

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

**DETECÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO VIRAL DA MURCHA
DO ABACAXIZEIRO EM PLANTAS E NO INSETO VETOR**

**VITÓRIA-ES
2011**

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

**DETECÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO
ABACAXIZEIRO EM PLANTAS E NO INSETO VETOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração do agronegócio.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

VITÓRIA-ES
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Amorim, Walkíria Andrade, 1978.

DETECÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO VIRAL DA
MURCHA DO ABACAXIZEIRO EM PLANTAS E NO INSETO VETOR – 2011.

86 f.: il.

Orientador: José Aires Ventura
Coorientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Pineapple mealybug wilt associated virus*. 2. *Dysmicoccus brevipes*.
3. RT-PCR. I. Ventura, José Aires. II. Fernandes, Patricia Machado Bueno. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

WALKÍRIA ANDRADE DE AMORIM

DETECÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO ABACAXIZEIRO EM PLANTAS E NO INSETO VETOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração do agronegócio.

Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

Aprovada em 03 de maio de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes
Coorientadora

Prof. Dr. Hécio Costa
Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes

Dr. Mark Paul Culik
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência
Técnica e Extensão Rural - Incaper

Ao meu Senhor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, que está comigo em todos os instantes da minha vida;

Aos amores da minha vida: meu querido pai, Vanadir Leal de Amorim, e minha querida mãe, Lúcia Andrade Amorim, que deram o seu melhor, para que eu pudesse ser feliz, sobretudo me incentivando na busca de sonho; a minha irmã, Meriely, orgulho da minha vida. Espero ser uma professora dedicada e realizada igualmente a ela; a minha irmã, Ariane, minha parceira nestes últimos anos; sem você não seria possível passar por esta etapa tão importante da minha vida; ao meu irmão, Jean Lucas, pelo amor, pelo respeito e pelo orgulho de mim; ao meu amado esposo, Judsmar Dias – minha fortaleza na realização deste sonho –, pela paciência, pelo amor e pelo companheirismo;

Ao meu querido orientador, prof. José Aires Ventura, pela oportunidade e confiança. Não tenho palavras para expressar minha gratidão e carinho. A minha querida coorientadora, prof^a. Patricia M. B. Fernandes, pelo exemplo e ensinamentos;

Ao meu vovô João Leal Amorim, por ter me dado, a sua maneira, a oportunidade de hoje consolidar este sonho. À prof^a. June Ferreira Maia, por ter sido a minha inspiração para a vida acadêmica; ao Dr. Carlos Alberto Fiorot, pelas suas palavras de incentivo;

A Érica e Rayster, pelo companheirismo e amizade. A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia aplicada ao Agronegócio, pela prazerosa convivência; aos colegas da BioMol, a solidariedade. Ao Mark, Edir e Clair pela ajuda na aquisição das amostras;

Às instituições de fomento à pesquisa: Incaper, Fapes, CNPq e Capes;

Aos colegas de trabalho, pelo carinho, apoio e cumplicidade;

E, por fim, às cochonilhas, muito obrigada!

RESUMO

AMORIM, A.A. Detecção molecular do complexo viral da murcha do abacaxizeiro em plantas e no inseto vetor. 2011. – 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação e Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, porém a cultura apresenta elevadas perdas econômicas com doenças, como a murcha do abacaxizeiro, que chega a provocar prejuízos à produção em 80%. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a detecção do complexo viral nas plantas e no inseto vetor de forma eficiente, simples e de baixo custo. As amostras de plantas e cochonilhas foram coletadas na Fazenda Experimental do Incaper em Sooretama, no Centro Regional de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano em Domingos Martins e em plantações comerciais no município de Marataízes. A detecção viral foi realizada por RT-PCR, utilizando *primers* degenerados. Os resultados mostraram que as amostras devem ser processadas no laboratório até 48 horas após a coleta, ou armazenadas em freezer ou ultrafreezer por 30 dias. Para amostras de plantas *in vitro*, de tecido foliar da região clorofilada e da raiz de plantas no campo, o melhor protocolo de extração foi o Trizol®; para os tecidos da parte aclorofilada das folhas, o de Doyle e Doyle (1990). Nas folhas mais velhas das plantas no campo, não foi possível detectar os vírus. Foi observado que plantas sem sintomas de murcha não garantem ausência do vírus. Na indexação de plantas em cultura de tecidos, foi detectada a presença do vírus em 15% das amostras. A técnica para o diagnóstico viral foi padronizada em cochonilhas, usando *primers* degenerados e específicos, por meio do protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997) e reagente Trizol®. Pela primeira vez, foi detectado o PMWaV em cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes*, considerada como vetor do vírus, e a presença de três estirpes do vírus em um mesmo inseto. A nova metodologia desenvolvida nesta pesquisa mostra-se viável para o diagnóstico da doença e indexação de material propagativo, bem como a detecção dos vírus no inseto vetor.

Palavras-chave: *Ananas comosus* var. *comosus*; murcha do abacaxizeiro; *Pineapple mealybug wilt associated vírus*; *Dysmicoccus brevipes*; RT-PCR

ABSTRACT

AMORIM, A.A. Molecular detection of the Pineapple mealybug wilt-associated viruses in plants and an insect vector. 2011. 83f. Dissertation (Masters in Biotechnology) – Post-Graduation in Biotechnology, UFES. Advisor: José Aires Ventura.

Brazil is one of the largest producers of pineapple, but the crop can have high economic losses due to diseases like mealybug wilt, caused by one or more Pineapple mealybug wilt-associated viruses (PMWaVs) with yield losses up to 80%. This study aimed to develop a methodology to detect the virus complex in plants and insect vectors, efficiently, simply and at low cost. Samples of plants and mealybugs were collected at the Experimental Farm of Incaper in Sooretama, at the Centro Serrano Regional Development Center in Domingos Martins, and at commercial plantations in the municipality of Marataízes, Espírito Santo, for virus detection by RT-PCR using degenerate primers. The results showed that the samples must be processed in the laboratory within 48 hours of collection or stored in a freezer for a maximum of 30 days. For samples of plants *in vitro*, and the green, pigmented leaf region and roots of plants from the field, the best protocol for RNA extraction was found to be Trizol®, and for chlorotic, unpigmented leaf tissues the method of Doyle and Doyle (1990) was preferable. In older leaves of plants from the field, we could not detect the virus. It was observed that absence of wilt symptoms in plants did not guarantee absence of the virus. In analysis of plants in tissue culture, we detected the presence of the virus in 15% of samples. The technique for viral diagnosis in mealybugs was standardized using degenerate and specific primers and Trizol® reagent, from the protocol of Gibbs and Mackenzie (1997). Although the mealybug *Dysmicoccus brevipes* is considered a vector, this is the first time that PMWaV has been detected in this insect by PCR with three PMWaVs detected in the same insect. The new methodology developed in this research was shown to be viable for the diagnosis of disease, disease indexing of propagative material, and detection of the virus in insect vector.

Key words: *Ananas comosus* var. *comosus*; mealybug; *Pineapple mealybug wilt associated virus*; *Dysmicoccus brevipes*; RT-PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na amplificação de sequências de ampelovírus para a detecção dos vírus isolados, <i>primers</i> para detecção do complexo viral e para actina vegetal.....	57
Tabela 2	Resultados obtidos por espectrofotometria de UV na comparação de três protocolos com amostras de plantas sintomáticas e assintomáticas, para determinar o grau de pureza e a concentração média dos ácidos nucléicos.....	62
Tabela 3	Indexação para PMWaV por RT-PCR em genótipos provenientes de cultura <i>in vitro</i> , do Laboratório de cultura de Tecidos do Centro Regional de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano, do Incaper, Domingos Martins-ES.....	70
Tabela 4	Resultados obtidos por espectrofotometria de UV na comparação de dois protocolos com diferentes quantidades de cochonilha, para determinar o grau de pureza e a concentração média de RNA total.....	74
Tabela 5	Características dos protocolos de extração no que se refere a custo, material utilizado e toxicidade.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cultivares Pérola, Smooth Cayenne e Vitória.....	19
Figura 2	Distribuição das folhas de abacaxizeiros de acordo com idade: A e B são folhas velhas C, D, E e F, as folhas novas.....	20
Figura 3	Cochonilha <i>Dysmicoccus brevipes</i> do abacaxizeiro.....	25
Figura 4	Organização do genoma de PMWaV-2 e outros closteroviruses caracterizados. As caixas representam as ORFs. PRO–protease; MTR–metiltransferase; HEL–helicase; HSP70–proteína homóloga de choque térmico 70; CPD–proteína capsidial duplicada.....	38
Figura 5	Comparação dos genomas dos três principais vírus do complexo PMWaV, o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3.....	39
Figura 6	Plantas de abacaxizeiro em cultura de tecido para extração de RNA total.....	51
Figura 7	Folha ‘D’ de abacaxizeiro da cv. Vitória mostrando a parte aclorofilada utilizada na extração de RNA total.....	52
Figura 8	Cochonilhas da espécie <i>Dysmicoccus brevipes</i> presentes em folhas de abacaxizeiro com sintomas de murcha e utilizada na extração do RNA total.....	52
Figura 9	Gel de agarose para amplificação do complexo PMWaV com <i>primers</i> específicos . (V1) Vírus 1 com banda em 495pb, (V2) vírus 2 em 609pb e (V3) vírus 3 em 600pb observados em abacaxizeiros doentes. (B) Branco e (M) Marcador de peso molecular 100bp.....	58
Figura 10	Amplificação do <i>primer</i> genérico em 350pb que evidencia a presença do complexo viral da murcha em folhas sintomáticas (CPG) e não na sadia (CNG). Com <i>primer</i> actina em 200pb para planta sadia (CNA) e sintomática (CPA). (M) Marcador de peso molecular 100bp.....	59
Figura 11	Gel de extração que evidencia a presença de ácidos nucléicos na amostras. (S) planta sintomática, (A) planta assintomática, (1C) extração a partir de um inseto e (4C) de quatro insetos. (M) Marcador de peso molecular 1kb e (m) marcador de peso molecular 100bp.....	62
Figura 12	<i>Amplicon</i> em 200pb característico do <i>primer</i> da actina (ACT) referentes aos métodos de Gibbs & Makenzie (G), Doyle & Doyle	

- (D), Trizol (T), Trizol modificado (T*). (B) Branco e (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 63
- Figura 13 *Amplicon* em 350 pb característico do *primer* genérico (G) de diferentes protocolos de extração: Doyle & Doyle (D), Gibbs e Makenzie (D), Trizol (T) e Trizol modificado (T*), a partir de folhas da mesma planta de abacaxizeiro. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 63
- Figura 14 *Amplicon* em 350 pb para plantas assintomáticas (PA), planta com sintomas iniciais (PP) e plantas com sintomas severos (PS). (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 64
- Figura 15 Detecção do vírus em relação ao tempo de processamento das folhas para análise por RT-PCR. (F) controle positivo a partir da planta sintomática e (CN) controle negativo a partir da planta sadia, coletadas no momento da extração. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 65
- Figura 16 *Amplicon* em 350pb para *primer* genérico característicos de folhas armazenadas em freezer à temperatura de -20°C (F) e ultrafreezer a -80°C (U) por 30 dias. (CP) Folha fresca como controle positivo. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 66
- Figura 17 *Amplicon* em 350pb característico do complexo viral da região clorofilada da folha (CL). Controle positivo, a região aclorofilada da planta doente (CP), e a mesma região da planta sadia, controle negativo (CN). (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 67
- Figura 18 Órgãos afetados pelo PMWaV. (A) Folha velha, (D) folhas média, (E) folha nova, (GA) Gema apical, (GL) Gema lateral, (R) raiz, (CN) cultura de tecido como controle negativo e (CP) controle positivo, planta sintomática. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 68
- Figura 19 *Amplicom* em 200pb para *primer* da actina validando as amostras negativas da figura 12. (A) Folha velha, (CN) cultura de tecido do abacaxizeiro. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 69
- Figura 20 Gel da cultura de tecidos com *primer* degenerado, *amplicon* em 350pb, para EC-117, amostra infectada, e ausência de banda para EC-99, não infectada. Com *primer* da actina, *amplicon* em 200pb, para amostra EC-117 e EC-99. (M) Marcador de peso molecular 100bp..... 71
- Figura 21 Gel de amostras da cultura de tecidos com *primers* degenerados, *amplicon* em 350 pb, para EC-117, EC-160 e EC-171. Controle negativo (CN) a partir de cultura de tecido sadia, e controle positivo

	(CP), planta doente. (M) Marcador de peso molecular 100bp.....	72
Figura 22	Gel de extração dos protocolos de Gibbs e Mackenzie (G) e reagente Trizol (T) para diferentes quantidades de cochonilhas (1C, 3C e 5C). (M) Marcador de peso molecular 100bp.....	74
Figura 23	<i>Amplicon</i> em 350 pb do <i>primer</i> genérico para controle positivo a partir de planta doente (CP), controle negativo de planta sadia (CN), planta doente de onde foi retirado inseto (P) e cochonilha (C). (M) Marcador de peso molecular 100bp.....	76
Figura 24	<i>Amplicon</i> do <i>primer</i> genérico em 350pb característico do PMWaV, pelos protocolos de extração de (G) Gibbs e Mackenzie e (T) reagente Trizol. (V1) vírus 1 (495 pb), (V2) vírus 2 (609pb) e (V3) vírus 3 (600pb) em cochonilha. (M) Marcador de peso molecular 100bp	77
Figura 25	Formigas carregando uma cochonilha <i>Dysmicoccus brevipes</i> em abacaxizeiro.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ABACAXIZEIRO	17
1.1.1 Taxonomia	17
1.1.2 Comportamento	17
1.1.3 Cultivares	18
1.1.4 Característica das folhas	19
1.2.5 Material propagativo	20
1.3 COCHONILHAS	22
1.3.1 Sistemática	22
1.3.2 Reprodução	25
1.3.3 Comportamento	26
1.3.4 Danos no hospedeiro	28
1.1 MURCHA DO ABACAXIZEIRO	30
1.1.1 Origem da doença	31
1.1.2 Sintomas da murcha	32
1.1.3 Disseminação da doença	34
1.1.4 Controle	35
1.4 VÍRUS	36
1.4.1 Características do PMWaVs	36
1.4.2 Classificação dos PMWaVs	37
1.4.3 Distribuição	39
1.5 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO-VETOR	41
1.5.1 Interação planta-vírus	41

1.5.2 Interação cochonilha-planta.....	43
1.5.3 Interação do vetor-vírus.....	44
1.5.4 Interação cochonilha-formiga	47
1.5.5 Interação planta-vírus-cochonilha-formiga.....	47
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	51
3.2 INSETO VETOR.....	52
3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO.....	53
3.3.1 Protocolo de Doyle & Doyle modificado	53
3.3.2 Protocolo de Gibbs e Mackenzie adaptado	53
3.3.3 Protocolo Reagente Trizol® adaptado.....	54
3.4 ELETROFORESE	54
3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	54
3.6 TRATAMENTO COM DNASE	55
3.7 TRATAMENTO COM TRANSCRIPTASE REVERSA	55
3.8 REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE	56
3.9 VALIDAÇÃO DO PROCESSO	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 VALIDAÇÃO DO <i>PRIMER</i> DEGENERADO	58
4.2 COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA	60
4.3 SEVERIDADE DA DOENÇA EM DIFERENTES GRAUS DE SINTOMA	64
4.4 TEMPO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	65
4.5 DETECÇÃO DO VÍRUS EM DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA.....	67

4.6	INFECCÃO VIRAL EM CULTURA DE TECIDO.....	68
4.7	DETECCÃO DO PMWaV EM COCHONILHAS	70
4.7.1	Isolamento do RNA viral no inseto	73
4.7.2	Diagnóstico viral por RT-PCR	76
5	CONCLUSÃO	80
6	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi é produzido em todos os países tropicais, entre os quais um dos seus maiores produtores é o Brasil, onde encontra excelentes condições para seu desenvolvimento, sendo cultivado em quase todos os estados (IBGE, 2010). É a sexta lavoura entre as frutas cultivadas no país. Em razão do grande mercado, deve haver investimentos no aumento da produtividade mediante a adoção de medidas de classificação dos frutos em relação à fitossanidade (PERON, 2010).

A Região Nordeste destaca-se com a maior produção nacional de frutos, seguida da Região Sudeste. O principal produtor é o estado da Paraíba, que, junto com os estados de Minas Gerais, Pará e Bahia totalizam 61,7% da produção brasileira de abacaxi (IBGE, 2010).

Com uma participação de 2,3% do total produzido, o estado do Espírito Santo, que já esteve entre os cinco maiores produtores, aparece no ranking da produção nacional, ocupando atualmente a 12^a colocação, porém produzindo mais que a Região Sul (IBGE, 2010).

A cultura do abacaxizeiro ainda não se destaca no cenário agrícola nacional devido às doenças que oferecem risco à produção. Entre elas, a que pode afetar determinadamente a cultura do abacaxi, está a murcha do abacaxizeiro, que pode causar perdas na produção até 80% (GUNASINGUE; GERMAN, 1989; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Segundo Peron (2010), a etiologia da murcha do abacaxizeiro no estado do Espírito Santo, está geralmente relacionada a três estirpes do complexo viral: relatadas como determinantes para o aparecimento dos sintomas o PMWaV-2, em presença da cochonilha de forma ativa; o PMWaV-1 e o PMWaV-3, apenas como coparticipantes.

Como em outras regiões produtoras de abacaxi, no Espírito Santo a murcha da cochonilha consiste num dos problemas mais graves na cultura e faltam informações sobre o manejo da doença. Para que o manejo seja adequado, torna-se importante o

uso de material propagativo sadio, além do conhecimento da epidemiologia da doença, sendo necessário determinar as formas de transmissão e dispersão do vírus, e o envolvimento das cochonilhas (CULIK; VENTURA, 2009).

O uso de técnicas moleculares é de grande importância na indexação do material propagativo infectado e assintomático, para que não seja uma fonte de inóculo primário em novos plantios (GOMES et al., 2003; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Nesse sentido, procurou-se desenvolver e padronizar uma metodologia molecular para detectar o complexo viral da murcha do abacaxizeiro nas plantas e no inseto vetor.

