

PERFIL PROTEÔMICO, EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DO  
PATOSSISTEMA *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic vírus

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2020

PERFIL PROTEÔMICO, EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DO  
PATOSSISTEMA *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic vírus

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Produção  
Vegetal”

Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2020

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C331 Carvalho, Beatriz Murizini.

Perfil proteômico, epidemiológico e genético do patossistema *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic virus / Beatriz Murizini Carvalho. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

120 f. : il.

Bibliografia: 18 - 27.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Alexandre Pio Viana.

1. Interação planta-patógeno. 2. Proteômica *gel-free*. 3. Virose do endurecimento dos frutos. 4. *P. edulis*. 5. *P. setacea*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

PERFIL PROTEÔMICO, EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DO  
PATOSSISTEMA *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic vírus

**BEATRIZ MURIZINI CARVALHO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Produção  
Vegetal”

Aprovada em 14 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:

---

Dr. Marcelo Eiras (D.Sc. Agronomia) Instituto Biológico - SP

---

Dr<sup>a</sup>. Eileen Azevedo Santos (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF

---

Prof.<sup>a</sup> Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Orientador)

À minha preciosa família, Ana, Jacinto, Rachel e João, que são minha base, e ao meu amado namorado, Pedro Henrique, por sempre estar em todos os momentos comigo, me apoiando e torcendo por mim

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias e ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso. E ao programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo acolhimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado. E as agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

Ao meu orientador, professor Alexandre Pio Viana, pela orientação e confiança que sempre demonstrou por mim, por estar sempre disponível a sanar alguma dúvida e pelos ensinamentos nesses anos de doutorado. E principalmente pela oportunidade de fazer parte do programa de melhoramento do maracujazeiro.

Ao professor Vanildo Silveira, pela parceria e disponibilidade para a realização desse trabalho. Ao Ricardo e Felipe, pela atenção e ajuda. E ao Caio que me acompanhou nesse trabalho e durante essa caminhada se tornou um grande amigo.

À professora Rosana Rodrigues, por todos os ensinamentos, tanto em sala de aula, como nas minhas bancas.

Ao Dr. Marcelo Eiras, pela disponibilidade de participar das minhas bancas, pelas valiosas contribuições no meu trabalho e com o grupo e por ter realizado a confirmação do isolado viral utilizado nesse trabalho.

À Dra. Eileen Santos, por estar sempre disponível a me ajudar e pelos conselhos que me deu durante essa caminhada e também pelos puxões de orelha. Pela orientação e aprendizados passados. Pelas tardes de trabalho e também de conversa e pelos cafés diários no laboratório nos últimos anos do doutorado. E por ter se tornado, nesse caminho, uma grande amiga.

À minha querida mãe, Ana Margarida, pelo carinho e por toda a força depositada em mim ao longo dessa jornada e por sempre ter confiado em mim.

Ao meu querido pai, Jacintho, por toda ajuda e pelas inúmeras cobranças, que me fazem a cada dia querer enfrentar os obstáculos que vem pela frente.

À minha querida irmã, Rachel, por estar sempre presente, mesmo que longe, nessa caminhada, confiando e torcendo por mim. Por ser sempre meu guarda roupas alternativo. E por ter me dado a honra de ser tia/madrinha do menino mais iluminado que eu conheço, o João.

Ao meu querido namorado Pedro Henrique, um verdadeiro companheiro nessa caminhada. Por sempre estar disposto a me ajudar, mesmo quando está atolado de coisas para fazer. Por tantos conselhos e puxões de orelha, e por tantos elogios também, que me fazem ser uma pessoa melhor. Por sempre estar ao meu lado nessa caminhada, me motivando e torcendo por mim e tornando os momentos mais leves e descontraídos.

As queridas Cristina e Paula, pelo carinho e pelas conversas descontraídas e também pelas construtivas nesses anos de convivência.

Aos amigos do laboratório, Sandra, Natan, Odimar, Misael, Géssica, Juninho, Raiane, Moisés, Daniele e Rodrigo, pela convivência e pelas confraternizações quase semanais no início do doutorado. Ao Paulo, que me deu o apelido mais legal que eu já tive. A Valquíria pelos sábios ensinamentos que me passou de tão boa vontade. A Dra. Andressa, por sempre se disponibilizar a me ajudar com a germinação das minhas plantas. Poucas vezes vi alguém me ajudar com tanto carinho e boa vontade. E a Flavia, que em pouco tempo se tornou uma grande amiga, pelas inúmeras ajudas no experimento, pela motivação diária, pelos momentos de descontração e principalmente por me usar de cobaia nas experiências culinárias.

À grande amiga Jaqueline Maas, que mesmo com a distância nossa amizade continua forte, pelos inúmeros momentos de descontração, risadas e conselhos nas conversas pela internet.

Aos professores do programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas por todos os conhecimentos transmitidos durante as disciplinas do doutorado.

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O gênero <i>Passiflora</i> e a cultura do maracujazeiro.....	4
2.1.1 <i>Passiflora edulis</i> .....	5
2.1.2 <i>Passiflora setacea</i> .....	6
2.2 Virose do endurecimento dos frutos: Etiologia, Sintomatologia e Controle ...	7
2.3 Melhoramento do maracujazeiro visando à resistência ao CABMV .....	10
2.4 Proteômica na interação planta-patógeno.....	12
3. TRABALHOS .....	14
3.1 PROTEOMA DE ESPÉCIES DE <i>PASSIFLORA</i> NA INTERAÇÃO COM CABMV REVELA DISTINTAS RESPOSTAS À PATOGÊNESE .....	14
RESUMO .....	14
3.1.1 INTRODUÇÃO.....	16
3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Material vegetal, germinação e condição de crescimento .....	17
Preparação do inóculo do vírus e inoculação .....	18
Extração de proteínas.....	19

Digestão.....	20
Espectrometria de massas.....	21
Análise de dados .....	22
3.1.3 RESULTADOS.....	23
Mudança no proteoma de populações de maracujazeiro em reposta à infecção por CABMV .....	23
Proteínas relacionadas ao Metabolismo Proteico .....	30
Proteínas relacionadas ao Metabolismo Energético .....	30
Proteínas relacionadas à Defesa/Estresse e Sinalização.....	31
Proteínas relacionadas ao Metabolismo de DNA e outras funções .....	32
3.1.4 DISCUSSÃO .....	33
Mudança no proteoma de populações de maracujá em reposta à infecção por CABMV .....	34
Proteínas relacionadas ao Metabolismo Proteico .....	36
Proteínas relacionadas ao Metabolismo Energético .....	37
Proteínas relacionadas à Defesa/Estresse e Sinalização.....	38
Proteínas relacionadas ao Metabolismo de DNA.....	40
Interpretação geral da interação de populações de maracujá e o CABMV ....	40
3.1.5 RESUMO E CONCLUSÕES.....	43
3.1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
3.2 RESPOSTAS DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE MARACUJAZEIRO AO CABMV. UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E GENÉTICA .....	50
RESUMO .....	50
3.2.1 INTRODUÇÃO.....	51
3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
Obtenção das populações, germinação e condição de crescimento .....	53
Identificação do isolado viral por PTA-ELISA e RT-PCR .....	55

Preparação do inóculo do vírus e inoculação .....	57
Avaliação dos sintomas .....	57
3.2.3 RESULTADOS.....	61
Severidade dos sintomas com base na incidência, na AACPD e Smax .....	61
Confirmação da identificação do isolado viral e da resistência ao CABMV ...	67
Avaliação genética para a resistência ao CABMV .....	70
Panorama da seleção para resistência em diferentes populações .....	71
3.2.5 RESUMO E CONCLUSÕES .....	76
3.2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

## RESUMO

CARVALHO, Beatriz Murizini; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; Perfil proteômico, epidemiológico e genético do patossistema *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic virus. Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana.

O programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro está desenvolvendo cultivares com diferentes níveis de resistência à virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), por meio de retrocruzamentos interespecíficos. Plantas infectadas apresentam sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar, diminuindo o tamanho e deformando a planta e frutos, com consequente redução do número, da qualidade e do seu valor comercial, tornando-a um fator limitante para a cultura. Portanto, estudos que mostrem como ocorre a patogênese, tanto em nível molecular, quanto fenotípico, e descrevam a resistência em populações segregantes, caracterizando esses indivíduos, são necessários para um melhor entendimento do patossistema. Neste sentido, o presente trabalho objetivou: (i) identificar proteínas responsivas, diferencialmente abundantes, de três populações de maracujazeiros, inoculadas com o CABMV em comparação com o controle, a fim de fornecer informações sobre a base molecular da interação entre planta e o patógeno, e; (ii) descrever a patogênese e avaliar a resistência no patossistema *Passiflora* sp. e o CABMV em diferentes gerações segregantes, visando a obtenção de informações sobre como cada geração responde à patogênese e quanto à sua resistência. Para o estudo da proteômica foram utilizadas as populações do híbrido

interespecífico e seus parentais, *Passiflora edulis* e *P. setacea*. As plantas das três populações foram inoculadas e, 72 horas após a inoculação, foram coletadas as folhas mais novas, para seguir os procedimentos de extração e análise das proteínas. O ensaio foi conduzido com 30 plantas de cada população. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo a unidade experimental composta por 10 plantas em *bulk*. Das mais de 500 proteínas identificadas nas folhas de maracujazeiro, 100, 290 e 96 foram diferencialmente abundantes para o híbrido, *P. edulis* e *P. setacea*, respectivamente, em resposta ao CABMV. No híbrido interespecífico, 41% das proteínas foram *down*-reguladas e 59% foram *up*-reguladas, em comparação ao controle. Este resultado foi similar ao encontrado para o parental *P. setacea*, em que 39% das proteínas foram *down*-reguladas. Já o parental *P. edulis* seguiu um perfil distinto, em que 82% das proteínas foram *down*-reguladas e somente 18% foram *up*-reguladas, em comparação ao controle. Sugere-se que o CABMV suprime a síntese de proteínas na espécie suscetível, o que pode ter função chave na resposta de defesa da planta. Mesmo respondendo à infecção, o *P. edulis* não foi capaz de conter o estabelecimento da doença. Os resultados sugerem que a doença se manifesta por uma falha no sistema de sinalização da espécie suscetível, que mesmo ativando algumas rotas de resposta, estas não são eficientes no controle da doença. Para o estudo genético e descrição da resistência ao CABMV, foram utilizadas diferentes gerações de cruzamento, sendo elas: o híbrido interespecífico e os retrocruzamentos RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>, e os parentais *P. edulis* e *P. setacea*. As plantas foram inoculadas em casa de vegetação, e foi avaliada a severidade da doença em todos os indivíduos. Essas observações foram utilizadas para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença e, a partir desses valores, foram estimados os componentes de variância para as populações em estudo. Foi realizada a análise dos componentes principais, por meio do método gráfico, GGE biplot. A confirmação da resistência ao CABMV foi realizada por meio de PTA-ELISA. Foi observada grande variabilidade genética entre os indivíduos de cada geração quanto à resistência ao CABMV, tendo sido encontradas desde plantas assintomáticas, até plantas expressando sintomas severos da doença. Pelo GGE biplot, pôde-se observar a formação de quatro grupos quanto à resistência, indicando que as cinco populações estudadas apresentaram severidades máximas para cada nível da escala de notas. *P. edulis*, a geração H<sub>1</sub> e a RC<sub>1.1</sub>, foram as

primeiras populações a expressar os sintomas da virose, e em pouco tempo atingiram a severidade máxima. Já *P. setacea* e a geração RC<sub>1,2</sub> demoraram o dobro do tempo para expressar os sintomas, confirmando os níveis de suscetibilidade e resistência dessas populações. Indivíduos da geração RC<sub>1,2</sub> podem ser inseridos como escolha para compor a lista dos futuros genitores do programa de melhoramento genético do maracujazeiro visando à resistência ao CABMV.

Palavras-chave: Interação planta-patógeno; Proteômica *gel-free*; virose do endurecimento dos frutos; *P. edulis*; *P. setacea*.

## ABSTRACT

CARVALHO, Beatriz Murizini; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2020. Proteomic, epidemiological and genetic profile of the *Passiflora* sp. x cowpea aphid-borne mosaic virus pathosystem. Advisor: Prof. Alexandre Pio Viana.

The passion fruit breeding program of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro is developing cultivars with different resistance levels to the fruit hardening virus, caused by the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), through interspecific backcrosses. Infected plants show symptoms of mosaic, bubbles and leaf deformation, decreasing the size and deforming the plant and fruits, with a consequent reduction in the number, quality and commercial value, becoming it a limiting factor for the crop. Therefore, studies that show how pathogenesis occurs, at the molecular and phenotypic levels, and describe resistance in segregating populations, characterizing these individuals, are necessary for a better understanding of the pathosystem. In this sense, the present work aimed to: (i) identify responsive proteins, differentially abundant, from three populations of passion fruit, inoculated with CABMV compared to the control, to provide information on the molecular basis of the interaction between the plant and the pathogen, and; (ii) describe the pathogenesis and evaluate the resistance in the *Passiflora* sp. and CABMV in different segregating generations, in order to obtain information on how each generation responds to pathogenesis and on its resistance. For the study of proteomics, populations of the interspecific hybrid and their parents,

*Passiflora edulis* and *P. setacea* were used. The plants of the three populations were inoculated and, 72 hours after inoculation, the youngest leaves were collected, to follow the procedures of extraction and analysis of proteins. The trial was conducted with 30 plants from each population. The experimental design was completely randomized, with three replications, with the experimental unit consisting of 10 plants in bulk. More than 500 proteins were identified in the passion fruit leaves. From this total, 100, 290 and 96 were differentially abundant for the hybrid, *P. edulis* and *P. setacea*, respectively, in response to CABMV. In the interspecific hybrid, 41% of the proteins were down-regulated and 59% were up-regulated, compared to the control. This result was similar to that found for the parental *P. setacea*, in which 39% of the proteins were down-regulated. Parental *P. edulis* followed a different profile, in which 82% of the proteins were down-regulated and only 18% were up-regulated, compared to the control. It is suggested that CABMV suppresses protein synthesis in the susceptible species, which may have a key role in the plant's defense response, even responding to the infection, *P. edulis* was unable to contain the onset of the disease. The results suggest that the disease is manifested by a failure in the signaling system of the susceptible species, that even activating some response routes, they are not efficient in controlling the disease. For the genetic study and description of resistance to CABMV, different breeding generations were used, namely: the interspecific hybrid and the RC<sub>1.1</sub> and RC<sub>1.2</sub> backcrosses, and the parental *P. edulis* and *P. setacea*. The plants were inoculated in a greenhouse, and the disease severity was evaluated in all individuals. These observations were used to calculate the area under the disease progress curve. From these values, the components of variance were estimated for the populations under study. The principal component analysis was performed using the GGE biplot graphic method. Confirmation of resistance to CABMV was performed using PTA-ELISA. High genetic variability was observed between individuals of each generation regarding resistance to CABMV, having been found from asymptomatic plants, to plants expressing severe symptoms of the disease. Through the GGE biplot, it was possible to observe the formation of four groups regarding resistance, indicating that the five populations studied had maximum severities for each level of the scale of grades. *P. edulis*, generation H<sub>1</sub> and RC<sub>1.1</sub>, were the first populations to express the symptoms of the virus, and in a short time, they reached maximum severity. *P. setacea* and the RC<sub>1.2</sub> generation took twice as long to express the

symptoms, confirming the levels of susceptibility and resistance of these populations. Individuals of the RC<sub>1,2</sub> generation can be entered as a choice to compose the list of future parents of the passion fruit breeding program aiming at resistance to CABMV.

Keywords: Plant-pathogen interaction; Gel-free proteomics; Passionfruit woodiness disease; *P. edulis*; *P. setacea*.

## 1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) é uma espécie amplamente cultivada no Brasil, e em alguns países de clima tropical, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco que essa espécie proporciona. Seus frutos são comercializados tanto *in natura*, quanto para a indústria de sucos concentrados (Meletti, 2011).

Essa espécie tem um grande potencial produtivo, podendo chegar a mais de 40 t/ha, porém, a produtividade média alcançada nos pomares brasileiros foi de 14,2 t/ha nos últimos 10 anos (IBGE, 2020). Vários fatores podem diminuir a produtividade dessa fruteira no campo, como necessidade de insetos polinizadores, tratamentos culturais não adequados e principalmente a incidência de doenças (Bruckner *et al.*, 2002; Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

Dentre as doenças que ocorrem no maracujazeiro, a mais importante é a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), sendo considerada um fator limitante para a cultura. Esta virose acomete a planta inteira, causando sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar, diminuindo o tamanho e deformando a planta e, principalmente, os frutos, com consequente redução do número, da qualidade e do seu valor comercial (Nascimento *et al.*, 2006; Rezende, 2006).

O Brasil, por ser o centro de origem da espécie *P. edulis*, apresenta grande diversidade no gênero *Passiflora* sp., ampliando as possibilidades na busca por resistência a essa doença. Dentro da espécie *P. edulis* existe pouca variabilidade quanto à resistência, pois a base genética do maracujazeiro-azedo é estreita,

mesmo ela sendo uma espécie alógama (Bruckner *et al.*, 2002; Cerqueira-Silva *et al.*, 2008).

Dessa forma, os melhoristas recorrem às espécies silvestres, pois estas podem contribuir para aumentar o grau de resistência das cultivares comerciais por meio de hibridações interespecíficas, sendo essa uma das alternativas para controlar a doença (Fonseca *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015a; Freitas *et al.*, 2015).

A espécie *P. setacea* é conhecida por apresentar resistência ao CABMV e, por esse motivo, o grupo de pesquisa de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF, visando resistência à virose, recorreu à essa espécie para iniciar o programa de melhoramento por meio da introgressão de genes. Apesar dos esforços, ainda não existe uma cultivar registrada de maracujazeiro-azedo resistente ao CABMV.

A seleção de genótipos resistentes é uma opção viável e atraente, visto que proporciona diminuição e/ou atraso da epidemia no campo. Nesse sentido, é necessária a exploração, a caracterização e o manuseio da variabilidade genética disponível dentro de um programa de melhoramento, o que requer a avaliação do germoplasma, caracterizando as respostas de diferentes genótipos para essa doença.

Dentre as indicações para o estudo de um patossistema, análises moleculares da patogênese são importantes, pois pouco se sabe sobre o entendimento da ativação ou inibição dos mecanismos naturais (bioquímicos, genéticos e moleculares) de defesa das plantas. Esses mecanismos podem ajudar a compreender melhor a interação planta-vírus (Romeiro, 2008; Munhoz *et al.*, 2015).

Uma das opções a ser adotada na compreensão destes mecanismos é o estudo sobre a proteômica na interação planta-patógeno. Esses estudos podem fornecer, por exemplo, informações sobre a variabilidade genética que é efetivamente expressa no genoma (Quirino *et al.*, 2010; Eldakak *et al.*, 2013), resultando em novas possibilidades a serem alcançadas no desenvolvimento de plantas mais resistentes e produtivas.

Essa variabilidade genética existente pode ser avaliada também em nível fenotípico. O estudo da epidemiologia da doença se faz importante para caracterizar as diferentes respostas de cada espécie ao CABMV, traçando e descrevendo o progresso da doença ao longo do tempo.

Para completar o estudo no âmbito fenotípico, as análises biométricas, sobretudo as estimativas de parâmetros genéticos, são fundamentais para conhecer a natureza da ação dos genes envolvidos no controle de determinado caráter, permitindo conhecer a estrutura genética das populações e fornecendo subsídios para definição das estratégias de seleção. Além disso, as estimativas permitem prever o ganho genético com a seleção e planejar as estratégias de melhoramento (Viana *et al.*, 2004; Cruz e Carneiro, 2006).

A fim de associar os estudos em nível molecular com os estudos epidemiológicos e biométricos, o presente trabalho teve como objetivo geral: traçar o perfil proteômico, epidemiológico e genético do patossistema CABMV x *Passiflora* sp. e como objetivos específicos: (i) identificar proteínas responsivas, diferencialmente abundantes, em três populações de maracujazeiro, o híbrido interespecífico e seus parentais, *P. edulis* e *P. setacea*, inoculadas com o CABMV em comparação com o controle, a fim de fornecer informações sobre a base molecular da interação entre planta e patógeno, e; (ii) avaliar a resistência e descrever a patogênese no patossistema *Passiflora* sp. e o CABMV, utilizando os parentais contrastantes quanto à resistência e às populações segregantes oriundas do cruzamento entre elas, sendo, o híbrido interespecífico, a geração de retrocruzamento RC<sub>1.1</sub> (Híbrido interespecífico x *P. edulis*) e RC<sub>1.2</sub> (híbrido interespecífico x *P. setacea*), visando a obtenção de informações genéticas sobre como cada geração responde à patogênese e quanto à sua resistência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Passiflora* e a cultura do maracujazeiro

O gênero *Passiflora* é considerado o mais representativo da família Passifloraceae, com cerca de 400 espécies, a maioria das quais tem como centro de origem a América Tropical (Vanderplank, 2000). Este gênero possui uma grande variabilidade genética, tanto inter, como intraespecífica, e grande parte dessa variabilidade está dispersa no território brasileiro, com mais de 140 espécies nativas do Brasil (Castro *et al.*, 2011; Bernacci *et al.*, 2015).

As plantas do gênero podem ser trepadeiras, herbáceas ou lenhosas, podendo apresentar-se como ervas e arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares (Vanderplank, 2000). Elas podem ser propagadas via sementes e por estaquia, sendo o pomar seminífero o mais utilizado comercialmente, visto que é de fácil execução e apresenta simplicidade de infraestrutura necessária no viveiro.

As flores apresentam simetria radial, tamanho, formas e coloração variadas. São classificadas como flores completas, ou seja, um único exemplar apresenta tanto a parte feminina, quanto a masculina. O horário de abertura das flores depende da espécie, e normalmente essa abertura se dá em um único período do dia. Os frutos do gênero são do tipo baga e apresentam uma grande variação na sua morfologia, podendo ser globosos ou ovoides, com coloração

amarela, vermelha ou roxa, indeiscentes ou em cápsulas deiscentes (Vanderplank, 2000). Quanto às sementes, são geralmente numerosas e apresentam grande variação quanto ao tamanho (Meletti *et al.*, 2003).

As espécies de maracujazeiro apresentam grande importância econômica devido às inúmeras características físico-químicas e farmacoterapêuticas de seus produtos e subprodutos do processamento dos frutos, sementes, folhas e raízes. Da parte aérea da planta, as folhas e as flores, extraem-se os fármacos, que são popularmente consumidos para o tratamento de ansiedade, insônia e irritabilidade (Nojomi *et al.*, 2016). O suco da fruta também possui valor medicinal, sendo fonte de compostos antioxidantes, devido à presença de polifenóis, principalmente os flavonoides (Zeraik *et al.*, 2010). Além disso, suas propriedades têm sido estudadas para o tratamento da diminuição da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (de Queiroz *et al.*, 2012) e alcoolismo crônico (Carlini *et al.*, 2006).

Dentre os subprodutos do processamento do fruto, as cascas e sementes podem ser utilizadas na alimentação, tanto humana, como animal. As cascas possuem fibras solúveis (pectina), que são benéficas aos seres humanos, além de serem ricas em niacina, ferro, cálcio e fósforo. Das sementes obtém-se óleo, altamente atraente para indústrias cosméticas, devido ao seu alto teor de ácidos graxos raros (Zeraik *et al.*, 2010; Espírito-Santo *et al.*, 2013).

Algumas espécies de maracujazeiro possuem ainda um potencial para uso ornamental, devido às suas belas flores, atrativas pelo seu tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas (Melo *et al.*, 2016).

### **2.1.1 *Passiflora edulis***

A espécie de maracujazeiro mais estudada e cultivada, dentro do gênero *Passiflora* é a *P. edulis* Sims, popularmente conhecida como maracujazeiro-azedo. Esta espécie apresenta grande qualidade dos seus frutos, vigor e produtividade (Meletti, 2011).

A sua polinização natural é dependente de insetos polinizadores, pois apesar das flores desta espécie serem completas, são alógamas e autoincompatíveis (Bruckner *et al.*, 1995). A polinização é realizada por abelhas de grande porte, geralmente mamangavas-de-toco, do gênero *Xylocopa* ssp. (Benevides *et al.*, 2009). A abertura de suas flores se inicia ao meio-dia, mas ocorre até o anoitecer, e o melhor horário para a polinização é quando o estilete se

encontra totalmente curvado após a antese. É importante que as flores recebam uma quantidade apropriada de pólen durante a polinização, pois o número de grãos de pólen depositados está correlacionado com a quantidade de sementes e o conteúdo de suco do fruto, influenciando diretamente a produção (Akamine e Girolami, 1959). As sementes são classificadas como intermediárias e tolerantes à perda de umidade, podendo ser preservada com viabilidade por até dois anos, em ambientes adequados (Catunda *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2012).

No que diz respeito ao cultivo, os pomares de maracujazeiro-azedo representam quase a totalidade de área cultivada por *Passiflora* ssp. no Brasil, chegando a cerca de 95% da área plantada. A maior parte da produção, por volta de 60%, é destinada ao consumo *in natura*, e o restante, às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto. (Meletti e Bruckner, 2001; Meletti, 2011).

Apesar de ser uma cultura de grande importância no cenário econômico do Brasil, esta espécie é bastante suscetível a pragas e doenças. Uma das doenças mais incidentes na cultura é a virose do endurecimento dos frutos, que apresenta um fator limitante para a cultura no campo, já que acaba diminuindo a vida útil do pomar, forçando os agricultores a renovarem seus pomares de maracujazeiro-azedo regularmente.

A fim de contornar este problema, alguns grupos de pesquisa estão se firmando na linha de melhoramento voltados para a resistência genética à doenças, e recorrendo a espécies silvestres para desenvolver uma cultivar de maracujá resistente a esta virose (Fonseca *et al.*, 2009; Monteiro-hara *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015a; Preisigke *et al.*, 2020).

### **2.1.2 *Passiflora setacea***

A espécie *Passiflora setacea* DC., conhecida como maracujá-do-sono, é uma espécie silvestre, que ocorre naturalmente nos biomas de Cerrado, Caatinga e no Semiárido Norte-Mineiro do Brasil. Esta espécie ficou conhecida entre os grupos de pesquisa de *Passiflora* spp. por apresentar resistência à virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Junqueira *et al.*, 2005).

Assim como *P. edulis*, esta espécie é alógama e autoincompatível, apesar de apresentar flores completas. Ela também apresenta também alto grau de

heterozigose. A abertura de suas flores ocorre no período noturno e, por isso, sua polinização está sujeita a animais de hábitos noturnos, como alguns himenópteros, lepidópteros e/ou coleópteros, tendo como prováveis polinizadores mariposas e morcegos (Duvick, 1967; Junqueira *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2016).

