre a safra 2010 e as estimativas para 2011. Brasil – Outubro 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201010_9.shtm>. Acesso em: 24, novembro, 2010a.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tabela 283**: Produção vegetal e área colhida dos estabelecimentos agropecuários por tipo de produção vegetal – série histórica (1920/2006). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=283&z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 27, outubro, 2010b.

IWANAGA, M.; IGLESIAS, C. Cassava genetic resources management at CIAT. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1, 1992, Cali. **Proceedings**. Rome: International Plant resources Institute. 1994. p. 77-86.

JACOBI, V.; BACHAND, G.D.; HAMELIN, R.C.; CASTELO, J.D. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. **Journal of Virological Methods**, 74:167-178, 1998.

JAMES, D. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. **Journal of Virological Methods** 83:1-9, 1999.

JANSEN, R.W.; SIEGL, G.; LEMOM, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of National Academy of Science*, 87:2867-2871, 1990.

JENNINGS, D.L. Cassava, *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae). In: SIMMONDS, N.W. (ed.). **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p. 81-84.

KITAJIMA, E.W.; WETTER, C.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M.; COSTA, A.S. Morfologia do vírus do mosaico comum da mandioca. **Bragantia**, 24:247-260, 1965.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de mandioca, infetados pelo vírus do mosaico comum da mandioca. **Bragantia**, 25:23-26, 1966.

LIMA, M.F. **Deteção e controle de viroses em videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009 (Circular Técnica, n, 90). Disponível em: <www.cpatia.embrapa.br>. Acesso em 27 de out de 2010.

LOPEZ, M.M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; CARUSO, P.; GORRIS, M.T.; LLOP, P.; PENYALVER, R.; CAMBRA, C. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, 6:233-343, 2003.

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A.C. **Cultura da mandioca**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), 1993. (Boletim Técnico, n. 211).

MANSILLA, C.; SANCHES, F.; PONZ, F. The diagnosis of the tomato variant of pepino mosaic virus: An IC-RT-PCR approach. **European Journal of Plant Pathology**, 109:139-146, 2003.

MCMAHON, J.M.; WHITE, W.L.B.; SAYRE, R.T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany**, 46:731-714, 1995.

MEKURIA, G.; RHAMES, S.A.; ALBERSTS, E.; BERTOZZI, T.; WIRTHENSOHN, M.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Comparison of ELISA and RT-PCR for detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). **Journal of Virological Methods**, 114:65-69, 2003.

MENTABERRY A.; ORMAN B. *Potexviruses*. In: SING, R.P.; SINGH U.S.; KOHMOTO K. (eds). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases. histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Vol 3: Viruses and Viroids. Kidlington:Elsevier Science Ltd, 1995. p. 19–33.

MIYAI, T. **Detecção de *Odontoglossum ringspot virus* em orquídeas por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais produzidos contra proteína capsidial recombinante**. São Paulo: IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

MULLIS, K.F.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Quantitative Biology**, 51:263-273, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

NOLT, B.L.; VELASCO, A.C.; PINEDA, B. Improved purification procedure and some serological and physical properties of *Cassava common mosaic virus* from South America. **Annals of Applied Biology**, 118:105-113, 1991.

OLIVEIRA, A.J.; ALCARDE, V.E.; CANOILAS, L.M.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Cultivo de microorganismos em mandioca e subprodutos da industrialização. In: CEREDA, M.P. (ed.). **Manejo uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p. 269-279. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 4).

PEREIRA, A.S.; PINTO, M.G. Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes “in natura”. **Bragantia**, 21:145-150, 1962.

ROCA, W.M. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Mcmillan, 1984. p. 269-301.

RODRIGUES, A.R.; ALVES, J.M.; UCHÔA, S.C.P.; ALBUQUERQUE, J.A.A.; RODRIGUES, G.S.; BARROS, M.M. A Avaliação da Capacidade de Enraizamento, em Água, de Brotações, Ponteiros e Estacas Herbáceas de Clones de Mandioca de Mesa. **Revista Brasileira de Agroambiente**, 2:37-45, 2008.

SOARES, M.B.B.; VALLE, T.L.; COLARICCIO, A.; FELTRAN, J.C.; VAZ LOBO, R.S.; MARTINS, A.L.M. Disseminação do Vírus do Mosaico Comum em área de mandioca (*Manihot esculenta* crantz.). In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, Botucatu, 2009. **Anais...** Botucatu: CERAT/UNESP, 2009. p. 394-398. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/compendio/artigos.html>>. Acesso em: 10, novembro, 2010.

TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S.A. **Cultura da mandioca**. Paranavaí: Indemil/Yoki, 2001. 88p.

USTA, M.; SIPAHIOGLU, H.M.; POLAT, B. Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR Methods for the Detection of *Prunus Necrotic Ringspot Virus* (PNRSV). **Journal of Agricultural Science**, 15:153-158, 2005.

VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.L.; RAMOS, M.T.B.; MUHLEN, G.S.; VILLELA, O.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, 63:221-226, 2004.

VAN DER VLUGT, R.A.A.; BERENDSEN, M. Development of a general potexvirus detection method. **European Journal of Plant Pathology**, 108:367–371, 2002.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. 1167p.

VIANA, A.E.S.; SEDIYAMA, T.; LOPES, S.C.; CECON, P.R.; SILVA, A.A. Avaliação de métodos de preparo de manivas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciência Agrotécnica**, Edição Especial:1383-1390, 2002.

VILPOUX, O.F. Arranjos institucionais nas transações entre produtores e fecularias de mandioca: abordagem pela economia dos custos de transação. **Informe Gepec**, 14:127-146, 2010.

VILPOUX, O.F.; SPROESSER, R.L.; CAMPEÃO, P. Avaliação dos sistemas de coordenação entre produtores e fecularias de mandioca através a economia dos custos de transação. In: XLV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, Londrina, 2007. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira De Economia, Administração E Sociologia Rural, 2007. Disponível em: < <http://www.sober.org.br/>>. Acesso em: 05, dezembro, 2010.

VUNSH, R.; ROSNER, A.; STAIN, A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in *Gladiolus*. **Annals of Applied Biology**, 117:561-569, 1990.

WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUAIRE, G.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal Virological Methods**, 39:27-37, 1992.

WEBSTER, J.P.; GOWER, C.M.; BLAIR, L. Do hosts and parasites coevolve? Empirical support from the *Schistosoma* system. **The American Naturalist**, 164:33–51, 2004.