1.1 ABACAXIZEIRO

1.1.1 Taxonomia

O abacaxi, *Ananas comosus var comosus*, é uma planta monocotiledônea, herbácea perene, que pertence à família *Bromeliaceae* (BARTHOLOMEW, 2008). Essa família possui cerca de 3.100 espécies, distribuídos em 56 gêneros, dos quais o gênero *Ananas* é o mais importante economicamente, pois nele está incluído o abacaxi comestível (BARBOSA, 2009).

Na família *Bromeliaceae*, as espécies podem ser divididas, em relação a seus hábitos, em dois grupos distintos: as epífitas, que crescem sobre outras plantas, e as terrestres, que crescem no solo à custa das próprias raízes. Os abacaxizeiros pertencem ao segundo grupo, mais precisamente aos gêneros *Ananas* e *Pseudananas*, mesmo apresentando algumas características das epífitas, como a capacidade de armazenar água tanto no tecido especial de suas folhas como nas axilas destas. A sua adaptação a condições de deficiência hídrica decorre da capacidade de armazenar água na hipoderme das folhas, de coletar água por meio de suas folhas em forma de canaleta e de reduzir as perdas de água na transpiração.

1.1.2 Comportamento

O abacaxizeiro é, provavelmente, originário da região da Amazônia, por ser o local onde se encontra o maior número de espécies consideradas válidas até o momento. É uma planta de clima tropical, apresentando ótimo crescimento e melhor qualidade do fruto na faixa de temperatura de 22°C a 32°C e com amplitude térmica, entre dia e noite, variando de 8°C a 14°C. Temperaturas acima de 32°C e abaixo de 20°C afetam o crescimento da planta. Desenvolve-se melhor em locais com alta incidência de radiação solar. Não tolera sombreamento, o que deve ser considerado na escolha dos locais para o seu cultivo e no plantio consorciado com outras culturas. A aeração e drenagem do solo são requisitos básicos para o seu cultivo, por favorecerem o desenvolvimento do sistema radicular da planta. Terrenos planos ou de pouca declividade são importantes, pois evitam a erosão. A planta é bem adaptada aos solos ácidos. A faixa de pH de 4,5 a 5,5 é a mais recomendada para o seu cultivo (MATOS et al., 2006).

Na escolha de uma variedade de abacaxi, devem-se considerar a adaptação ao local de plantio, às exigências do mercado, a disponibilidade e a qualidade da muda. As principais características desejadas em uma variedade de abacaxi são: crescimento rápido; folhas curtas, largas e sem espinhos; fruto de casca de cor amarelo-alaranjada, polpa amarela, firme, mas não fibrosa; teor de açúcar elevado; acidez moderada; coroa média a pequena. Associado a esses requisitos, variedade que proporcione alto rendimento e que seja resistente e/ou tolerante às principais pragas e doenças que ocorrem nos locais de plantio.

1.1.3 Cultivares

As variedades de abacaxi mais conhecidas no mundo foram classificadas em cinco grupos distintos: *Cayenne*, *Spanish*, *Queen*, *Pernambuco* e *Perolera*, de acordo com um conjunto de caracteres comuns, relativos ao porte da planta, à forma do fruto e às características morfológicas das folhas. Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi provém de *Smooth Cayenne*. No Brasil, predominam as

cultivares *Smooth Cayenne* e Pérola (Figura 1). A abacaxicultura capixaba é predominantemente da cultivar Pérola e está concentrada nos municípios de Marataízes, Presidente Kennedy e Itapemirim, todos localizados na Região Sul do estado. Porém há grande potencial para expansão da produção baseada em condições favoráveis de crescimento e interesse no desenvolvimento do cultivo do abacaxi nas Regiões Norte e Noroeste do estado nos municípios de Colatina, Linhares, Sooretama e Pinheiros (PERON, 2010).

Na Fazenda Experimental do Incaper, em Sooretama, foi lançada a cultivar Vitória (Figura 1), cujos parentais foram a cv. Primavera (PRI) e cv. *Smooth Cayenne* (SC), provenientes do Programa de Melhoramento Genético do Abacaxizeiro, coordenado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Essa nova cultivar tem apresentado resistência à fusariose e viabilizado a expansão da abacaxicultura (VENTURA et al., 2006).

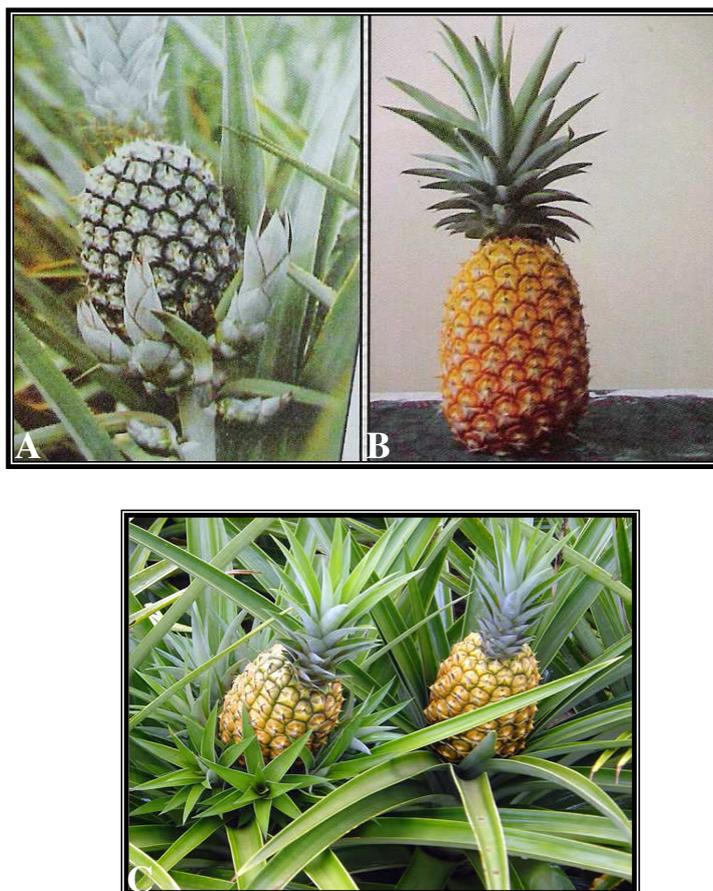


Figura 1 Cultivares Pérola (A), *Smooth Cayenne* (B) e Vitória (C). Fonte: VENTURA; ZAMBOLIM (2002); PERON et al., (2009).

1.1.4 Características das folhas

O abacaxizeiro compõe-se de um caule curto e grosso, ao redor do qual crescem as folhas em forma de calhas, estreitas e rígidas, e no qual se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, encontrado em geral à profundidade de 0 a 60 cm da superfície do solo. A planta adulta das variedades comerciais mede 1,00 m a 1,20 m de altura e 1,00 m a 1,50 m de diâmetro. As folhas são classificadas, segundo seu formato e sua posição na planta, em A, B, C, D, E e F, da mais velha e externa para a mais nova e interna (Figura 2). A folha D é a mais importante sob o aspecto do manejo da cultura. Ela é a mais jovem entre as folhas adultas e, metabolicamente, a mais ativa de todas; por conseguinte, é usada na análise do crescimento e do estado nutricional da planta. Em geral, a folha D forma um ângulo de 45° entre o nível de solo e um eixo imaginário que passa pelo centro da planta, apresenta os bordos da parte inferior perpendiculares à base e é fácil de ser destacada da planta. Para a efetivação da diagnose foliar no abacaxizeiro, coleta-se, normalmente, a folha D, considerada como a que melhor representa o estado nutricional da planta (PY et al., 1984).

As folhas A e B são consideradas como velhas ou adultas e já estavam presentes às mudas por ocasião do plantio. As folhas C, D, E e F são conhecidas como novas, originárias da própria planta, cuja grande parte do limbo se apresenta aclorofilada (PY et al., 1984). No caule, insere-se, também, o pedúnculo, que sustenta a inflorescência e o fruto (PY et al., 1984).

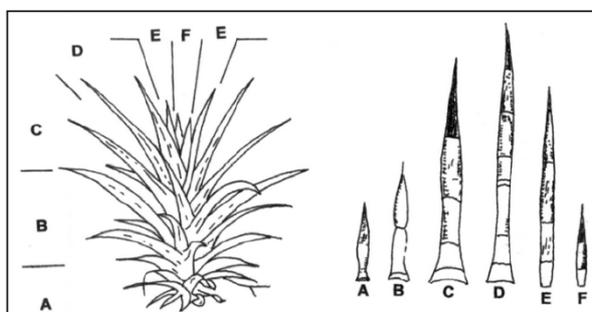


Figura 2 Distribuição das folhas de abacaxizeiros de acordo com a idade: A e B são folhas velhas; C, D, E e F, folhas novas. Fonte: PY et al., 1984.

1.1.5 Material propagativo

O ciclo do abacaxizeiro é dividido em três fases: a fase do plantio até o dia da iniciação floral natural, aproximadamente de 8 a 12 meses; a fase reprodutiva, sendo de 5 a 6 meses; a fase propagativa, variável de 4 a 10 meses para mudas do tipo filhote e, de 2 a 6 meses, para mudas do tipo rebentão (REINHARDT et al., 2000).

Segundo Manica (2000), a reprodução pode ser por sementes por meio de via sexuada ou gâmica, cruzando plantas férteis, ou de via assexuada ou vegetativa, por mudas do tipo coroa, originadas do ápice do fruto da planta adulta; mudas filhote, filhotes-rebentos, rebento lateral ou rebento-raiz, originados da planta matriz; plântulas formadas em viveiros, originadas de pedaços do talo, filhote, rebento ou coroa; plântulas originadas da cultura de tecidos.

O sucesso do plantio depende diretamente da qualidade do material propagativo utilizado em sua implantação. Especificamente com referência ao abacaxizeiro, além do aspecto fitossanitário, deve-se atentar tanto para o tipo do material propagativo a ser utilizado quanto para sua origem. As mudas coletadas diretamente do plantio, tipo filhote, rebentões e coroas, devem ser sadias e vigorosas, isentas de pragas, doenças e danos mecânicos, devendo-se descartar rigorosamente aquelas que apresentarem o menor sinal de goma ou resina e aquelas presentes em plantas que produziram frutos doentes. As mudas produzidas por secção de caule, obtidas de plantas que já produziram frutos, também podem ser usadas como material de plantio, assim como mudas produzidas em laboratório, por meio da cultura de tecido, tendo em vista que estas são isentas de pragas e doenças (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002; MATOS et al., 2007).

A muda de boa qualidade é a base para o sucesso de qualquer cultura. Para aumentar e acelerar o índice de multiplicação e, simultaneamente, diminuir o potencial ou até mesmo evitar a disseminação de pragas e patógenos, técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas para a propagação *in vitro* do abacaxizeiro. Em laboratório, num espaço físico reduzido e sob condições de temperatura e luminosidade controladas, podem-se produzir rapidamente grandes quantidades de mudas de abacaxizeiro, geneticamente uniformes e de excelente qualidade

fitossanitária, seja de cultivares recomendadas, seja de novos híbridos gerados. Essa forma de propagação do abacaxi consiste na produção de plântulas por gemas existentes nas axilas das folhas, inseridas no caule das plantas. O custo elevado e o surgimento de variações somaclonais, características indesejáveis que propiciam a formação de plantas anormais do abacaxizeiro, são os fatores limitantes da técnica. Todavia, em 18 meses, podem-se obter de uma planta, aproximadamente, 50.000 mudas, enquanto seriam necessários 7 anos e 6 meses, para conseguir cerca de 32.000 plantas, partindo-se também de uma planta que produza em média oito mudas, mediante a aplicação do método de propagação vegetativa tradicional, e com risco de estar doente (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002; CABRAL et. al., 2000).

1.2 COCHONILHA DO ABACAXIZEIRO

As cochonilhas (Hemiptera: Coccoidea) são insetos fitófagos, hospedeiras em cerca de 250 famílias de plantas (MILLER, 2005). É uma praga que causa grandes prejuízos à cultura do abacaxizeiro (CULIK, 2008). Essencialmente é encontrada onde quer que o abacaxi seja cultivado, como África, Austrália, América Central e do Sul, Índia e em todo o Pacífico (MAU, 2007). A espécie encontrada nos abacaxizeiros é a *Dysmicoccus brevipes*, também conhecida por piolho branco, cochonilha pulverulenta-do-abacaxi, cochonilha-da-raiz, cochonilha farinhosa ou piolho farinhento.

São várias as famílias de cochonilhas, entre as quais estão as seguintes: Ortheziidae, Margarodidae, Diaspididae, Aclerdidae, Coccidae, Lacciféridae, Asterolecaniidae, Pseudococcidae, Eriococcidae, Dactylopiidae e Kermidae. A família Pseudococcidae é a segunda maior família da escala dos insetos. Os três dos maiores gêneros de cochonilhas, *Dysmicoccus*, *Pseudococcus* e *Trionymus*, pertencem a essa família (DOWNIE, GULLAN, 2004).

1.2.1 Sistemática da cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*)

As cochonilhas de abacaxizeiros pertencem ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha, superfamília

Coccoidea, Família Pseudococcidae, gênero *Dysmicoccus*, e espécie *Dysmicoccus brevipes* (BEM-DOV et al., 2004).

A classe Insecta é caracterizada pelo corpo dividido em três porções: cabeça com um par de antenas, olhos compostos, peças bucais expostas; tórax com três segmentos, três pares de pernas, nenhum par de asas, um ou dois pares de asas; abdome com 6 a 11 segmentos.

Os insetos da ordem Hemiptera caracterizam-se essencialmente pelo aparelho bucal sugador labial, ápteros ou com dois pares de asas, insetos terrestres, numerosos e diversificados. Mostram grande variação na forma do corpo e muitas espécies são estruturalmente degeneradas. Todos são fitófagos e muitas espécies transmitem doenças de plantas. Constituem a subordem Sternorrhyncha: cochonilhas, pulgões, moscas brancas e psílídeos que apresentam ninfas e adultos que podem viver aderidos às plantas, inativos ou sedentários. Alimentam-se exclusivamente de fluidos vegetais. Apresentam diversos mecanismos de defesa, entre os quais a produção de cera por coccídeos e o estabelecimento de relações mutualísticas, por exemplo, afídeos e formigas (CASTRO, 2010).

Na sistemática dos pseudococcídeos, recorre-se às características das fêmeas, a reduzida dimensão dos machos e a raridade com que são observados. Outro fato são os danos nas plantas hospedeiras que resultam da atividade alimentícia das fêmeas (GÓIS, 2008). Os insetos da família Pseudococcidae são conhecidos como cochonilhas farinhentas por apresentarem o corpo recoberto por uma secreção pulverulenta de cera branca que abrange o corpo das ninfas e fêmeas adultas da maioria das espécies. São pequenos insetos de corpo mole, adaptados a viver em locais escondidos (WILLIAMS, GULLAN, 2010).

Apesar de as cochonilhas serem pragas importantes mundialmente em várias culturas, a sua identificação morfológica é notoriamente difícil, demorada e exige um elevado nível de conhecimentos taxonômicos (SACCAGGI, 2008). São escassas as informações disponíveis no Brasil sobre a taxonomia, bioecologia e métodos de controle dessa família. O grupo inclui cerca de 1.050 gêneros e 7.300 espécies (MILLER, 2005). As espécies de cochonilhas são difíceis de identificar, e,

na América do Sul, há poucos taxonomistas com experiência para diferenciar esses insetos. Cochonilhas (*Hemiptera: Coccoidea*) são pragas que se alimentam da seiva de muitas culturas agrícolas e plantas ornamentais (MILLER et al., 2005), mas são relativamente pouco conhecidas as cochonilhas da fauna do Espírito Santo, Brasil (CULIK et al., 2007).

O complexo de todos os membros da cochonilha do abacaxi foi considerado uma única espécie, nomeado *Pseudococcus brevipes* (Cockerell) (Carter 1933a, Ito 1938), depois mudou para *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Ferris 1950). Beardsley (1959) estabeleceu um modelo de cochonilha rosa como *Dysmicoccus brevipes* e a forma cinza como *Dysmicoccus neobrevipes*.

A espécie de *Dysmicoccus brevipes* (Figuras 3), quando observadas em campo, podem ser descritas da seguinte forma: corpo oval, rosa ou laranja-rosado, pernas castanho-amareladas; corpo coberto por fina camada de cera branca, permitindo que a cor do corpo seja visível, sem áreas nuas no dorso; alguns fios filamentosos no ventre com 17 pares de filamentos de cera lateral visível, muitas vezes, ligeiramente curvo, os pares posteriores mais longos, filamentos anterior mais curto do que os pares posteriores. Ocorre em todas as partes da planta, geralmente na área protegida. Ovovivíparas, ovos cor-de-rosa (WILLIAN, 2004).



Foto: Judsmar Dias

Figura 3 Cochonilha *Dysmicoccus brevipes* do abacaxizeiro.

A diferenciação das espécies hospedeiras do abacaxizeiro, *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes*, é taxonômica (WILLIAMS, 2004; MILER et al., 2005).

1.2.2 Reprodução

As cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* se reproduzem por partenogênese, na qual as larvas nascem do sexo feminino sem fecundação por machos, ou por anfigonia, geração sexual. Em sua maioria, são ovíparos, não depositam ovos, estes eclodem dentro da fêmea, e dela são liberadas as larvas. Os ovos são elípticos, com *corion* liso e de coloração amarelo-alaranjada, e cada fêmea coloca em média 295 ovos (MENEZES, 1973). O período de oviposição varia de 22 dias a 40 dias. As formas jovens já se encontram formadas no interior dos ovos, e as ninfas, entre 10 e 50 minutos, eclodem após a postura (SANTA CECÍLIA; REIS, 1985).

A larva antes do desenvolvimento permanece protegida por uma cobertura de cera sob o corpo da mãe, por um curto período. Depois passam por três mudas antes de atingir a maturidade do adulto e alimentam-se apenas no primeiro e no início da segunda fase (MAU; KESSING, 2007).