Os frutos do maracujá-do-sono apresentam um formato redondo-ovalado, são menores em comparação aos frutos do maracujazeiro-azedo, e apresentam coloração verde-amarelada, com cinco listras longitudinais. Estas características são pouco desejáveis comercialmente, o que torna a sua comercialização quase insignificante, ocorrendo apenas em feiras livres e durante poucos meses do ano (Vieira *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2014).

A espécie *P. setacea* apresenta dormência em suas sementes, porém esta dormência pode ser superada, principalmente, pelo cultivo *in vitro* do embrião ou ainda por tratamento com ácido giberélico. Alguns trabalhos relatam que esta espécie tem dificuldade de propagação, tanto por sementes como por estacas herbáceas (Chaves *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2016).

Apesar da *P. setacea* apresentar características pouco desejáveis para a produção em grande escala, ela passou a ser utilizada em programas de melhoramento, para introgressão de genes de resistência, por meio de métodos de melhoramento convencionais. Assim, esta espécie se tornou alvo de vários estudos, cujo resultado foi que ela se tornou a primeira espécie silvestre de maracujazeiro com cultivar registrada e protegida pelo Ministério da Agricultura, mostrando boas perspectivas para seu uso em programas de melhoramento (Fonseca *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; EMBRAPA, 2015; Santos *et al.*, 2015a; Preisigke *et al.*, 2020).

## **2.2 Virose do endurecimento dos frutos: Etiologia, Sintomatologia e Controle**

A virose do endurecimento dos frutos é causada pelo cowpea aphid borne mosaic vírus (CABMV- *Potyvirus*, família *Potyviridae*). Esta é a doença mais importante da cultura, se apresentando como um fator limitante para o cultivo do

maracujazeiro-azedo nas regiões produtoras (Nascimento *et al.*, 2006). Ela foi originalmente descrita na Austrália, causada pelo passion fruit woodiness vírus (PWV) e na década de 1970 ocorreram no Brasil, os primeiros relatos desta virose, e os registros afirmam que ela estava afetando severamente a produtividade da cultura (Taylor e Greber, 1973; Chagas *et al.*, 1981).

Até aproximadamente meados da década de 1990, acreditava-se que o agente causador desta virose no Brasil, fosse o mesmo reportado na Austrália, porém, com o avanço das técnicas de diagnóstico molecular, os isolados, que anteriormente eram considerados como PWV, foram identificados como CABMV. As análises filogenéticas das amostras de maracujazeiro, expressando sintomas da virose do endurecimento, indicaram identidade de 86 a 94% com isolados de CABMV, já com os isolados de PWV apenas de 68 a 76% de identidade. Estas análises foram baseadas no sequenciamento da proteína capsidial de alguns isolados, provenientes de diferentes estados brasileiros. Portanto, até o momento, nenhum isolado brasileiro sequenciado pertence à espécie *Passion fruit woodiness vírus*, sendo o CABMV o principal, senão o único, agente etiológico do endurecimento dos frutos em maracujazeiros cultivados em território nacional (Kitajima *et al.*, 1986; Barros *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015a).

O CABMV é transmitido por várias espécies de afídeos vetores como, por exemplo, espécies dos gêneros *Aphis* spp. e *Myzus* spp. A transmissão ocorre de forma não-persistente e pela picada de prova, visto que o maracujazeiro não é planta alvo destas espécies de afídeos, o que faz a transmissão desta doença ocorrer de maneira muito rápida. Além da transmissão por insetos vetores, o CABMV pode ser transmitido também mecanicamente, por meio de extrato foliar tamponado e por enxertia (Di Piero *et al.*, 2006; Gibbs e Ohshima, 2010; Garcêz *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016).

As plantas de maracujazeiro-azedo infectadas por esse vírus expressam sintomas como mosaico, comum em estágios iniciais da doença, já nos estágios mais avançados, surgem outros sintomas como enrugamento, bolhas e deformações no limbo foliar. Os sintomas foliares podem diminuir em intensidade ou quase desaparecerem em algumas folhas da haste, e retornarem, posteriormente, nas folhas mais novas, dependendo da estirpe do vírus e das condições ambientais. Nos frutos esta virose causa um espessamento e endurecimento da casca, tornando-o impróprios para a comercialização e

diminuindo a sua produtividade no campo. Esta virose causa ainda, redução de crescimento das plantas, diminuição do ciclo da cultura e da vida econômica do pomar (Rezende, 2006).

Quanto ao controle da virose, todas as cultivares de maracujazeiro-azedo são suscetíveis ao CABMV. O controle químico do vetor é ineficiente devido à relação não-persistente entre o vírus e o afídeo vetor, tornando difícil o controle desta virose nos pomares. Porém, algumas medidas são recomendadas para prevenção e convivência da doença nos pomares, tais como: utilização de mudas sadias e certificadas, obtidas em viveiros telados; eliminação de pomares velhos ou abandonados; cuidados nas operações de poda para evitar a transmissão mecânica do vírus e, se possível, plantios em locais isolados (Di Piero *et al.*, 2006; Rezende, 2006; Cavichioli *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos recomendam medidas ainda mais específicas de manejo desta doença e convivência com o vírus. Rodrigues *et al.* (2016) recomendam a aquisição de mudas em estágios de desenvolvimento mais avançados (de 80 a 100 cm de altura) para iniciar os pomares de maracujazeiro-azedo, pois mudas menores e mais novas são infectadas e expressam os sintomas mais severos da doença mais rapidamente, em comparação às mudas mais desenvolvidas. Spadotti *et al.* (2019) recomendam a prática de *roguing* sistemático das plantas doentes, em inspeções semanais, até o florescimento, sendo necessário o plantio mais espaçado das plantas para facilitar a visualização dos sintomas, assim como responsáveis técnicos treinados para identificar e erradicar as plantas que apresentarem sintomas iniciais da doença no campo.

Mesmo com essas recomendações de manejo e prevenção da doença, até o momento, não há indicação de um método eficiente no controle do CABMV no campo. Portanto, uma forma de controle a se considerar, e dar importância, seria a busca pela resistência genética. Ressalta-se que, dentro do gênero *Passiflora*, existem espécies silvestres resistentes a essa virose, o que possibilita a introgressão de genes de resistência em uma cultivar elite já registrada e, posteriormente, a seleção de genótipos resistentes ao CABMV.

### 2.3 Melhoramento do maracujazeiro visando à resistência ao CABMV

O melhoramento visando à resistência ao CABMV merece uma atenção especial dos pesquisadores da área, especialmente pela inviabilidade de comercialização dos frutos e redução na vida útil da lavoura, causada por esta doença, que pode chegar a reduzir de 36 meses para aproximadamente 18 meses, a vida útil do pomar (Fischer e Rezende, 2008; Correa *et al.*, 2015).

Tendo em vista esses problemas na cultura do maracujazeiro-azedo, no ano de 2010 foi iniciado o programa de melhoramento genético visando à resistência ao CABMV da UENF. Este programa já apresenta alguns resultados promissores em seus trabalhos. Ele teve início com a obtenção e avaliação de híbridos interespecíficos oriundos de cruzamentos entre a espécie suscetível, *P. edulis*, e a espécie resistente, *P. setacea*. Esses híbridos foram avaliados quanto à resistência e quanto às características morfoagronômicas. Os pesquisadores observaram níveis de resistência ao CABMV e selecionaram os híbridos com melhores desempenhos para compor a primeira geração de retrocruzamento (RC<sub>1.1</sub>) (Santos *et al.*, 2015b, a).

Dando continuidade ao programa, Preisigke *et al.* (2020) obtiveram e avaliaram a resistência e as características morfoagronômicas na população RC<sub>1.1</sub> e selecionaram os genótipos com melhores desempenhos, enquanto Dos Santos *et al.* (2019), avaliaram a divergência genética nesta mesma população, e observaram uma ampla variabilidade entre os genótipos estudados. Além disso, Freitas *et al.* (2015), avaliando quatro populações segregantes, constataram que a herança da resistência é poligênica, sendo necessário trabalhar com grandes populações para se obter ganhos satisfatórios.

Concomitantemente à avaliação da segunda geração de retrocruzamento (RC<sub>2.1</sub>) (dados não publicados), foi iniciada uma nova abordagem de seleção, em que os quatro melhores genótipos selecionados por Preisigke *et al.* (2020) na população RC<sub>1.1</sub>, foram recombinados entre si, gerando três famílias de irmãos completos (FIC). Essas FIC foram avaliadas por Gonçalves Júnior (2019) quanto à resistência e características morfoagronômicas e, em seguida, foram selecionados os genótipos mais promissores para compor a população do primeiro ciclo de seleção recorrente.

Além de estudos de campo, também foram realizados estudos em nível molecular, como os trabalhos de Santos *et al.* (2019) e Carvalho *et al.* (2019). Ao avaliar a primeira geração de retrocruzamento, Santos *et al.* (2019) construíram um mapa genético baseado em sete marcadores microssatélites e 43 marcadores ISSR. O mapa gerado cobriu 1017.1 cM, permitindo que os autores detectassem sete QTL de menores efeitos para resistência ao CABMV, em sete dos nove grupos de ligação.

E Carvalho *et al.* (2019) avaliaram o proteoma do híbrido interespecífico e de seus parentais contrastantes (*P. edulis* e *P. setacea*) não inoculados e inoculados com o CABMV, e observaram uma diferença na resposta dos genótipos quanto ao vírus, indicando que a doença se manifesta por uma falha no sistema de sinalização da espécie suscetível, que chega a ativar algumas vias de resposta quando inoculada, porém, essa sinalização não é eficiente para o controle da doença (Figura 1).

Mesmo com alguns resultados positivos, ainda são necessárias informações acerca desse patossistema, o que requer a continuidade das pesquisas nesse programa, a fim de obter um controle eficiente dessa doença.



Figura 1. Organograma das etapas do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, visando à resistência à virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic vírus.

## 2.4 Proteômica na interação planta-patógeno

O proteoma representa o conjunto completo de proteínas que estão presentes num organismo, órgão específico, tecido, célula ou mesmo os compartimentos subcelulares, refletindo o estado atual de funcionamento de um sistema em condições específicas e a expressão funcional do genoma (Jorrín *et al.*, 2007). A proteômica trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática, utilizando metodologias analíticas para caracterizar, quali e quantitativamente, um proteoma.

As plantas, de maneira geral, possuem mais genes que o genoma humano e, por isso, se tornam organismos mais complexos para estudo (Neilson *et al.*, 2010). Vários fatores físicos, como o tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, estímulos ambientais, afetam a expressão gênica em plantas (Rampitsch e Srinivasan, 2006). Além do mais, devido ao número de níveis de ploidia em algumas plantas e à presença de várias isoformas da proteína, estudar o proteoma de plantas pode-se tornar complexo (Vadivel, 2015). Além disso, um gene pode codificar mais de uma proteína, ou ainda proteínas diferentes terem funções semelhantes (Roberts e Smith, 2002).

Mesmo diante da complexidade que é estudar a dinâmica das proteínas, estas são efetores diretos da resposta ao estresse, portanto, estão mais próximas da resposta fenotípica, aumentando a correlação com o fenótipo biológico (Zubarev, 2013).

O estudo de proteômica em plantas tem tido várias abordagens, podendo ser descritivo, comparativo, subcelular, PTMs, interatômicas, proteômicas, e proteômica translacional (Jorrín-Novo *et al.*, 2015). A proteômica comparativa é a estratégia que permite a elaboração de perfis proteicos, estudo da expressão proteica ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento, garantindo a identificação de proteínas estágio-específico, cuja expressão possa ser usada como marcadores do desenvolvimento (Dias *et al.*, 2010), permitindo a comparação quantitativa de várias proteínas (Hurkman e Tanaka, 2007).

O estudo da proteômica fornece informações importantes no que diz respeito às respostas de defesa de plantas frente ao estresse. Considerando o contexto de estresse causados por fatores bióticos, diversas proteínas envolvidas em inúmeros

processos biológicos já foram detectadas, sendo algumas relacionadas a estresses e defesa, outras envolvidas com transdução de sinais e fotossíntese, além das proteínas do metabolismo basal (Quirino et al., 2010; Koga et al., 2012; Paiva et al., 2016). Quanto ao desenvolvimento da resistência, tem sido amplamente correlacionado com o acúmulo de proteínas induzidas durante a interação planta-patógeno.

Nesse sentido, Fang *et al.* (2012) discutem que a resistência de plantas de morango à infecção com o fungo *Colletotrichum fragariae* pode ser atribuída à indução de marcadores proteicos relacionados ao estresse oxidativo, lignificação da parede celular, proteínas de defesa, além da reprogramação do metabolismo decorrente da inoculação do patógeno. Já Ventelon-Debout *et al.* (2004), avaliaram a expressão de proteínas em cultivares de arroz resistentes e susceptíveis à virose da mancha amarela, e identificaram proteínas envolvidas na resposta de defesa e no metabolismo da planta. Liao *et al.* (2009) identificaram diferentes proteínas em folhas de arroz, envolvidas na resposta de defesa vegetal contra eliciadores. Para maracujá existe um trabalho em que houve a identificação de proteínas envolvidas na defesa após o tratamento com metil jasmonato, substância que simula um ataque de herbivoria na planta, a fim de compreender os mecanismos de defesa da planta contra ataques de insetos (Perdizio, 2016).

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 PROTEOMA DE ESPÉCIES DE *PASSIFLORA* NA INTERAÇÃO COM CABMV REVELA DISTINTAS RESPOSTAS À PATOGÊNESE

##### RESUMO

Um dos entraves para o aumento do rendimento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) no Brasil é a ocorrência de doenças, principalmente aquelas que, além de não possuir uma alternativa de controle eficiente, ainda limitam o seu cultivo, como a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus*-CABMV. O uso de cultivares resistentes é potencialmente a melhor opção para o controle da doença, entretanto, nenhuma cultivar registrada utilizada até o presente momento possui essa característica. Além disso, outras possíveis alternativas de controle do CABMV também se mostraram ineficientes. Portanto, compreender os mecanismos de defesa que regulam a resposta das plantas à infecção consistiria, em um primeiro passo, na elaboração de uma estratégia de controle eficiente. Para compreender melhor as

interações planta-patógeno e a ativação dos mecanismos de defesa, este trabalho objetivou identificar as proteínas diferencialmente abundantes no híbrido interespecífico e nos seus parentais, *P. edulis* e *P. setacea*, inoculadas com o CABMV, em comparação com o controle. As folhas das três populações utilizadas foram inoculadas e, após 72 horas, foram coletadas. As proteínas foram extraídas e analisadas. O ensaio foi conduzido com 30 plantas de cada população. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo a unidade experimental composta por 10 plantas em *bulk*. Das mais de 500 proteínas identificadas nas folhas de maracujazeiro, 100, 290 e 96 foram diferencialmente abundantes para os híbridos *P. edulis* e *P. setacea*, respectivamente, em resposta ao CABMV. No híbrido interespecífico, 41% das proteínas foram *down*-reguladas e 59% foram *up*-reguladas, em comparação ao controle. O parental *P. setacea* seguiu um perfil similar, em que 39% das proteínas foram *down*-reguladas. Já o parental *P. edulis* seguiu um perfil distinto, em que 82% das proteínas foram *down*-reguladas e somente 18% foram *up*-reguladas, em comparação ao controle. Acredita-se que o CABMV suprime o acúmulo de proteínas que podem ter função chave na resposta de defesa da espécie suscetível, como aquelas ligadas à regulação do proteassoma e as *heat shock proteins* (HSPs), e ao mesmo tempo deve regular o acúmulo de proteínas que podem prejudicar a sinalização do vírus no interior da hospedeira, como a glutathione peroxidase. Ressalta-se que, mesmo respondendo à infecção, *P. edulis* não foi capaz de conter o estabelecimento da doença. Ao contrário, as plantas das populações resistentes sintetizaram as proteínas que apresentam funções chave contra a infecção pelo vírus, como as proteínas associadas à regulação do proteassoma e as HSPs. Os resultados sugerem que a doença se manifesta por uma falha no sistema de sinalização da espécie suscetível, que mesmo ativando algumas rotas de resposta, essas não são eficientes no controle da doença.

Palavras-chave: *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, proteômica gel-free, virose do endurecimento dos frutos, *Passiflora edulis*, *Passiflora setacea*

### 3.1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando, desde a década de 1970, como maior consumidor e produtor mundial de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) (Meletti, 2011). Mas o rendimento e o cultivo do maracujazeiro são seriamente prejudicados por problemas fitossanitários que acarretam abandono dos pomares e troca da atividade agrícola, obrigando os produtores a desistirem do plantio desta fruteira. A virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV) destaca-se como um fator limitante para a cultura, principalmente por não existirem formas eficientes de controle para esta doença (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

Para outros patossistemas, foram estudadas e avaliadas algumas estratégias de manejo que proporcionaram eficiência e pouca agressividade à saúde humana e ao meio ambiente, em maracujazeiro, entre elas destacam-se: indução de resistência contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorea* (Boro *et al.*, 2011), controle biológico empregando *Trichoderma* spp. para controlar patógenos associados à “dieback disease” (Amata *et al.*, 2013), e melhoramento genético para controle da fusariose (Preisigke *et al.*, 2015). Para a virose do endurecimento dos frutos, Santos *et al.* (2015a), avaliando a população segregante oriunda do cruzamento entre *P. edulis* vs *P. setacea*, observaram que os híbridos interespecíficos apresentaram diferentes níveis de resistência ao CABMV.

No entanto, até o presente momento nenhuma estratégia de controle tem se mostrado eficiente para o patossistema maracujazeiro-CABMV. O entendimento da ativação ou inibição dos mecanismos naturais de defesa das plantas, bioquímicos, genéticos e moleculares, pode ajudar a compreender melhor a interação planta-vírus. O conhecimento dessas etapas tem papel fundamental no desenvolvimento de tecnologias que ativem efetivamente os mecanismos naturais de defesa, aumentando a resistência a doenças (Romeiro, 2008; Munhoz *et al.*, 2015).

Uma estratégia de estudo para melhor compreensão destes mecanismos de defesa é a associação de estudos de melhoramento genético visando à resistência à doenças, e estudos sobre a proteômica na interação planta-patógeno. Essa integração de conhecimentos pode fornecer, por exemplo, informações em

nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa no genoma, resultando em novas possibilidades a serem alcançadas no desenvolvimento de variedades de plantas mais resistentes e produtivas (Quirino *et al.*, 2010; Eldakak *et al.*, 2013).

As proteínas podem ter funções significativas na resposta ao estresse e para a compreensão das interações moleculares planta-patógeno, podendo fornecer base para a descoberta de novos marcadores moleculares. A fim de compreender os mecanismos moleculares de defesa do maracujazeiro frente à herbivoria, Perdizio (2016) identificou quais proteínas estavam envolvidas na defesa após o tratamento com metil jasmonato, no intuito de compreender sobre os mecanismos de defesa da planta contra a herbivoria. No patossistema maracujazeiro-CABMV não há trabalhos publicados envolvendo a identificação de proteínas associadas à patogênese.

O presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas responsivas, diferencialmente abundantes, de três populações de maracujazeiro, o híbrido interespecífico e seus parentais, *P. edulis* (suscetível) e *P. setacea* (resistente), inoculados com o CABMV em comparação com o controle, buscando fornecer informações sobre a base molecular da interação entre planta e patógeno.

### **3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Material vegetal, germinação e condição de crescimento**

No presente estudo foram utilizadas as populações do híbrido interespecífico e seus parentais, *Passiflora edulis* e *P. setacea*. A população suscetível (*P. edulis*) utilizada foi a 'UENF Rio Dourado', oriunda do terceiro ciclo de seleção recorrente do programa de melhoramento do maracujazeiro da UENF (Viana *et al.*, 2016). A população resistente (*P. setacea*) utilizada pertence ao BAG da UENF. E o híbrido interespecífico foi obtido por meio do cruzamento entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea*. Os cruzamentos foram realizados respeitando o

horário da antese de cada espécie, seguindo a metodologia utilizada por Santos *et al.* (2015a).

As plantas das três populações de maracujá foram obtidas por cultivo de embrião. O tegumento das sementes foi removido com o auxílio de um bisturi. Em câmara de fluxo laminar, as sementes, sem tegumento, foram desinfestadas em álcool 70% por trinta segundos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (NaClO) com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL, durante 15 minutos e, por fim, foram enxaguadas por três vezes em água deionizada autoclavada. Posteriormente, os embriões foram excisados com auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio (Tecnival®), e colocados para germinar em meio de cultivo.

O meio de cultivo foi constituído por metade da concentração dos sais minerais do meio MS modificado por Monteiro (2000), acrescidos de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH ajustado para 5,7 e, em seguida, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®. Distribuiu-se 40mL do meio de cultivo em diversos frascos, que foram autoclavados por 20 minutos, a 121 °C e 1,0 atm. Os frascos com os explantes foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro, por sete dias, em seguida eles foram transferidos para luz, com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Aos 30 dias de cultivo, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação, em sacolas plásticas próprias para o cultivo de mudas (30 x 15cm), contendo substrato comercial Basaplant®. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, protegidas com tela antiafídeo, durante todo o experimento. Os tratamentos culturais seguiram as recomendações para cultura (Abreu, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições biológicas, e a unidade experimental foi composta por 10 plantas em *bulk*, totalizando 90 plantas. A inoculação das plantas com um isolado do CABMV foi realizada aos quatro meses após o transplante.

### **Preparação do inóculo do vírus e inoculação**

Utilizou-se um isolado de CABMV obtido de plantas de maracujazeiro-azedo com sintomas típicos da virose, coletadas na área experimental do Colégio

Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes - RJ. O isolado viral foi identificado por meio de RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), utilizando os *primers* desenvolvidos por Ha *et al.* (2008) e detectado por PTA-ELISA (*Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Santos *et al.*, 2015a). Para uma constante produção de inóculo, o isolado foi mantido em plantas de maracujazeiro suscetíveis, cultivadas em casa de vegetação.

O inóculo foi preparado em almofariz por meio de maceração das folhas sintomáticas de maracujazeiro, na proporção de 1 g de tecido foliar para 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, utilizando-se carborundum (600 mesh) como abrasivo. As plantas foram inoculadas mecanicamente, aos quatro meses após o transplante, ao entardecer (das 17 às 18 h), esfregando, com uma compressa de gaze, a suspensão com o vírus nas superfícies adaxial e abaxial das últimas três folhas da parte basal da planta. As plantas controle foram inoculadas apenas com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 e carborundum. Foram coletadas somente as folhas primárias, completamente expandidas, nos tempos 0 e 72 horas após a inoculação (HAI), e as amostras foram mantidas a -80 °C para as análises posteriores.

O tempo de coleta das folhas foi determinado considerando um momento em que as plantas não estivessem expressando os sintomas da virose, mas que já estivessem infectadas e respondendo ao patógeno. A opção pelo tempo de 72h foi embasada no trabalho de Alfenas-Zerbini *et al.* (2009), que verificaram na interação tomateiro e pepper yellow mosaic vírus (PepYMV), vírus pertencente ao mesmo gênero do CABMV (*Potyvirus*), encontrando mais de 700 genes diferencialmente abundantes às 72 HAI.

### **Extração de proteínas**

As proteínas foram extraídas utilizando o método de precipitação ácido tricloroacético modificado (TCA/acetona) (Damerval *et al.*, 1986). As amostras de tecido foliar congeladas, das três populações, inoculadas e não inoculadas, foram maceradas até a obtenção de um pó fino, utilizando um almofariz de cerâmica em presença de nitrogênio líquido. Em seguida, para homogeneização, adicionou-se

1 mL de TCA a 10% (m/v) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e acetona com 20 mM ditionitrotol (DTT) (GE Healthcare).

Após a centrifugação à 16.000g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com acetona refrigerada com 20 mM DTT, e centrifugado por 5 min a cada lavagem. Os precipitados obtidos foram secos ao ar, ressuspensos em 1 mL de ureia 7M, tiourea 2M, 2% triton X-100, 1% DTT, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich), e um coquetel completo de inibidores de protease (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e centrifugados (20 min a 16.000g). O novo sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

## Digestão

Antes da digestão trípica, as amostras de proteínas foram precipitadas usando a metodologia do metanol/clorofórmio para remover qualquer interferente das amostras (Nanjo *et al.*, 2012). Em seguida, as amostras foram ressuspensas em solução ureia 7M e tiourea 2M. A digestão proteica foi realizada utilizando a metodologia de filtro auxiliar (FASP - *filter-aided sample preparation*), descrita por (Wisniewski *et al.*, 2009), com pequenas modificações. Antes do início da digestão, foi realizado um teste de integridade dos filtros (Hernandez-Valladares *et al.*, 2016).

Após o teste, 100 µg de proteínas de cada amostra foram adicionadas a um filtro Microcon-30 kDa (Millipore) (Lipecka *et al.*, 2016), lavados com 200 µL 50 mM de bicarbonato de amônio (solução A) e centrifugados a 10.000g por 15 min a 25 °C. Esta lavagem foi repetida mais uma vez para remoção completa da ureia, antes da redução das proteínas. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de DTT 50 mM refrigerado e preparado em solução A, submetido a agitação rigorosa em vortex e incubado por 20 min a 60 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Após esta etapa, foram adicionados 200 µL de ureia 8 M e bicarbonato de amônio 50 mM (solução B) e centrifugado (10.000g por 15 min a 25 °C). Para alquilação das proteínas, 100 µL com iodoacetamida 50 mM (GE Healthcare) refrigerado, preparado em solução B, foi submetido à agitação rigorosa em vortex e incubado por 20 min a 25 °C na ausência de luz (1 min agitando e 19 min parado, a 650 rpm). Posteriormente, foram feitas duas lavagem com 200 µL de solução B, que foi centrifugada (10.000g por 15 min a 25 °C), e em seguida foi realizada mais uma

lavagem com solução A. Nesta última lavagem centrifugou-se a mistura até que permanecesse aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de amostra.

Para digestão proteica foram adicionados à amostra 25  $\mu\text{L}$  de RapiGest 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT, USA) e 25  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina (40 ng/ $\mu\text{L}$ , V5111, Promega, Madison, WI, USA), que foi submetida à agitação em vortex, e incubada por 16 h a 37 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Para eluição dos peptídeos, o filtro foi transferido para um novo microtubo e centrifugado por 10 min. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução A e centrifugado por 15 min. Esta lavagem foi realizada duas vezes.

Para precipitação do RapiGest e inibição da tripsina, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 15% (TFA, Sigma-Aldrich), submetido a agitação em vortex gentilmente e incubado por 30 min a 37 °C. As amostras foram centrifugadas por 15 min, e os sobrenadantes foram coletados e secos a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de solução contendo 95% de bicarbonato de amônio 50 mM, 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. Os peptídeos resultantes foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific), com leitura de absorvância a 205 nm.