No acasalamento, a razão sexual é, aproximadamente, de um macho para duas fêmeas. As fêmeas sofrem três ecdises antes de alcançar a maturidade e, durante os três estádios de vida, alimentam-se normalmente, enquanto os machos sofrem quatro ecdises antes que se transformem em adultos (SANTA CECÍLIA; REIS, 1985). As fêmeas adultas dessa espécie medem em redor de 1 mm de comprimento, apresentam coloração rósea, corpo oval e são recobertas por secreção pulverulenta de cera branca que circunda o corpo do inseto, formando 34 prolongamentos de tamanho e espessuras iguais, sendo os quatro posteriores maiores e mais robustos; com essa secreção, elas medem cerca de 3 mm de comprimento. Segundo Mau e Kessing (2007), as fêmeas adultas têm o corpo gordo e convexo e de coloração rósea, com filamentos laterais de cera. Fêmeas de ambas as formas, *D. brevipes* e *D. neobrevipes*, são aparentemente indistinguíveis. Os machos adultos são menores, alados, com um par de filamentos caudais longos, têm vida curta, normalmente de dois dias a três dias, e fecundam, em média, duas

fêmeas (SANTA CECÍLIA; REIS, 1985). O macho da espécie cinza difere do da rósea por uma diferença no número de segmentos da antena, de 10 a 8 antenas, respectivamente. Além disso, a cochonilha *D. brevipes* tem cerdas curtas em seu corpo e apêndices no lugar de cerdas digitiformes que se encontram no macho da *D. neobrevipes* (MAU; KESSING, 2007).

1.2.3 Ecologia do vetor

Dysmicoccus brevipes e *D. neobrevipes* são as pragas do abacaxizeiro relatadas como mais importantes do mundo. *D. brevipes* tem distribuição mais global do que *D. neobrevipes*, ocorrendo em quase toda parte que o abacaxi é cultivado. Essa espécie não é encontrada na cultura em parte da Austrália, África e Ásia. Na Austrália, somente a fêmea da *D. brevipes* tem sido encontrada (GAMBLEY, 2008). Ambas as espécies, pela primeira vez, apareceram no Havaí em 1905. *D. neobrevipes* foi descoberta na Tailândia em 1988, infestando árvores, mas não tem sido relatada em abacaxizeiros (BEARDSLEY, 1993); já a *D. brevipes* foi relatada na Tailândia (JAHN, 1995). Na América tropical, várias espécies do gênero *Dysmicoccus* foram descobertas (JAHN et al., 2003). No Brasil, apenas a *Dysmicoccus brevipes* é relatada desde 1931, cujos prejuízos foram a causa do declínio da cultura em muitas áreas do estado de São Paulo e, posteriormente, de Minas Gerais (SANTA-CECÍLIA, 2004). *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) foi coletada na base das plantas e raízes de abacaxizeiros (*Ananas comosus*) em junho 2004, no Espírito Santo (CULIK; GULLAN, 2005).

Sintomas de murcha foram comuns em plantas de abacaxi em áreas comerciais de Marataízes, estado do Espírito Santo. As amostras de cochonilhas foram obtidas de agosto a outubro de 2005 e identificados como *Dysmicoccus brevipes*. Cochonilhas relativamente comuns também foram encontradas no abacaxi comercializado em Vitória em datas diferentes, entre junho de 2005 e fevereiro de 2006. Os frutos eram da região de Marataízes, e as cochonilhas foram encontradas em torno da coroa e base dos frutos. As cochonilhas coletadas de uma planta de abacaxi infestada de um campo de pesquisa Incaper em Sooretama em dezembro de 2005 parecem ser

D. brevipes (VENTURA, CULIK, 2006). Culik (2008) reafirma a presença de *Dysmicoccus brevipes* em plantações de abacaxi no estado do Espírito Santo.

A ocorrência da cochonilha é constatada durante todo o ciclo da cultura, com variação na intensidade de infestação. A fecundidade e a longevidade desse inseto são afetadas pelo clima, sendo os períodos quentes e úmidos os que oferecem condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento (SANTA CECÍLIA, 1990). No período seco, o índice populacional da cochonilha é elevado, ao passo que, no período das chuvas, em virtude do arrastamento de boa parte dos indivíduos, há um decréscimo da população (ROCHA, 1960). Além do clima, outros fatores, como a presença de formigas, a procedência do material de plantio, as condições fisiológicas das plantas e do solo, contribuem para elevar o nível populacional da praga (LACERDA, 2009).

As cochonilhas são gregárias, isto é, são insetos que vivem em colônias, sendo normalmente encontradas sugando seiva nas raízes e nas axilas das folhas. Com o aumento populacional, elas passam a infestar também os frutos, as cavidades florais e a parte superior das folhas e mudas (GIACOMELLI, 1969). *D. brevipes* é frequentemente encontrada abaixo da terra e um pouco acima do solo em raízes e caules de plantas de abacaxi respectivamente. O local de ataque das *D. neobrevipes* é normalmente encontrado nas partes aéreas de seus hospedeiros, tais como folhas, caules, raízes aéreas, flores e cachos. Estas cochonilhas alimentam-se de folhas, da superfície externa do fruto e do interior da flor (JAHN, 1995). No entanto, na ausência de *D. neobrevipes*, a *D. brevipes* pode ocorrer na parte aérea da planta (MAU; KESSING, 2007).

1.2.4 Danos no hospedeiro

As cochonilhas, por serem sugadores de seiva, danificam as plantas, reduzindo os fotoassimilados, afetando o crescimento e distribuição de nutrientes e, em alguns casos, injetando toxinas nos tecidos.

A dieta de floema é rica em sacarose, água e aminoácidos e geralmente contém vitaminas, esteróis e minerais, elementos essenciais para o crescimento e a

reprodução normal desses insetos. Contudo, a grande vantagem de se alimentar do floema é que todos os nutrientes estão em uma forma solúvel e prontamente assimilável. Eles também conseguem absorver pequenas partículas, mas, se houver algum bloqueio no canal alimentar, movem-se os estiletos e regurgitam. Esse comportamento de regurgitação pode ter implicações na transmissão do vírus (CARVALHO; LAZZARI apud PARRA; PANIZI, 2009).

Segundo Vasconcelos (2008), o que determina os tipos de enzimas produzidas no intestino médio, o comprimento e a complexidade do tubo alimentar é o hábito alimentar dos insetos. Os hemípteros que sugam seiva possuem saliva que não tem importância no processo de digestão. Contudo é constituída de enzimas, aminoácidos, amidas, corantes, metabólitos radioativos, compostos fenólicos, polifenol oxidase e peroxidases. A função desses compostos é a proteção contra substâncias tóxicas para inseto. Há indícios de que os constituintes da saliva são produtos da dieta não utilizados, que são absorvidos pela hemolinfa e daí para as glândulas salivares das quais são excretados.

As peças bucais são especializadas em perfurar e penetrar no tecido vegetal para sugar a seiva dos elementos do floema. O alimento segue para a faringe, posteriormente para esôfago, do qual é bombeado para o estômago; posteriormente segue para o intestino médio, que é longo e possui microvilosidades e dobras profundas, para aproveitar os nutrientes durante a digestão. Caracteriza-se por ser uma região dilatada, com parede espessa que serve como reservatório de alimento, onde também ocorre a maior parte da atividade de hidrólise de carboidratos, absorção de água e glicose. As enzimas produzidas por essa subordem são basicamente polissacaridasas, invertases, e proteases ou peptidasas. No intestino posterior, são secretadas ceras produzidas pelo tecido adiposo que se misturam ao *honeydew* a ser excretados pelo reto e ânus (PARRA, PANIZZI, 2009).

Segundo Vasconcelos (2008), ao analisar o *honeydew*, foi verificado que o principal constituinte é sacarose, o que mostra que esse açúcar não é totalmente hidrolisado no trato digestivo. Isso pode ser justificado pelo trânsito intestinal rápido do alimento.

Indiretamente, as cochonilhas também podem danificar as plantas, servindo como vetores de doenças. Além disso, o *honeydew* excretado pelas cochonilhas produz a melada que contribui para o desenvolvimento de fumagina, que reduz a fotossíntese e pode reduzir a comercialização dos frutos. Esses danos diretos e indiretos à cultura do abacaxizeiro, faz das cochonilhas pragas quarentenárias, adicionando custos de produção para evitar ou eliminar a sua presença nas plantas (CULIK et al., 2005).

As cochonilhas se alimentam de variadas plantas além do abacaxizeiro, mas são consideradas como praga apenas para as bromélias. Acredita-se que esse inseto seja o vetor do vírus que causa a murcha do abacaxizeiro. A presença do vírus em associação à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* desencadeia os sintomas da doença (PERON et al., 2009).

1.3 MURCHA DO ABACAXIZEIRO

A murcha-do-abacaxizeiro, ou vermelhão do abacaxizeiro, é causada pelo vírus *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV), em associação com cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes*. Atualmente considera-se o PMWaV um complexo de vírus (PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV-5), que tem o abacaxizeiro como seu único hospedeiro conhecido. A doença causa perdas que podem chegar a 100% na produção de abacaxi, sendo a espécie uma praga-chave do abacaxizeiro no Brasil (VENTURA; COSTA, 2002).

Segundo Peron (2010), foi detectada, pela primeira vez no Brasil, a presença dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 em amostras de plantas no campo com murcha do abacaxizeiro no estado do Espírito Santo. O período de incubação da doença na planta foi associado à eficiência do tratamento químico para o controle das cochonilhas. Isso confirma que esse complexo tem constituído um dos maiores entraves para o aumento da produtividade da cultura no Brasil, conforme sugerido por Santa-Cecília (2004). O vírus encontra-se amplamente distribuído nas regiões produtoras de abacaxi do Brasil, trazendo problemas fitossanitários para cultura.

1.3.1 Origem da doença

A cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) vem ocorrendo nos abacaxizeiros do Brasil desde 1931, sendo a causa do declínio da cultura em muitos estados (HAMBLETON, 1935; SANTA-CECÍLIA; CHALFOUN, 1998). A cochonilha ocasiona o enfraquecimento das plantas devido à sucção da seiva, além de estar associada a uma doença de origem virótica que impede a frutificação normal, podendo ocasionar também a morte das plantas antes do período reprodutivo (CULIK et al., 2008).

Apesar de sua ampla disseminação e importância econômica para a abacaxicultura, a doença só recentemente teve a etiologia esclarecida. Anteriormente, supunha-se que a doença era causada por uma toxina produzida pelas cochonilhas que infestavam as plantas, razão pela qual também é conhecida por murcha-de-cochonilha (MATOS et al., 2007).

Carter, em 1933, fez a primeira descrição dos sintomas observados na Murcha do Abacaxizeiro (PMW) no Havaí. O primeiro sintoma ocorre quando as raízes param de crescer. São identificados dois tipos de murcha: a lenta, cujos sintomas demoram meses para aparecer; a rápida, manifestada após dois meses de indução pela alimentação das cochonilhas. Os sintomas podem ser facilmente confundidos e, no caso da murcha lenta, eles retrocedem quando as medidas de controle são adequadas. No caso da murcha rápida, os sintomas são persistentes e variam sazonalmente, desaparecendo logo após a infecção. A murcha rápida é hoje universalmente conhecida como murcha da cochonilha.

Acreditava-se inicialmente que a doença era provocada por um inseto, o *Pseudococcus brevipes* (Cockerell) (CARTER, 1933a, ITO, 1938), *Pseudococcidae*, tendo sido revisada a taxonomia para *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (FERRIS, 1950 apud JAHN, et al., 2003). Esse, ao se alimentar da planta, inoculava fitotoxinas causando os danos.

Estudos adicionais por Carter (1937) demonstraram que o aumento da murcha não era diretamente proporcional ao número de cochonilhas. Às vezes, um pequeno número causava a murcha, porém havia geralmente um ponto além do qual o

aumento do número de cochonilhas teria pouco ou nenhum efeito sobre o aumento dos sinais da murcha. Carter (1945c) demonstrou que cochonilhas depositavam saliva quando se alimentavam no abacaxi. Ao transferir cochonilhas de plantas de abacaxi com murcha para outras plantas, ele observou que nem sempre apresentavam fontes positivas de murcha-de-cochonilha. Assim, ele sugeriu a existência de um fator latente, que deve estar presente no abacaxi, para as cochonilhas desenvolverem a saliva tóxica. Isso porque a sua presença no abacaxizeiro, na ausência da saliva da cochonilha, parecia não produzir sintomas de murcha, sendo o fator latente conservado e reproduzido vegetativamente para as plantas. Ito (1962) sugeriu que as cochonilhas não são tóxicas, mas que a doença da murcha do abacaxizeiro é uma doença viral transmitida por elas.

Estudos posteriores isolaram viriões filamentosos de RNA fita simples em abacaxizeiros que apresentavam sintomas da murcha e propuseram definitivamente a etiologia viral da doença, passando a ser conhecida por *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (GUNASINGHE; GERMAN, 1989).

1.3.2 Sintomas da murcha

No local de alimentação das cochonilhas, ocorre o aparecimento de manchas circulares verdes de tonalidade mais pronunciada do que a da cor normal da folha, correspondendo aos pontos de alimentação (SANTA-CECILIA et al., 2001). A murcha do abacaxizeiro caracteriza-se por apresentar sintomas que se iniciam pelo ressecamento das raízes, seguidos de murcha e descoloração gradual das folhas, que curvam-se em direção ao solo e secam as pontas. Plantas infectadas frutificam com dificuldade ou podem ter seus frutos atrofiados e murchos, impróprios ao consumo ou à industrialização (VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Entre a infestação e o aparecimento dos primeiros sintomas da doença, ocorre um período de incubação, que pode ser muito variável a depender da idade da planta, do período alimentar das cochonilhas e do seu número na planta. Contudo, normalmente a sintomatologia se evidencia, de dois a três meses após a infecção,

em plantas de cinco meses de idade e, de quatro a cinco meses, naquelas infectadas aos nove meses de idade (CUNHA et al., 1994). Na Guiné, abacaxizeiros infestados aos cinco e nove meses apresentaram sintomas da doença entre dois e três meses e, de quatro a cinco meses, respectivamente. No Havaí e na Índia, nas plantas infestadas aos seis meses de idade, os sintomas da murcha apareceram em redor de dois meses. Na Malásia, plantas infestadas com 30 cochonilhas cada uma começaram a apresentar sintomas de murcha aos 37 dias. Antes da ocorrência dos sintomas foliares dessa doença, estes primeiramente surgem nas raízes. O desenvolvimento radicular já é afetado aos 42 dias após a infestação pela cochonilha, contudo os primeiros sintomas nas folhas só vão ocorrer entre o segundo e terceiro meses, embora o desenvolvimento desses sintomas possa atingir até 10 meses.

Além da interrupção do crescimento radicular, ocorre um apodrecimento dos tecidos, embora as raízes mais novas estejam sadias. Nesse estágio final, as plantas, ao serem retiradas do solo, vão mostrar um sistema radicular totalmente destruído. Nessa fase é rara a presença de cochonilhas, já que estas, por falta de alimento, migram para plantas vizinhas em bom estado vegetativo. O surgimento dos sintomas de murcha e a sua intensidade e evolução são funções de vários fatores, fundamentalmente aqueles ligados à cochonilha e inerentes à planta (vigor, idade e cultivar) e os ambientais (SANTA-CECÍLIA, 2004; MATOS et al., 2007).

Agentes bióticos, como *Phytophthora cinnamomi* e nematoides, e abióticos, como estresse hídrico, podem causar sintomas que se assemelham aos da murcha associada à cochonilha. Na murcha, a doença é agressiva e raramente reversível; ocorre em pés isolados, na mesma linha ou reboleira de pequena dimensão; em plantas sadias próximas das com murcha, o enrolamento dos bordos do limbo aparece em todo o comprimento da folha. Enquanto que, na murcha fisiológica, devido à escassez de água no solo, a murcha é progressiva e reversível com a volta das chuvas; ocupam vasta área, e o enrolamento dos bordos do limbo fica limitado ao seu terço superior (MATOS et al., 2007). Celestino e colaboradores (1989) revelaram que a incidência da cochonilha deixa as folhas das plantas vermelhas, passando a róseas e amarelas, encurvadas para baixo, apresentando tricomas e frutos murchos, pequenos e com cerosidade. Esses autores advertem que a

coloração vermelha das folhas (vermelho-vinho) pode ser sintoma de deficiência de cobre; mas, nesse caso, os frutos não ficam deformados nem pequenos, duros ou com cerosidade, e os tricomas permanecem normais.

A murcha do abacaxi é o tipo mais grave de dano e é a principal causa do fracasso da cultura no Havaí. Na Costa do Marfim e nos países da África, a doença causa até 70% de **prejuízos** (PY et al., 1984). No Brasil, a doença tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, causando em **média perdas** acima de 30% nos estados produtores, como o Espírito Santo, a Paraíba e a Bahia, chegando, em alguns casos, a 90% (SANCHES; DIAMANTINO, 1997; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Poucas pesquisas foram realizadas sobre a biologia de *Dysmicoccus brevipes*, sendo escassas as informações sobre o seu desenvolvimento associado a diferentes cultivares de abacaxi (GIACOMELLI, 1969). Porém, é observado que os sintomas requerem mais tempo para aparecerem nos cultivares Pérola e Vitória e os prejuízos são evidentes quando a cultivar doente é a *Smooth Cayenne* (SANCHES, 2005). Alguns híbridos que estão sendo avaliados no Espírito Santo para resistência à fusariose também têm apresentado resistência à murcha (GOMES et al., 2003).

1.3.3 Disseminação da doença

É sugerido que PMWaV seja transmitido por cochonilhas das espécies *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*. As ninfas do inseto do primeiro estágio se locomovem com rapidez e podem percorrer grandes distâncias; já as dos estágios posteriores o fazem mais lentamente, enquanto as cochonilhas adultas permanecem praticamente imóveis (MATOS, 2007). Além de ter a capacidade de se movimentar na planta, acredita-se também na sua disseminação por meio do vento quando jovens, as larvas possuem prolongamentos ao redor do corpo que facilitam a dispersão pelo vento, podendo alcançar plantações adjacentes (SEETHER, et al., 1998; MAU, KEEING, 2007).

Sua associação simbiótica com as formigas-doceiras é importante na inibição dos inimigos naturais das cochonilhas pelas formigas, favorecendo a movimentação das cochonilhas para as plantas vizinhas, surgindo sintomas da doença em reboleiras. As formigas se nutrem de substâncias adocicadas produzidas pelo inseto (SILVA et al., 1968; MENEZES, 1973). Em contrapartida, as formigas oferecem proteção das intempéries ao cobrir os refúgios com terra e restos orgânicos, criando um microclima favorável à multiplicação das cochonilhas, além de transportar, de uma planta a outra, as formas mais jovens (MANICA, 2000). Sem as formigas, as populações de cochonilhas são pequenas e lentas, o que reduz o fluxo de infestação e probabilidade de perda da produção (JAHN et al., 2003).

As cochonilhas podem sobreviver em outras plantas hospedeiras, principalmente gramíneas e a cana-de-açúcar (MATOS et al., 2007).

De todos os vírus já descritos na cultura do abacaxizeiro, o PMWaV é o que tem ocasionado os principais problemas à cultura, principalmente pelo fato de ser um vírus disseminado pelo material propagativo e por apresentar diferentes estirpes (GAMBLEY et al., 2008; SETHER et al., 2005). Por vezes plantas doentes que não manifestam sintomas são classificadas como “sadias” apenas com base na avaliação visual dos sintomas]. Mudanças provenientes dessas plantas assintomáticas são as principais formas de levar a doença para novas áreas. O vírus pode permanecer nos tecidos das plantas durante todo o ciclo da cultura sem manifestar os sintomas de murcha, o que só ocorre quando há presença das cochonilhas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

1.3.4 Controle da doença

Tendo em vista que as mudas são altamente eficientes na dispersão do vírus, as medidas de controle devem ser dirigidas inicialmente para a origem e o aspecto fitossanitário do material de plantio.

Não existe legislação que estabeleça para o País normas específicas para essa doença e os padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização

de mudas de abacaxi. Porém, como o patógeno é transmitido pelas mudas, a sua qualidade é de fundamental importância para prevenir ou reduzir as perdas, bem como para evitar a transmissão, para áreas novas (VENTURA, ZAMBOLIM, 2002). O diagnóstico laboratorial deveria ser obrigatório para eliminar as plantas doentes nos campos de produção (GAMBLEY, 2008; SETHER et al., 2005; ULLMAN et al., 1989; VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Peron (2010) demonstrou a viabilidade do uso da técnica de RT-PCR na indexação de plantas matrizes e material propagativo de abacaxizeiros, como forma de identificar e garantir mudas sadias.

Em relação às cochonilhas existem as práticas culturais adotadas, com destaque para destruição dos restos culturais, a manutenção do plantio livre de plantas hospedeiras da cochonilha e o manejo integrado das formigas (MATOS et al., 2007).

Após sua instalação da cultura, o controle das cochonilhas pode ser efetuado com inseticidas aplicados diretamente sobre a planta (CUNHA et al., 1994). No entanto, devido ao hábito das colônias se localizarem nas raízes e/ou sob a casca, muitas vezes o produto não conseguiu atingir o inseto (MORANDI FILHO, 2008). A água abundante sobre a cultura, segundo Santa Cecília et al. (1991), provoca sensível redução da infestação da praga, possivelmente devido a sua retirada das plantas pela lavagem, à morte por afogamento e até por ação de agentes entomopatogênicos que se desenvolvem melhor nessas condições de alta umidade. A cochonilha *D. brevipēs* também é parasitada por alguns Hymenoptera e predada por larvas de Diptera e Coleoptera (SANTA CECÍLIA et al., 1985). Segundo Caetano (2006), os microhimenópteros são os parasitoides que fazem o controle biológico das cochonilhas.

Para evitar a proliferação da cochonilha na propriedade, o produtor deve sempre destruir os restos de cultura anterior que servem de fontes de infestação para o próximo cultivo. Além disso, deve controlar as formigas, o que pode ser conseguido com manejo integrado de pragas, e efetuar um bom preparo do solo, para destruir seus ninhos.

1.4 VÍRUS

A murcha do abacaxizeiro é causada por um complexo de vírus de RNA de fita simples, que, em associação com cochonilhas, podem devastar uma plantação. Os vírus de RNA são os únicos organismos conhecidos por usar RNA como seu material genético. Fazem isso por meio da replicação de seus genomas por vias bioquímicas únicas. As várias estratégias genéticas usados por vírus de RNA podem ser organizados em uma estrutura conceitual simples, centrada em torno de mRNA viral. Por convenção, o mRNA é definido como sentido positivo e seu complemento, como sentido negativo. As vias principais para a mensagem do genoma variam muito entre as famílias de vírus diferentes e formam a base da taxonomia viral (HOWLEY; KNIPE, 2002).

1.4.1 Características PMWaV

O *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV) é um complexo viral formado pelo PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV-5. Não possuem ordem ainda definida, pertencem à família *Closteroviridae* e ao gênero *Ampelovirus* (PERON, 2009). Baseado no tipo de vetor, a família *Closteroviridae* possui três gêneros: o *Ampelovirus*, o *Closterovirus* e o *Crinivirus*, que são transmitidos por cochonilhas, pulgões e moscas brancas, respectivamente (PERON, 2010). Antes, a classificação era em relação ao número de RNA, tendo somente o gênero *Crinivirus* com genoma bipartido, transmitido pela moscas brancas, e o gênero *Closterovirus* com o genoma monopartido, transmitido pelos pulgões (MELZER et al., 2001).

No gênero *Ampelovirus*, os vírus não possuem cápsula, são flexíveis e longos, cerca de 1.400-2.200 nm de comprimento e 10-13 nm de diâmetro. O corpo do vírion é formado pela principal proteína do capsídeo (CP) e da cauda da proteína capsidial (CPM). O RNA é linear, de filamento único, e é transcrito imediatamente no interior da célula pelos ribossomos; portanto, sentido positivo. O genoma compreende entre 16,9 e 17,9 Kb. Além dessas características, são transmitidos pelas cochonilhas (VIRALZONE, 2011).

Os *Ampelovirus* são vírus hospedeiros de planta. O vírion RNA é infeccioso e serve como genoma viral e RNA mensageiro. A replicação ocorre no momento em que o vírus penetra na célula hospedeira. O RNA viral é traduzido, os ssRNAs complementares sentido negativo são sintetizados pelo RNA genômico usado como molde. Novos RNAs genômicos são sintetizados, obtendo, assim, novas partículas virais (VIRALZONE, 2011). Os PMWaVs estão enquadrados no gênero *Ampelovirus*, junto com o *Grapevine Leafroll associated Virus Type 3* (GLRaV-3), *Grapevine Leafroll associated Virus Type 1* (GLRaV-1) e *Little Cherry Virus 2* (LChV-2) por possuírem tais características (PERON, 2010).

1.4.2 Classificação dos PMWaVs

Para estudar a filogenia dos vírus envolvidos na etiologia da murcha do abacaxizeiro, o dsRNA de tecidos infectados de abacaxizeiros foi isolado e identificada uma banda de 16Kb. Com *primers* degenerados, que amplificam o gene conservado HSP70, seguidos de clonagem e sequenciamento, foram identificados os tipos virais diferentes com homologia para a HSP70, sendo designados como PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (MELZER et al., 2001).

O PMWaV-2 é o que possui maior semelhança com membros do *Ampelovirus* (Figura 4). Apresenta 10 ORFs e genoma com aproximadamente 14 Kb (MELZER et al., 2001). O PMWaV-1, segundo sequenciado, apresenta genoma com 13,1 Kb, ausência da CPd, característica que está fora do padrão para *Ampelovirus*; porém, por ser considerado transmitidos por cochonilhas, assim como PMWaV-2, foi considerado membro (MELZER et al., 2008). Para PMWaV-3 foi observado genoma de 14 Kb, apresentando 7 ORFs; não apresenta a região intergênica entre OF1b e ORF2, e ausência de uma proteína capsical duplicada. Também é um vírus supostamente transmitido por *Dysmicoccus* do abacaxizeiro (SETHER et al., 2009).

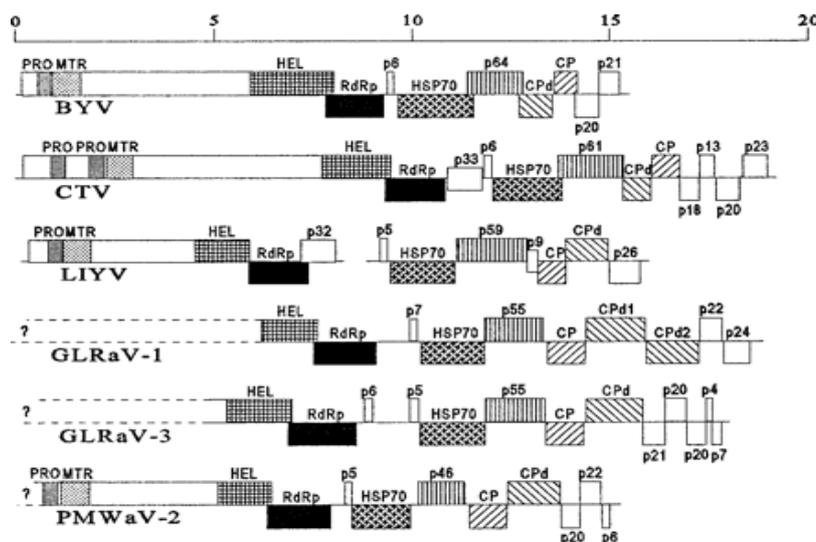


Figura 4 Organização do genoma de PMWaV-2 e outros closterovírus caracterizados. As caixas representam as ORFs. PRO-protease; MTR-metiltransferase; HEL-helicase; HSP70-proteína homóloga de choque térmico 70; CPD-proteína capsial duplicada. Fonte: MELZER et al. (2001).

PMWaV-2 difere do PMWaV-1 e PMWaV-3 filogeneticamente, mas todos são membros do gênero *Ampelovirus* e podem ser adquiridos e transmitidos por *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) e *D. neobrevipes* Beardsley (Figura 5). PMWaV-3 possui homologia maior com PMWaV-1. Plantas infectadas com PMWaV-1 e/ou PMWaV-3 não desenvolvem sintomas MWP, quando expostas as cochonilhas na ausência de PMWaV-2 (SETHER et al., 2005, 2009).

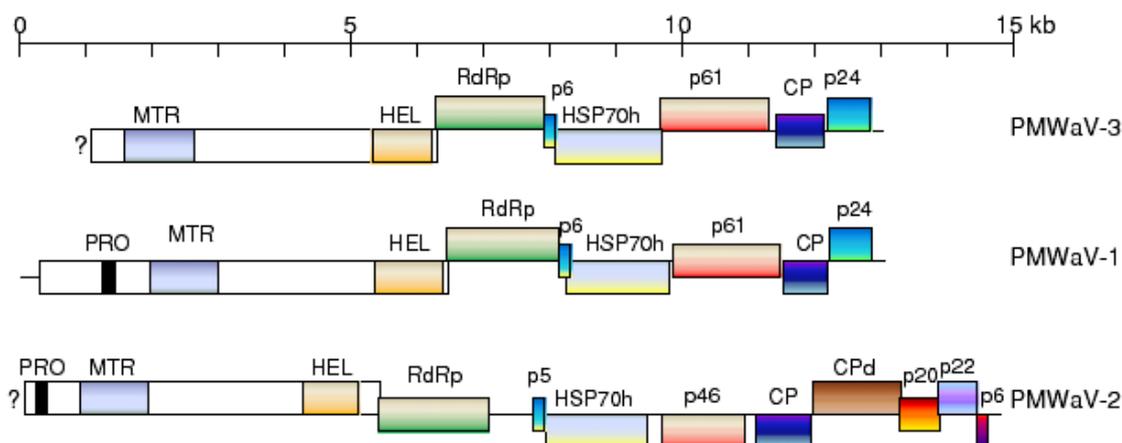


Figura 5 Comparação dos genomas dos três principais vírus do complexo PMWaV, o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. Fonte: SETHER, et al. (2009).

1.4.3 Distribuição geográfica

No Havaí, a etiologia da murcha do abacaxizeiro (MWP) envolve a alimentação da cochonilha e a presença de PMWaV-2. Embora a incidência de PMWaV-1 em abacaxizeiro havaiano seja superior a PMWaV-2, a presença somente da cochonilha, ou dessa em combinação com PMWaV-1, não resulta em MWP no Havaí. O mesmo foi observado com PMWaV-3, isoladamente ou em combinação com cochonilhas, não ocorre o desenvolvimento dos sintomas PMW (SETHER et al., 2005). A prevalência de PMWaV-1 em seleções cultivadas comercialmente do Havaí e sua transmissibilidade por cochonilhas contribuem para sua ocorrência frequente em plantas com sintomas de murcha, embora não esteja diretamente envolvida no desenvolvimento dos sintomas (SETHER; HU, 2002).

Há estudos de certificação em regiões do Havaí e da Austrália que determinaram a presença do vírus PMWaV-1 em plantas assintomáticas, sem ocorrência da doença mesmo quando induzidas por seus vetores. Parece que sua presença está envolvida na redução da produtividade, mas não necessariamente aparece como fator indutor da doença. Sua presença, porém, deve ser determinada para reduzir o risco de efeitos sinérgicos com outros vírus (GAMBLEY et al., 2008).

PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 foram detectados na Austrália em abacaxizeiros, junto com um *Ampelovirus* ainda não descrito, cujo nome *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5* (PMWaV-5) foi proposto. Análises filogenéticas revelaram que PMWaV-5 é uma espécie distinta e mais estreitamente relacionada com PMWaV-1 (GAMBLEY et al., 2008). Sether et al., (2001) mostrou que PMWaV-1 foi detectado em um pequeno número de amostras de abacaxizeiros australianos. Com relação ao PMWaV-3, foi demonstrada a transmissão por *D. brevipes* e *D. neobrevipes* na ausência ou presença de PMWaV-1 ou PMWaV-2 (SETHER; HU, 2002).

Foi observado que, dentro de uma mesma região australiana, havia uma forte associação entre MWD e infecção com PMWaV-2. Porém, PMWaV-1 e PMWaV-3 também foram detectados nas mesmas plantas amostradas, independentemente do estágio da doença. Em outra área, a incidência de PMWaV-2 foi baixa, mas em associação com a doença. No entanto, a presença de PMWaV-3 foi fortemente associada a MWD. PMWaV-5 não foi associado com a MWD em qualquer um dos

locais estudados. Assim, os resultados deste estudo não fornecem nenhuma associação consistente entre a presença de um vírus individual e MWD. É possível que vários vírus possam contribuir isoladamente ou em combinação para a etiologia da doença. Uma alternativa seria uma interação sinérgica entre tipos diferentes de vírus, ocorrendo o mecanismo de silenciamento (GAMBLEY et al., 2008).

Em Cuba, a cultivar *Smooth Cayenne* tem perdas de 40% devido à murcha do abacaxizeiro. Estudos demonstram que o agente causal é o PMWaV-2 (BORROTO et al., 2007). No Brasil, mediante estudos moleculares, as estirpes encontradas são PWMaV-1, -2 e -3, das quais a PMWaV-2 está associada a cochonilhas que provocam o aparecimento dos sintomas (PERON et al., 2009).

Embora seja relatada a ocorrência de cinco vírus do complexo PMWaV, o PMWaV-4 e o PMWaV-5 não foram diretamente associados ao desenvolvimento dos sintomas; não são, portanto, agentes patogênicos da murcha do abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008).

1.5 AS RELAÇÕES QUE OCORREM NO DESENVOLVIMENTO DA MURCHA

1.5.1 Interação planta-vírus

Os vírus utilizam dois processos para invasão na planta, um é o movimento de célula a célula pelos plasmodesmas; o outro é o transporte à longa distância, movimentação entre os órgãos, pelos tecidos vasculares do floema (NIEHL; HEINLEIN, 2010). PMWaV nunca foi detectado em tecido fora os feixes vasculares. Esta limitação ao floema aparente é característica de closteroviruses (SETHER; HU, 2002).

O silenciamento de RNA engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica a nível pós-transducional, por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos ou do bloqueio de sua tradução. Constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (ZERBINI et al., 2005 apud TEIXEIRA, 2008). No abacaxizeiro, apenas dois tipos virais do complexo que compreende as cinco estirpes foram

relatados como determinantes para o aparecimento dos sintomas e em diferentes continentes, enquanto que os demais estariam apenas presentes como coparticipantes. Estudos na Austrália admitem a possibilidade de ocorrer interação sinérgica entre tipos virais podendo ocorrer o mecanismo de silenciamento de um sobre o outro. Admite-se a possibilidade de até mesmo vírus de famílias distintas, como Badnavírus estarem correlacionados (GAMBLEY et al, 2008). A infecção por Badnavirus já foi detectada em plantas de abacaxi com sintomas MWP, bem como nas plantas sem sintomas na Austrália e no Havaí (SEThER; HU, 2002).

Além do movimento do vírus na planta, a transmissão de hospedeira para hospedeira é a chave principal do ciclo biológico de um parasita. Sem dúvida, propagação clonal de material infectado tem contribuído para a prevalência deste vírus na cultura do abacaxi em todo o mundo. Isso é agravado, pois a sintomatologia é insuficiente para determinar a ausência de PMWaV, pois no abacaxizeiro, plantas podem hospedar o vírus sem manifestar sintomas de murcha. A expressão dos sintomas também é variável e, aparentemente ligada a fatores como condições ambientais, populações de cochonilha, e o genótipo de abacaxi. Plantas afetadas com MWP podem recuperar-se de sintomas de murcha, mas permanecem infectadas com PMWaVs, o que demonstra a necessidade de testes para detectar infecção latente (SEThER et al., 2009). Além disso, há relato de que o PMWaV-1 pode ser eliminado por meio do uso de gemas da cultura de tecido (SEThER; HU, 2002), alternativas que permitem obter material livre PMWaV e impedir a propagação dos vírus (SEThER, 2005).

1.5.2 Interação cochonilha-planta

Até os anos oitenta, a cochonilha era considerada como a causa da murcha do abacaxizeiro. Porém, com base em vários estudos, ficou evidente que a origem da doença é viral, tendo as cochonilhas como participantes do desenvolvimento da doença. A forma como isso ocorre ainda não foi claramente desvendada. Ela pode ser um agravante para desencadear os sintomas, assim como pode ser o vetor do vírus na planta (PERON et al., 2009).