### **Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas foi realizada utilizando um equipamento de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*) nanoAcquity, acoplado a um instrumento Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters, Manchester, UK). Cada uma das triplicatas biológicas foi injetada em volume correspondente a 1  $\mu\text{g}$  de peptídeos. Para a separação, as amostras foram carregadas no nanoAcquity UPLC, em uma coluna M-Classe Symmetry C18 5  $\mu\text{m}$  (180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm), a 5  $\mu\text{L min}^{-1}$  durante 3 min e, em seguida, na coluna de fase reversa analítica M-Class HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  (75  $\mu\text{m}$   $\times$  150 mm) a 400 nL  $\text{min}^{-1}$ , com uma temperatura de coluna de 45 °C.

Para eluição de peptídeos, foi utilizado um gradiente binário, com fase móvel A, composto por água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich), e fase móvel B, composto por acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% ácido fórmico. O gradiente de eluição foi iniciado a 5% B, aumentando de 5% B para 40% B até 91,12 min.; e de 40% B para 99% B até 95,12 min., sendo mantida

em 99% até 99,12 min.; diminuindo então para 5% B até 101,12 min., e mantido 5% B até o final da injeção a 117,00 min.

A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e modo resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica e no modo de aquisição independente de dados (DIA). Para a separação da mobilidade iônica utilizou-se uma rampa de velocidade da onda IMS começando com 800 m·s<sup>-1</sup> e terminando com 500 m·s<sup>-1</sup>; teve fluxo de hélio de 180 mL·min<sup>-1</sup> e de gás IMS de 90 mL·min<sup>-1</sup>. A energia de transferência de colisão variou de 25 V para 55 V, em modo de alta energia; a voltagem do cone e capilares foram de 30 V e 3000 V, respectivamente; ocorreu nano fluxo de gás de 0,5 bar e gás de purga de 150 L·h<sup>-1</sup>; e a temperatura da fonte foi de 100 °C. Nos parâmetros TOF, o tempo de varredura foi definido em 0,6 s no modo contínuo, com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. Foi utilizado padrão externo o [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich), a 100 fmol·μl<sup>-1</sup> com aquisição da massa de referência a cada 30 s. A aquisição do espectro de massa foi realizada pelo *software* MassLynx v4.0.

### **Análise de dados**

O processamento dos espectros e banco de referência foram realizados utilizando o *software ProteinLynx Global Server* (PLGS) v.3.02 (Waters), e o fluxo de trabalho do *software* ISOQuant (Distler *et al.*, 2014). O PLGS foi processado utilizando os seguintes parâmetros: *threshold* de 150 contagens como limite de baixa energia, 50 contagens como limite de energia elevada e 750 contagens como limite de intensidade; uma clivagem perdida; no mínimo três fragmentos de íon por peptídeos; no mínimo sete fragmentos de íon por proteína; no mínimo dois peptídeos por proteína; modificações fixas como carbamidometil (C) e modificações variáveis como oxidação (M) e fosforil (STY); taxa de falso positivo (FDR) de 1%; tolerância automática a peptídeos e fragmentos.

Foi utilizado o banco de dados de proteínas *Populus trichocarpa* (ID: UP000006729) do UniProtKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Esta espécie foi escolhida devido à proximidade filogenética. A quantificação foi realizada utilizando o *software* ISOQuant v.1.7 (Distler *et al.*, 2014). Foram utilizados os seguintes parâmetros: peptídeo e proteínas com FDR 1%, comprimento da sequência de pelo menos seis aminoácidos e pontuação mínima de peptídeo igual a seis. Para a correção das

intensidades de pico, com base nos domínios de intensidade e tempo de retenção, foi utilizada uma normalização multidimensional. O *software* foi utilizado para a quantificação relativa de proteínas com base no método TOP3. Com base na abundância relativa de peptídeos atribuídos exclusivamente, as abundâncias de peptídeos compartilhados foram redistribuídas para as respectivas proteínas que os originaram, seguida pela quantificação baseada em TOP3 (Distler *et al.*, 2014).

Para garantir a qualidade dos resultados após o processamento dos dados, apenas proteínas presentes ou ausentes nas três replicatas biológicas foram aceitas para análise de abundância diferencial. As proteínas foram consideradas como diferencialmente abundantes se houvesse diferença significativa pelo Teste t ( $p$ -valor $<0,05$ ), e se entre as médias das triplicatas o valor da abundância relativa (tratado/controle) fosse maior do que 1,5 vezes. As anotações funcionais foram realizadas usando o *software* Blast2Go v.5.0 (Conesa *et al.*, 2005). De posse das anotações funcionais, a análise dos resultados foi realizada utilizando scripts em Python (acervo pessoal) e R para retirar e classificar as ID's das proteínas e, por fim, gerar gráficos utilizando o pacote VennDiagram (Chen e Boutros, 2011) e o *software* Spotfire®.

### 3.1.3 RESULTADOS

#### **Mudança no proteoma de populações de maracujazeiro em reposta à infecção por CABMV**

As plantas de *Passiflora edulis* começaram a exibir os sintomas característicos da virose 15 dias após a inoculação (DAI), e o híbrido interespecífico com 24 DAI. As plantas de *P. setacea* não exibiram sintomas da virose.

Mais de 500 proteínas foram identificadas nas folhas de maracujazeiro não inoculadas e inoculadas com o CABMV. Dentre essas proteínas, 437 e 406 são comuns às três populações nos tratamentos controle (0h) e inoculado (72 HAI), respectivamente. No tratamento não inoculado, cinco proteínas foram únicas para o híbrido, oito para *P. edulis* e 15 para a *P. setacea*.

As plantas inoculadas com o vírus apresentaram variações em relação ao número de proteínas, conforme observado para o híbrido que dobrou a quantidade de proteínas únicas, enquanto *P. edulis* reduziu em 50% essa quantidade e *P. setacea* apresentou um sutil aumento em relação ao controle, totalizando 19 proteínas únicas após inoculação (Figura 1).

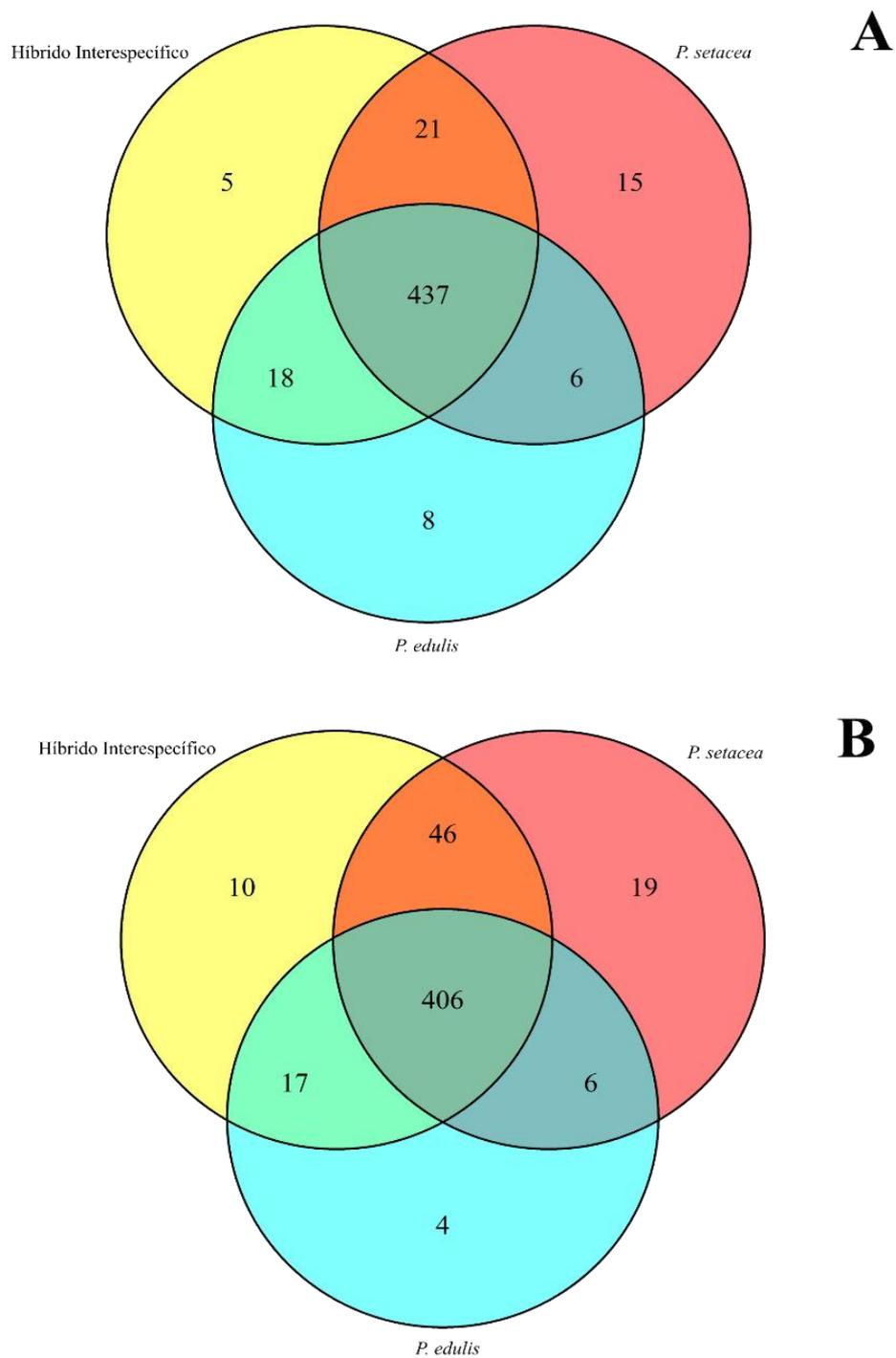


Figura 1. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas identificadas por proteômica gel-free de folhas de maracujazeiro suscetível (*Passiflora edulis*) e resistente (*P. setacea* e híbrido interespecífico) não inoculadas (A) e 72 horas após a inoculação com o CABMV (B).

Dentre as proteínas identificadas, 100, 290 e 96 foram diferencialmente abundantes para o híbrido, *P. edulis* e *P. setacea*, respectivamente, quando comparadas com o controle (tempo 0h). Durante o processo de infecção, as populações apresentaram distintas mudanças em seu proteoma, resultando em diferentes respostas ao patógeno. No híbrido interespecífico, 41% das proteínas diferencialmente abundantes decresceram em quantidade, ou sua produção foi interrompida, e 59% aumentaram ou começaram a ser produzidas, em comparação ao controle. O parental *P. setacea* seguiu um perfil similar, em que 39% das proteínas decresceram em quantidade. Já o parental *P. edulis* seguiu um perfil um pouco diferente, em que 82% das proteínas decresceram em quantidade e somente 18% aumentaram em comparação ao controle (Figura 2).

O híbrido interespecífico e seu parental resistente tiveram uma resposta similar quanto à quantidade de proteínas que aumentaram ou decresceram em quantidade, demonstrando que eles apresentam um padrão similar quando em contato com o patógeno (Figura 2).

Uma visão geral da caracterização de proteínas diferencialmente abundantes, identificadas e agrupadas de acordo com sua distribuição nas diferentes categorias de processos biológicos, pode ser observada na Tabela 1. As proteínas diferencialmente abundantes em resposta à infecção viral foram distribuídas em seis grupos: Metabolismo Proteico, Metabolismo Energético, Sinalização e Defesa contra Estresse, Metabolismo de DNA e outras funções (Figura 2).

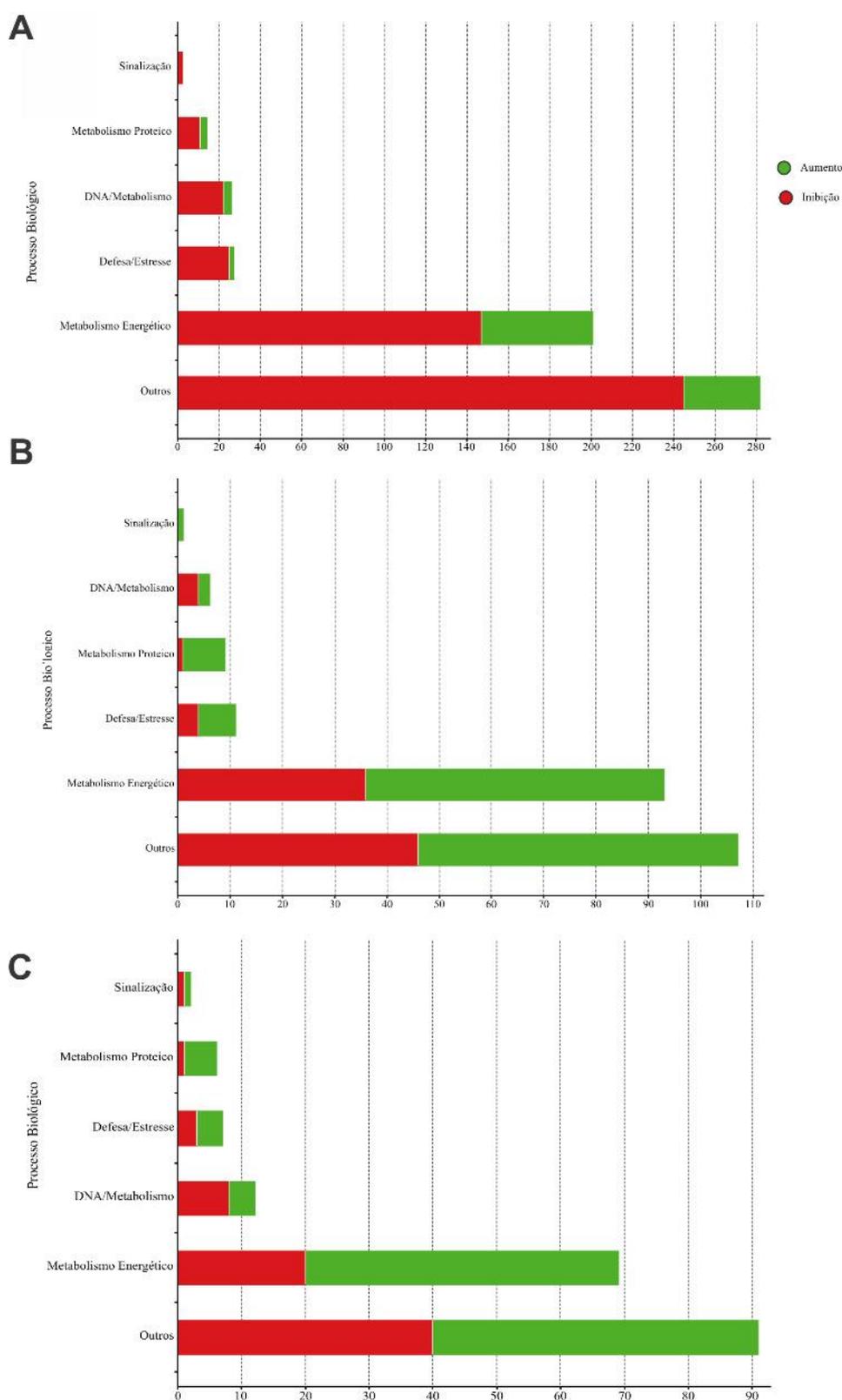


Figura 2. Distribuição das proteínas diferencialmente abundantes de folhas de maracujazeiro. Barras vermelhas representam proteínas que diminuíram em quantidade ou foram inibidas. As barras verdes representam proteínas que aumentaram em quantidade ou foram sintetizadas após a inoculação com o CABMV. (A) Espécie suscetível, *Passiflora edulis*. (B) Híbrido interespecífico, (C) *P. setacea*.

Tabela 1. Resumo das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por proteômica gel-free em folhas de espécies de maracujazeiro suscetível (*Passiflora edulis*) e resistente (*P. setacea* e híbrido interespecífico) após 72 horas da inoculação com o CABMV em comparação com o controle (plantas não inoculadas)

Acesso	Peptídeos Reportados	Max score	Descrição	Regulação diferencial da abundância		
				<i>P. edulis</i>	Híbrido Interespecífico	<i>P. setacea</i>
<b>Metabolismo Proteico</b>						
A0A2K2A5X5	4	894.3	26S protease regulatory subunit 7-like	Única E-0	Inalterada	Inalterada
U5G5S8	5	940.7	26S proteasome regulatory subunit 8 homolog A	Única E-0	Inalterada	Inalterada
A0A2K1ZW30	5	1323.0	26S proteasome regulatory subunit 6B homolog	Down	Up	Inalterada
B9GRL8	2	2156.6	proteasome subunit alpha type-1-B-like	Down	Inalterada	Inalterada
A0A2K1WZ20	8	916.0	leucine aminopeptidase 1-like	Up	Inalterada	Inalterada
A0A2K2BBP3	10	1038.1	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH	Up	Up	Inalterada
A0A2K1X9T1	5	1068.6	26S proteasome regulatory subunit 6B homolog	-	Única H-0	Inalterada
B9HT94	2	5135.1	proteasome subunit beta type-5	-	Única H-72	Única S-72
<b>Metabolismo Energético</b>						
B9I107	10	41677.1	chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1	Down	Inalterada	Inalterada
B9MXP7	6	609.7	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1	Down	Inalterada	Única S-72
A0A2K1ZF43	4	1261.9	ATP-citrate synthase beta chain protein 2	Down	Inalterada	-
A0A0A0UXZ8	10	9385.0	photosystem I P700 apoprotein A2	Up	Inalterada	Inalterada
A0A0A0UYQ3	14	21821.0	photosystem II 44 kDa protein	Up	Inalterada	Inalterada
A0A2K1WVT8	4	2824.4	NADP-dependent malic enzyme isoform X1	-	Única H-0	Up
A0A2K1Z094	3	560.8	pyruvate kinase	Única E-0	Única H-72	-
A0A2K1Y883	4	1082.0	plastidial pyruvate kinase 2	Única E-0	Up	Down
A0A2K1WQI6	6	33341.4	chlorophyll a-b binding protein CP26	Inalterada	Inalterada	Única S-72
<b>Defesa/Estresse</b>						
U5G5S8	5	940.7	26S proteasome regulatory subunit 8 homolog A	Única E-0	Inalterada	Inalterada
A0A2K1XWY9	8	1940.6	heat shock protein 90-6	Down	Inalterada	Inalterada
A0A2K2CE63	16	5888.1	heat shock cognate protein 80	Down	Inalterada	Down
A0A2K1ZW30	5	1323.0	26S proteasome regulatory subunit 6B homolog	Down	Up	Inalterada
A0A2K2BVL2	2	4423.4	glutathione peroxidase	Única E-72	-	-

A0A2K1X9T1	5	1068.6	26S proteasome regulatory subunit 6B homolog	-	Única H-0	Inalterada
A0A2K1ZFI3	22	6740.0	heat shock protein 90-5	Inalterada	Down	Up
A9PIF1	5	2134.9	20 kDa chaperonin	Down	Down	Inalterada
A0A2K2A230	4	2210.6	20 kDa chaperonin	Down	Única H-72	-
<b>Sinalização</b>						
B9HGA2	6	2629.5	guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2	Única E-0	Inalterada	Up
A9PHJ4	5	5038.2	14-3-3-like protein A	Down	Inalterada	Inalterada
A0A2K1X188	5	2573.1	guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2	-	Única H-72	Única S-0
<b>Metabolismo DNA</b>						
A9PBW0	5	10297.7	60S ribosomal protein L12	Única E-0	Inalterada	Inalterada
A0A2K2AX63	4	12686.4	60S ribosomal protein L30	Única E-0	Inalterada	Inalterada
U5GJN6	10	1189.3	chaperonin CPN60-2	Down	Inalterada	Inalterada
A9PIG1	5	5263.7	photosystem II 22 kDa protein	Up	Inalterada	Inalterada
A0A2K1YKM0	3	2590.4	50S ribosomal protein L11	Inalterada	Down	Down
A9P8F6	2	9384.9	40S ribosomal protein S27-2	-	Única H-0	Inalterada
B9GWA4	6	1669.3	ADP, ATP carrier protein	Inalterada	Up	Inalterada
A0A2K1YXH1	19	16382.4	heat shock cognate 70 kDa protein 2	-	Inalterada	Down
A9PBU0	3	4916.0	50S ribosomal protein L12	Down	Inalterada	Down

### Proteínas relacionadas ao Metabolismo Proteico

Estão incluídas no grupo Metabolismo Proteico as proteínas com a função biológica de “Processo metabólico proteico” (Figura 2 e Tabela 1).

Diversas proteínas envolvidas no metabolismo proteico foram inibidas em *P. edulis*, após a inoculação com o vírus, como por exemplo, *chaperone protein ClpD*, *aspartyl protease family protein 2*, *proteasome subunit alpha type-1-B-like*, entre outras. Foram observadas também proteínas ligadas à regulação do proteassoma (*ubiquitin/26S proteasome system* - UPS) com diminuição da sua síntese. O sistema de regulação do proteassoma está ligado à proteção da planta contra patógenos, e a inibição de sua síntese pode favorecer a infecção. Apenas três proteínas desse grupo aumentaram sua síntese, foram elas: *leucine aminopeptidase 1-like* e duas proteínas identificadas como *ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH*.

Ao contrário de *P. edulis*, no híbrido interespecífico e na espécie *P. setacea* houve um incremento da síntese de proteína ligada à regulação do proteassoma (*26S proteasome regulatory subunit 6B homolog* e *proteasome subunit beta type-5*, respectivamente).

### Proteínas relacionadas ao Metabolismo Energético

O grupo de proteínas relacionadas ao metabolismo energético foi um dos mais afetados após a infecção pelo CABMV. Estão incluídas nesse grupo as proteínas com funções biológicas de “Geração de metabólitos precursores e energia”, “Processo metabólico de carboidrato”, “Fotossíntese”, “Processo metabólico lipídico”, “Processo metabólico” (Figura 2 e Tabela 1).

Houve um desbalanço na produção de proteínas ligadas ao metabolismo energético para *P. edulis*, onde a grande parte delas, 147, decresceu em quantidade, quando comparadas ao controle, como por exemplo, *chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1*, *ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*, *ATP-citrate synthase beta chain protein 2*, *succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1*, entre outras, enquanto 54 aumentaram, como *fructose-bisphosphate aldolase 6* e diversas proteínas ligadas ao fotosistema I e II (*photosystem I P700 apoprotein A1* e *photosystem II 44 kDa protein*), indicando que o parental suscetível teve um desbalanço energético muito alto após a inoculação, deslocando sua

energia e fotoassimilados para a defesa da planta e mesmo assim não foi capaz de suprimir a doença.

O híbrido interespecífico e *P. setacea* novamente apresentaram padrão similar em relação à quantidade das proteínas que diminuíram ou aumentaram nesse grupo, das quais 36 decresceram comparadas ao controle, como *NADP-dependent malic enzyme isoform X1* e *fructose-bisphosphate aldolase*, por exemplo. Mas 57 aumentaram para o híbrido, como *pyruvate kinase*, *chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like*, entre outras.

Para *P. setacea*, 20 decresceram em quantidade, como: *protochlorophyllide reductase*, *plastidial pyruvate kinase 2*, entre outras, enquanto 49 aumentaram em comparação ao controle, como: *succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1* (mesma ID da proteína down regulada em *P. edulis* - ID B9MXP7) e *chlorophyll a-b binding protein CP26*, entre outras. Portanto, *P. setacea* apresentou um padrão diferente ao encontrado em *P. edulis*, mas ainda com supressão de algumas proteínas ligadas ao metabolismo energético.

### **Proteínas relacionadas à Defesa/Estresse e Sinalização**

Estão incluídas no grupo Defesa/Estresse e Sinalização as proteínas com as funções biológicas de “Resposta ao estresse”, “Resposta a estímulos bióticos”, “Resposta a estímulos externos”, “Resposta a estímulos extracelulares” e “Transdução de sinal” (Figura 2 e Tabela 1).

Para este grupo, *P. edulis* novamente apresentou um padrão de síntese proteica diferente do híbrido interespecífico e diferente de *P. setacea*. O parental suscetível apresentou 25 proteínas que tiveram sua síntese inibida após a inoculação, como proteínas ligadas ao sistema de regulação do proteassoma (*26S protease regulatory*) e proteínas do tipo chaperonas (*Heat shock proteins – HSP90*). Somente duas proteínas se acumularam, foram elas, *glutathione peroxidase* e *V-type proton ATPase catalytic subunit A*.

Novamente o híbrido interespecífico e *P. setacea* apresentaram um padrão similar de acúmulo de proteínas após a inoculação. No híbrido interespecífico quatro proteínas tiveram sua síntese interrompida: *26S proteasome regulatory subunit 6B homolog*, *heat shock protein 90-5, 20 kDa chaperonin* e *aspartate aminotransferase*, enquanto sete proteínas se acumularam, dentre as quais se

destacaram as proteínas ligadas à regulação do proteassoma e as chaperoninas. A espécie *P. setacea* apresentou inibição da proteína *heat shock cognate protein 80* e síntese da proteína *heat shock protein 90-5*, ambas são do tipo chaperonas.

A categoria de proteínas relacionadas à sinalização foi a que apresentou seus níveis relativos de proteínas com menores modificações após a inoculação do vírus. No parental susceptível (*P. edulis*), somente duas proteínas tiveram sua síntese interrompida, *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2* e *14-3-3-like protein A*. O híbrido interespecífico apresentou apenas uma proteína que aumentou em quantidade, *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2*.

Já o *P. setacea* exibiu uma mistura do acúmulo apresentado pelas outras duas populações, com uma proteína inibida e outra acumulada. A proteína inibida após a inoculação em *P. setacea* foi a mesma que o híbrido acumulou (A0A2K1X188 - *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2*), enquanto a proteína acumulada em *P. setacea* foi a mesma inibida em *P. edulis* após a inoculação (B9HGA2 - *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2*).

### **Proteínas relacionadas ao Metabolismo de DNA e outras funções**

Estão incluídas no grupo Metabolismo de DNA as proteínas com funções biológicas de *DNA metabolic process; Transport; Translation* (Figura 2 e Tabela 1).

*P. edulis* expressou um perfil proteico com maior desbalanço que as outras duas populações estudadas. Observou-se que a maioria das proteínas teve sua síntese bloqueada ou inibida após a inoculação, totalizando 22 proteínas, enquanto somente quatro apresentaram incremento de sua síntese. Das proteínas que tiveram sua síntese inibida, podem ser citadas: a *60S ribosomal protein*, que apareceu em maior abundância, proteínas da classe das chaperoninas (*chaperonin CPN60-2*) e a *ubiquitin-60S ribosomal protein L40*. Das quatro que tiveram um incremento na sua síntese pode-se citar a proteína ligada ao fotossistema II (*photosystem II 22 kDa protein*).