Há relatos na literatura, através de observações em campo, de que a cochonilha também é o meio de infecção do vírus no abacaxizeiro. O inseto em outros hospedeiros, não havendo relatos com associação com outros patógenos, causa sintomas semelhantes, porém com menos severidade. No café, essas cochonilhas infestam as raízes e podem causar raquitismo e enfraquecimento da planta, mas não levar a planta à morte (MAU, KESSING; 2007).

A capacidade de distinguir plantas infectadas e não infectadas permite a avaliação da cochonilha em relação às características de aquisição e transmissão de PMWaV. Embora as evidências indiquem, há associação entre as cochonilhas, PMWaV e MWP (SETHER; HU, 2002).

Outras espécies de cochonilhas também são conhecidas como vetores de vírus de plantas, incluindo da videira, GLRaV-3. Há indícios de que a transmissão do vírus esta relacionada ao período do ciclo de vida do inseto (SETHER; HU, 2002). No abacaxizeiro, só há desenvolvimento dos sintomas quando o PMWaV-2 e cochonilhas estão presentes. O PMWaV-2 em plantas sem cochonilha não provocam o desenvolvimento dos sintomas, e as cochonilhas em plantas saudias sem o PMWaV-2 não provocam o desenvolvimento dos sintomas da murcha do abacaxizeiro (PERON et al., 2009).

1.5.3 Interação vetor-vírus

Na etiologia da murcha do abacaxizeiro, acredita-se que as cochonilhas tenham papel fundamental na disseminação do vírus, já que a presença dos sintomas depende do PMWaV e da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* na planta (PERON, 2010).

Isso acontece porque os vírus de plantas, em sua maioria, são dependentes, para sua sobrevivência, da eficiente transmissão planta a planta por vetores específicos. Essa propagação assegura a sobrevivência do vírus, resultando muitas vezes em ocorrência de doença. Os primeiros estudos sobre transmissão de vírus de plantas por vetores demonstraram tanto a complexidade como a especificidade da interação

vírus-vetor. Há hipóteses de existirem substâncias ou receptores específicos no vetor que poderiam afetar a estabilidade, a retenção e a transmissão dos diferentes vírus de plantas pelos seus vetores. Os vírus são absolutamente dependentes de vetores para sua propagação, e os insetos são os mais comuns entre todos os vetores (NG; FALK, 2006).

Entre as ordens descritas como representantes vetores de vírus, a Hemiptera é a mais estudada por apresentar um maior número de famílias e espécies envolvidas em todas as modalidades de transmissão de vírus de planta; especialmente os afídeos, por sua importância como vetores de vírus e pela apresentação de definidas etapas de aquisição, latência, inoculação e retenção dos vírus (PAVAN, 2006).

Muitos patossistemas já foram estudados e amplamente entendidos, mas há outros que precisam ser compreendidos quanto à interação, como no caso do vetor da murcha do abacaxizeiro (TEIXEIRA, 2008). Há relatos de que o PMWaV-3 pode ser transmitido por *D. brevipes* e *D. neobrevipes* na ausência ou presença de PMWaV-1 ou PMWaV-2; porém outros estudos mostram que a *D. brevipes* reduziu a eficiência da transmissão PMWaV-3. Isso pode estar relacionado às características fisiológicas ou comportamentais do vetor que atualmente são desconhecidas (SEThER, 2005).

1.5.4 Interação cochonilha-formiga

Na murcha do abacaxizeiro, o PMWaV pode ser disseminado por *D. brevipes* na presença ou ausência de formigas; mas o maior índice de expansão está associado à presença de formigas. A razão para isso é desconhecida. As formigas consomem o *honeydew* das cochonilhas, o que reduz a ocorrência da fumagina. Com isso, é possível que a presença das formigas favoreça o aumento do índice de crescimento ou sobrevivência das cochonilhas. Outra possibilidade é que a presença das formigas modifica o comportamento das cochonilhas, resultando em um índice de colonização mais rápida na planta (SEThER, 1998). A característica da doença em aparecer em reboleiras em regiões diferentes na plantação pode ser explicada pela disseminação das cochonilhas por meio do transporte pelas formigas (BOGO; MANTLE, 2000; NAIS, 2008).

Experimentos de transmissão do PMWaV com cochonilhas, realizados na ausência de formigas, demonstraram que as formigas não são necessárias para a indução do MWP. Porém reinoculações frequentes de cochonilhas nas plantas devem ser realizadas para manter sua presença constante para a propagação do PMWaV-2 e a indução do MWP (Sether, 2005 apud SETHER et al., 2010). Isso sugere que as formigas podem ter um papel indireto no sentido de facilitar a propagação da PMWaV-2 e a indução de sintomas (SETHER; HU, 2002). Formigas também têm um impacto sobre as populações de cochonilha nos campos de plantações de abacaxi comerciais em todo o mundo. O controle das formigas na plantação tem resultado positivo sobre a redução da MWP associado às cochonilhas (SETHER, 1998).

Foi observado, durante a execução desse trabalho, que as cochonilhas são transportadas pelas formigas (figura 6). Assim o seu controle é recomendado e importante para evitar a dispersão das cochonilhas entre plantas na mesma área ou mesmo para outras áreas da plantação, o que contribui para reduzir a disseminação da doença ou desencadeamento dos sintomas devido ao hábito alimentar das cochonilhas.

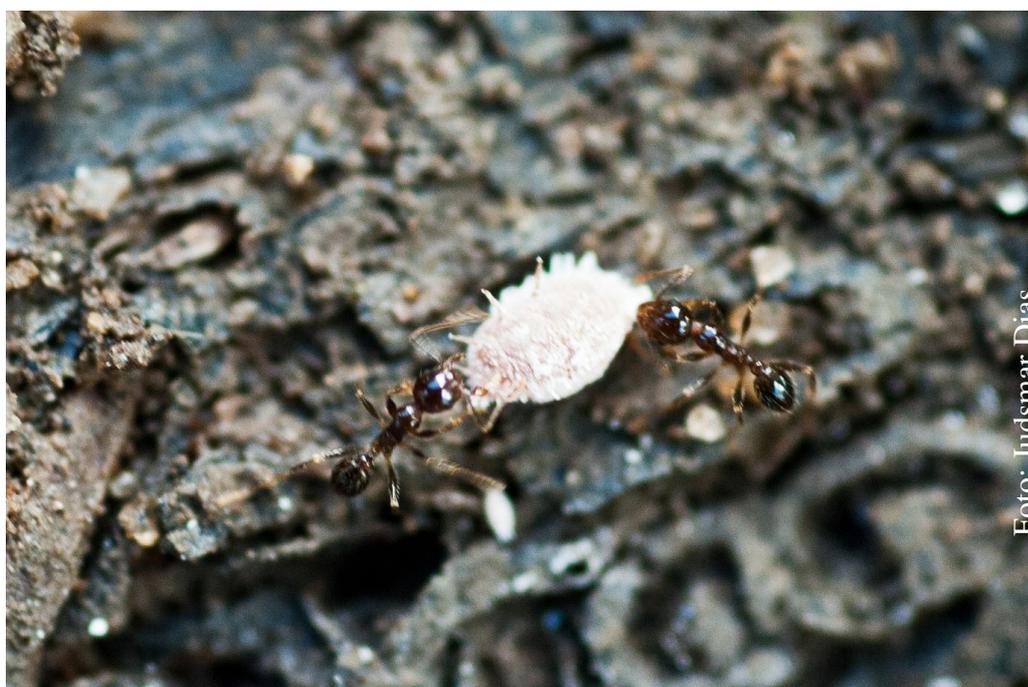


Figura 6 Formigas carregando uma cochonilha *Dysmicoccus brevipes* em abacaxizeiro.

1.5.5 Interação planta-vírus-cochonilha-formiga

Os patossistemas virais apresentam maior complexidade quando comparados àqueles causados por outros agentes etiológicos, pois, de certa forma, há uma maior dificuldade em identificar precisamente os sintomas de viroses, uma vez que existem múltiplas doenças, pragas e deficiências nutricionais que causam sintomas semelhantes àqueles de vírus. Essa complexidade aumenta ainda porque é resultante da interação existente entre o vírus, a planta hospedeira e o vetor (NUTTER, 1997; ZHANG et al., 2000).

A explicação para a relação entre planta, vírus e cochonilha no desenvolvimento da murcha pode ser parte desvendada com a avaliação de genes e proteínas envolvidos no mecanismo de “reposta imune” inata da planta. Menezes (2009) assegura que todos os compostos, sejam de plantas ou animais, que apresentam um efeito negativo sobre o desenvolvimento, o crescimento ou a sobrevivência de outro organismo, podem ser vistos como uma toxina. O armazenamento dessas substâncias nas plantas é estrategicamente localizado de tal forma que essas toxinas sejam liberadas em grandes quantidades imediatamente após a ruptura dessas estruturas, como em decorrência do ataque de um herbívoro. A geração de espécies ativas de oxigênio (EAO's) pode ser um dos possíveis mecanismos a elucidar tal evento. As EAOs ocorrem durante o contato inicial entre o patógeno e a célula vegetal, mas podem também ser produzidas e apresentar um papel sutil nos estágios posteriores da patogênese (RESENDE, 2003).

Outro indicativo é produção de compostos fenólicos na ferida causada pela sucção do inseto. Análise química em folhas evidencia uma relação entre a coloração róseo vivo anormal e os maiores teores de compostos fenólicos decorrentes da incidência do agente causal da murcha-do-abacaxizeiro (SANTA CECILIA et al., 2001). Tais fatores podem ser a justificativa para o dano aparecer tardiamente na planta e fazer que ela se mantenha assintomática por certo período em alguns genótipos. Segundo Nieves e colaboradores (apud TEIXEIRA, 2008), as mudanças metabólicas induzidas no abacaxizeiro com fortes sintomas de murcha incluem o aparecimento

de altos níveis de ácido abscísico, proteínas solúveis totais, prolina livre e fenóis, junto com aumentos de peroxidase e da atividade da invertase. Isso demonstra a necessidade de desvendar o processo de defesa que ocorre na planta, já que o acúmulo de proteínas está intimamente ligado a patogênese e a lignificação.

Essas hipóteses se fundamentam no fato de que as plantas de abacaxi são tolerantes à infecção PMWaV-2 e alimentação das cochonilha; somente na presença de ambos os fatores os sintomas da MWP se desenvolvem.

Mecanismo de silenciamento entre as estirpes e outros tipos de vírus também podem estar relacionados, o que justifica a presença de cochonilha na planta e a falta de desencadeamento dos sintomas. Também com relação ao PMWaV-1 e -3, foi demonstrada a participação apenas coadjuvante no desenvolvimento da murcha, envolvidos na redução da produtividade, e não como agente indutor da doença. Além disso, foi observado em plantas sintomáticas um fenômeno de recuperação caracterizado pela ausência de sintomas sobre as folhas mais recentes na maioria das plantas. Essas plantas foram avaliadas e ainda apresentavam PMWaV-2 e cochonilhas. Isso sugere que a planta pode ter um mecanismo ainda não desvendado, que é ativado durante a expressão sintoma. Tal característica pode estar relacionada a fatores inerentes à planta, como idade, densidade de cochonilha, quantidade e tipos de estirpes de vírus, ou outros fatores a ser compreendidos (PERON et al., 2009).

Quanto às formigas, é sugerido que ela participe na disseminação do vírus, por transportarem cochonilhas para áreas mais distantes da cultura e as protege dos seus inimigos naturais.

A relação que ocorre entre esses organismos pode ser parte elucidada com desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico do vírus em plantas e nas cochonilhas, às quais se propõe este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia molecular para a detecção do complexo viral da murcha do abacaxizeiro na planta e no inseto vetor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar metodologia para detecção do complexo viral no abacaxizeiro utilizando *primers* degenerados;
- Identificar a presença do complexo viral nos diferentes órgãos da planta;
- Determinar tempo e condições de armazenamento das amostras para a detecção dos vírus;
- Indexação de plantas provenientes de cultura de tecidos para a presença do vírus;
- Desenvolver e validar uma metodologia para a detecção dos vírus nas cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram avaliadas amostras de abacaxizeiros sintomático e assintomático das cultivares Vitória, Smooth Cayenne e Pérola, cultivados na Fazenda Experimental do Incaper, localizada no município de Sooretama, norte do estado, e em Marataízes, no Sul do Espírito Santo. As plantas foram mantidas em vasos no telado da Universidade Federal do Espírito Santo – campus Maruípe - durante a realização dos experimentos. As amostras de cultura de tecido (Figura 7) foram obtidas no laboratório de cultura de tecidos vegetais do Incaper, no Centro de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano (CRDR-CS), localizado no município de Domingos Martins-ES.



Figura 7 Plantas de abacaxizeiro em cultura de tecido para extração de RNA total.

Foram utilizados como amostras diferentes órgãos da planta, como folhas de posições diferentes (A, B, C, D, E e F), raízes, gemas (apicais e laterais), e cultura de tecido. Da mesma folha foram usadas também diferentes regiões.

Após a coleta, as amostras foram lavadas em água corrente, solução alcoólica 70% e água destilada; depois secadas com papel-toalha. Em seguida, armazenadas em freezer a temperatura de -20°C a -80°C ou realizada extração. Para as extrações de plantas, foram utilizados aproximadamente 100 mg de amostra.

A parte acolorofilada da folha D (Figura 8), coletada no momento da extração, foi usada como controle, de acordo com Peron, (2010). Após a coleta ou retirada do ambiente de conservação, a região amostrada foi seccionada e triturada em nitrogênio líquido em grau e pistilo, até pó fino, de forma ágil e sem deixar a amostra

descongelar. Posteriormente, transferido para tubo previamente gelado e imediatamente acrescentado o tampão ou reagente de extração.



Figura 8 Folha 'D' de abacaxizeiro da cv. Vitória mostrando a parte aclorofilada utilizada na extração de RNA total.

3.2 INSETO VETOR

As cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes* foram obtidas das plantas doentes e sadias (Figura 9). Um inseto era coletado e triturado diretamente no tampão ou reagente de extração.



Figura 9 Cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes* (B) presentes em folhas de abacaxizeiro com sintomas de murcha (A), utilizadas na extração do RNA total.

3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Procedeu-se à extração dos ácidos nucleicos por meio dos protocolos que possuem características que favoreçam a extração de RNA total: método Doyle e Doyle (1990) modificado, método de Gibbs e Mackenzie (1997) e Reagente Trizol®.

3.3.1 Protocolo de Doyle e Doyle modificado

Após triturar o material, adicionou-se 600 µL de tampão de extração CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1% PVP e 0,1% β-mercaptoetanol) em tubos de reação de 1,5 ml. Esses tubos foram submetidos à agitação em vórtex, alternada com imersão em gelo, por 4 vezes, seguida de centrifugação a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Aos sobrenadantes adicionaram-se 200 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio, seguida de centrifugação nas mesmas condições citadas acima. Essa etapa foi repetida e ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de clorofórmio, seguida de centrifugação a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Ao novo sobrenadante adicionaram-se 500 µL de etanol absoluto e 50 µL de acetato de sódio 3 M para precipitação por 12 horas a -20° C. O precipitado foi centrifugado por 50 minutos nas condições acima e os *pellets* foram lavados com etanol 70%, secos a vácuo e ressuspensos em 10 µL de água Mili Q.

3.3.2 Protocolo de Gibbs e Mackenzie adaptado

Ao material triturado, adicionou-se 600µL de tampão de extração CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1% PVP e 0,1% β-mercaptoetanol) em tubos de reação de 1,5 ml, e incubados 55°C por 20 minutos. Adicionaram-se 300 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação 14.000 rpm (15.339 G) a 4°C por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e acrescentou-se 0,1 volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol gelado. Centrifugou-se durante 30 minutos a 14.000 rpm (15.339 G) a 4°C. Os *pellets* foram lavados com etanol 70°, secos a vácuo e ressuspensos em 10 µL de água Mili Q.

3.3.3 Protocolo do Reagente Trizol® modificado

Ao triturado adicionaram-se 600 µl de TRIZOL® (Invitrogen), que foi incubado por 5 minutos a 30 °C. Acrescentaram-se 200 µl de clorofórmio, agitou vigorosamente por 15 segundos e incubou por 3 minutos a 30 °C. Em seguida centrifugou a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Transferiu a fase aquosa para novo tubo, adicionaram 500 µl de álcool isopropílico, incubou durante 10 minutos a 30 °C e centrifugou a 12.000 rpm (11.269 G), 10 minutos, a 4°C. O *pellet* gelatinoso ficou depositado no fundo do tubo. Desprezou-se o sobrenadante com cuidado para não perder o *pellet*. Adicionaram-se 1000 µl de álcool etílico 75° e centrifugou a 7.500 rpm (4.402 G) por 5 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se o *pellet* secar, por aproximadamente 10 minutos na câmara de fluxo laminar e dissolveu em 10 µl água Mili Q. Na etapa de precipitação com isopropanol, o material foi estocado a -20 °C.

3.4 ELETROFORESE

Para estimar a qualidade do extrato, após a extração os ácidos nucleicos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE1X, a voltagem de 65 mV por 60 minutos. Em cada poço foram colocados 2 µL da amostra e 2 µL do tampão de amostra (Biolabs). Foi utilizado marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). O gel foi corado com brometo de etídeo 10 ng/ml seguido de fotodocumentação digitalizada em transluminador L. Pix (Lotus Biotecnologia® Molecular Imaging).

Os ácidos nucleicos extraídos foram retidos em determinada posição do gel e seu tamanho foi estimado por meio da comparação com um padrão cujas posições são conhecidas (BRASILEIRO, 1998).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A qualidade dos extratos e a quantidade de ácidos nucléicos, foi estimada por Espectrofotometria de UV em aparelho Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EUA). Para cada dosagem foi utilizado 1 µL da amostra.

Para a detecção de ácidos nucleicos ajustou-se o equipamento para 260 nm contra um branco, 2 µl de água MiliQ que foi utilizada para ressuspender os *pellets*. Foi feito ajuste a 280nm para detecção de proteínas, e a 230nm que indica a presença de outras substâncias contaminantes nas amostras tais como carboidratos, peptídeos, fenóis e compostos aromáticos. Posteriormente se fez a leitura das amostras em ng/µl. Uma razão de 2,0 entre as absorbâncias da solução a 260nm e 280nm, e o valor aproximado de 2,2 entre 260nm e 230nm indicam análise da qualidade do extrato de RNA puro (JRC, 2003).

3.6 TRATAMENTO COM DNASE

Certificada a presença de RNA total em volume e qualidade adequados às próximas etapas da certificação molecular, procedeu-se ao tratamento dos extratos a atividade da DNase, enzima que vai digerir o DNA genômico que pode estar presente na amostra e que deve ser removido para evitar resultados falsos.

Assim, do volume de amostra extraído foi retirado um quantidade correspondente a 1 µg de ácido nucleico que foi tratado com uma unidade de DNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega) de acordo com as orientações do fabricante, durante 30 minutos à temperatura de 37°C. A enzima é inativada logo após, para evitar que ela interfira na transcrição reversa.

3.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA

O processo de transcrição reversa fundamenta-se na atividade da enzima Transcriptase Reversa (RT) responsável pela transcrição do molde RNA sob a forma de DNA complementar. No caso PMWaV, vírus ssRNA+, o próprio genoma de RNA é acessível aos ribossomos contidos no interior da célula hospedeira, se expressando-se diretamente (PERON et al., 2009).

Nos mesmos tubos de reação que contêm as alíquotas tratadas com DNase, foi adicionado o *primer*, 0,5 µg hexâmero randômico, e incubado por 5 minutos a 70°C. Depois se adicionava o mix de reagentes, 0,5 µl de dNTP (25 mM), 200 U da enzima

M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), 5 µl tampão de reação (10X), e completados para 20 µl de reação com água MiliQ. Logo depois, foram incubados a 42°C por 1 hora, seguindo-se a inativação da enzima por aquecimento a 85°C por 10 segundos, de acordo com orientação do fabricante para a conversão do RNA total em DNA complementar.

3.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a PCR ocorrer, é necessário que o fragmento de DNA, alvo da amplificação, esteja livre de interferentes, permitindo o acesso da enzima termoestável DNA polimerase, responsável pela síntese dos *amplicons*. Cada ciclo compreende a desnaturação das fitas de DNA, o anelamento dos *primers* às regiões complementares de interesse de amplificação e a extensão do fragmento pela atuação da enzima DNA polimerase termoestável. Repetindo-se o ciclo entre 30 e 50 vezes, ter-se-á, como produto final, uma grande quantidade de DNA de fita-dupla que contém cópias da região do DNA entre os *primers* (PERON, 2010).

A reação de PCR ocorreu em tubo de reação 0,2 ml que contém 2,5 µL de tampão 5X, 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,3 µL de dNTP 25 mM, 0,5 µL de primer F (100 ng/µl), 0,5 µL de primer R (100 ng/µl), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase Promega), alíquota de 2 µL de cDNA e água para completar 20 µL de reação. A ciclagem se deu com aquecimento inicial de 94°C por um minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, com temperatura de anelamento de acordo com primer utilizado (Tabela 1) por 30 segundos, e 72°C por um minuto, concluindo a extensão final com 72°C durante três minutos em termocilador Mastercycler personal (Eppendorf®). Os *amplicons* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em transluminador, utilizando 4 µl do marcador 100pb (New England Biolabs).

Para a detecção dos vírus PMWaV-1, -2 e -3, adotaram-se os *primers* específicos (Tabela 1) que anelam a região conservada na família *Closteroviridae* e que codificam a proteína de choque térmico Hsp70h (PERON, 2009). Para amplificar o complexo viral, foram usados *primers* degenerados, que apresentam *amplicon* em

350pb, caso a amostra esteja infectada por um ou mais vírus do complexo (Santos et al., 2005).

Tabela 1 *Primers* utilizados na amplificação de sequências de ampelovirus para a detecção dos vírus isolados; *primers* para detecção do complexo viral e para actina vegetal.

Oligonucleotídeo	Seq 5' para 3'	Temperatura anelamento	Direção	Vírus específico
PMW1225	ACAGGAAGGACAACACTCAC	50°C	Sense	PMWaV-1
PMW1226	CGCACAAACTTCAAGCAATC	50°C	Anti sense	PMWaV-1
PMW2224	CATACGAACTAGACTCATACG	55°C	Sense	PMWaV- 2
PMW2223	CCATCCACCAATTTTACTAC	55°C	Anti sense	PMWaV-2
PMW3264	AGTTCACTGTAGATTTTCGGA	50°C	Sense	PMWaV-3
PMW3263	ATTGATGGATGTGTATCG	50°C	Anti sense	PMWaV-3
PW deg R	YGCCYARAWAGTTATCKCC	46°C	Sense	PMWaV-1,-2,-3 e -5
PW deg F	TAYSTSSWWAAATTRAACCC	46°C	Anti sense	PMWaV-1,-2,-3 e -5
ACTINA F	ATCTGCTGAACGGGAAATTG	60°C	sense	Actina vegetal
ACTINA R	TGATGGCTGGAAGAGAACCT	60°C	Anti sense	Actina vegetal

Fonte: Adaptado de: Sether et al. (2001), Sethler e Hu (2005), Gambley et al. (2008), e Santos et al. (2005).

3.9 VALIDAÇÃO DO PROCESSO

Foi utilizada a alíquota de 2 µl de cDNA para a amplificação do gene que codifica a actina vegetal (Tabela 2), a fim de validar o protocolo e todos os extratos com resultado negativo. A metodologia foi a mesma utilizada, sendo a temperatura de anelamento igual 60°C por 1,3 min. Esperava-se obter um *amplicon* em 200pb, que indicava resultado positivo para amostra testada, e não degradação ou possíveis interferentes que poderiam ter inibido a reação de PCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO DEGENERADO

Para o vírus da murcha do abacaxizeiro, já foram caracterizados os oligonucleotídeos específicos para o PMWaV, tipo 1, 2 e 3 (SEETHER et al., 2005). No entanto, foi desenhado um par de oligonucleotídeos degenerados, visando detectar a presença de qualquer um dos tipos virais que compõem o complexo causador da murcha do abacaxizeiro (SANTOS; ANDRADE, 2009).

Segundo Peron (2010), o PMWaV-1, PMWaV -2 e PMWaV -3 foram identificados em abacaxizeiros provenientes da Fazenda Experimental do Incaper de Sooretama no município de Sooretama, estado do Espírito Santo, Brasil, utilizando os *primers* específicos. Para a validação dos *primers* degenerados, inicialmente foram selecionadas amostras de plantas saudáveis e doentes, provenientes do campo, → utilizando os oligonucleotídeos específicos para PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 de acordo com a metodologia descrita por Peron (2009) (Figura 10).

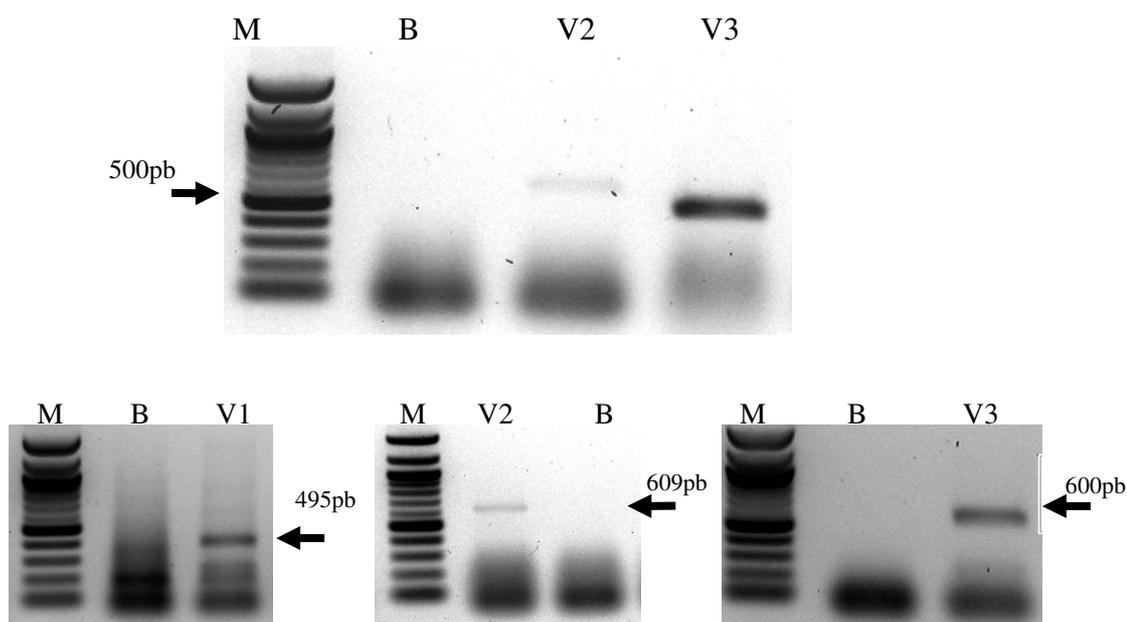


Figura 10 Amplificação do complexo PMWaV com *primers* específicos . (V1) Vírus 1 com banda em 495pb, (V2) vírus 2 em 609pb e (V3) vírus 3 em 600pb observados em abacaxizeiros doentes. (B) Branco e (M) Marcador de peso molecular Quick-Load® 100bp DNA Ladder (New England Biolabs).

Nas plantas infectadas foram testados os oligonucleotídeos degenerados, partindo da alíquota de cDNA utilizada para a amplificação com *primers* específicos. Foi possível a amplificação do fragmento de tamanho esperado, 350pb para *primer* degenerado, nas amostras infectadas testadas, e não na planta sadia (figura 11).

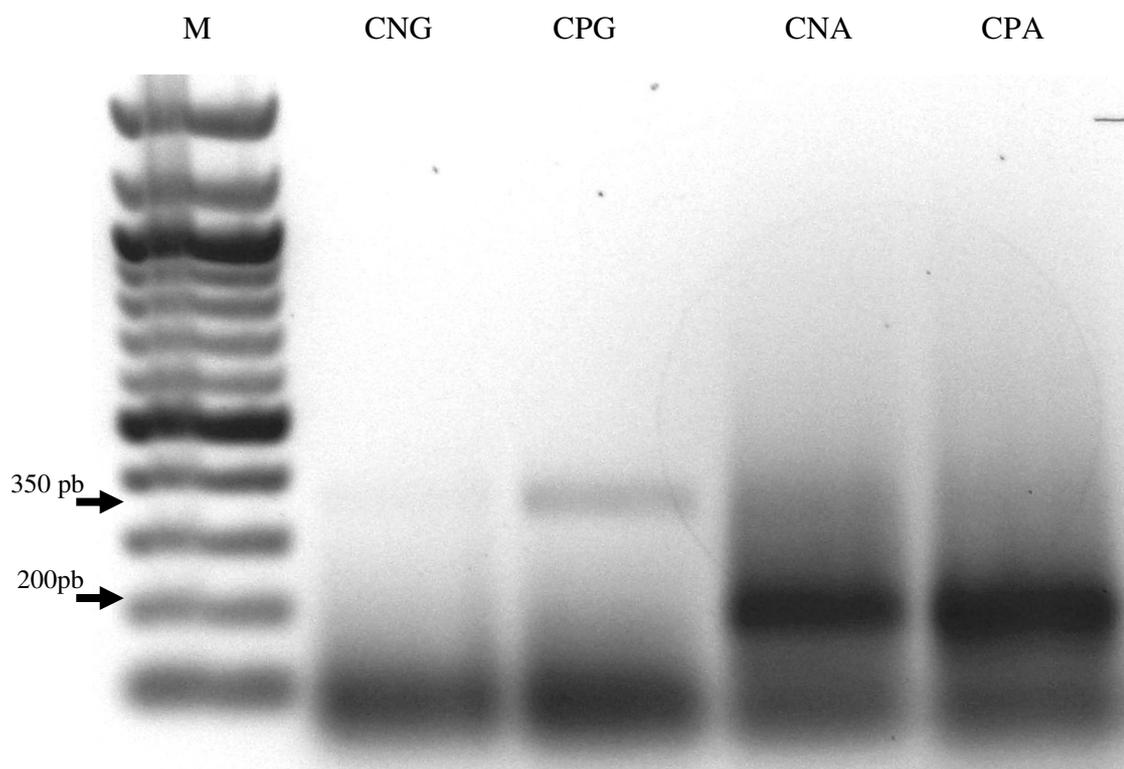


Figura 11 Amplificação do *primer* genérico em 350pb que evidencia a presença do complexo viral da murcha em folhas sintomáticas (CPG) e não na sadia (CNG). Com *primer* actina em 200pb para planta sadia (CNA) e sintomática (CPA). (M) Marcador de peso molecular 100kb.

Para validar o protocolo e verificar se a amostra de ácidos nucléicos proveniente da planta sadia não havia degradado durante o processamento, foi feito um RT-PCR com o *primer* da actina de planta. Para confirmação foi utilizado o mesmo cDNA das amostras para os oligonucleotídeos específicos e degenerados e sob as mesmas condições do teste PCR. Observou-se uma banda referente ao gene da actina, de 200 pb, nas amostras provenientes de plantas sadias e doentes, confirmando a integridade dos ácidos nucléicos. Este resultando, no caso específico das plantas sadias, confirmou que a falta de banda com *primer* degenerado indica ausência do complexo viral (Figura 11).

Foi observado para plantas que apresentavam o PMWaV-2 e PMWaV-3 e para o PMWaV-1, PMWaV-2 ou PMWaV-3 a banda em 350pb que caracteriza a presença de um ou mais vírus do complexo da murcha do abacaxizeiro (Figura 10). Isso demonstra a possibilidade de utilizar *primers* degenerados nos testes de indexação realizados no laboratório, obtendo diagnóstico mais rápido e menos oneroso para a seleção de plantas ou mudas saudáveis.

4.2 COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

A extração dos ácidos nucleicos é a etapa determinante da metodologia, para que o resultado seja alcançado. Neste trabalho, três métodos foram utilizados: Doyle e Doyle, Gibbs e Mackenzie e pelo uso do reagente Trizol[®], sendo todos com tendência à extração de RNA total. Os três métodos apresentaram resultados positivos para extração de RNA total tanto nas plantas como nas cochonilhas. No entanto, existem particularidades em relação ao tipo de amostra.

O método de Doyle e Doyle foi o mais demorado. O tempo gasto no processo de extração por esse protocolo é o dobro quando comparado com de Gibbs e Mackenzie e com o reagente Trizol[®]. Para precipitação, o período do método de Doyle e Doyle é de 12 horas a -20°C, enquanto o de Gibbs e Mackenzie, apenas 30 minutos a -80°C, e Trizol[®] não é necessária a precipitação, o *pellet* fica visível logo após centrifugação. Outro ponto negativo no método de Doyle e Doyle, assim como o Trizol[®], é ter o fenol, substância tóxica, como componente do processo. O custo de extração por amostra é, no entanto, o mais oneroso. O valor dos reagentes é menor, porém as etapas de purificação são repetidas, gerando gasto em relação à quantidade de reagente usado e ao tempo de execução do processo.

No entanto, o método de Doyle e Doyle é mais eficiente para extrações da região aclorofilada da folha do abacaxizeiro, deixando o extrato com melhor resultado de pureza.

O método de Gibbs e Mackenzie garante *amplicon* para extrações de cochonilhas, assim como Trizol[®]. Para amostras de planta, tanto aclorofilada quanto clorofilada,

ele também pode ser aplicado, mais exige repetições, pois pode gerar resultados falsos positivos. O método de Gibbs e Mackenzie também é o de menor custo e o menos tóxico, já que não necessita de fenol. Esse método de extração foi utilizado para detecção do vírus da videira nas plantas e cochonilha *Pseudococcus longispinus* (KUNIYKI et al., 2006).

Para protocolo do Trizol[®], recomendam-se extrações da parte clorofilada da planta, assim como para cultura de tecidos. No primeiro contato com o triturado, a clorofila foi oxidada e, apenas em uma etapa de separação, a fase aquosa, que contém os ácidos nucleicos, fica límpida, formando um *pellet* incolor e garantindo a amplificação posterior. Para cochonilhas o mesmo resultado foi encontrado, não havendo interferentes no extrato para inibir reação de PCR. A agilidade do protocolo está no fato de exigir somente uma etapa de separação e não precisar de tempo para precipitação. Além disso, para reduzir custo, o protocolo original sugere 1 ml de reagente nas extrações; no entanto, 0,5 ml para cochonilhas e 0,6 ml para plantas são o suficiente. O protocolo também sugere incubação do *pellet* ressuspenso a 60°C por dez minutos, entretanto essa etapa não foi realizada, sem prejuízos para o resultado. O método do Trizol[®] é o mais aplicado atualmente na extração de RNA de plantas, tecidos e leveduras. Apesar de o reagente Trizol ter o custo elevado, devido à agilidade da metodologia, o valor final de extração por amostra é mais viável quando comparado com o de Doyle e Doyle.

Para os diferentes protocolos de extração e diferentes regiões da planta, foi observado o mesmo padrão de bandas nas corridas de eletroforese. No gel de extração foi verificada a boa qualidade dos extratos por ter apresentado a banda de RNA ribossômico em 1.500pb, tanto nas plantas doentes e sadias quanto nas cochonilhas amostradas (Figura 12).

Em aproximadamente 14.000 pb foi observado uma banda característica nas cochonilhas e plantas doentes e sadias. Esta banda provavelmente é DNA vegetal que está presente também nos insetos devido ao seu conteúdo gastrointestinal, por se alimentar de seiva. Esse *amplicon* pode ser confundido com RNA viral que possui o mesmo tamanho, principalmente por estar na planta e no inseto. No entanto, a retenção dos fragmentos de RNA fita simples não é possível em gel de agarose

comum porque o filamento sofre conformação mínima e passa através dos poros da malha seletiva da agarose. No resultado pós tratamento com DNase ficou evidente que a banda mencionada é DNA, pois degrada sob ação da enzima.