O híbrido interespecífico apresentou um perfil com um menor desbalanço na síntese de proteínas após a inoculação. Apenas quatro proteínas tiveram sua síntese diminuída, como *heat shock protein 90-5*, *50S ribosomal protein L11* e *40S ribosomal protein S27-2*, e duas apresentaram um acúmulo após a inoculação,

foram elas, *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2* e ADP, ATP carrier protein.

*P. setacea* apresentou o dobro da quantidade de proteínas diferencialmente abundantes do híbrido nessa classe. Houve redução em quantidade de oito proteínas, como, por exemplo, *heat shock cognate 70 kDa protein 2*, *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2* e *50S ribosomal protein L12*. E quatro proteínas apresentaram um acúmulo após a inoculação, como, *heat shock protein 90-5* (mesmo ID da proteína inibida no híbrido interespecífico, A0A2K1ZFI3) e *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2* (mesmo ID da proteína inibida na *P. edulis*, B9HGA2).

Esse foi o único grupo, dentre os citados anteriormente, em que no híbrido interespecífico e em *P. setacea* a quantidade de proteínas inibidas foi maior do que a quantidade de proteínas que aumentaram em abundância. Enquanto *P. edulis* apresentou esse padrão de inibição de síntese de proteínas após a inoculação, em todos os grupos de proteínas citados anteriormente.

Em relação às proteínas categorizadas como “outras funções”, elas estão incluídas no grupo proteínas com as funções biológicas de “Processo celular”, “Processo biossintético”, “Organização de componentes celulares”, “Processo metabólico composto”, “Processo de modificação de proteína celular”, entre outros. Novamente *P. edulis* apresentou maior desbalanço de síntese proteica, onde 245 proteínas tiveram sua produção inibida, enquanto 54 tiveram um aumento da sua produção após a inoculação. O híbrido interespecífico apresentou 46 proteínas que diminuíram em quantidade e 61 que acumularam, enquanto *P. setacea* exibiu 40 proteínas inibidas após a inoculação e 51 acumuladas.

#### 3.1.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho analisou-se a mudança do proteoma em três populações de maracujazeiro: o híbrido interespecífico (população segregante) e seus parentais, *P. edulis* ('UENF Rio Dourado' - suscetível ao CABMV) e *P. setacea* (BAG da UENF - resistente ao CABMV), na interação com o cowpea aphid-borne mosaic virus

(CABMV), vírus que causa o endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Essas populações foram previamente caracterizadas quanto à resistência ao CABMV em nível de campo (Santos *et al.*, 2015a).

Estudos de interação vírus-hospedeiros são complexos em alguns sentidos, por exemplo, é necessário apenas algumas horas para a replicação do vírus dentro da célula, mas são necessários alguns dias para o aparecimento dos sintomas (Dolja *et al.*, 1992). A partir dessa informação foi necessário escolher um tempo, após a inoculação, em que as plantas estivessem respondendo à infecção de maneira mais efetiva para proceder as análises.

Estudando a interação do tomateiro com o vírus pepper yellow mosaic vírus (PepYMV), avaliando a expressão gênica, Alfenas-Zerbini *et al.* (2009), construíram uma biblioteca de cDNA a partir de folhas inoculadas de tomateiro, e encontraram mais de 700 genes diferencialmente expressos em comparação com plantas não inoculadas. Eles realizaram as análises 72 horas após a inoculação (HAI). O CABMV é um vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*, mesmo gênero que o PepYMV. Portanto, foi escolhido o tempo de 72 HAI para proceder as análises, pois acredita-se que nesse tempo a planta já tenha desencadeado respostas à infecção, mas sem ter começado a expressar os sintomas característicos da virose.

As plantas de maracujá suscetíveis ao CABMV começaram a expressar os sintomas característicos da virose, como mosaico e formação de bolhas, 15 dias após a inoculação (DAI). Em experimentos anteriores (dados não publicados), plantas da cultivar 'UENF Rio Dourado' começaram a expressar os sintomas de mosaico 7 DAI. Porém, Gonçalves *et al.* (2017), avaliando 12 espécies de maracujazeiro quanto à resistência à virose do endurecimento dos frutos, observaram o início dos sintomas nas espécies suscetíveis aos 20 DAI. Essa diferença quanto ao período de incubação pode ser atribuída a fatores ambientais e até de virulência dos isolados virais.

### **Mudança no proteoma de populações de maracujá em resposta à infecção por CABMV**

A mudança quantitativa da síntese proteica foi analisada nas três populações de maracujá após a inoculação. No parental suscetível, *P. edulis*, observou-se que as plantas tiveram uma grande inibição na síntese proteica após

a infecção. Já as outras duas populações, o híbrido interespecífico e *P. setacea*, não apresentaram essa inibição em suas sínteses proteicas, entretanto, apresentaram um aumento na produção de proteínas de maneira geral.

Esses resultados quantitativos evidenciam uma diferença marcante na síntese proteica para as três populações, entre os dois tempos analisados, e indicam que para o parental suscetível o maquinário de síntese proteica foi bloqueado ou inibido, já que a maioria das proteínas decresceu em quantidade ou teve sua produção interrompida. Este resultado mostra que *P. edulis* foi a população mais sensível à infecção viral, não só em relação à fenologia, como também em nível bioquímico. Com os resultados obtidos neste estudo, assim como no trabalho de Paiva *et al.* (2016), analisando a interação feijão caupi e o cowpea severe mosaic virus (CPSMV), observou-se que as plantas infectadas, quando comparadas às plantas saudáveis, sofrem uma importante alteração da síntese proteica.

A inibição da expressão de vários genes foi previamente observada em outros patossistemas, como em plantas de pepino infectados com CMV (cucumber mosaic virus), e em tomateiros inoculadas com TYLCV (tomato yellow leaf curl virus), coincidindo com a replicação do vírus na planta (Dolja *et al.*, 1992; Moshe *et al.*, 2016). Assim, sugere-se que a inibição da síntese das proteínas em *P. edulis*, principalmente, durante a infecção pelo CABMV observada neste trabalho, pode ser crucial para o estabelecimento da doença e suscetibilidade das plantas ao vírus, mostrando que essa repressão do metabolismo proteico pode estar relacionada à sobrevivência e replicação do vírus na planta.

Além da mudança quantitativa da síntese proteica, avaliou-se também a mudança qualitativa do proteoma. Após a infecção pelo vírus, as populações de maracujá estudadas apresentaram mudança em seu perfil proteico. Essa mudança pode ter sido resultante da reprogramação dos genes em resposta à infecção (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). A partir dessas mudanças pôde-se observar as proteínas, inibidas e abundantes, que estão envolvidas na resposta à interação planta-patógeno. As proteínas foram agrupadas quanto à sua função ou associação aos processos biológicos: Metabolismo Proteico; Metabolismo Energético; Defesa/Estresse; Sinalização; Metabolismo de DNA e outras funções.

## Proteínas relacionadas ao Metabolismo Proteico

O grupo metabolismo proteico engloba proteínas do sistema de regulação do proteassoma (sistema *Ubiquitina/26s proteassoma* – UPS). O sistema UPS desempenha um papel de controle de qualidade na célula, e tem como alvo dois tipos principais de proteínas: proteínas anormais/danificadas e proteínas funcionais que transportam sinais de destruição específicos (Livneh *et al.*, 2016). Além dessa função chave de vigilância celular, o UPS pode estar envolvido na defesa de plantas contra patógenos, emergindo como eficiente mecanismo de defesa contra vírus (Citovsky *et al.*, 2009).

O UPS parece ser necessário em algumas etapas das vias de sinalização, incluindo a do ácido salicílico, o qual desempenha um papel importante na regulação das respostas imunes das plantas, coordenando sua defesa contra patógenos, principalmente, biotróficos (Yaeno e Iba, 2008; Pieterse *et al.*, 2012).

No entanto, a sinalização hormonal não parece ser a única maneira pela qual o UPS está envolvido nos mecanismos de defesa das plantas. O sistema UPS é responsável pela degradação proteica, sendo um dos mais importantes mecanismos para a regulação das duas principais linhas de defesa do sistema imune inato das plantas, a imunidade desencadeada pelos PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) – PTI (*PAMP-triggered immunity*), e a imunidade desencadeada pelo efector - ETI (*Effector-triggered immunity*) (Shirsekhar *et al.*, 2010).

A ETI pode ser traduzida na interação gene a gene, em que a proteína de resistência do hospedeiro reconhece um efector do patógeno, chamado de fator de avirulência, resultando tanto na resposta hipersensitiva (HR), como na resistência sistêmica adquirida (SAR) (Jones e Dangl, 2006; Nicaise, 2017). Acredita-se que a população suscetível de *P. edulis*, após a inibição da síntese das proteínas desse grupo, esteja implicada na redução da sua capacidade de defesa, até, de alguma forma, chegando a favorecer a infecção pelo vírus.

Já as populações que apresentam resistência ao CABMV, o híbrido interespecífico e *P. setacea*, apresentaram um sistema de regulação do proteassoma mais eficiente que o da *P. edulis*, sugerindo que a síntese dessas proteínas pode ser um evento chave para a defesa contra o vírus.

## Proteínas relacionadas ao Metabolismo Energético

Além das proteínas relacionadas ao metabolismo proteico, as proteínas do grupo metabolismo energético também foram analisadas. O processo de metabolismo energético foi mais uma das respostas suprimidas pelo hospedeiro suscetível durante a defesa. Essa supressão de proteínas do metabolismo energético é comum em plantas infectadas por vírus (Pineda *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2016), sugerindo que a planta pode se tornar menos apta a combater a infecção pelo vírus quando há essa supressão na fase inicial da infecção. Em plantas de tomateiro suscetíveis, infectadas com cucumber mosaic virus (CMV), a síntese de algumas proteínas ligadas ao metabolismo energético foi suprimida e, por consequência ocorreu a repressão de genes que codificam proteínas do metabolismo primário, envolvidas na fotossíntese e respiração (Carli *et al.*, 2010).

Por outro lado, existem estudos que evidenciam que as plantas, quando estão sob ataque de patógenos, podem alterar a rota dos fotoassimilados, alocando os carboidratos da direção de sua defesa e não mais na direção do seu crescimento. Esse processo é chamado de troca crescimento-defesa. Nesse contexto, a supressão da síntese das proteínas envolvidas na geração de energia na espécie suscetível pode ser desfavorável para o hospedeiro, pois enfraquece o seu metabolismo e sua capacidade de investir mais na geração de compostos de defesa para bloquear a ação do patógeno (Huot *et al.*, 2014).

De acordo com estes resultados, a redução da síntese de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, em especial à fotossíntese, é mais evidente na interação compatível com o vírus, com a espécie *P. edulis*, causando maior impacto do aparato fotossintético e inibição das atividades metabólicas primárias na planta.

No caso da espécie *P. setacea* e do híbrido interespecífico, não foi tão evidente a perturbação no mecanismo fotossintético, uma vez que não foi detectado desbalanço na síntese de proteínas como ocorreu na interação compatível. Desta forma, acredita-se que as duas populações resistentes utilizam sua energia, proveniente da fotossíntese, em resposta à defesa das plantas na interação incompatível.

## Proteínas relacionadas à Defesa/Estresse e Sinalização

O grupo de proteínas relacionadas à defesa/estresse inclui as *Heat shock proteins* (HSPs), principalmente, a Hsp90, peroxidases e proteínas associadas ao sistema de regulação do proteassoma, que foram discutidas anteriormente.

As HSP90 estão envolvidas na regulação e manutenção da integridade estrutural de proteínas e na assistência à sobrevivência de células sob estresse, realizando, muitas vezes, funções de chaperonas. Por esse motivo, muitas chaperonas são considerados como HSPs. A HSP90 promove o enovelamento de proteínas (processo pelo qual a proteína adquire sua conformação tridimensional) e impede a agregação de proteínas desdobradas. O vírus produz várias perturbações na planta durante sua replicação, portanto, as plantas utilizam as HSP90 para facilitar o enovelamento correto das proteínas nascentes, visto que algumas podem se desdobrar e se agregar de maneira não funcional (Jockusch *et al.*, 2001; Picard, 2002).

As HSPs foram primeiramente relacionadas ao estresse por choque térmico, entretanto, podem estar associadas a vários tipos de estresses abióticos, como seca, salinidade e frio. Além disso, elas também estão associadas a estresses bióticos (Park *et al.*, 2015). As HSP90 desempenham um papel importante na imunidade de plantas, intermediando as vias de transdução de sinal de resistência a doenças em plantas. A imunidade em plantas pode ser influenciada por proteínas de resistência (R) que reconhecem proteínas efetoras dos patógenos (fatores de avirulência, Avr). As HSP90 ativam e estabilizam a proteína R, contribuindo para o reconhecimento dos efetores de patógenos (Xu *et al.*, 2012).

Ressalta-se que foi observado um acúmulo de Glutathione peroxidase (GPX) somente na espécie suscetível. As Glutathione peroxidases são enzimas à base de tiol que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos a água ou álcoois. As plantas utilizam a GPX, assim como outras enzimas, para decompor o peróxido de hidrogênio nas células, atenuando a toxicidade destes compostos para a célula e, com isso, modulando o estado de oxidação nas plantas (Navrot *et al.*, 2006; Passaia e Margis-Pinheiro, 2015).

O peróxido de hidrogênio, em particular, pode atuar também como uma molécula de sinalização que se difunde por meio das membranas e desencadeia vias específicas de transdução de sinal. A geração do peróxido de hidrogênio é particularmente aumentada quando as plantas são submetidas a estresses

bióticos, ou seja, são compostos que auxiliam a sinalização de rotas de defesa e estresse da planta (Veal *et al.*, 2007; Veal e Day, 2011).

Por possuir um papel duplo, como um composto tóxico e como uma molécula sinalizadora, o peróxido de hidrogênio deve ser mantido em um nível micromolar muito baixo, pois caso a planta seja submetida a níveis aumentados de peróxido de hidrogênio, o sinal será propagado para os alvos reguladores, resultando na ativação apropriada das respostas (Cotter, 2011).

Serra-Soriano *et al.* (2015), estudando o perfil proteico de plantas de melão, observaram um acúmulo de proteínas que decompõem o peróxido de hidrogênio nas células, assim como a GPX, na interação compatível com o *melon necrotic spot virus* (MNSV). Por outro lado, a atividade e os níveis de algumas enzimas desintoxicantes (como a GPX) podem ser reprimidos em diferentes interações planta-patógeno (Wu *et al.*, 2013). A supressão dessas enzimas desintoxicantes pode ser crucial para o início da morte celular programada e, conseqüentemente, pode levar a uma inibição da propagação do vírus na planta (Apel e Hirt, 2004). No presente trabalho, a espécie suscetível *P. edulis* apresentou aumento da síntese dessas enzimas desintoxicantes (GPX).

Proteínas associadas à sinalização estão relacionadas ao mecanismo de defesa da planta, como a geração de espécies reativas de oxigênio, a ativação da HR e a biossíntese de proteínas PR (Scheler *et al.*, 2013). A função da proteína *guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor* (GDP inhibitor - GDI) na defesa de plantas ainda não foi muito estudada. Entretanto, acredita-se que essa proteína age na inibição da troca de GDP por GTP. A GTP interage com efetores que atuam após a ativação dos receptores da membrana celular (*downstream effectors*) e, em seguida, aciona várias respostas celulares (Kawano *et al.*, 2014). Surpreendentemente, *P. edulis* inibiu a síntese dessa proteína, enquanto o híbrido interespecífico e *P. setacea* aumentaram sua síntese. Este fato evidencia a dificuldade das plantas de *P. edulis* em reagir às constantes ações do vírus, resultando na expressão dos sintomas e, conseqüentemente, no avanço da doença.

## **Proteínas relacionadas ao Metabolismo de DNA**

O grupo metabolismo de DNA apresentou proteínas correlatas aos outros grupos, como por exemplo, as proteínas da classe chaperoninas e *heat shock protein* (Defesa/Estresse) e as GDI (sinalização), discutidas anteriormente.

As proteínas ribossômicas (*ribosomal protein* - RPLs), identificadas em maior abundância nesse grupo, são componentes da maquinaria ribossômica e são necessárias para a síntese de proteínas. Embora as RPLs sejam componentes de maquinaria de tradução, essas proteínas são suspeitas de terem funções ribossômicas extras, como a sinalização de estresse (Warner e McIntosh, 2009; Nagaraj *et al.*, 2016).

Mcgregor *et al.* (2009) observaram que plantas de batata doce induziram a expressão dos genes da proteína ribossômica (RPLs), após a infecção com dois vírus que são os agentes causais de uma única doença, o sweet potato feathery mottle virus e sweet potato chlorotic stunt virus. A alteração dos níveis de transcrição ribossômica também foi observada em plantas de soja, infectadas com o soybean mosaic virus (Babu *et al.*, 2008). Curiosamente, as três espécies estudadas neste trabalho também inibiram a síntese de proteínas ribossômicas.

Não se sabe se o aumento na expressão destas proteínas ribossômicas é uma resposta simples ao estresse, para compensar a célula hospedeira que pode não ter componentes de tradução suficientes para manter sua viabilidade, uma vez que muitos desses componentes são sequestrados pelo vírus para sua tradução e replicação do genoma (Babu *et al.*, 2008). Uma das principais estratégias adotadas pelo patógeno na infecção é a indução do aumento da replicação do RNA em células vegetais maduras, reprogramando assim, a expressão do gene hospedeiro (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004).

A partir dessas análises, pode-se afirmar que mesmo o parental suscetível desencadeando algumas rotas de resposta e sinalização de defesa como uma tentativa de minimizar a infecção pelo vírus, o hospedeiro não apresentou defesa efetiva, e a interação compatível (vírus-planta) foi estabelecida.

## **Interpretação geral da interação de populações de maracujá e o CABMV**

Observou-se, no presente trabalho, que as alterações de vários processos bioquímicos do hospedeiro, durante a infecção viral, podem ser essenciais para o

estabelecimento da relação compatível ou não entre o CABMV e o maracujazeiro. Destaca-se, portanto, a importância da inibição de vários mecanismos de defesa do hospedeiro e o papel das várias proteínas, particularmente daquelas relativas ao sistema de regulação do proteossoma e das que estão ligadas ao estresse e proteção da planta, apresentando um papel central na defesa das plantas contra o CABMV.

As plantas são consideradas suscetíveis não por uma impossibilidade de responder ativamente a um estresse biótico, mas porque não responderam dentro de um intervalo de tempo apropriado após o contato com o patógeno. Portanto, plantas suscetíveis podem reagir à infecção até mesmo com maior intensidade em comparação com as resistentes, mas induzidas de forma retardada, caracterizando a reação como sem valor para prevenir o estabelecimento da doença (Kuč e Preisig, 1984), o que em muitas vezes foi observado nos resultados do presente estudo (Figura 3).

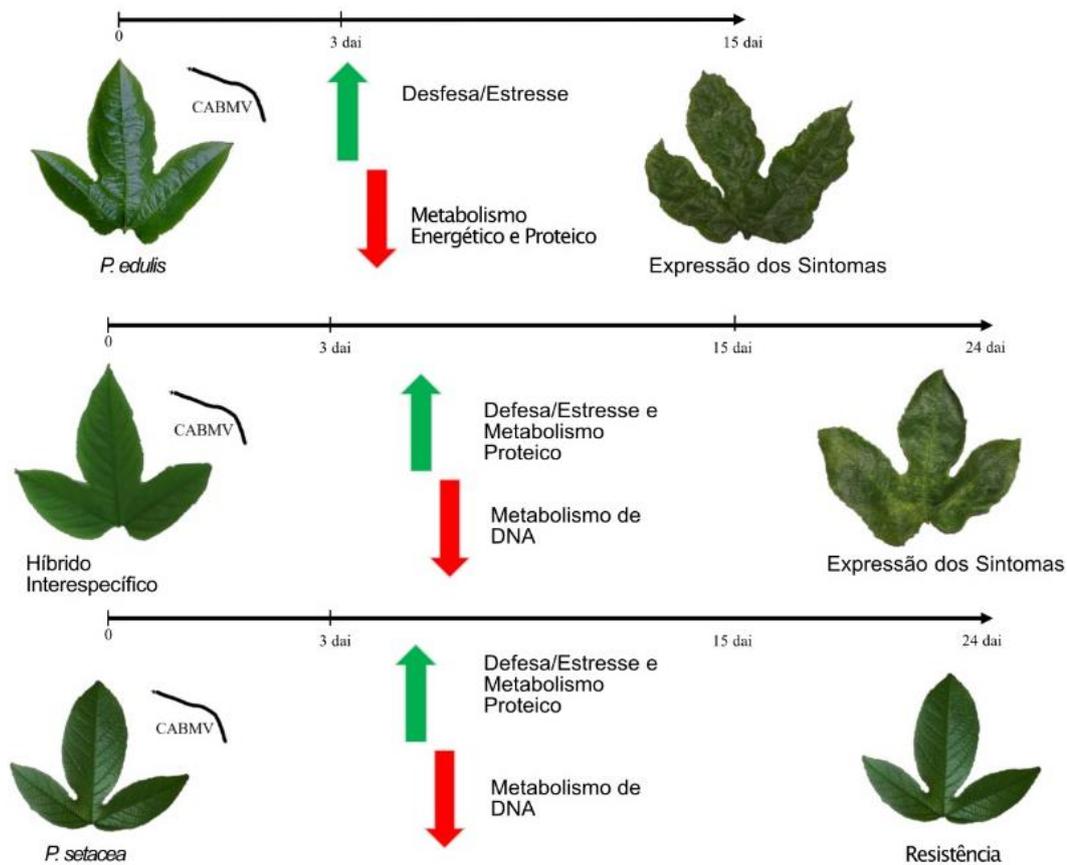


Figura 3. Cronologia de aparecimento dos sintomas nas diferentes populações estudadas (*Passiflora edulis*, *P. setacea* e o híbrido interspecífico), destacando a classificação funcional das proteínas em relação ao seu aumento (setas verdes) ou inibição (setas vermelhas) em resposta ao CABMV.

### 3.1.5 RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho analisou-se a alteração do proteoma em três populações de maracujá: o híbrido interespecífico (população segregante) e seus parentais, *P. edulis* (suscetível ao CABMV) e *P. setacea* (resistente), na interação com o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), vírus que causa o endurecimento dos frutos do maracujazeiro.

A espécie suscetível inibiu proteínas que podem ter função chave na resposta à defesa da planta, como as proteínas ligadas à regulação do proteassoma e as HSPs, e ao mesmo tempo sintetizou proteínas que podem prejudicar a sinalização da infecção viral, como a *glutathione peroxidase*. Portanto, mesmo respondendo à infecção, *P. edulis* não foi capaz de conter o estabelecimento da doença.

Ao contrário de *P. edulis*, o híbrido interespecífico e seu parental resistente (*P. setacea*) sintetizaram proteínas que apresentam funções chave contra a infecção viral, como as proteínas ligadas à regulação do proteassoma e as HSPs. Este resultado sugere que a doença se manifesta por uma falha no sistema de sinalização da espécie suscetível, assim, mesmo que a planta ative algumas rotas de resposta, essas não são eficientes no controle da doença.

### 3.1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, S. de P.M. (2011) Cultivo de maracujá-azedo.

Alfenas-Zerbini, P., Maia, I.G., Fávares, R.D., Cascardo, J.C.M., Brommonschenkel, S.H., & Zerbini, F.M. (2009) Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. *Mol Plant-Microbe Interact* (22): 352–361.

Amata, R., Otipa, M., Waiganjo, M., Wasilwa, L., Erbaugh, M., & Miller, S. (2013) Management of dieback disease of passion fruits. *Acta Hort* 363–368.

- Apel, K., & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* (55): 373–399.
- Babu, M., Gagarinova, A.G., Brandle, J.E., & Wang, A. (2008) Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *J Gen Virol* (89): 1069–1080.
- Boro, M.C., Beriam, L.O.S., & Guzzo, S.D. (2011) Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. *Trop Plant Pathol* (36): 74–80.
- Carli, M. Di., Villani, M.E., Bianco, L., Lombardi, R., Perrotta, G., Benvenuto, E., & Donini, M. (2010) Proteomic Analysis of the Plant - Virus Interaction in Cucumber Mosaic Virus (CMV) Resistant Transgenic Tomato. *J Proteome Res* (9): 5684–5697.
- Cerqueira-Silva, C.B., Conceição, L.D.H.C.S., Souza, A.P., & Corrêa, R.X. (2014) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects. *Eur J Plant Pathol* (139): 261–270.
- Chen, H., & Boutros, P.C. (2011) VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/1471-2105-12-3512
- Citovsky, V., Zaltsman, A., Kozlovsky, S. V., Gafni, Y., & Krichevsky, A. (2009) Proteasomal degradation in plant – pathogen interactions. *Semin Cell Dev Biol* (20): 1048–1054.
- Conesa, A., Götz, S., García-gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Genómica, D., Valenciano, I., Agrarias, D.I., & Valencia, U.P. De. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* (21): 3674–3676.
- Cotter, T.G. (2011) Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* (2): 1-8.

- Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M., & Thiellemen, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 52–54.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., & Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable independent acquisition proteomics. *Nat Methods* (11): 167–170.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., & Tenzer, S. (2016) Label-free quantification in ion mobility – enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat Protoc* (11): 795–812.
- Dolja, V. V., McBride, H.J., & Carrington, J.C. (1992) Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* (89): 10208–10212.
- Eldakak, M., Milad, S.I.M., Nawar, A.I., & Rohila, J.S. (2013) Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. *Front Plant Sci* (4): 1–12.
- Gonçalves, Zanon Santana; Jesus, Onildo Nunes De; Cerqueira-silva, Carlos Bernard; Diniz, Rafael Parreira; Soares, Taliane Leila; Oliveira, E.J. de; (2017) Methodological approaches to assess passion fruit resistance (*Passiflora* spp.) to passionfruit woodiness disease. *Biosci J* (33): 1441–1451.
- Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M., & Dale, J.L. (2008) Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Arch Virol* (153): 25–36.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., & Robertson, D. (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol* (5): 149–156.
- Hernandez-Valladares, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., & Bruserud, Ø. (2016) Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biol Proced Online* (18): 1–10.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., & Yang, S. (2014) Growth – Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant* (7): 1267–1287.

- Jockusch, H., Wiegand, C., Mersch, B., & Rajes, D. (2001) Mutants of Tobacco mosaic virus with Temperature-Sensitive Coat Proteins Induce Heat Shock Response in Tobacco Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (14): 914–917.
- Jones, J.D.G., & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nat Publ Gr* (444): 323–329.
- Kawano, Y., Kaneko-kawano, T., & Shimamoto, K. (2014) Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals. *Frontiers in Plant Science* (5): 1–12.
- Kuč, J., & Preisig, C. (1984) Fungal Regulation of Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Mycol Soc Am* (76): 767–784.
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.-A., Endert, P. van., Edelman, A., & Guerrero, I.C. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 1–13.
- Livneh, I., Cohen-kaplan, V., Cohen-rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome: from birth , through regulation and function , and onto its death. *Nat Publ Gr* (26): 869–885.
- Mcgregor, C.E., Miano, D.W., Labonte, D.R., Hoy, M., & Clark, C.A. (2009) Differential Gene Expression of Resistant and Susceptible Sweetpotato Plants after Infection with the Causal Agents of Sweet Potato Virus Disease. *J Amersochortsci* (134): 658–666.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev Bras Frutic* (33): 83–91.
- Monteiro, A.C.B. de A., Higashi, E.N., Gonçalves, A.N., Rodriguez, A.P.M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* sims f. *flavicarpa* Deg.). *Vitr Cell Dev Biol* (36): 527–531.
- Moshe, A.D.I., Gorovits, R., Liu, Y., & Czosnek, H. (2016) Tomato plant cell death induced by inhibition of HSP90 is alleviated by *Tomato yellow leaf curl virus* infection. *Molecular plant pathology* (17): 247-260. doi: 10.1111/mpp.12275

- Munhoz, C.F., Santos, A.A., Arenhart, R.A., Santini, L., Monteiro-Vitorello, C.B., & Vieira, M.L.C. (2015) Analysis of plant gene expression during passion fruit-*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. *Ann Appl Biol* (167): 135–155.
- Murashige, Toshio; Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* (15): 437–497.
- Nagaraj, S., Senthil-kumar, M., Ramu, V.S., & Wang, K. (2016) Plant Ribosomal Proteins, RPL12 and RPL19, Play a Role in Nonhost Disease Resistance against Bacterial Pathogens. *Front Plant Sci* (6): 1–10.
- Nanjo, Y., Skultety, L., Hajduch, M., & Komatsu, S. (2012) Mass Spectrometry-Based Analysis of Proteomic Changes in the Root Tips of Flooded Soybean Seedlings. *J Proteome Res* (11): 372–385.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J., & Rouhier, N. (2006) Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and and Abiotic Stresses. *Plant Physiol* (142): 1364–1379.
- Nicaise, V. (2017) Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr Opin Virol* (26): 112–119.
- Paiva, A.L.S., Oliveira, J.T.A., Souza, G.A. De., & Vasconcelos, I.M. (2016) Label-free Proteomics Reveals that *Cowpea Severe Mosaic Virus* Transiently Suppresses the Host Leaf Protein Accumulation During the Compatible Interaction with Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J Proteome Res*. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00211
- Park, C., Seo, Y., & Park, C. (2015) Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol J* (31): 323–333.
- Passaia, G., & Margis-pinho, M. (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Sci* (234): 22–26.
- Perdizio, V.A. (2016) Abordagem proteômica na investigação dos mecanismos de defesa em maracujá. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro 1–70p.

- Picard, D. (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* (59): 1640–1648.
- Pieterse, M.J., Does, D. Van Der., Zamioudis, C., Leon-reyes, A., & Wees, S.C.M. Van. (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* (28): 16–45.
- Pineda, M., Sajani, C., & Baro, M. (2010) Changes induced by the Pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. *Photosynth Res* (103): 31–45.
- Preisigke, S. da C., Martini, F.V., Rossi, A.A.B., Serafim, M.E., Barelli, M.A.A., da Luz, P.B., Araújo, K.L., & Neves, L.G. (2015) Genetic variability of *Passiflora* spp. against collar rot disease. *Aust J Crop Sci* (9): 69–74.
- Quirino, B.F., Candido, E.S., Campos, P.F., Franco, O.L., & Krüger, R.H. (2010) Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry* (71): 351–362.
- Romeiro, R. (2008) Indução de resistência em plantas a patógenos. In: Pascholati, S.F., Leite, B., Stangarlin, J.R., Cia, P. (ed) *Interações planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: Fealq, p. 411–431.
- Santos, E.A., Viana, A.P., de Oliveira Freitas, J.C., de Lima e Silva, F.H., Rodrigues, R., & Eiras, M. (2015) Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *Eur J Plant Pathol* (143): 85–98.
- Scheler, C., Durner, J., & Astier, J. (2013) Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr Opin Plant Biol* (16): 534–539.
- Serra-Soriano, M., Navarro, J.A., Genoves, A., & Pallás, V. (2015) Comparative proteomic analysis of melon phloem exudates in response to viral infection. *J Proteomics* (124): 11–24.
- Shirsekhar, G., Dai, L., Hu, Y., Wang, X., Zeng, L., & Wang, G. (2010) Role of Ubiquitination in Plant Innate Immunity and Pathogen Virulence. *J Plant Biol* (53): 10–18.

- Veal, E., & Day, A. (2011) Hydrogen Peroxide as a Signaling Molecule. *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2011.396815
- Veal, E.A., Day, A.M., & Morgan, B.A. (2007) Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol Cell* 1–14.
- Viana, A.P., Higino, F., Lima, D., Gonçalves, M., Geraldo, M., Silva, D.M., Ferreira, R.T., Nair, T., & Pereira, S. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breed Appl Biotechnol* (16): 250–253.
- Warner, J.R., & McIntosh, K.B. (2009) How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol Cell* (34): 3–11.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* (6): 3–7.
- Wu, L., Han, Z., Wang, S., Wang, X., Sun, A., Zu, X., & Chen, Y. (2013) Comparative proteomic analysis of the plant – virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *J Proteomics* (89): 124–140.
- Xu, Z., Li, Z., Chen, Y., Chen, M., Li, L., & Ma, Y. (2012) Heat Shock Protein 90 in Plants: Molecular Mechanisms and Roles in Stress Responses. *Int J Mol Sci* (13): 15706–15723.
- Yaeno, T., & Iba, K. (2008) BAH1 / NLA, a RING-Type Ubiquitin E3 Ligase , Regulates the Accumulation of Salicylic Acid and Immune Responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol* (148): 1032–1041.

### 3.2 RESPOSTAS DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE MARACUJAZEIRO AO CABMV. UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA, SINTOMATOLÓGICA E GENÉTICA

#### RESUMO

O endurecimento dos frutos, virose causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) é um fator limitante para a cultura do maracujazeiro, diminuindo e inviabilizando a produção. Cultivares com níveis de resistência ao CABMV estão sendo desenvolvidas a partir de retrocruzamentos interespecíficos pelo grupo de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF. Estudos que mostrem como as populações segregantes respondem à infecção ao longo do tempo e descrevam a resistência, são necessários, pois, além de caracterizar os genótipos, torna-se possível selecionar os mais promissores. Portanto, este trabalho objetivou descrever a patogênese e avaliar a resistência no patossistema *Passiflora* sp. x CABMV e selecionar os indivíduos mais resistentes para o avanço de gerações no programa. Foram utilizadas cinco diferentes gerações de cruzamento: híbrido interespecífico, retrocruzamentos RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub> e os parentais, *P. edulis* e *P. setacea*. As plantas foram inoculadas em casa de vegetação e avaliadas quanto à resistência ao CABMV. Foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e estimados os componentes de variância e valores genéticos para as populações em estudo. Observou-se grande variabilidade

genética entre os indivíduos de cada geração quanto à resistência ao CABMV, tendo sido encontradas desde plantas assintomáticas, até plantas expressando os sintomas mais severos da doença. Verificou-se a formação quatro grupos fenotípicos, permitindo uma maior diferenciação entre as gerações e seus parentais. A presença do CABMV foi confirmada em plantas da geração RC<sub>1.1</sub> e de *P. edulis* com sintomas característicos da virose. Nas plantas assintomáticas, 75% dos indivíduos foram consideradas resistentes, por PTA-ELISA e RT-PCR. A geração RC<sub>1.2</sub> teve o maior número de indivíduos selecionados para a resistência ao CABMV que poderão ser agregados ao programa de seleção recorrente.

### 3.2.1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) é a espécie mais conhecida e estudada do gênero *Passiflora*, além de ser a espécie de maior importância econômica (Meletti, 2011). O Brasil é o maior produtor e consumidor desta fruteira, com uma produção em torno de 600 mil toneladas, e uma produtividade de 14.103 t/ha no ano de 2018 (IBGE, 2020). Essa produtividade, mesmo que alta, ainda apresenta potencial de crescimento para a produção de maracujazeiro no país.

Entretanto, um dos principais fatores que impedem o aumento da produtividade do maracujazeiro no Brasil e diminui a longevidade dos pomares no campo, é a incidência de doenças. A virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), um vírus do gênero *Potyvirus*, se destaca como a virose mais importante, se tornando um fator limitante para a cultura (Cerqueira-Silva *et al.*, 2014).

Essa virose acomete a planta inteira, causa sintomas de mosaico, bolhas e deformação nas folhas, diminui o tamanho da planta e, no frutos, causa deformação, com conseqüente redução do número e da qualidade, inviabilizando seu consumo e principalmente sua comercialização. O CABMV é um típico *Potyvirus* transmitido por várias espécies de afídeos durante as picadas de prova, o que caracteriza a relação vírus-vetor como sendo do tipo não-persistente e não

circulativa (Di Piero *et al.*, 2006). Por isso, não pode ser controlada de maneira eficaz pelos métodos tradicionais de controle. Embora estudos apontem para técnicas eficientes de manejo, essas não são capazes de erradicar a doença nos pomares comerciais (Spadotti *et al.*, 2019). Como ainda não há variedades de maracujazeiros resistentes ao CABMV, a obtenção de fontes de resistência genética são objetivos primordiais dos programas de melhoramento do maracujazeiro-azedo no Brasil.

A espécie silvestre *P. setacea* é conhecida por apresentar resistência a esta virose e se tornou uma espécie bastante estudada em programas de melhoramento genético do maracujazeiro, ampliando a base genética do maracujazeiro-azedo quanto à resistência, visto que as espécies comerciais não apresentam variabilidade genética para resistência ao CABMV (Fonseca *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015a; Freitas *et al.*, 2015; Dos Santos *et al.*, 2019; Preisigke *et al.*, 2020).

O grupo de pesquisa de melhoramento genético do maracujazeiro-azedo visando à resistência ao CABMV, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, recorreu à esta espécie silvestre para obter populações segregantes, oriundas do cruzamento interespecífico entre *P. edulis* e *P. setacea*, para dar início ao programa e gerar informações acerca do patossistema, após a observação de níveis de resistência em alguns híbridos interespecíficos (Santos *et al.*, 2015a). Em um estudo sobre a base genética da resistência neste patossistema, Freitas *et al.* (2015) constataram que a herança da resistência é poligênica, aconselhando o uso de grandes populações de estudo para obter ganhos satisfatórios na seleção.

Dando continuidade ao programa, Preisigke *et al.* (2020) avaliaram a população RC<sub>1</sub>, [(*P. edulis* x *P. setacea*) x *P. edulis*], com um grande número de indivíduos, quanto à resistência ao CABMV e selecionaram indivíduos superiores, enquanto, Dos Santos *et al.* (2019), objetivando avaliar a diversidade genética dessa mesma população, acrescidos dos genitores (*P. edulis*, *P. setacea* e híbrido interespecífico), observaram a formação de cinco grupos homogêneos e uma ampla variabilidade entre os genótipos testados, evidenciando alguns genótipos mais promissores para o segundo ciclo de retrocruzamento.

Além da continuidade do programa com o segundo ciclo de retrocruzamento, é interessante incluir métodos de melhoramento mais complexos

para este patossistema, como a seleção recorrente, visto que a herança da resistência é poligênica. Para isso é de grande importância a etapa de caracterização dos indivíduos quanto as reações ao CABMV. A partir dessas informações, se faz necessários estudos que evidenciem como os indivíduos respondem à infecção ao longo do tempo e descrevam a resistência em diferentes gerações de cruzamento.

Portanto, este trabalho objetivou: i) avaliar a resistência em três gerações segregantes de *Passiflora* sp. incluindo os parentais, ii) descrever a evolução da doença e as diferentes respostas dessas gerações e seus parentais em relação a patogênese iii) confirmar a resistência dos indivíduos assintomáticos por testes sorológicos e moleculares e iv) selecionar os indivíduos mais resistentes a fim de agregá-los ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro e assim aumentar a resistência nas populações ao longo dos ciclos de seleção.

### 3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### **Obtenção das populações, germinação e condição de crescimento**

Foram utilizados os parentais *P. edulis* (suscetível), *P. setacea* (resistente), o híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. setacea*) e as gerações de retrocruzamento RC<sub>1.1</sub> (híbrido interespecífico x *P. edulis*) e RC<sub>1.2</sub> (híbrido interespecífico x *P. setacea*) totalizando 505 indivíduos avaliados (Tabela 1).

A população suscetível utilizada foi a cultivar 'UENF Rio Dourado', oriunda do terceiro ciclo de seleção recorrente do programa de melhoramento do maracujazeiro da UENF (Viana *et al.*, 2016). A população resistente utilizada pertence ao BAG da UENF. O híbrido interespecífico e as gerações RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub> foram obtidos através de cruzamentos artificiais. Estes cruzamentos foram realizados conforme metodologia descrita por Santos *et al.* (2015a) e foram realizados respeitando o horário da antese de cada espécie.

Tabela 1: Origem e identificação das populações de estudo, compostas por gerações de retrocruzamento (RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>), híbridos interespecíficos (H<sub>1</sub>) e os genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea* e distribuição dos genótipos na área experimental

Descrição	Cruzamentos	Identificação das gerações por bloco	Total de plantas
Genitor <i>Passiflora edulis</i>	'UENF Rio Dourado'	BI: 206 - 253 BII: 452 - 505	102
Genitor <i>P. setacea</i>	BAG da UENF	BI: 92 - 148 BII: 344 - 394	108
Geração H <sub>1</sub>	Pe x Ps*	BI: 1 - 59 BII: 254 - 306	112
Geração RC <sub>1.1</sub>	H1-15** x <i>P. edulis</i>	BI: 188 - 205 BII: 434 - 451	36
Geração RC <sub>1.1</sub>	H2-10** x <i>P. edulis</i>	BI: 168 - 187 BII: 415 - 433	39
Geração RC <sub>1.1</sub>	H5-14** x <i>P. edulis</i>	BI: 149 - 167 BII: 395 - 414	39
Geração RC <sub>1.2</sub>	H1-15** x <i>P. setacea</i>	BI: 82 - 91 BII: 331 - 343	23
Geração RC <sub>1.2</sub>	H2-10** x <i>P. setacea</i>	BI: 65 - 81 BII: 315 - 330	33
Geração RC <sub>1.2</sub>	H5-14** x <i>P. setacea</i>	BI: 60 - 64 BII: 307 - 314	13
<b>Total</b>			<b>505</b>

\*Pe= *P. edulis*; Ps= *P. setacea*.

\*\*híbridos interespecíficos selecionados por Santos et al. (2015a).

Devido à baixa taxa de germinação, as plantas da espécie *P. setacea* e das gerações híbrido interespecífico e RC<sub>1.2</sub> foram obtidas por cultivo *in vitro* de embrião. Já as plantas da espécie *P. edulis* e a geração RC<sub>1.1</sub> foram obtidas por germinação convencional, em substrato comercial Basaplant®.

Para o cultivo de embrião, as sementes sem tegumento foram desinfestadas em álcool 70%, por 30 segundos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL, durante 15 minutos e enxaguadas por três vezes em água deionizada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, os embriões foram excisados com auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio (Tecnival®), e colocados para germinar em meio de cultivo.

O meio de cultivo utilizado foi o meio MS, com metade da concentração dos sais minerais, modificado por Monteiro (2000), e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos de 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®, pH ajustado para 5,7.

Após a autoclavagem dos frascos contendo o meio, por 20 minutos a 121 °C e 1,0 atm, foram inseridos oito embriões por frasco, e estes foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro, por sete dias. Em seguida eles foram transferidos para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Aos 30 dias de cultivo as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação, em copos plásticos, com capacidade 0,6 L, contendo substrato comercial Basaplant®.

Para a obtenção das plantas das gerações *P. edulis* e RC<sub>1.1</sub>, as sementes foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 15 minutos. Após lavagem em água corrente, as sementes permaneceram imersas em água por 1 hora. A semeadura foi feita em bandejas de isopor de 128 células, contendo substrato comercial Basaplant®, e foram mantidas em casa de nebulização até o estágio de plântula. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas para copos plásticos, idênticos ao utilizado para as outras gerações, contendo substrato comercial Basaplant®.

Após seis meses as plantas foram transplantadas para vasos com capacidade para 7 L, contendo uma mistura de terra preta adubada e substrato comercial Basaplant® (2:1). O substrato comercial foi utilizado nessa mistura para ajudar na aeração do solo. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o experimento. Os tratamentos culturais seguiram as recomendações para cultura (Abreu, 2011).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com duas repetições, desbalanceado para plantas dentro de tratamento (gerações e parentais).

### **Identificação do isolado viral por PTA-ELISA e RT-PCR**

Os dois testes (sorológico por *Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – PTA-ELISA e molecular por *Reverse Transcription* –

*Polymerase Chain Reaction* - RT-PCR) foram realizados no Instituto Biológico no município de São Paulo – SP, de acordo com protocolo utilizado por Santos *et al.* (2015a).

Os testes foram realizados com folhas de 11 indivíduos de *P. edulis* [Pe (206, 211, 212, 219, 220, 231, 238, 461, 473, 482 e 499)] e dois de RC<sub>1.1</sub> (178 e 426) que apresentaram sintomas clássicos de mosaico, bolhas e deformação foliar. O primeiro teste foi o sorológico, por PTA-ELISA, utilizando antissoro policlonal específico para o CABMV (doado pelo Dr. J.A.M Rezende, ESALQ), no intuito de comprovar a identidade do vírus e confirmar a infecção. Como controle negativo foram utilizadas amostras de tecido foliares sadias de *P. edulis* (1 g), e como controle positivo foram utilizadas folhas de *P. edulis* previamente infectadas com CABMV, que apresentavam sintomas de mosaico e deformação foliar.

A absorbância em PTA-ELISA foi lida a 405 nm, utilizando-se o aparelho *Microplate reader 3550-UV* (Bio-Rad), em triplicatas. Os resultados foram analisados pela média da leitura das amostras infectadas sobre as amostras sadias (I/S). As amostras foram consideradas positivas quando a média das leituras de absorbância foi três vezes superior à obtida para o controle negativo.

O segundo teste realizado foi o molecular, por RT-PCR. Para esse teste foi utilizado *primers* desenhados para o anelamento na porção genômica dos *Potyvirus*, correspondente à proteína de inclusão citoplasmática cilíndrica (CI). O RNA total foi extraído a partir de 0,2 g de folha de maracujazeiro infectado, utilizando-se o produto comercial *TRizol® Reagent* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A sequência das moléculas de DNA complementares (cDNA) foi sintetizada com aproximadamente 100 ng de RNA total, utilizando a enzima *M-MLV reverse transcriptase* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando o primer CIRev (5' ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC 3') para anelar a região genômica do CI (Ha *et al.*, 2008).

Para a PCR, foram utilizados 5 µL do cDNA e o par de *primers* (10 pmoles/µL) desenhados para anelar a região genômica do Potivirus CI, CIRev/CIFor (5' GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC 3'), permitindo amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pb. As condições da PCR foram de: 5 min a 92 °C, seguido de 40 ciclos de 50 s a 92 °C, 1 min a 54 °C e 30 s a 72 °C, com uma extensão final de 5 min a 72 °C (Ha *et al.*, 2008). As amostras foram

amplificadas em termociclador PTC100 (MJ Research) e os fragmentos de DNA visualizados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo 0,01%, sob luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Preparação do inóculo do vírus e inoculação**

Utilizou-se um isolado de CABMV obtido de plantas de maracujazeiro-azedo com sintomas típicos da virose, coletadas na área experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes - RJ.

O isolado viral foi identificado por meio de RT-PCR, utilizando os *primers* desenvolvidos por Ha *et al.* (2008) e detectado por PTA-ELISA (Santos *et al.*, 2015a). Para uma constante produção de inóculo, o isolado foi mantido em plantas de maracujazeiro suscetíveis, cultivadas em casa de vegetação.

O inóculo foi preparado em almofariz, por meio de maceração das folhas sintomáticas de maracujazeiro, na proporção de 1 g de tecido foliar para 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, utilizando-se carborundum (600 mesh) como abrasivo. As plantas foram inoculadas mecanicamente, aos 10 meses após o transplântio, ao entardecer (17 às 18 horas), esfregando, com uma compressa de gaze, a suspensão com o vírus na superfície adaxial das primeiras quatro folhas completamente expandidas. Foi realizada a reinoculação das plantas 48 horas após a primeira inoculação, para evitar escapes.

### **Avaliação dos sintomas**

As avaliações dos sintomas da virose nas plantas foram iniciadas sete dias após a segunda inoculação, sendo avaliadas semanalmente, durante sete semanas. As avaliações foram feitas visualmente em folhas jovens: a partir da terceira folha mais jovem nos ramos novos; e na planta inteira: pela distribuição dos sintomas da virose em toda a área ocupada pela planta. A severidade dos sintomas foi quantificada por meio de uma escala de notas com modificações, proposta por Novaes e Rezende (1999), e modificada por Oliveira *et al.* (2013). Essas avaliações foram realizadas nos 505 indivíduos das cinco gerações.

Para folhas jovens, as notas da escala variaram de 1 a 4, onde 1 = Ausência de sintomas; 2 = Mosaico leve sem deformação foliar; 3 = Mosaico severo sem

deformação foliar; e 4 = Mosaico severo com bolhas e deformação foliar. As avaliações da severidade dos sintomas na área total da planta foram realizadas com escala também variando de 1 a 4, onde 1 = Planta sem sintomas; 2 = Poucas folhas com sintomas, mosaico leve ou enrugamento leve nas folhas; 3 = Quantidade moderada de folhas com sintomas, mosaico leve e enrugamento nas folhas; e 4 = Muitas folhas com sintomas, mosaico, enrugamento severo e deformação nas folhas.

Ao final das avaliações, os dados obtidos, por meio da escala de notas, foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para folhas jovens e para a área total da planta (Campbell e Madden, 1990), para cada genótipo avaliado, utilizando a equação:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} (T_{i+1} - T_i)$$

Em que:

$Y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima observação;

$T_i$  = tempo em dias da  $i$ -ésima observação; e

$n$  = número de observações.

Para a análise de deviance, estimação dos componentes de variância (REML) e ranqueamento dos melhores indivíduos (BLUP), foram utilizados somente 295 indivíduos referentes às seguintes gerações: Híbrido interespecífico, RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>. Portanto, os valores obtidos com o cálculo da AACPD e os valores da severidade máxima foram submetidos à análise de deviance e foram estimados os componentes de variâncias, via REML, com base somente na AACPD. As análises foram realizadas utilizando o programa Selegen-Reml/Blup, para famílias de irmãos completos (Resende, 2016), que segue o modelo estatístico:

$$y = Xr + Zg + Wp + e$$

Em que:

$y$  = vetor de observações;

$r$  = vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral;

$g$  = vetor dos efeitos genotípicos individuais (assumidos como aleatórios);

$p$  = vetor dos efeitos de parcelas (aleatórios) e;

$e$  = vetor de erros (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

De acordo com modelo descrito em Viana e Resende (2014), a ANADEV foi obtida da seguinte forma:

$$D = -2\ln(L)$$

$$\ln(L) = -1/2\ln|X'V - 1X| - 1/2\ln|V| - 1/2(y - Xm)'V^{-1}(y - Xm),$$

Onde:

$\ln(L)$  = ponto máximo da função de logaritmo de máxima verossimilhança restrita (REML);

$y$  = vetor da variável analisada;

$m$  = vetor dos efeitos das observações, assumido fixo;

$X$  = matriz de incidência dos efeitos fixos; e

$V$  = matriz de variância-covariância de  $y$ .

O teste estatístico LRT (teste de razão de verossimilhança) foi utilizado para testar o significado dos efeitos, da seguinte forma:

$$LRT: -2\ln(Lse) + 2\ln(Lfm)$$

Onde:

$Lse$  = ponto máximo da função de máxima verossimilhança para o modelo reduzido (sem os efeitos) e;

$Lfm$  = ponto máximo da função de máxima verossimilhança para o modelo completo.

Foram estimados os seguintes componentes de variância:

$\sigma_g^2$ : variância genotípica entre progênies de irmãos completos, equivalendo a  $1/2$  da variância genética aditiva mais  $1/4$  da variância genética de dominância, ignorando-se a epistasia;

$\sigma_f^2$ : variância fenotípica individual;

$h^2_a$ : herdabilidade individual no sentido restrito, obtida ignorando-se a fração,  $\frac{1}{4}$ , da variância genética de dominância;

$h^2_{mp}$ : herdabilidade da média de progênes, assumindo sobrevivência completa; e  $A_{cprog}$ : acurácia da seleção de progênes, assumindo sobrevivência completa.

Os 295 indivíduos das três gerações foram ranqueados com base nos valores genotípicos ( $u+a$ ) estimados pelos BLUP – Melhor Predição Linear não viciada. Em seguida, foram escolhidos os 60 melhores indivíduos (que apresentaram os menores valores) para cada variável, o que representa aproximadamente 20% dos indivíduos avaliados.

As análises foram realizadas utilizando o modelo estatístico 147 do programa Selegen. Este modelo possibilita avaliação de indivíduos em progênes de irmãos completos com várias observações por parcela, sendo a avaliação em um local, em delineamento de blocos ao acaso, com várias plantas por parcela.

Os valores genotípicos ( $u+a$ ) estimados para AACPD e severidade máxima foram utilizados para agrupar os genótipos nos biplots. PC1 ficou situado no eixo horizontal, considerando os valores da AACPD; enquanto PC2 ficou situado no eixo vertical, considerando os valores da severidade máxima. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016) e ggrepel (Slowikowski, 2019), implementados no *software* R (R Core Team, 2018).

### **Confirmação da resistência ao CABMV**

Após a avaliação visual e identificação de genótipos assintomáticos de *Passiflora* spp., realizou-se o PTA-ELISA e RT-PCR, com o objetivo de se confirmar a resistência ao CABMV. Devido ao grande número de plantas assintomáticas, foi realizada uma amostragem dos genótipos sem sintomas, e como controle positivo adicional, foram utilizados 11 genótipos de *P. edulis* e dois do RC<sub>1.1</sub> com sintomas da doença.

Ao total, foram utilizados 125 indivíduos que corresponderam às três gerações e aos dois parentais, sendo 73 indivíduos da espécie *P. setacea*, nove indivíduos da geração H<sub>1</sub>, seis indivíduos da geração RC<sub>1.1</sub> e 24 indivíduos da geração RC<sub>1.2</sub>. O PTA-ELISA foi realizado de acordo com o descrito anteriormente.

### 3.2.3 RESULTADOS

#### Severidade dos sintomas com base na incidência, na AACPD e Smax

Neste trabalho foram analisadas respostas das três gerações oriundas do cruzamento *Passiflora edulis* x *P. setacea* e seus parentais quando submetidas à infecção pelo CABMV. Foram realizadas avaliações fenotípicas e testes sorológicos e moleculares a fim de confirmar a identificação do isolado viral e a resistência ao CABMV em cada uma das populações.