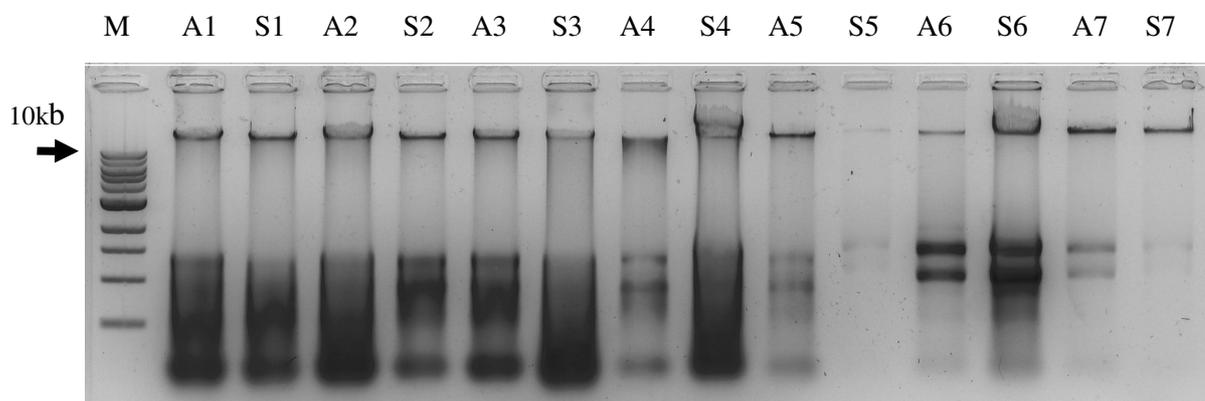


Figura 12 Gel de extração que evidencia a presença de ácidos nucleicos nas amostras. (S) planta sintomática e (A) planta assintomática que apresentaram perfil desejável. (M) Marcador de peso molecular 1kb.

Outra forma de checar a qualidade e quantidade dos produtos da extração é a dosagem dos ácidos nucleicos. Foi verificado que 1µg de extrato é suficiente para detecção do vírus por RT-PCR, com base nos protocolos analisados. Para os diferentes métodos, as amostras apresentaram boa qualidade para prosseguir com a técnica de RT-PCR (tabela 2).

Tabela 2 Resultados obtidos por espectrofotometria de UV na comparação de três protocolos com amostras de plantas sintomáticas e assintomáticas, para determinar o grau de pureza e a concentração média dos ácidos nucleicos.

Protocolo de extração	Planta	Concentração média de ácido nucleico (ng/100mg)	Grau de Pureza (A260/A280)	Grau de Pureza (A230/A260)	Concentração média de RNA total (ng/µl)
Doyle e Doyle	Sintomática (S2)	1.108	2,01	1,93	174
Doyle e Doyle	Assintomática (A4)	1.327	2,02	1,89	186
Trizol	Sintomática (S5)	3.198	1,82	1,6	152
Trizol	Assintomática (A5)	3.201	1,73	1,4	129
Gibbs e Mackenzie	Sintomática (S6)	983	1,86	1,8	106
Gibbs e Mackenzie	Assintomática (A6)	714	1,7	1,7	114
Trizol modificado	Sintomática (S7)	2.964	1,84	1,2	257
Trizol modificado	Assintomática (A7)	3.385	1,65	1,3	224

A alíquota constituída dos RNAs de vírus e cochonilha ou planta teve na etapa seguinte, por ação da transcriptase reversa, a fita de RNA duplicada, utilizando *primers* hexâmeros. Isso se justifica no fato de obter cDNA suficiente para realizar até dez reações de PCR e assim avaliar para uma mesma amostra vários *primers* diferentes, garantindo resultados mais seguros.

Nos produtos da reação de PCR para os protocolos de Gibbs e Makenzie, Doyle e Doyle, Trizol®, Trizol modificado, foi verificada a presença em 200pb da banda característica para *primer* da actina (figura 13).

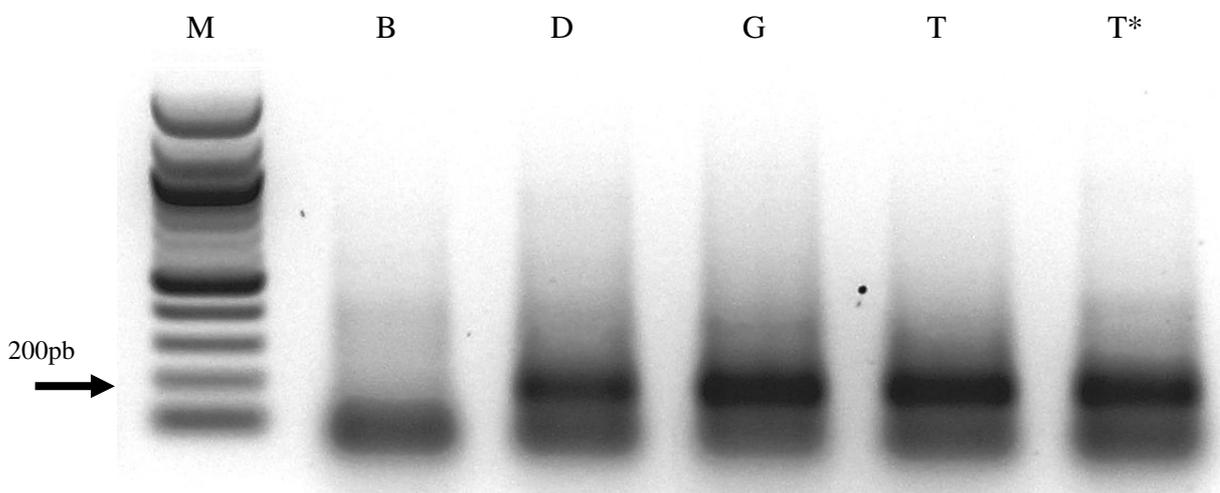


Figura 13 *Amplicon* em 200pb característico do *primer* da actina (ACT) referente aos métodos de Gibbs & Makenzie (G), Doyle & Doyle (D), Trizol (T), Trizol modificado (T*). (B) Branco e (M) Marcador de peso molecular 100pb.

A eletroforese da RT-PCR utilizando os *primers* degenerados mostrou que, por meio dos três métodos, inclusive do Trizol® modificado, foi possível detectar o complexo viral da murche do abacaxizeiro na região aclorofilada da folha “D” da mesma planta (figura 14).

Em regiões diferentes da planta e no inseto o resultado também foi positivo e serão apresentados a seguir.

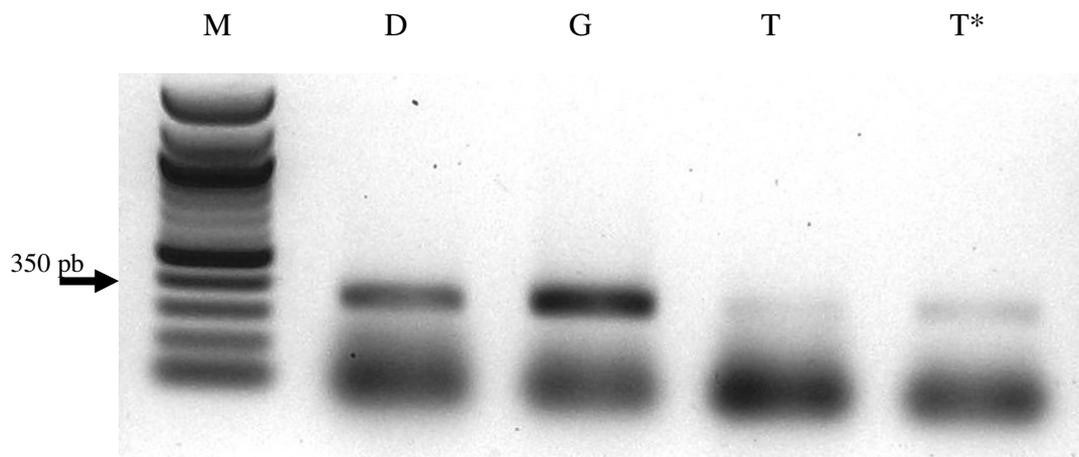


Figura 14 *Amplicon* em 350 pb característico do *primer* genérico (G) de diferentes protocolos de extração: Doyle & Doyle (D), Gibbs e Makenzie (D), Trizol (T) e Trizol modificado (T*), a partir de folhas da mesma planta de abacaxizeiro. (M) Marcador de peso molecular 100bp.

4.3 DETECÇÃO DO VÍRUS EM PLANTAS SINTOMÁTICAS E ASSINTOMÁTICAS

Em todas as amostras avaliadas, planta assintomática, com sintomas iniciais de murcha e com sintomas severos de murcha, foi diagnosticada a presença do vírus (Figura 15). Por meio do gel de revelação da RT-PCR, verificou-se a banda com *amplicon* de 350pb que indica a presença, pelo menos, de um dos vírus que compõem o complexo que causa a murcha do abacaxizeiro.

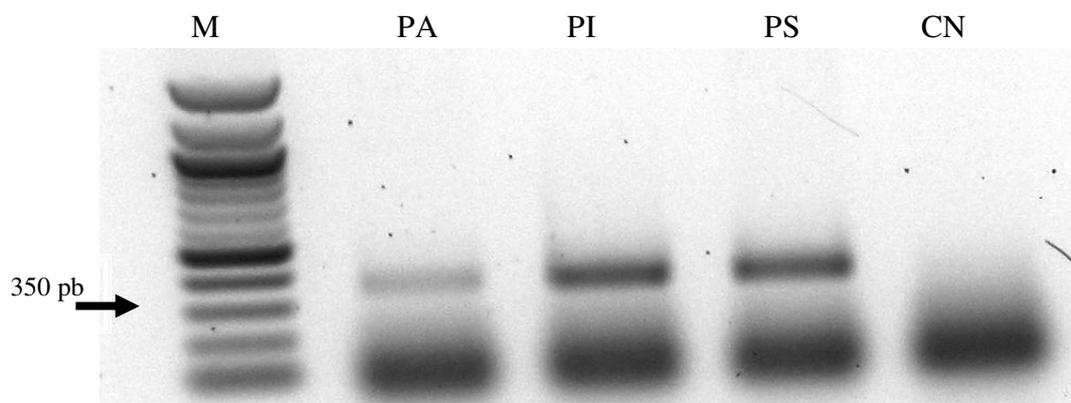


Figura 15 *Amplicon* em 350 pb para plantas assintomáticas (PA), planta com sintomas iniciais (PI) e plantas com sintomas severos (PS). (CN) Planta sadia e (M) Marcador de peso molecular 100pb.

As plantas assintomáticas, consideradas sadias, mas infectadas na detecção por RT-PCR, provavelmente ainda não haviam desenvolvido os sintomas devido à ausência da cochonilha, considerada como coparticipante na evolução dos sintomas (PERON, 2010). Outros fatores, como o tipo de estirpe de vírus presente e a tolerância da cultivar, também podem estar relacionados.

Nas plantas com sintomas iniciais de murcha, foi comum observar as cochonilhas. Esse comportamento é frequentemente observado nas plantações comerciais. As cochonilhas migram das plantas que apresentam sintomas de murcha para as plantas vizinhas, formando as reboleiras.

Foi verificado que tanto nas plantas sintomáticas como nas assintomáticas havia infecção viral. Essa condição é preocupante, já que plantas assintomáticas frequentemente são utilizadas para a produção de mudas. A utilização dessas mudas como material propagativo tem disseminado a doença, ressaltando a importância em rever a gestão do manejo das mudas convencionais que são comercializadas e usadas para novos plantios e que podem estar disseminando o vírus para novas áreas.

Pelos resultados ficou demonstrado que a técnica de RT-PCR usando *primers* degenerados é útil para detectar se mudas ou plantas adultas sem sintomas estão infectadas. O tempo de diagnóstico é menor e menos oneroso, já que apenas em uma reação é possível classificar a amostra em doente ou sadia, pois o *amplicon* é caracterizado pela presença de um ou mais estirpes presentes. Fazendo uso dos *primers* específicos, são necessárias, pelo menos, três reações PCR para avaliar a presença do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3.

4.4 TEMPO E CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO ENTRE A COLETA DAS AMOSTRAS E A REALIZAÇÃO DA ANÁLISE

O diagnóstico por RT-PCR em folhas de uma mesma planta doente, colhidas em intervalos de 0, 12, 24, 48 e 72 horas antes da extração, confirmou a presença do vírus apenas nas amostras processadas até 48 horas da análise (Figura 16). As

folhas coletadas foram armazenadas a temperatura ambiente a 30°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) até o momento da extração.

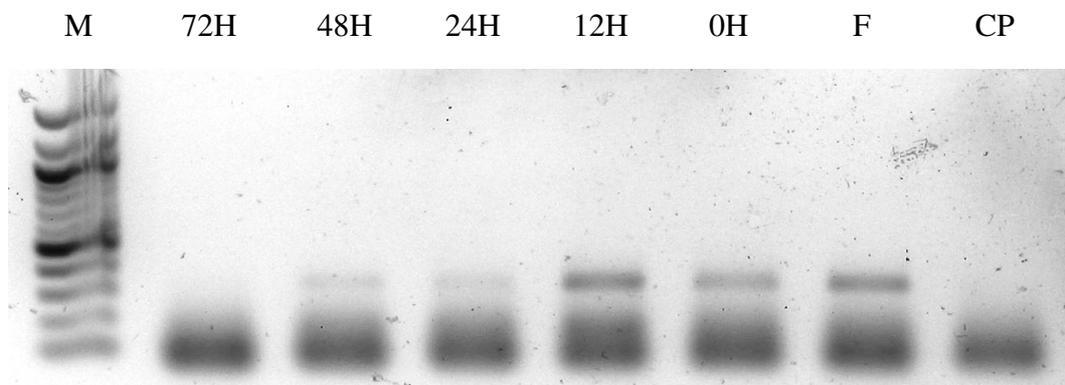


Figura16 Detecção do vírus em relação ao tempo de processamento das folhas para análise por RT-PCR. (F) controle positivo a partir da planta sintomática e (CN) controle negativo a partir da planta sadia, coletadas no momento da extração. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

Esses resultados sugerem que o tempo para o diagnóstico do vírus em amostras coletadas no campo e mantidas em condições de ambiente seja no máximo de 48 horas. O agricultor pode transportar as amostras em sacolas limpas e com furos, ou em papel, como sugerido por Souza e colaboradores (2010).

Segundo Sether (1998), o vírus pode ser detectado nas folhas destacadas do abacaxizeiro até 15 dias após a remoção das plantas. Porém não foi descrito em que condições essas amostras foram armazenadas e de que região da folha foi realizada a extração.

As análises realizadas 30 dias após o armazenamento das folhas mostraram que, em ambas as temperaturas, a -20°C do freezer e a -80°C em ultrafreezer, foi confirmada a viabilidade do vírus (Figura 17). Contudo, as amostras devem ser retiradas do armazenamento e imediatamente trituradas, para evitar descongelamento e, conseqüentemente, degradação.

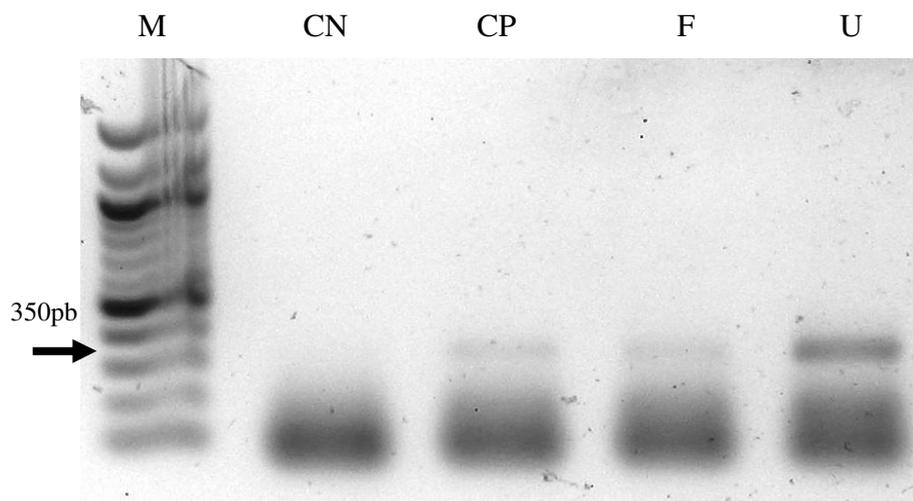


Figura 17 *Amplicon* em 350pb para *primer* genérico característicos de folhas armazenadas em freezer à temperatura de -20°C (F) e ultrafreezer a -80°C (U) por 30 dias. (CP) Folha fresca como controle positivo e (CN) folha fresca de planta sadia. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

O acondicionamento das folhas é importante para reduzir a respiração, a transpiração e a atividade enzimática da amostra, devendo ocorrer com a maior brevidade possível. Por isso, o ideal é que o material vegetal chegue ao laboratório ainda fresco, de preferência no mesmo dia da coleta, para iniciar os testes ou armazenar as amostras recebidas do campo em freezer ou ultrafreezer para posterior análise ou mesmo como prova legal em análises oficiais fitossanitárias.

4.5 DETECÇÃO DO VÍRUS EM DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA

As raízes e a parte aclorofilada na base das folhas são utilizadas para detecção do vírus no abacaxizeiro. Isso pode estar relacionado com o comportamento alimentar das cochonilhas (JANH et al., 2003).

Neste estudo foi verificado que, na parte clorofilada da folha, também se encontra o complexo viral (Figura 18). Foi observado *amplicon* em 350pb para área clorofilada, assim como no controle positivo da região aclorofilada da mesma planta, indicando infecção viral. A parte apical, mediana e próxima à aclorofilada da folha foram avaliadas, e o resultado, positivo. A metodologia foi a mesma, sendo o método de extração mais eficiente do Trizol®. Com o método de Doyle e Doyle, é necessário

fazer duas etapas de purificação com clorofórmio para retirar a clorofila, aumentando o tempo de extração e o custo, e favorecendo a perda dos RNAs do vírus.