As três gerações avaliadas e os seus parentais - *Passiflora edulis* (Pe), *P. setacea* (Ps), híbrido interespecífico (H<sub>1</sub>) e os retrocruzamentos RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>, apresentaram ampla variação dos sintomas ao longo do período de avaliação. Com isso, a amplitude da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) apresentou valores altos, com exceção para as gerações Ps e RC<sub>1.2</sub> (Figura 1A). Houve variação desde plantas assintomáticas (Ps, H<sub>1</sub> e RC<sub>1.2</sub>), até plantas expressando sintomas severos da virose (Pe e RC<sub>1.1</sub>), como mosaico, bolhas e deformações foliares (Figura 2).

Na primeira avaliação, aos sete dias após a inoculação (DAI), 28,43% das plantas da população Pe, 21,40% das plantas da geração H<sub>1</sub> e 26,31% das plantas da RC<sub>1.1</sub>, já apresentavam sintomas que se caracterizavam por mosaico leve nas folhas novas. O parental Ps e a geração RC<sub>1.2</sub> começaram a expressar os sintomas mais tardiamente, aos 21 e 14 DAI respectivamente, quando aproximadamente 7,5% das plantas de ambas gerações, apresentavam sintomas brandos de mosaico.

As plantas do parental Pe apresentaram quantidade crescente de indivíduos doentes ao longo da avaliação, variando de 28,5% de incidência na primeira avaliação e chegando a 100% de incidência de virose, ao final do experimento. Dessas plantas, aproximadamente 70% apresentavam as notas máximas (S<sub>max</sub>=4), na última avaliação, de acordo com a escala de notas utilizada. Esse valor de severidade não foi o maior apresentado ao longo da avaliação, pois houve uma pequena redução na severidade das plantas nas duas últimas avaliações (Figura 1B). Essa redução pode estar relacionada com a replicação do vírus no interior da planta.

Ao longo do período de avaliação as plantas do parental Ps apresentaram resposta de resistência ao CABMV, o que já era esperado. Houve aparecimento de sintomas, porém, ocorreu em menos de 8% das plantas. Esses sintomas não passaram de mosaico leve nas folhas novas ( $S_{max}=2$ ), chegando a desaparecer até o final das avaliações. Portanto, nenhuma planta dessa população apresentou sintoma da virose em folhas novas na última avaliação (Figura 1C). Nenhuma outra geração apresentou um perfil de resposta similar ao de Ps.

A geração  $H_1$  apresentou uma crescente proporção de plantas com sintomas da virose em folhas novas nas três primeiras avaliações, dobrando o número de plantas doentes na segunda avaliação. Na quinta e sexta avaliações o número de plantas com sintomas voltou a crescer, chegando a aproximadamente 82%. Ao final das avaliações essa geração apresentou 81 plantas com sintomas da virose em folhas novas (Figura 1D). Ao longo das avaliações não foi observado plantas apresentando a nota máxima da escala de notas, ou seja, os sintomas não passaram de mosaico e um início de formação de bolhas nas folhas novas, porém sem deformação foliar ( $S_{max}=3$ ).

Aproximadamente 26% das plantas da geração  $RC_{1.1}$  já apresentavam sintomas na primeira avaliação, e a incidência de plantas doentes seguiu aumentando até a quinta avaliação, chegando a 83,5% de incidência. Após esse período ocorreu uma pequena queda no número de plantas com sintomas, apresentando um perfil similar ao da geração  $H_1$  (Figura 1E). Os sintomas expressos pelas plantas dessa geração foram desde mosaico leve nas folhas novas, até a formação de bolhas e deformações foliares em toda a planta, ou seja, alcançando as notas mais altas da escala de notas ( $S_{max}=4$ ).

As plantas da geração  $RC_{1.2}$  começaram a expressar alguns sintomas leves da virose aos 14 DAI, e a incidência de plantas com sintomas foi crescente até a quarta avaliação, chegando a 17,5% de incidência. Ao final da avaliação apenas oito plantas apresentavam sintomas de mosaico leve nas folhas novas (Figura 1F). Assim como o híbrido interespecífico, não foram observadas plantas apresentando a nota máxima de acordo com a escala de notas. Portanto, além de poucas plantas com sintomas da virose, esses sintomas foram brandos e não chegaram a deformar as folhas, exibindo as características de resistência à virose do *P. setacea* ( $S_{max}=2$ ).

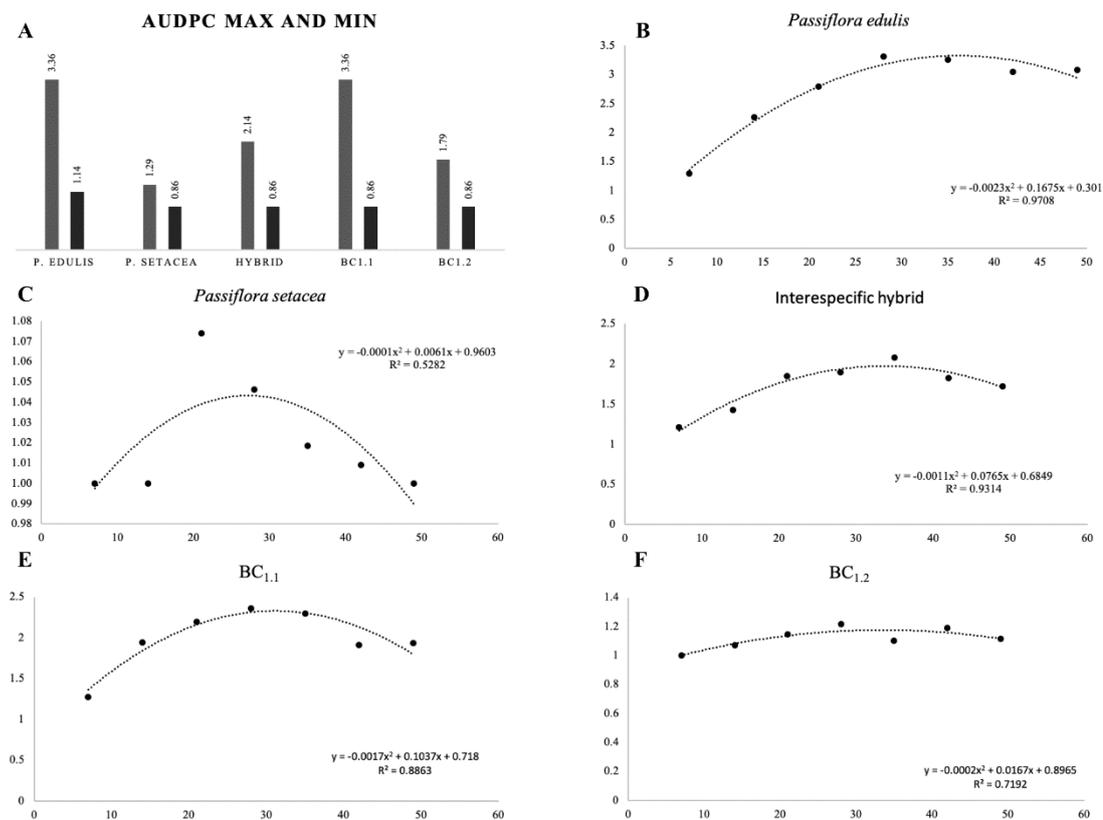


Figura 1. Progresso da doença para as cinco gerações de estudo. A: Valores máximo e mínimo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). B: Regressão da AACPD para a espécie *Passiflora edulis*. C: Regressão para *P. setacea*. D: Híbrido interespecífico. E: Primeira geração de retrocruzamento entre *P. edulis* e o híbrido interespecífico e F: Primeira geração de retrocruzamento entre *P. setacea* e o híbrido interespecífico.

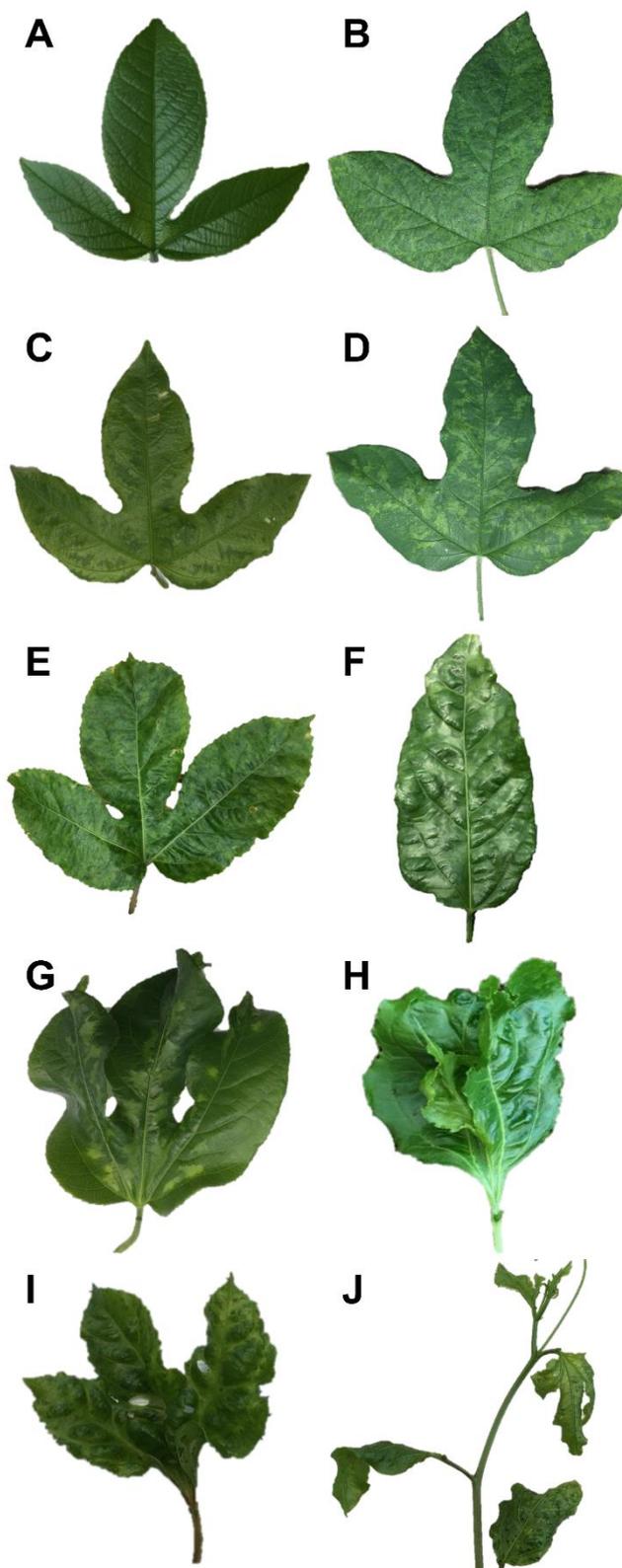


Figura 2. Variação dos sintomas apresentados pelas cinco gerações de estudo. A: *P. setacea* sem sintomas (nota 1). B: RC<sub>1.2</sub> apresentando severidade nota 2. C: H<sub>1</sub> com severidade nota 2. D: RC<sub>1.2</sub> com nota 2. E: RC<sub>1.1</sub> com nota 3. F: *P. edulis* com nota 3. G: RC<sub>1.1</sub> com nota 4. H, I e J: *P. edulis* com nota 4.

O método gráfico de análise, via GGE biplot, foi empregado para investigar a variação da AACPD (PC1) e a severidade máxima (PC2), pois facilita a avaliação visual da interação da AACPD e a severidade máxima. Os resultados indicaram que o PC1 foi responsável por 96,4% e o PC2 por 3,6% do total da variância entre as variáveis para resistência à virose.

Observou-se a formação de quatro diferentes grupos de *Passiflora* sp., com base em sua resistência à virose, no gráfico GGE biplot, indicando que se formou um grupo para cada classe de resistência (3=resistente; 1=moderadamente resistente; 2=moderadamente suscetível; 4=suscetível).

Os grupos 1 e 2 incluem os indivíduos que apresentaram os valores intermediários quanto à resistência. Nestes grupos estão incluídos, em sua maioria, indivíduos que pertencem às gerações: híbrido interespecífico e RC<sub>1.1</sub>, respectivamente. No grupo 3 estão incluídos indivíduos que pertencem à população *P. setacea* e à geração RC<sub>1.2</sub>, sendo o grupo dos indivíduos mais resistentes. O grupo 4 representa o grupo dos indivíduos mais suscetíveis e estão incluídos, em sua maioria, indivíduos da população *P. edulis* (Figura 3).

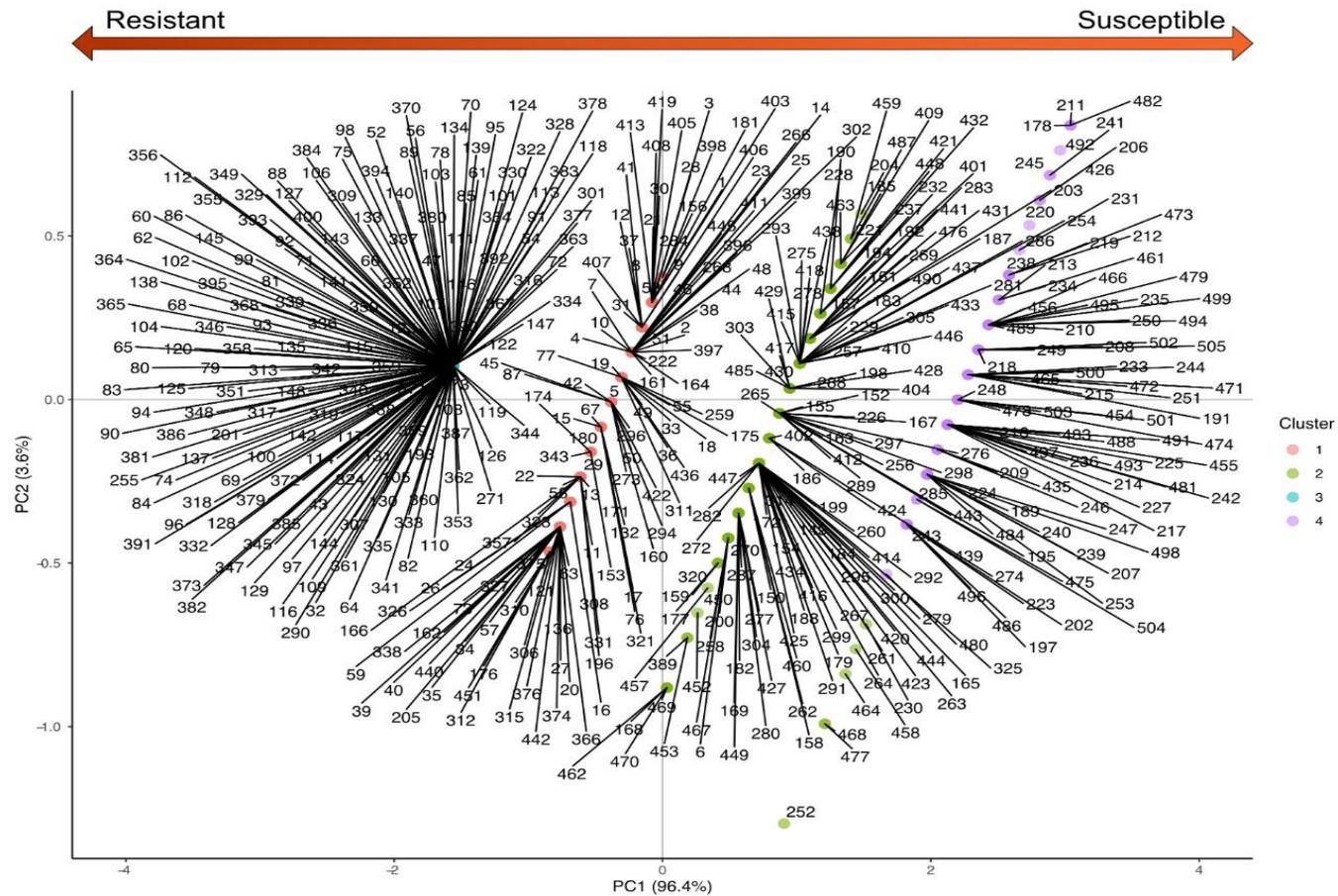


Figura 3. Análise do GGE biplot baseado nos valores de área abaixo da curva de progresso da doença (PC1) e nos valores de severidade máximas (PC2), obtidos a partir de cinco gerações segregantes de *Passiflora* sp. inoculadas com o CABMV. Grupo 1 engloba indivíduos em sua maioria da geração H<sub>1</sub>. Grupo 2, da geração RC<sub>1,1</sub>. Grupo 3, da geração RC<sub>1,2</sub> e do parental *P. setacea*. E o grupo 4, do parental *P. edulis*.

### **Confirmação da identificação do isolado viral e da resistência ao CABMV**

Os testes sorológicos (PTA-ELISA) e moleculares (RT-PCR) foram realizados em 125 amostras. Destas, 11 amostras eram de *P. edulis* e duas do RC<sub>1.1</sub>, e apresentavam sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar, e 112 eram amostras assintomáticas pertencentes ao *P. setacea* e às gerações do híbrido interespecífico RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>,

Todas as 13 amostras sintomáticas reagiram positivamente com o antissoro policlonal contra CABMV (As-CABMV). As amostras positivas apresentaram valores bem elevados, variando de 0,57 a 0,98 nm, em relação às amostras negativas, que variaram de 0,08 a 0,095 nm (Figura 4). Essas mesmas amostras foram submetidas à extração de RNAs totais e RT-PCR, com *primers* universais para espécies do gênero *Potyvirus*, e apresentaram bandas do tamanho esperado, de cerca de 700 pb, de uma porção genômica que inclui a proteína de inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) do CABMV (Figura 4 e 5).

Os testes sorológicos e moleculares confirmaram que os isolados provenientes de Campos dos Goytacazes - RJ, pertencem à espécie *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

Para confirmar a resistência ao CABMV, foi realizado o teste sorológico para avaliar os 112 indivíduos das populações RC<sub>1.1</sub>, RC<sub>1.2</sub>, híbrido interespecífico e *P. setacea*, que ao final das avaliações visuais permaneceram assintomáticos, comparando com *P. edulis*, como controle positivo.

Os controles positivos tiveram valores de absorvância elevados, confirmando que o teste foi realizado corretamente e que o antissoro utilizado reconheceu o isolado viral. Com a realização do teste foi possível confirmar a resistência dos indivíduos analisados de *P. setacea*, da geração RC<sub>1.2</sub> e do híbrido interespecífico, os quais não reagiram positivamente com o antissoro policlonal específico para o CABMV, significando que não foi possível detectar o vírus nestas plantas. Apenas dois indivíduos pertencentes à geração RC<sub>1.1</sub> reagiram positivamente com o antissoro (Figura 4).

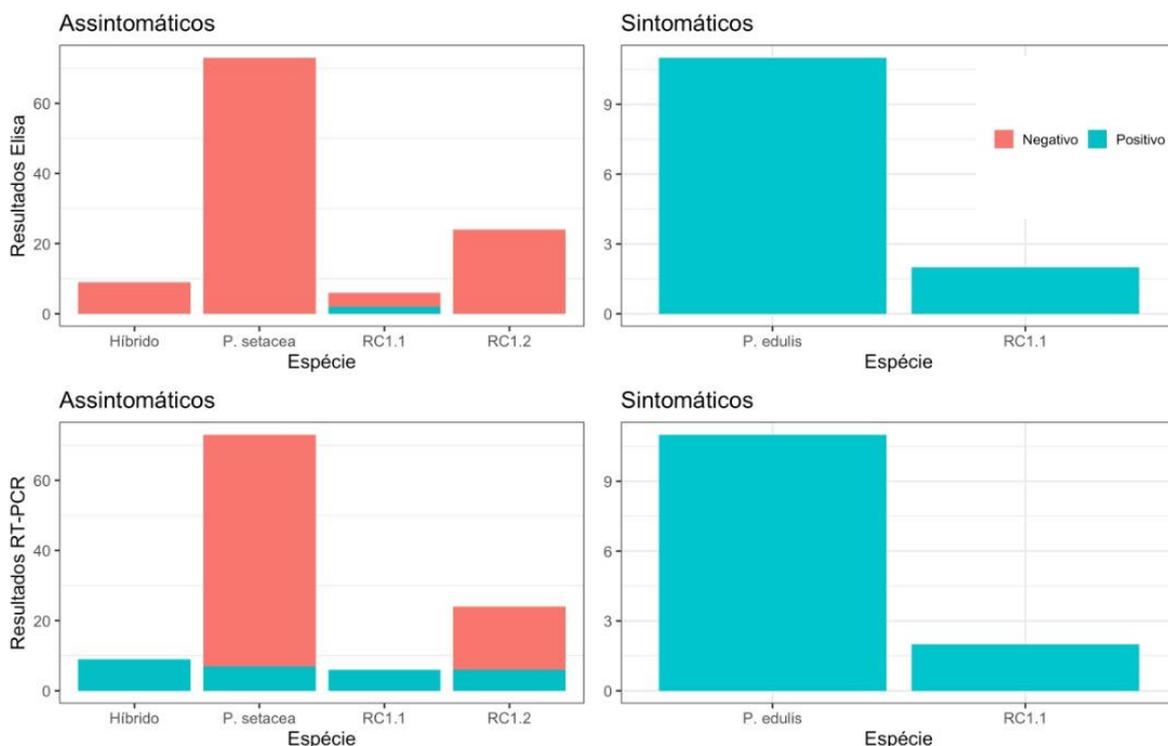


Figura 4. Resultados do teste sorológico (PTA-ELISA) e do teste molecular (RT-PCR) em amostras de folhas assintomáticas e sintomáticas *Passiflora* sp. inoculadas com o CABMV. Barras vermelhas, para o teste sorológico, indicam as amostras que reagiram negativamente com o antissoro policlonal contra CABMV (As-CABMV) e as barras azuis indicam que reagiram positivamente. Para o teste molecular, as barras azuis indicam as amostras que apresentaram bandas do tamanho esperado de uma porção genômica do CABMV, enquanto as barras vermelhas indicam as amostras que não apresentaram bandas específicas do CABMV.

O teste molecular demonstrou um resultado um pouco diferente, mas ainda assim confirmou a resistência da maioria dos indivíduos assintomáticos analisados. Observou-se no teste molecular uma maior quantidade de indivíduos reagindo positivamente à presença do CABMV. Dentre os 73 indivíduos de *P. setacea*, sete apresentaram bandas de cerca de 700 pb, similares às do controle positivo (Figura 5). Dos 24 indivíduos da geração RC<sub>1,2</sub>, seis reagiram positivamente à presença do CABMV. E todas as amostras das gerações H<sub>1</sub> e RC<sub>1,1</sub> analisadas reagiram positivamente à presença do CABMV.

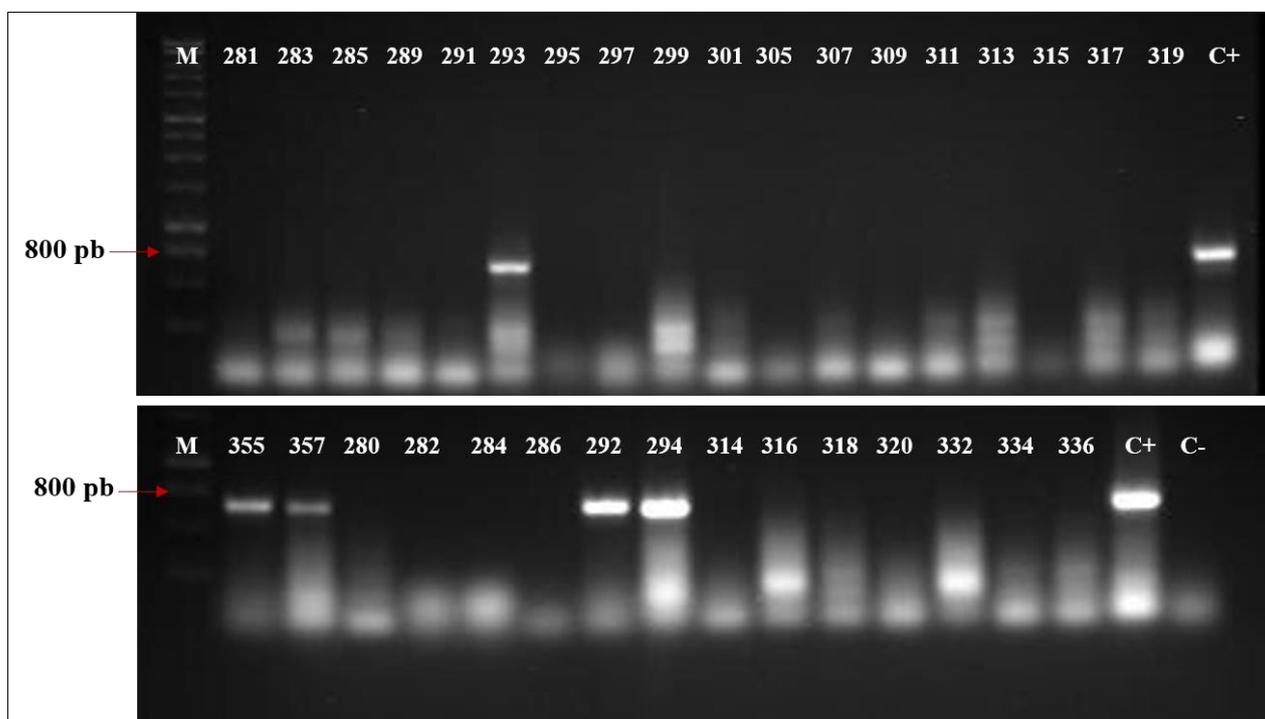


Figura 5. Perfil de 33 amostras obtidas da RT-PCR a partir de RNAs totais extraídos de *Passiflora setacea* inoculados com o CABMV. Amostras de número 293, 355, 357, 292 e 294 consideradas infectadas pelo CABMV, apresentando bandas com tamanho esperado de cerca de 700pb. C+= controle positivo. M= Marcador de tamanho de DNA 1 Kb DNA ladder.

### **Avaliação genética para a resistência ao CABMV**

A significância dos efeitos genotípicos estimados foi avaliada pela análise de deviance, por meio do teste da razão de verossimilhança (LTR), e foi observada significância para o efeito de parcela a 1% de probabilidade para o caráter resistência, com base nos valores da AACPD e da severidade máxima (Tabela 2). Essa significância indica a existência de variabilidade genética entre os indivíduos dentro de cada parcela, o que já era esperado em se tratando de uma avaliação com indivíduos contrastantes em relação à resistência. Porém, não foi observada significância entre as gerações.

Ao estimar os parâmetros genéticos, observou-se que a variância genotípica (0,28 e 0,77) foi a que mais contribuiu para a variância fenotípica (0,29 e 0,85) tanto para AACPD quanto para sevmax, respectivamente (Tabela 2).

Os valores estimados para herdabilidade com base na média de família foram maiores do que os estimados para herdabilidade individual tanto para AACPD (95,37 e 42,96) como para sevmax (92,24 e 40,35) respectivamente, o que era esperado uma vez que os efeitos ambientais são minimizados pelo número de repetições e de plantas por parcela (Tabela 2). Isso indica que a seleção de famílias pode contribuir para reduzir a severidade da doença do endurecimento dos frutos no maracujazeiro.

Foi observado também um alto valor de acurácia seletiva, superior a 97% para a AACPD e 96% para a sevmax. A acurácia é a fidedignidade na estimação dos valores genéticos com base nos valores fenotípicos. Esse valor elevado mostra uma alta precisão em estimar os valores genéticos individuais, ou seja, transmite uma alta confiabilidade dos valores genotípicos preditos em relação ao valor real.

Tabela 2. Análise de deviance e estimativa dos parâmetros genéticos, via procedimento REML, para a característica área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e para a severidade máxima (Sev max), em três gerações segregantes obtidas do cruzamento entre *Passiflora edulis* e *P. setacea*

Efeitos	AACPD		Sev max	
	Deviance	<sup>2</sup> LTR( $\chi^2$ )	Deviance	<sup>2</sup> LTR( $\chi^2$ )
<sup>1</sup> Geração	282,12	3,31	6,79	2,53
<sup>1</sup> Parcela	277,57	7,85**	21,90	17,64**
Modelo completo	285,43		4,26	
Estimativas dos parâmetros				
$\sigma^2$ fenotípica	0,2984		0,8507	
$\sigma^2$ genotípica	0,2836		0,7784	
$h^2a$	42,96		40,35	
$h^2mp$	95,37		92,24	
<i>Acprog</i>	0,9766		0,9604	
Média	1,415		2,103	

<sup>1</sup> Deviance do modelo ajustado sem os efeitos de gerações e parcelas, <sup>2</sup>LTR, teste da razão de verossimilhança de distribuição com 1 grau de liberdade, e \*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste  $\chi^2$ . \*significativo a 5% de probabilidade

### Panorama da seleção para resistência em diferentes populações

Considerando as três gerações oriundas do cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*, foram calculados os valores genéticos, via BLUP, para as variáveis AACPD e severidade máxima, a fim de ranquear os melhores indivíduos quanto à resistência ao CABMV.

Os valores genotípicos ( $u+a$ ) dos indivíduos variaram de 0,49 a 3,74 e de 0,17 a 4,31, para a AACPD e severidade máxima, respectivamente. Os maiores valores correspondem aos indivíduos mais suscetíveis, e os menores valores aos indivíduos mais resistentes, indicando uma grande diferença na resposta à resistência nas três gerações avaliadas.

Embora a maioria dos indivíduos selecionados sejam da geração RC<sub>1,2</sub>, os 10 primeiros ranqueados pertencem às gerações H<sub>1</sub> e RC<sub>1,1</sub>, tanto para a AACPD quanto para a severidade máxima.

Foram ranqueados 60 indivíduos com os menores valores genéticos para cada variável avaliada, AACPD e severidade máxima, correspondendo a aproximadamente 20% da população. Desses 60 indivíduos, 52 foram coincidentes para as duas variáveis, sendo quatro genótipos da geração H<sub>1</sub>, seis da RC<sub>1.1</sub> e 42 da geração RC<sub>1.2</sub> (Tabela anexo).

## Discussão

Para a avaliação da resistência ao CABMV, em nível fenológico, foram utilizadas neste trabalho, a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) e a severidade máxima (S<sub>max</sub>), como as variáveis de estudo nas três gerações de cruzamento e nos seus parentais.

A AACPD é uma variável utilizada para representar o efeito acumulado das doenças ao longo do tempo, caracterizando interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente (Campbell e Madden, 1990). Para o patossistema *Passiflora* sp. e o CABMV, essa variável tem sido utilizada em diversos trabalhos (Santos et al., 2015a; Freitas et al., 2015; Sacoman et al., 2018) e tem se mostrado eficaz em distinguir os genótipos suscetíveis dos resistentes e dos moderadamente resistentes.

Neste presente trabalho, foram observadas plantas apresentando todas as classes fenotípicas em relação à resistência, indo da alta suscetibilidade até a alta resistência, e também as classificações intermediárias - moderadamente resistente e moderadamente suscetível, mostrando que a variável AACPD foi eficiente em distinguir as classes fenotípicas, assim como os resultados obtidos por Santos et al. (2015a).

O fato de, neste trabalho, terem sido avaliadas as diferentes gerações de cruzamento entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea*, juntamente com seus genitores, gerou essa gama de classes fenotípicas. Sacoman et al. (2018), avaliando somente as espécies *P. edulis* e *P. setacea* após inoculação artificial do CABMV, em condições controladas, encontraram somente duas classes fenotípicas, altamente suscetível e altamente resistente, confirmando a suscetibilidade e resistência, respectivamente, das espécies em estudo. Já Santos et al. (2015a), em avaliação quanto à resistência ao CABMV do híbrido interespecífico e seus parentais (*P. edulis* e *P. setacea*) e Freitas et al. (2015), analisando o híbrido interespecífico, a primeira geração de retrocruzamento e os

seus parentais (*P. edulis* e *P. setacea*), encontram uma gama maior de classes fenotípicas. Nos três trabalhos foi utilizado a variável AACPD para representar a epidemia e distinguir os genótipos quanto à resistência ao CABMV.

Embora neste trabalho tenham sido identificadas plantas que não apresentaram nenhum sintoma da virose, também foram observadas plantas da espécie resistente, *P. setacea*, apresentando sintomas, mesmo que leves, de mosaico. Este fato pode estar relacionado com a quantidade de genes envolvidos na resposta à infecção, uma vez que, além de existirem indícios de a doença apresentar herança poligênica, foram detectados sete Locos de Característica Quantitativa (QTL) de menores efeitos para resistência ao vírus em sete dos nove grupos de ligação, em um trabalho de mapeamento genético da resistência de *Passiflora* sp. ao CABMV (Freitas et al., 2015; Santos et al., 2019). Além desses fatores, deve-se também considerar a hipótese de variabilidade genética do vírus.

Por outro lado, nem todas as plantas da espécie suscetível, *P. edulis*, apresentaram os níveis máximos de doença ao final da avaliação, de acordo com a escala de notas utilizada, permanecendo ainda algumas plantas com sintomas leves de mosaico nas folhas novas. Essa variabilidade pode estar associada à heterogeneidade genética do gênero *Passiflora*, visto que são plantas de polinização cruzada (Bruckner et al., 2002). Porém, essa variabilidade, dentro da espécie *P. edulis* para resistência à virose do endurecimento dos frutos, é muito baixa, não sendo constatados níveis de resistência que possam oferecer resultados satisfatórios no controle da virose (Junqueira et al., 2003; Leao et al., 2006; Pinto et al., 2008; Santos et al., 2015a).

Essa gama de classes fenotípicas pôde ser facilmente observada a partir da análise com o método gráfico GGE biplot, em que as gerações avaliadas foram divididas em quatro grupos de resistência ao CABMV. O GGE biplot é uma ferramenta versátil para o melhoramento de plantas e genética quantitativa. Além disso, esse método gráfico ajuda a analisar diferentes tipos de dados bidirecionais, como genótipo por característica, genótipo por marcador ou cruzamento dialélico (Yan e Hunt, 2001). Neste trabalho foi utilizado genótipo pelo caráter resistência à doença.

Recentemente, a metodologia GGE-biplot foi usada para determinar a estabilidade da resistência a doenças, por meio de ensaios em vários locais, para caracterizar e identificar a estabilidade de germoplasma, linhagens e cultivares

resistentes (Akçura e Akan, 2018). Amaral *et al.* (2020) utilizaram desta mesma metodologia para discriminar a reação de híbridos de videira ao fungo *Plasmopara viticola* complex species e verificaram que a AACPD respondeu pela maior parte da variação total (99.2%) quando comparada a sevmax, semelhante ao observado no presente estudo.

Os testes sorológicos e moleculares foram realizados a fim de confirmar a identificação do isolado viral e a resistência ao CABMV nas três gerações oriundas do cruzamento entre *Passiflora edulis* e *P. setacea* e nos seus parentais, avaliados neste trabalho.

Foi confirmado que o isolado viral pertence à espécie *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, assim como nos resultados de Santos *et al.* (2015a), Rodrigues *et al.* (2015) e Nicolini *et al.* (2012), que concluíram que no Brasil esta espécie de vírus está associada ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro.

Entretanto, Vidal *et al.* (2018), avaliando plantas de maracujá-azedo que apresentavam sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar no estado da Bahia, reportaram alta identidade nucleotídica (85 a 98%) das sequências analisadas, com sequências de cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (Gênero *Polemovirus*, Família *Luteoviridae*). Este CABYV foi encontrado em infecções mistas com o CABMV, causando sintomas mais severos em plantas de maracujá-azedo.

A RT-PCR normalmente apresenta sensibilidade maior quando comparada a testes sorológicos, como o PTA-ELISA, e permite a detecção do vírus em baixas concentrações no tecido da hospedeira. Isso ajuda a explicar alguns resultados, os quais, para os testes sorológicos, algumas amostras apresentaram resultado negativo e para a RT-PCR, positivo. Essa diferença observada é normal, principalmente quando o vírus se apresenta em baixas concentrações na planta.

Para a avaliação da resistência ao CABMV, alguns indivíduos que foram considerados resistentes pela avaliação visual, na avaliação em nível molecular, eles foram considerados suscetíveis. Esses indivíduos, possivelmente, necessitariam de um tempo maior para expressar os sintomas. Por um lado, essa situação é favorável, visto que a planta poderia chegar a produzir, sem apresentar os sintomas da virose, por outro lado, é desfavorável, visto que essa planta pode estar servindo de fonte de inóculo para outras plantas no campo.

Com base na avaliação genética para a resistência ao CABMV, foi observado um alto valor de herdabilidade com base na média de famílias. Porém, como neste trabalho foram utilizados cruzamentos oriundos de duas espécies contrastantes quanto à resistência, já era esperado um valor alto, visto que a variação fenotípica observada tem origem, de maior efeito, na diferença genética entre as espécies e as gerações, e somente um pequeno efeito de origem ambiental (Allard, 1971), ou seja, a maior parte da variação fenotípica advém dos efeitos genéticos. Altos valores de herdabilidade também foram encontrados por Freitas *et al.* (2015) e Preisigke *et al.* (2020), que, para esse caráter, encontraram uma herdabilidade de 0,94 e de 0,95, respectivamente.

De acordo com os componentes de variância estimados neste trabalho, as gerações apresentaram alta variabilidade genética na expressão da resistência ao CABMV, como pôde ser observado pelos valores de variância genotípica e fenotípica estimados pelo procedimento REML. A variância genotípica responde quase que pela totalidade da variância fenotípica, ou seja, a variação é praticamente toda oriunda dos efeitos genéticos, e esse fato contribui para o aumento das estimativas da herdabilidade e na acurácia seletiva.

Para os valores de acurácia seletiva, Resende (2007) observou que devem ser buscados valores de acurácia acima de 70%, pois, para essa estimativa, valores altos transmitem uma alta confiabilidade dos valores genotípicos preditos em relação ao valor real, propiciando uma identificação e separação dos genótipos, de acordo com a característica desejada. Preisigke *et al.* (2020), em avaliações de campo de populações oriundas de cruzamento interespecífico entre *P. edulis* e *P. setacea* quanto à resistência ao CABMV, observaram também um alto valor de acurácia seletiva.

Fatores ambientais como temperatura e umidade relativa do ar, o estado nutricional das plantas e a diferença de idade das plantas, não foram considerados como influenciadores da virulência do vírus e, conseqüentemente, na expressão dos sintomas da doença, visto que todas as plantas das diferentes gerações possuíam a mesma idade, e foram submetidas às mesmas condições ambientais e nutricionais.

Para a seleção dos melhores indivíduos quanto à resistência, nas três gerações estudadas, escolheu-se utilizar o procedimento BLUP, pois esse método leva em consideração o desbalanceamento dos dados, o delineamento utilizado e

a estrutura genética da população e, com isso, esse método maximiza a acurácia seletiva (Viana e Resende, 2014). A geração RC<sub>1.2</sub> foi a que obteve os valores mais baixos de AACPD e severidade máxima, porém, no ranqueamento das famílias, ela ficou em terceiro lugar, justamente porque foi a geração que teve um menor número de indivíduos avaliados.

Programas de melhoramento genético têm como base a seleção de indivíduos que apresentam características superiores para serem os genitores das próximas gerações (Cruz et al., 2012). Em se tratando de resistência à doença, os indivíduos com características superiores são os que apresentam os menores valores genéticos. Portanto, foi realizada a seleção dentro dessas três gerações, buscando se ter uma dimensão do ranqueamento e um direcionamento para futuros cruzamentos.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, e em outros trabalhos do grupo de melhoramento genético do maracujazeiro visando resistência ao CABMV da UENF, observou-se que é possível aumentar a gama de opções para se obter um genótipo de maracujazeiro com resistência ao CABMV. Além da continuidade no programa de retrocruzamento, também é possível fazer a recombinação dos melhores indivíduos, a fim de agregar e aumentar a resistência em indivíduos previamente selecionados pelo grupo, ou seja, incluir indivíduos da geração RC<sub>1.2</sub>, que foram resistentes ao CABMV, no programa de Seleção Recorrente.

### 3.2.5 RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foram utilizadas Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) e a severidade máxima (Sevmax) como as variáveis de estudo nas três gerações de cruzamento (H<sub>1</sub>, RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>), e nos seus parentais (*Passiflora edulis* e *P. setacea*), para a resistência à virose do endurecimento dos frutos causada pelo cowpea aphid-borne mosaic vírus (CABMV).

A presença do CABMV foi confirmada em plantas da geração RC<sub>1.1</sub> e de *P. edulis* com sintomas característicos da virose, em Campos dos Goytacazes - RJ. Em plantas assintomáticas, 75% dos indivíduos de *Passiflora* (H<sub>1</sub>, RC<sub>1.1</sub>, RC<sub>1.2</sub> e

Ps), foram consideradas resistentes, pois o vírus não foi detectado por PTA-ELISA e RT-PCR.

Houve variabilidade genética quanto à resistência ao CABMV, nas cinco gerações de estudo. Na geração RC<sub>1.1</sub>, os indivíduos apresentaram os quatro níveis de resistência: resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. Nas gerações H<sub>1</sub> e RC<sub>1.2</sub> e no parental *P. setacea*, foram observados apenas indivíduos resistentes e moderadamente resistentes. Já no parental *P. edulis* e na geração RC<sub>1.1</sub>, foram observados indivíduos suscetíveis e moderadamente suscetíveis.

O método gráfico, GGE biplot, juntamente com as variáveis AACPD e a severidade máxima, foram eficientes na discriminação dos grupos, permitindo um maior conhecimento da resistência entre os indivíduos avaliados.

Com base nos dados apresentados neste trabalho, é possível repensar a escolha dos futuros genitores do programa, a fim de incluir os melhores indivíduos da geração RC<sub>1.2</sub>, uma vez que eles apresentaram bons resultados quanto à resistência.

### 3.2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, S. de P.M. (2011) Cultivo de maracujá-azedo.

Akçura, M., & Akan, K. (2018) Assessment of the reactions of pure lines selected from Turkish bread wheat landraces against bunt disease (*Tilletia foetida*) with the GGE-biplot method. *Plant Genet Resour Characterisation Util* (16): 325–333.

Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blüchner, 381p.

Bruckner, C.H., Meletti, L.M.M., Otoni, W.C., & Junior, F.M. (2002) Maracujazeiro. In: Bruckner, C. (ed) *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa: UFV, p. 373–409.

- Campbell, C., & Madden, L.V. (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: J. Wiley, 113–118p.
- Cerqueira-Silva, C.B., Conceição, L.D.H.C.S., Souza, A.P., & Corrêa, R.X. (2014) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *Eur J Plant Pathol* (139): 261–270.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., & Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 4 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 514p.
- Dos Santos, V.O., Viana, A.P., Preisigke, S. da C., & Santos, E.A. (2019) Backcrosses in a segregating population of *Passiflora* mediated by morphoagronomic and resistance traits. *Bragantia* (78): 542–552.
- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., & Vaz, C. de F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Rev Bras Frutic* (31): 145–153.
- Freitas, J.C.O., Viana, A.P., Santos, E.A., Silva, F.H.L., Paiva, C.L., Rodrigues, R., Souza, M.M., & Eiras, M. (2015) Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). *Trop Plant Pathol* (40): 291–297.
- Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M., & Dale, J.L. (2008) Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Arch Virol* (153): 25–36.
- IBGE. (2020) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In: Produção agrícola Munic. Cult. temporárias e Perm. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Accessed 8 Jan 2020
- Junqueira, N.T.V., Nazareno Dos Anjos, J.R., Silva, A.P.D.O., Chaves, R.D.C., & Gomes, A.C. (2003) Reação a doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. *Pesqui Agropecu Bras* (38): 1005–1010.
- Leao, R.M.K., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., de Oliveira Resende, R., de Abreu Mattos, J.K., de Melo, B., & Article, O. (2006) Reação de progênies de

- maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (cowpea aphid-borne mosaic virus–CABMV), em casa de vegetação. *Biosci J* (22): 87–92.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev Bras Frutic* (33): 83–91.
- Monteiro, A.C.B. de A., Higashi, E.N., Gonçalves, A.N., Rodriguez, A.P.M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). *Vitr Cell Dev Biol* (36): 527–531.
- Murashige, Toshio; Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* (15): 437–497.
- Nicolini, C., Rabelo Filho, F.A.C., Resende, R.O., Andrade, G.P., Kitajima, E.W., Pio-Ribeiro, G., & Nagata, T. (2012) Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. *J Phytopathol* (160): 82–87.
- Novaes, Q.S., & Rezende, J.A. (1999) Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao 'Passionfruit Woodiness Virus.' *Fitopatol Bras* (24): 76–79.
- Oliveira, E.J., Soares, T.L., Barbosa, C.J., Santos-Filho, H.P., & de Jesus, O.N. (2013) Disease severity from passion fruit to identify sources of resistance in field conditions. *Rev Bras Frutic* (35): 485–492.
- Pinto, P.H.D., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T. V., Resende, R.D.O., Mattos, J.K.A., & Melo, B. De. (2008) Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (cowpea aphid-borne mosaic virus – cabmv). *Biosci J* (24): 19–26.
- Preisigke, S.D.C. (2016) Retrocruzamento em maracujazeiro visando à resistência genética ao cowpea aphid-borne mosaic virus assistida por técnicas clássicas e moleculares.
- R Core Team. (2018) R: A language and environment for statistical computing.

- Resende, M.D.V. (2007) *Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no Melhoramento Genético*. Curitiba: Embrapa Florestas: Editora Colombo, 561p.
- Resende, M.D.V. (2016) *Software Selegen-REML / BLUP: a useful tool for plant breeding*. 330–339.
- 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*. *Rev Bras Frutic*. doi: 10.1590/0100-2945201760740
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. 2nd.ed. New York: Cold Spring Harbor Press,
- Santos, E.A., Viana, A.P., de Oliveira Freitas, J.C., de Lima e Silva, F.H., Rodrigues, R., & Eiras, M. (2015) Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *Eur J Plant Pathol* (143): 85–98.
- Slowikowski, K. (2019) ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with “ggplot2.”
- Viana, A.P., Higino, F., Lima, D., Gonçalves, M., Geraldo, M., Silva, D.M., Ferreira, R.T., Nair, T., & Pereira, S. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breed Appl Biotechnol* (16): 250–253.
- Viana, A.P., & Resende, M.D. V. (2014) *Genética quantitativa no melhoramento de fruteiras*. 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 296p.
- Vidal, A.H., Sanches, M.M., Alves-Freitas, D.M.T., Abreu, E.F.M., Lacorte, C., Pinheiro-Lima, B., Rosa, R.C.C., Jesus, O.N., Campos, M.A., Varsani, A., & Ribeiro, S.G. (2018) First World Report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* Infecting Passionfruit. 1–3p.
- Wickham, H. (2016) ggplot2: *Elegant Graphics for Data Analysis*. Second. New York: Springer-Verlag,
- Yan, W., & Hunt, L.A. (2001) Interpretation of genotype environment interaction for winter wheat yield in Ontario. *Crop Sci* (41): 19–25.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliadas diferentes gerações de cruzamento entre *Passiflora edulis* e *P. setacea*, quanto à resistência ao CABMV, causador da virose do endurecimento dos frutos. As plantas foram avaliadas pelo estudo da proteômica do patossistema e por meio da avaliação dos sintomas causados pela inoculação.

A infecção pelo CABMV na espécie *P. edulis* causa inibição da síntese de proteínas, que podem apresentar uma função chave na resposta de defesa da planta. Diferente do que ocorre na espécie *P. setacea* e na geração H<sub>1</sub>, em que não foi observada uma inibição tão evidente da síntese de proteínas.

Sugere-se que a doença se manifesta por uma falha no sistema de sinalização da espécie suscetível, que mesmo ativando algumas rotas de resposta, essas não são eficientes para impedir o aparecimento da doença.

Os primeiros sintomas em *P. edulis*, na geração H<sub>1</sub> e na RC<sub>1.1</sub> ocorreram antes de sete dias após a inoculação (DAI), e essas populações atingiram a severidade máxima em pouco tempo após o aparecimento dos sintomas. Já *P. setacea* e a geração RC<sub>1.2</sub> demoraram o dobro do tempo para expressar os sintomas, confirmando os níveis de suscetibilidade e resistência dessas populações.

Houve variabilidade genética entre os indivíduos de cada geração quanto à resistência ao CABMV.

Indivíduos da geração RC<sub>1,2</sub> podem ser inseridos para compor a lista dos futuros genitores do programa de melhoramento do maracujazeiro visando à resistência ao CABMV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, S. de P.M. (2011) Cultivo de maracujá-azedo.
- Akamine, E., & Girolami, G. (1959) *Pollination and fruit set in the yellow passion fruit*. Honolulu: Hawaii Agricultural Experiment Station: University of Hawaii, 44 pp.
- Akçura, M., & Akan, K. (2018) Assessment of the reactions of pure lines selected from Turkish bread wheat landraces against bunt disease (*Tilletia foetida*) with the GGE-biplot method. *Plant Genet Resour Characterisation Util* (16): 325–333.16
- Alfenas-zerbini, P., Maia, I.G., Fávares, R.D., Cascardo, J.C.M., Brommonschenkel, S.H., & Zerbini, F.M. (2009) Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. *Mol Plant-Microbe Interact* (22): 352–361.22
- Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blüchner, 381p.
- Amaral, B.D., Viana, A.P., Santos, E.A., Ribeiro, R.M., Silva, F.A. da., Ambrósio, M., & Walker, A.M. (2020) Prospecting for resistance of interspecific hybrids of *Vitis* spp. to *Plasmopara viticola*. *Euphytica* (216): 68.216
- Amata, R., Otipa, M., Waiganjo, M., Wasilwa, L., Erbaugh, M., & Miller, S. (2013) Management of dieback disease of passion fruits. *Acta Hort* 363–368.

- Apel, K., & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species : Metabolism , Oxidative Stress , and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* (55): 373–399.55
- Babu, M., Gagarinova, A.G., Brandle, J.E., & Wang, A. (2008) Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *J Gen Virol* (89): 1069–1080.89
- Barros, D.R., Alfenas-Zerbini, P., Beserra, J.E.A., Antunes, T.F.S., & Zerbini, F.M. (2011) Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. *Arch Virol* (156): 1085–1091.156
- Benevides, C.R., Gaglianone, M.C., & Hoffmann, M. (2009) Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na região Norte Fluminense, RJ. *Rev Bras Entomol* (53): 415–421.53
- Bernacci, L.C., Cervi, A.C., Milward-de-Azevedo, M.A., Nunes, T.S., Imig, D.C., & Mezzonato, A.C. (2015) Lista de Espécies da Flora do Brasil. In: Jard. Botânico do Rio Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>. Accessed 1 Feb 2020
- Boro, M.C., Beriam, L.O.S., & Guzzo, S.D. (2011) Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. *Trop Plant Pathol* (36): 74–80.36
- Bruckner, C.H., Casali, V.W.D., Moraes, C.F. de., Regazzi, A.J., & Da Silva, E.A.M. (1995) Self incompatibility in passion fruit.pdf. 370
- Bruckner, C.H., Meletti, L.M.M., Otoni, W.C., & Junior, F.M.. (2002) Maracujazeiro. In: Bruckner, C.. (ed) *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa: UFV, p. 373–409 373–409
- Campbell, C., & Madden, L.V. (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: J. Wiley, 113–118p.
- Carli, M. Di., Villani, M.E., Bianco, L., Lombardi, R., Perrotta, G., Benvenuto, E., & Donini, M. (2010) Proteomic Analysis of the Plant - Virus Interaction in Cucumber Mosaic Virus ( CMV ) Resistant Transgenic Tomato. *J Proteome Res* (9): 5684–5697.9

- Carlini, E.A., Rodrigues, E., Mendes, F.R., Tabach, R., & Gianfratti, B. (2006) Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn* (16): 690–695.16
- Carvalho, B.M., Viana, A.P., Santos, P.H.D., Generoso, A.L., Corrêa, C.C.G., Silveira, V., Eiras, M., & Santos, E.A. (2019) Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with cowpea aphid-borne mosaic virus reveals distinct responses to pathogenesis. *Euphytica* (5): 1–17.5
- Castro, A.P.G. de., Faleiro, F.G., Carvalho, D.D.C., Fonseca, K.G. da., Vilela, M. de F., Junqueira, N.T.V., & Cares, J.E. (2011) Genetic variability of *Passiflora* spp. from commercial fields in the Federal District, Brazil. *Ciência Rural* (41): 996–1002.41
- Catunda, P.H.A., Vieira, H.D., Silva, R.F. da., & Posse, S.C.P. (2003) Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. *Rev Bras Sementes* (25): 65–71.25
- Cavichioli, J.C., Corrêa, L. de S., Narita, N., & Kasai, F.S. (2011) Incidência e Severidade do Vírus do Endurecimento dos Frutos em Maracujazeiros Enxertados em Pé-Franco. *Rev Bras Frutic* (33): 411–414.33
- Cerqueira-Silva, C.B., Conceição, L.D.H.C.S., Souza, A.P., & Corrêa, R.X. (2014) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *Eur J Plant Pathol* (139): 261–270.139
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Moreira, C.N., Figueira, A.R., Corrêa, R.X., & Oliveira, A.C. (2008) Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of “yellow” passion fruit plants under field conditions. *Genet Mol Res* (7): 1209–1216.7
- Chagas, C.M., Kitajima, E.W., & Lin, M.T. (1981) Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia, causado por um isolado do vírus do “woodiness” do maracujá. *Fitopatol Bras* (2): 259–268.2
- Chaves, R. da C., Junqueira, N.T.V., Manica, I., Peixoto, J.R., Pereira, A.V., & Fialho, J. de F. (2004) Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. *Rev Bras Frutic* (26): 120–

123.26

- Chen, H., & Boutros, P.C. (2011) VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/1471-2105-12-3512
- Citovsky, V., Zaltsman, A., Kozlovsky, S. V., Gafni, Y., & Krichevsky, A. (2009) Proteasomal degradation in plant – pathogen interactions. *Semin Cell Dev Biol* (20): 1048–1054.20
- Conesa, A., Götz, S., García-gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Genómica, D., Valenciano, I., Agrarias, D.I., & Valencia, U.P. De. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* (21): 3674–3676.21
- Correa, M.F., Pinto, A.P.C., Rezende, J.A.M., Harakava, R., & Mendes, B.M.J. (2015) Genetic transformation of sweet passion fruit (*Passiflora alata*) and reactions of the transgenic plants to Cowpea aphid borne mosaic virus. *Eur J Plant Pathol* (143): 813–821.143
- Costa, A.M., Lima, H.C., Cardoso, E.R., Silva, J.R., Padua, J.G., Faleiro, F.G., Pereira, R.C.A., & Campos, G.A. (2015) Produção de Mudanças de Maracujazeiro Silvestre (*Passiflora setacea*).
- Cotter, T.G. (2011) Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* (2): 1–8.2
- Cruz, C.D., & Carneiro, P.C.S. (2006) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2.ed. Viçosa 585p.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., & Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 4 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 514p.
- Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M., & Thiellemen, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electro-phoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 52–54.
- de Queiroz, M. do S.R., Janebro, D.I., da Cunha, M.A.L., Medeiros, J. dos S., Sabaa-Srur, A.U.O., Diniz, M. de F.F.M., & Dos Santos, S.C. (2012) Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin

- sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr J* (11): 1–7.11
- 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. *Neotrop Entomol* (35): 139–140.35
- Dias, L.L.C., Balbuena, T.S., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Schevchenko, A., & Floh, E.I.S. (2010) Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: A recalcitrant seed species. *Brazilian J Plant Physiol* (22): 23–33.22
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., & Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable independent acquisition proteomics. *Nat Methods* (11): 167–170.11
- Dolja, V. V., McBride, H.J., & Carrington, J.C. (1992) Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* (89): 10208–10212.89
- Dos Santos, V.O., Viana, A.P., Preisigke, S. da C., & Santos, E.A. (2019) Backcrosses in a segregating population of *Passiflora* mediated by morphoagronomic and resistance traits. *Bragantia* (78): 542–552.78
- Duvick, D.. (1967) Influence of morphology and sterility on breeding methodology. *In: Frey, K.J. (ed) Plant breeding*. Iowa: Iowa States University Press, p. 85–138 85–138
- Eldakak, M., Milad, S.I.M., Nawar, A.I., & Rohila, J.S. (2013) Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. *Front Plant Sci* (4): 1–12.4
- EMBRAPA. (2015) Lançamento da cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado. In: Embrapa Cerrados. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1492806/embrapa-lanca-cultivar-de-maracuja-silvestre-brs-perola-do-cerrado>. Accessed 10 Mar 2020
- Espírito-Santo, A.P., Lagazzo, A., Sousa, A.L.O.P., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M.N. (2013) Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Res Int* (50): 224–231.50

- Fang, X., Chen, W., Xin, Y., Zhang, H., Yan, C., Yu, H., Liu, H., Xiao, W., Wang, S., Zheng, G., Liu, H., Jin, L., Ma, H., & Ruan, S. (2012) Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. *J Proteomics* (75): 4074–4090.75
- Ferreira, J.B., Libano, A.M., & Alves, R.U. (2016) Determinação do polinizador efetivo de *Passiflora setacea* DC. (Passifloraceae).
- Fischer, I., & Rezende, J. (2008) Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technol* (2): 1–19.2
- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., & Vaz, C. de F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Rev Bras Frutic* (31): 145–153.31
- Freitas, J.C.O., Viana, A.P., Santos, E.A., Silva, F.H.L., Paiva, C.L., Rodrigues, R., Souza, M.M., & Eiras, M. (2015) Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Trop Plant Pathol* (40): 291–297.40
- Garcêz, R.M., Chaves, A.L.R., Eiras, M., Meletti, L.M.M., de Azevedo Filho, J.A., da Silva, L.A., & Colariccio, A. (2015) Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread Cowpea aphid-borne mosaic virus in a subtropical region of Brazil. Springerplus. doi: 10.1186/s40064-015-1263-54
- Gibbs, A., & Ohshima, K. (2010) Potyviruses and the Digital Revolution. *Annu Rev Phytopathol* (48): 205–223.48
- Gonçalves, Zanon Santana; Jesus, Onildo Nunes De; Cerqueira-silva, Carlos Bernard; Diniz, Rafael Parreira; Soares, Taliane Leila; Oliveira, E.J. de; (2017) Methodological approaches to assess passion fruit resistance (*Passiflora* spp.) to passionfruit woodiness disease. *Biosci J* (33): 1441–1451.33
- Gonçalves Júnior, D.H. (2019) Prospecção dentro de famílias de retrocruzamento em *Passiflora*: Implicações para o melhoramento visando resistência ao CABMV. 79p.
- Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M., & Dale, J.L. (2008) Design

- and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Arch Virol* (153): 25–36.153
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., & Robertson, D. (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol* (5): 149–156.5
- Hernandez-Valladares, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., & Bruserud, Ø. (2016) Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biol Proced Online* (18): 1–10.18
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., & Yang, S. (2014) Growth – Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant* (7): 1267–1287.7
- Hurkman, W.J., & Tanaka, C.K. (2007) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *J Chromatogr B* (849): 344–350.849
- IBGE. (2020) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In: Produção agrícola Munic. Cult. temporárias e Perm. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Accessed 8 Jan 2020
- Jockusch, H., Wiegand, C., Mersch, B., & Rajes, D. (2001) Mutants of Tobacco mosaic virus with Temperature-Sensitive Coat Proteins Induce Heat Shock Response in Tobacco Leaves. *Mol Plant-Microbe Interact* (14): 914–917.14
- Jones, J.D.G., & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nat Publ Gr* (444): 323–329.444
- Jorrín-Novo, J. V., Pascual, J., Sánchez-Lucas, R., Romero-Rodríguez, M.C., Rodríguez-Ortega, M.J., Lenz, C., & Valledor, L. (2015) Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics* (15): 1089–1112.15
- Jorrín, J. V., Maldonado, A.M., & Castillejo, M.A. (2007) Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics* (7): 2947–2962.7
- Junqueira, N.T.V., Nazareno Dos Anjos, J.R., Silva, A.P.D.O., Chaves, R.D.C., & Gomes, A.C. (2003) Reação à doenças e produtividade de onze cultivares de

- maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. *Pesqui Agropecu Bras* (38): 1005–1010.38
- Junqueira, N.T. V., Braga, M.F., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., & Bernacci, L.C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *In: Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. p. 81–108 81–108
- Kawano, Y., Kaneko-kawano, T., & Shimamoto, K. (2014) Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals. *Front Plant Sci* (5): 1–12.5
- Kitajima, E.W., Chagas, C.W., & Crestani, O.A. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. *Fitopatol Bras* (5): 409–432.5
- Koga, H., Dohi, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Takahara, H., Mori, M., & Komatsu, S. (2012) Proteomic analysis of susceptible rice plants expressing the whole plant-specific resistance against *Magnaporthe oryzae*: Involvement of a thaumatin-like protein. *Physiol Mol Plant Pathol* (77): 60–66.77
- Kuč, J., & Preisig, C. (1984) Fungal Regulation of Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Mycol Soc Am* (76): 767–784.76
- Leao, R.M.K., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., de Oliveira Resende, R., de Abreu Mattos, J.K., de Melo, B., & Article, O. (2006) Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic virus–CABMV), em casa de vegetacao. *Biosci J* (22): 87–92.22
- Liao, M., Li, Y., & Wang, Z. (2009) Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. *Proteomics* (9): 2809–2819.9
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.-A., Endert, P. van., Edelman, A., & Guerrero, I.C. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 1–13.
- Livneh, I., Cohen-kaplan, V., Cohen-rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome : from birth , through regulation and function , and onto its death. *Nat Publ Gr* (26): 869–885.26

- Mcgregor, C.E., Miano, D.W., Labonte, D.R., Hoy, M., & Clark, C.A. (2009) Differential Gene Expression of Resistant and Susceptible Sweetpotato Plants after Infection with the Causal Agents of Sweet Potato Virus Disease. *J AMERSOCHORTSCI* (134): 658–666.134
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev Bras Frutic* (33): 83–91.33
- Meletti, L.M.M., Bernacci, L.C., Soares-Scott, M.D., Azevedo Filho, J.A. de., & Martins, A.L.M. (2003) Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce(*Passiflora alata* Curtis). *Rev Bras Frutic* (25): 275–278.25
- Meletti, L.M.M., & Bruckner, C.H. (2001) Maracujá tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. *In*: Bruckner, C., Picanço, M. (ed) *Melhoramento genético*. Porto Alegre. RS: Cinco Continentes, p. 345–385 345–385
- Melo, C.A.F. de., Souza, M.M., Viana, A.P., Santos, E.A., de Oliveira Souza, V., & Corrêa, R.X. (2016) Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. *Sci Hortic (Amsterdam)* (212): 91–103.212
- Monteiro-hara, A.C.B.A., Jidão, A.S., Mendes, B.M.J., Rezende, J.A.M., Trevisan, F., Mello, A.P.O.A., Vieira, M.L.C., Meletti, L.M.M., & Piedade, S.M.D.S. (2011) Genetic Transformation of Passionflower and Evaluation of R1 and R2 Generations for Resistance to Cowpea aphid borne mosaic virus. *Plant Dis* 1021–1025.
- Monteiro, A.C.B. de A., Higashi, E.N., Gonçalves, A.N., Rodriguez, A.P.M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). *Vitr Cell Dev Biol* (36): 527–531.36
- Moshe, A.D.I., Gorovits, R., Liu, Y., & Czosnek, H. (2016) Tomato plant cell death induced by inhibition of HSP90 is alleviated by Tomato yellow leaf curl virus infection. *Mol Plant Pathol* (17): 247–260.17
- Munhoz, C.F., Santos, A.A., Arenhart, R.A., Santini, L., Monteiro-Vitorello, C.B., &

- Vieira, M.L.C. (2015) Analysis of plant gene expression during passion fruit-Xanthomonas axonopodis interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. *Ann Appl Biol* (167): 135–155.167
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* (15): 437–497.15
- Nagaraj, S., Senthil-kumar, M., Ramu, V.S., & Wang, K. (2016) Plant Ribosomal Proteins, RPL12 and RPL19, Play a Role in Nonhost Disease Resistance against Bacterial Pathogens. *Front Plant Sci* (6): 1–10.6
- Nanjo, Y., Skultety, L., Hajduch, M., & Komatsu, S. (2012) Mass Spectrometry-Based Analysis of Proteomic Changes in the Root Tips of Flooded Soybean Seedlings. *J Proteome Res* (11): 372–385.11
- Nascimento, A.V.S., Santana, E.N., Braz, A.S.K., Alfenas, P.F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G.P., De Carvalho, M.G., & Murilo Zerbini, F. (2006) Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch Virol* (151): 1797–1809.151
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J., & Rouhier, N. (2006) Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and and Abiotic Stresses. *Plant Physiol* (142): 1364–1379.142
- Neilson, K.A., Gammulla, C.G., Mirzaei, M., Imin, N., & Haynes, P.A. (2010) Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics* (10): 828–845.10
- Nicaise, V. (2017) Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr Opin Virol* (26): 112–119.26
- Nicolini, C., Rabelo Filho, F.A.C., Resende, R.O., Andrade, G.P., Kitajima, E.W., Pio-Ribeiro, G., & Nagata, T. (2012) Possible host adaptation as an evolution factor of cowpea aphid-borne mosaic virus deduced by coat protein gene analysis. *J Phytopathol* (160): 82–87.160
- Nojoumi, M., Ghaeli, P., Salimi, S., Sharifi, A., & Raisi, F. (2016) Effects of passion flower extract, as an add-on treatment to sertraline, on reaction time in patients

- with generalized anxiety disorder: A double-blind Placebo-controlled study. *Iran J Psychiatry* (11): 191–197.11
- Novaes, Q.S., & Rezende, J.A.. (1999) Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao 'Passionfruit Woodiness Virus.' *Fitopatol Bras* (24): 76–79.24
- Oliveira, J.P.B. de., Alexandre, R.S., Negreiros, J.R. da S., Lopes, J.C., & Bruckner, C.H. (2012) Lipid peroxidation and seed emergency in progenies of the yellow passion fruit plant. *Rev Bras Frutic* (34): 711–718.34
- Oliveira, E.J., Soares, T.L., Barbosa, C.J., Santos-Filho, H.P., & de Jesus, O.N. (2013) Disease severity from passion fruit to identify sources of resistance in field conditions. *Rev Bras Frutic* (35): 485–492.35
- Paiva, A.L.S., Oliveira, J.T.A., Souza, G.A. De., & Vasconcelos, I.M. (2016) Label-free Proteomics Reveals that Cowpea Severe Mosaic Virus Transiently Suppresses the Host Leaf Protein Accumulation During the Compatible Interaction with Cowpea ( *Vigna unguiculata* [ L. ] Walp .). *J Proteome Res.* doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00211
- Park, C., Seo, Y., & Park, C. (2015) Heat Shock Proteins : A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol J* (31): 323–333.31
- Passaia, G., & Margis-Pinheiro, M. (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Sci* (234): 22–26.234
- Perdizio, V.A. (2016) Abordagem proteômica na investigação dos mecanismos de defesa em maracujá. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro 1–70p.
- Picard, D. (2002) Heat-shock protein 90 , a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* (59): 1640–1648.59
- Pieterse, M.J., Does, D. Van Der., Zamioudis, C., Leon-reyes, A., & Wees, S.C.M. Van. (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* (28): 16–45.28
- Pineda, M., Sajani, C., & Baro, M. (2010) Changes induced by the Pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*.

*Photosynth Res* (103): 31–45.103

- Pinto, P.H.D., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T. V., Resende, R.D.O., Mattos, J.K.A., & Melo, B. De. (2008) Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (cowpea aphid-borne mosaic virus – cabmv). *Biosci J* (24): 19–26.24
- Preisigke, S. da C., Martini, F.V., Rossi, A.A.B., Serafim, M.E., Barelli, M.A.A., da Luz, P.B., Araújo, K.L., & Neves, L.G. (2015) Genetic variability of *Passiflora* spp. against collar rot disease. *Aust J Crop Sci* (9): 69–74.9
- Preisigke, S. da C., Viana, A.P., Santos, E.A., Dos Santos, P.R., Dos Santos, V.O., Ambrósio, M., da Silva, F.A., & Walter, F.H. de B. (2020) Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. *Bragantia* (79): 47–61.79
- Quirino, B.F., Candido, E.S., Campos, P.F., Franco, O.L., & Krüger, R.H. (2010) Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry* (71): 351–362.71
- R Core Team. (2018) R: A language and environment for statistical computing.
- Rampitsch, C., & Srinivasan, M. (2006) The application of proteomics to plant biology: A review. *Can J Bot* (84): 883–892.84
- Resende, M.D.. (2007) *Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no Melhoramento Genético*. Curitiba: Embrapa Florestas: Editora Colombo, 561p.
- Resende, M.D. V. (2016) Software Selegen-REML / BLUP : a useful tool for plant breeding. 330–339.
- Rezende, J.A.M. (2006) Práticas culturais para prevenção e convivência com as viroses do maracujazeiro. In: Sampaio, A.C., Fumis, T.F., Rossi, A.G., et al. (ed) *Manejo no controle do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) do Maracujazeiro*. Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 76 76
- Ribeiro, P.D., José, A.R.S., Bomfim, P.M., Jesus, J.S. De., & Jesus, J.S. De. (2014) Teor de carotenoides e características pós-colheita de frutos de *Passiflora setacea* D. C. *Rev Iberoam Tecnol Postcosecha* (15): 145–152.15
- Roberts, G.C., & Smith, C.W.J. (2002) Alternative splicing: Combinatorial output

- from the genome. *Curr Opin Chem Biol* (6): 375–383.6
- Rodrigues, L.K., Chaves, A.L.R., Junior, E.R.D., & Eiras, M. (2016) Epidemiological aspects of the transmission and management of cowpea aphid-borne mosaic virus in a passion fruit orchard. *J Plant Pathol*. doi: 10.4454/JPP.V98I3.03798
- Rodrigues, L.K., Silva, L.A., Garcêz, R.M., Chaves, A.L.R., Duarte, L.M.L., Giampani, J.S., Colariccio, A., Harakava, R., & Eiras, M. (2015) Phylogeny and recombination analysis of Brazilian yellow passion fruit isolates of Cowpea aphid-borne mosaic virus: origin and relationship with hosts. *Australas Plant Pathol* (44): 31–41.44
- Romeiro, R. (2008) Indução de resistência em plantas a patógenos. *In: Pascholati, S.F., Leite, B., Stangarlin, J.R., Cia, P. (ed) Interações planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: Fealq, p. 411–431 411–431
- 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*. *Rev Bras Frutic*. doi: 10.1590/0100-2945201760740
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. 2nd.ed. New York: Cold Spring Harbor Press,
- Santos, C.H.B., Da Cruz Neto, A.J., Junghans, T.G., De Jesus, O.N., & Girardi, E.A. (2016) Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora* spp. *Rev Cienc Agron* (47): 481–490.47
- Santos, E.A., Viana, A.P., de Barros Walter, F.H., de Oliveira Freitas, J.C., Ramos, H.C.C., & Boechat, M.S.B. (2019) First report of a genetic map and evidence of QTL for resistance to CABMV in a segregating population of *Passiflora*. *Eur J Plant Pathol* (155): 903–915.155
- Santos, E.A., Viana, A.P., de Oliveira Freitas, J.C., de Lima e Silva, F.H., Rodrigues, R., & Eiras, M. (2015a) Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *Eur J Plant Pathol* (143): 85–98.143

- Santos, E.A., Viana, A.P., de Oliveira Freitas, J.C., Rodrigues, D.L., Tavares, R.F., Paiva, C.L., & Souza, M.M. (2015b) Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp. crossing. *Euphytica* (204): 1–11.204
- Scheler, C., Durner, J., & Astier, J. (2013) Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr Opin Plant Biol* (16): 534–539.16
- Serra-soriano, M., Navarro, J.A., Genoves, A., & Pallás, V. (2015) Comparative proteomic analysis of melon phloem exudates in response to viral infection. *J Proteomics* (124): 11–24.124
- Shirsekar, G., Dai, L., Hu, Y., Wang, X., Zeng, L., & Wang, G. (2010) Role of Ubiquitination in Plant Innate Immunity and Pathogen Virulence. *J Plant Biol* (53): 10–18.53
- Slowikowski, K. (2019) ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with “ggplot2.”
- Spadotti, D.M.A., Favara, G.M., Novaes, Q.S., Mello, A.P.O.A., Freitas, D.M.S., Edwards Molina, J.P., & Rezende, J.A.M. (2019) Long-lasting systematic roguing for effective management of CABMV in passion flower orchards through maintenance of separated plants. *Plant Pathol* (68): 1259–1267.68
- Taylor, R.H., & Greber, R.S. (1973) Passion fruit woodiness virus. Description of plantvirus no.122. *In: Descriptions of plant viruses*. England: Mycol. Inst./Assoc.Appl. Biol.,
- Vadivel, A.K.A. (2015) Gel-based proteomics in plants: Time to move on from the tradition. *Front Plant Sci* (6): 1–4.6
- Vanderplank, J. (2000) *Passion Flowers*. Third Edit. Cambridge: The MIT Press, 224p.
- Veal, E., & Day, A. (2011) Hydrogen Peroxide as a Signaling Molecule. *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2011.396815
- Veal, E.A., Day, A.M., & Morgan, B.A. (2007) Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol Cell* 1–14.
- Ventelon-Debout, M., Delalande, F., Brizard, J.P., Diemer, H., Van Dorsselaer, A.,

- & Brugidou, C. (2004) Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing Rice yellow mottle virus infection. *Proteomics* (4): 216–225.4
- Viana, A.P., Higino, F., Lima, D., Gonçalves, M., Geraldo, M., Silva, D.M., Ferreira, R.T., Nair, T., & Pereira, S. (2016) UENF Rio Dourado : a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breed Appl Biotechnol* (16): 250–253.16
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T., Souza, M.M., & Maldonado, J.F.M. (2004) Parâmetros genéticos em populações de Maracujazeiro-amarelo. 51
- Viana, A.P., & Resende, M.D. V. (2014) *Genética quantitativa no melhoramento de fruteiras*. 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 296p.
- Vidal, A.H., Sanches, M.M., Alves-Freitas, D.M.T., Abreu, E.F.M., Lacorte, C., Pinheiro-Lima, B., Rosa, R.C.C., Jesus, O.N., Campos, M.A., Varsani, A., & Ribeiro, S.G. (2018) First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus Infecting Passionfruit. 1–3p.
- Vieira, L.M., Pereira, W.V.S., Oliveira, T.G.S., Aquino, F.F., Ribeiro, L.M., & Mercadante-Simões, M.O. (2008) Análise Biométrica de Frutos e Sementes de *Passiflora setacea*.
- Warner, J.R., & Mcintosh, K.B. (2009) How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins?. *Mol Cell* (34): 3–11.34
- Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Second. New York: Springer-Verlag,
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* (6): 3–7.6
- Wu, L., Han, Z., Wang, S., Wang, X., Sun, A., Zu, X., & Chen, Y. (2013) Comparative proteomic analysis of the plant – virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *J Proteomics* (89): 124–140.89
- Xu, Z., Li, Z., Chen, Y., Chen, M., Li, L., & Ma, Y. (2012) Heat Shock Protein 90 in Plants : Molecular Mechanisms and Roles in Stress Responses. *Int J Mol Sci*

(13): 15706–15723.13

Yaeno, T., & Iba, K. (2008) BAH1 / NLA , a RING-Type Ubiquitin E3 Ligase , Regulates the Accumulation of Salicylic Acid and Immune Responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol* (148): 1032–1041.148

Yan, W., & Hunt, L.A. (2001) Interpretation of genotype environment interaction for winter wheat yield in Ontario. *Crop Sci* (41): 19–25.41

Zeraik, M.L., Pereira, C.A.M., Zuin, V.G., & Yariwake, J.H. (2010) Maracujá: Um alimento funcional?. *Brazilian J Pharmacogn* (20): 459–471.20

Zubarev, R.A. (2013) The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics* (13): 723–726.13

**ANEXO**

Tabela anexo. Ranqueamento dos 60 indivíduos com as menores estimativas para valor genético aditivo, estimados via REML/BLUP, em três diferentes gerações de maracujazeiro (híbrido interespecífico, retrocruzamento<sub>1,1</sub> retrocruzamento<sub>1,2</sub>), para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e severidade máxima (Sevmax)

Ordenamento	Família	Ind.	AACPD	Ordenamento	Família	Ind.	Sevmax
			u+a				u+a
1	1	301	0.4901	1	1	301	0.1755
2	1	290	0.4901	2	1	290	0.1755
3	1	271	0.4901	3	1	271	0.1755
4	1	255	0.4901	4	1	255	0.1755
5	1	306	0.575	5	2	400	0.5026
6	2	400	0.5941	6	2	395	0.5026
7	2	395	0.5941	7	2	201	0.516
8	2	451	0.6789	8	2	193	0.516
9	2	201	0.7146	9	2	173	0.516
10	2	193	0.7146	10	2	170	0.516
11	2	173	0.7146	11	3	342	0.7735
12	2	170	0.7146	12	3	341	0.7735
13	2	442	0.7638	13	3	340	0.7735
14	2	440	0.7638	14	3	339	0.7735
15	3	342	0.7953	15	3	337	0.7735
16	3	341	0.7953	16	3	336	0.7735
17	3	340	0.7953	17	3	335	0.7735
18	3	339	0.7953	18	3	334	0.7735
19	3	337	0.7953	19	3	333	0.7735
20	3	336	0.7953	20	3	332	0.7735
21	3	335	0.7953	21	3	330	0.7735
22	3	334	0.7953	22	3	329	0.7735
23	3	333	0.7953	23	3	328	0.7735

---

24	3	332	0.7953	24	3	324	0.7735
25	3	330	0.7953	25	3	322	0.7735
26	3	329	0.7953	26	3	319	0.7735
27	3	328	0.7953	27	3	318	0.7735
28	3	324	0.7953	28	3	317	0.7735
29	3	322	0.7953	29	3	316	0.7735
30	3	319	0.7953	30	3	313	0.7735
31	3	318	0.7953	31	3	309	0.7735
32	3	317	0.7953	32	3	307	0.7735
33	3	316	0.7953	33	1	56	1.1024
34	3	313	0.7953	34	1	54	1.1024
35	3	309	0.7953	35	1	52	1.1024
36	3	307	0.7953	36	1	47	1.1024
37	2	176	0.7994	37	1	43	1.1024
38	3	312	0.8801	38	1	32	1.1024
39	3	310	0.8801	39	3	91	1.1587
40	2	205	0.8842	40	3	90	1.1587
41	2	162	0.8842	41	3	89	1.1587
42	3	91	0.9172	42	3	88	1.1587
43	3	90	0.9172	43	3	86	1.1587
44	3	89	0.9172	44	3	85	1.1587
45	3	88	0.9172	45	3	84	1.1587
46	3	86	0.9172	46	3	83	1.1587
47	3	85	0.9172	47	3	82	1.1587
48	3	84	0.9172	48	3	81	1.1587
49	3	83	0.9172	49	3	80	1.1587
50	3	82	0.9172	50	3	79	1.1587
51	3	81	0.9172	51	3	78	1.1587

---

---

52	3	80	0.9172	52	3	75	1.1587
53	3	79	0.9172	53	3	74	1.1587
54	3	78	0.9172	54	3	72	1.1587
55	3	75	0.9172	55	3	71	1.1587
56	3	74	0.9172	56	3	70	1.1587
57	3	72	0.9172	57	3	69	1.1587
58	3	71	0.9172	58	3	68	1.1587
59	3	70	0.9172	59	3	66	1.1587
60	3	69	0.9172	60	3	65	1.1587

---

Família: 1=Híbrido interespecífico; 2=Retrocruzamento<sub>1,1</sub>; 3=Retrocruzamento<sub>1,2</sub>