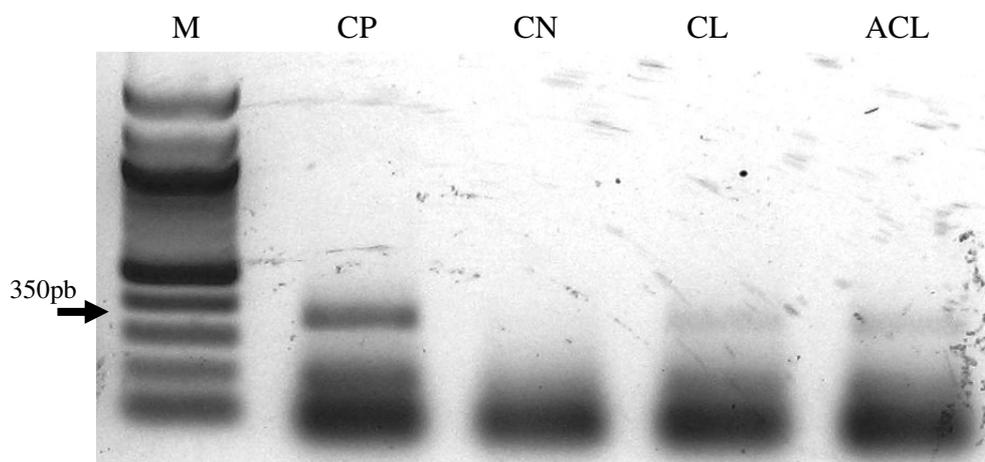


Figura 18 *Amplicon* em 350pb característico do complexo viral da região clorofilada da folha (CL) e regiãoa aclorofilada (ACL). Controle positivo, a região aclorofilada da planta doente (CP), e a mesma região da planta sadia, controle negativo (CN). (M) Marcador de peso molecular 100pb.

A infecção em outras partes da folha pode ser explicada pela distribuição do vírus na planta de célula-célula pelos plasmodesmas (ZERBINI et al., 2005 apud TEIXEIRA, 2008). O movimento das cochonilhas, principalmente na fase larval, também pode favorecer a disseminação do vírus (SANCHES; MATOS, 2007).

Analisando outros órgãos da planta, também foi observada a presença do PMWaV (Figura 19). Na raiz foi identificado o vírus, assim como na folha “D”, conforme proposto por Peron (2009). Analisando as folhas “C” e “E” (folhas novas da planta), observou-se a presença do vírus. A explicação dessa distribuição do vírus pode estar no fato de que o PMWaV seja introduzido no floema pela alimentação das cochonilhas e movido sistemicamente, muitas vezes ao menor feixe vascular de outras folhas pelos vasos condutores (SETHUR; HU, 2002).

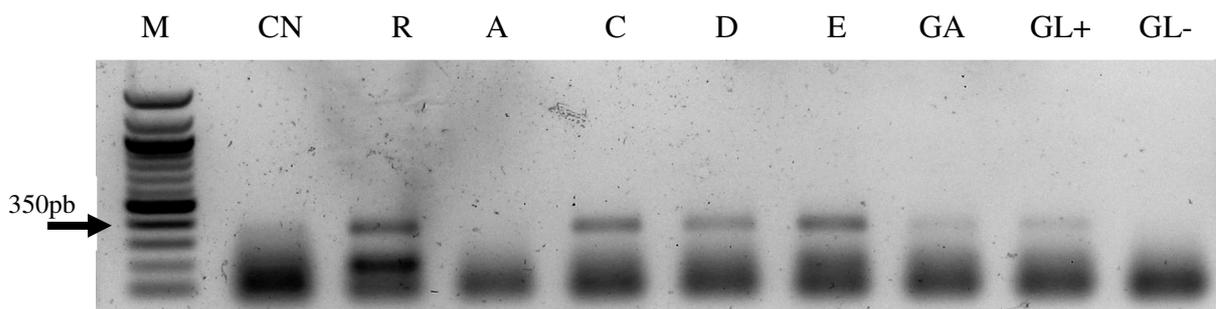


Figura 19 Órgãos analisados de abacaxizeiro doente utilizando *primers* degenerados (350 pb): (R) raiz, (A) folha velha, (C) folhas médias, (E) folha nova, (GA) Gema apical, (GL) Gema lateral. (CN) Folha D, planta sadia como controle negativo e (D) folha D, dessa planta doente como controle positivo. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

Na avaliação da folha "A", localizadas na região da base da planta, não foi possível identificar a presença do vírus nas plantas amostradas. Essas folhas são consideradas velhas ou adultas e já estavam presentes nas mudas por ocasião do plantio (MANICA, 2000). Alguns fatores intrínsecos ao hospedeiro e o comportamentos dos insetos sugadores podem estar relacionados a essa ausência do vírus. Folhas velhas podem conter substâncias deletérias, como os taninos. Segundo Santa-Cecília et al. (2001), fatores relacionados à fisiologia da planta, como mecanismos bioquímicos de defesa ao patógeno caracterizados pela presença de células com altas concentrações de substâncias tóxicas ou inibidoras, como os compostos fenólicos, podem constituir fortes barreiras microbianas.

A idade da planta hospedeira, a alimentação e a nutrição dos sugadores de seiva floemática estão relacionadas com a fisiologia e disponibilidade de nutrientes de toda a planta ou parte dela. Infestações *A. fabae* em beterraba-açucareira promovem o acúmulo de nitrogênio nas folhas novas e caule e diminuem nas folhas velhas e raízes. Pode haver diferença nos estratos de uma mesma planta, dependendo da idade da folha, de fatores bióticos e abióticos, ou da posição da folha em relação à sombra (PANZINNI et al., 2009).

A avaliação da presença do PMWaV também foi realizado nas gemas. Na região apical, foi verificada a presença do complexo viral da murcha do abacaxizeiro (figura 18). A justificativa pode ser a mesma para folhas infectadas. Zerbini et al. (2005, apud, Teixeira, 2008) sugerem que a distribuição do vírus na planta a longa distância ocorre por meio dos vasos condutores. Segundo Jahn et al. (2003), a concentração

de vírus na seiva da planta foi medida, demonstrando que não são as cochonilhas a causa direta da murcha do abacaxizeiro.

Nas gemas laterais, as avaliações não mostraram resultado conclusivo; em 50% das plantas testadas, foi encontrado o vírus. Isso pode ser explicado pela quantidade de amostra (são necessários 100mg para análise) e pela dificuldade de coleta da gema lateral. São válidos mais estudos para determinar se essa região está infectada, já que é usada como fonte de explantes para a cultura de tecidos. Acredita-se que, por não haver vasos condutores de floema no tecido meristemático, a infecção viral pode não ocorrer nas gemas. Segundo Sether e Hu (2002), o PMWaV nunca foi detectado em tecido fora dos feixes vasculares. O ideal seria fazer a análise nos tecidos meristemáticos, validando assim a produção de mudas *in vitro* com explantes obtidos de gemas. Porém existe fator limitante: a quantidade de tecido meristemático isento de áreas adjacentes contaminadas (PINTO et al., 2005).

Para validar os resultados negativos da folha "A" e na amostra proveniente de cultura de tecido (controle negativo), a partir do *primer* degenerado, foram realizados testes com *primer* da actina de planta e observado *amplicon* em 200pb, confirmando a integridade da metodologia (Figura 20).

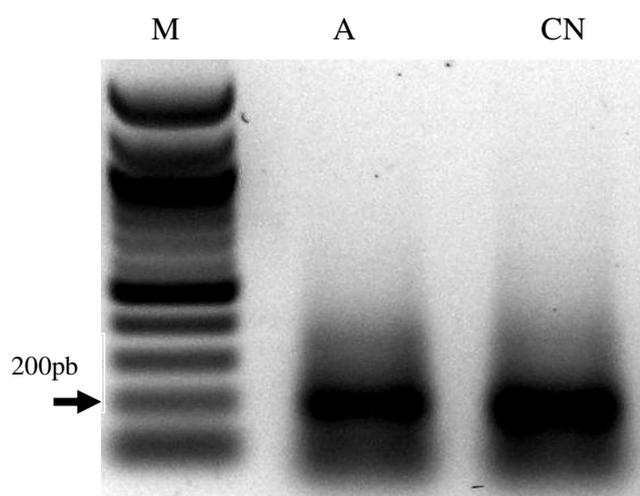


Figura 20 *Amplicom* em 200pb para *primer* da actina validando as amostras negativas da figura 12. (A) Folha velha, (CN) cultura de tecido do abacaxizeiro. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

4.6 DETECÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL EM CULTURA DE TECIDOS

A avaliação das amostras de cultura de tecidos obtidas do laboratório de cultura de Tecidos do Centro Regional de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano, do Incaper, Domingos Martins-ES, foi realizada pelo método Trizol®. Das 19 amostras analisadas, as dos genótipos EC-117, EC-160 e EC-171 apresentaram infecção pelo PMWaV (Tabela 3).

Tabela 3 Indexação para PMWaV por RT-PCR em genótipos provenientes de cultura *in vitro*, do laboratório de cultura de Tecidos do Centro Regional de Desenvolvimento Rural-Centro Serrano, do Incaper, Domingos Martins-ES.

GENÓTIPO	PMWaV ¹
EC-084	—
EC-088	—
EC-099	—
EC-101	—
EC-102	—
EC-106	—
EC-107	—
EC-112	—
EC-117	+
EC-154	—
EC-160	+
EC-163	—
EC-171	+
EC-174	—
EC-176	—
EC-177	—
EC-182	—
EC-186	—

+ Amostras com infecção do PMWaV; amostras negativas.

Para amostras de cultura de tecidos com resultado negativo para infecção viral, foi realizada avaliação com *primer* actina, mostrando que não houve interferentes ou degradação das amostras durante a metodologia (Figura 21).

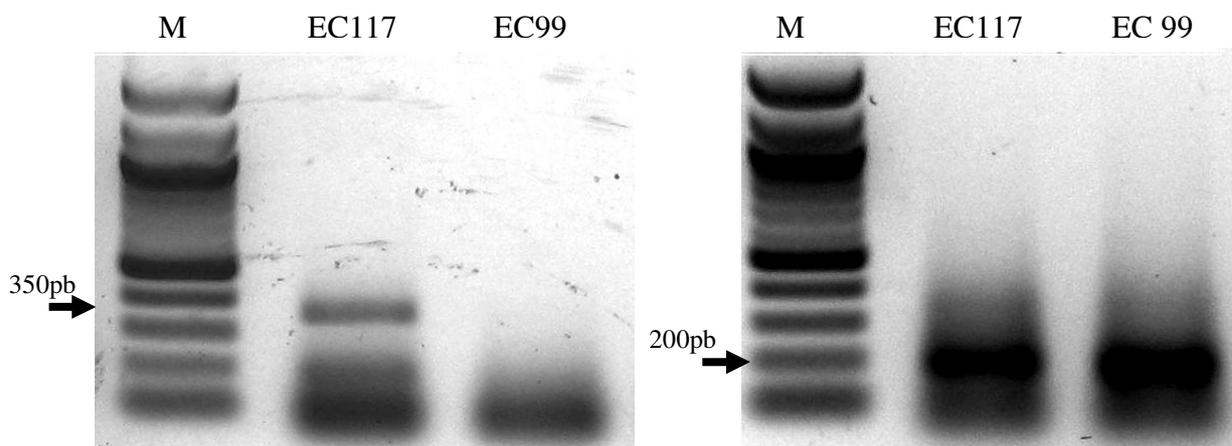


Figura 21 Gel da cultura de tecidos com *primer* degenerado, *amplicon* em 350pb, para EC-117, amostra infectada, e ausência de banda para EC-99, não infectada. Com *primer* da actina, *amplicon* em 200pb, para amostra EC-117 e EC-99. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

Para validar a análise, nas amostras do genótipo EC-117 foram então realizadas cinco repetições, das quais duas se apresentaram sadias e três infectadas. Para o genótipo EC-160, três amostras foram selecionadas, obtendo-se, por RT-PCR, uma amostra sadia e duas infectadas. Os acessos de EC-117 e EC-160 são provenientes de plantas no campo do mesmo genótipo, híbrido PE x SC-52, resistente a fusariose, com a coleta das gemas para cultura *in vitro* realizada em anos diferentes, 2006 e 2008, respectivamente. O resultado positivo nas duas amostras evidencia que possivelmente essas plantas já estivessem infectadas no campo, mas assintomáticas. Os acessos EC-99 e EC-101 foram provenientes de plantas cultivadas na mesma área experimental em parcelas vizinhas do híbrido EC-117, contudo estavam isentas de vírus, como mostrado por RT-PCR. Entretanto, a amostra EC-171, cultivada na mesma área, mostrou infecção para uma amostra e negativa para outra, advertindo que as repicagens ao acaso dos explantes em um mesmo frasco não garantem culturas limpas (Figura 22).

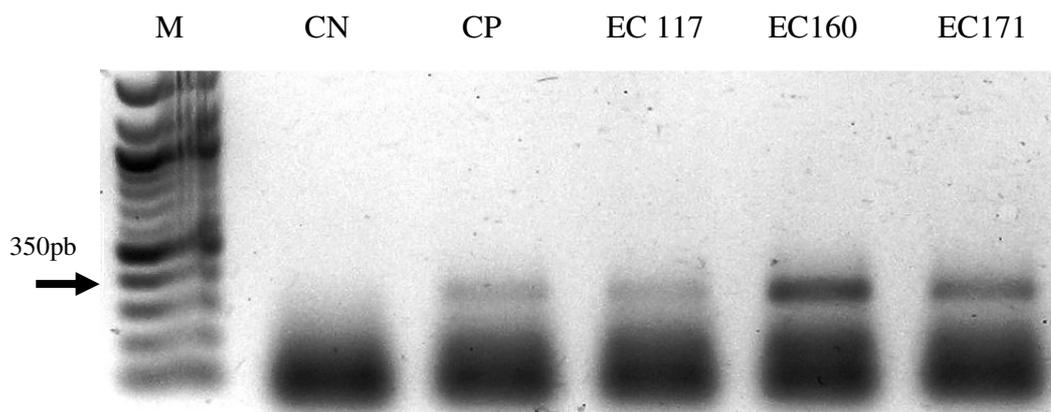


Figura 3 Gel de amostras da cultura de tecidos com *primers* degenerados, *amplicon* em 350 pb, para EC-117, EC-160 e EC-171. Controle negativo (CN) em cultura de tecido sadia, e controle positivo (CP), planta doente. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

Para as amostras dos genótipos EC-102 e EC-106, com ausência vírus, foram realizados seis novos testes e verificada a continuidade do resultado negativo. Isso reafirma que não há distribuição uniforme do vírus em repicagens ao acaso. Os repiques originados de calos, frequentemente presentes em abacaxizeiros na cultura *in vitro*, podem gerar subcultivos limpos, decorrentes da sua estrutura formada por tecido desorganizado, ou seja, ainda não contêm vasos condutores e, conseqüentemente, não contêm vírus. Meristemas ou mesmo gemas pequenas transplantadas também podem resultar em culturas isentas de vírus.

Vale investir em novos estudos para avaliar se sucessivas repicagens originam cultura limpa. A produção de subculturas de calos também deve ser estudada. Essas análises podem ser realizadas pela técnica desenvolvida neste trabalho.

Sether (2001) mostra que o tratamento das coroas com calor antes da excisão das gemas não garantiu que as subculturas ficassem livres de PMWaV. Sugere ser o corte da gema com 1 mm ou menor o fator crítico para obter plantas livres de vírus. Em estudos posteriores, o mesmo autor demonstrou que PMWaV-1 pode ser eliminada por meio da propagação de gema apical e axilares em coroas infectadas (SETHET, 2005). Entretanto, os resultados do presente trabalho sugerem que a produção de cultura de tecidos de gemas não garante que todas as amostras sejam isentas de vírus. A produção da cultura do tecido meristemático talvez seja solução, devido à ausência de vasos condutores e, conseqüentemente, sem vírus conforme

relatos da literatura. No entanto, quanto menor explante, maior a dificuldade de obter as respectivas plântulas (PINTO et al., 2005).

Uma alternativa seria implementar a metodologia desenvolvida neste trabalho, utilizando *primers* degenerados para indexação de mudas produzidas em laboratórios de cultura de tecidos e garantindo assim a utilização de mudas sadias, para atender à Legislação Fitossanitária.

4.7 DETECÇÃO DO PMWaV EM COCHONILHAS

4.7.1 Isolamento do RNA viral no inseto

Foi possível padronizar a técnica de RT-PCR para diagnóstico do PMWaV na cochonilha. A metodologia foi semelhante à utilizada nas plantas, com diferenças no isolamento do RNA total em relação à quantidade de amostra, à coleta e aos métodos de extração utilizados.

Dos métodos testados, os de Gibbs e Mackenzie e Trizol® foram os que possibilitaram amplificação do RNA do vírus. Ambos os protocolos podem ser aplicados; a diferença está na menor toxicidade e custo por análise para o Gibbs e Mackenzie. O reagente Trizol® é composto por fenol e isocianato de guanidina, que promove o rompimento da célula e, concomitantemente, protege o RNA contra degradação. O protocolo de Gibbs e Mackenzie se baseia no rompimento celular devido ao detergente CTAB a 2%, e não faz uso do fenol. Em relação ao tempo de execução, as técnicas se equivalem.

A corrida de eletroforese apresentou bons resultados com diferentes quantidades de inseto para os dois métodos de extração (figura 23).

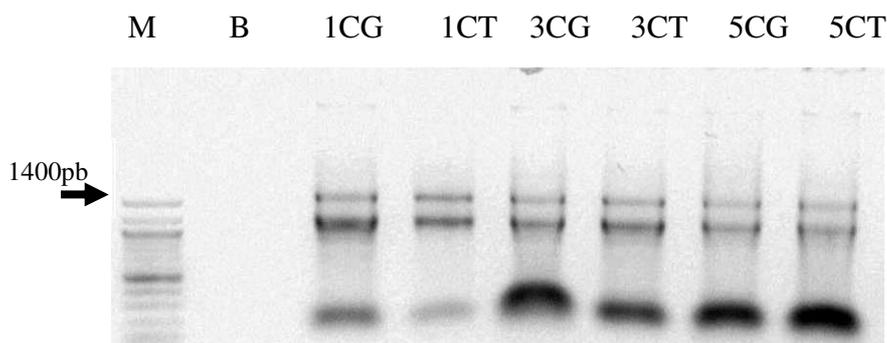


Figura 4 Gel de extração dos protocolos de Gibbs e Mackenzie (G) e reagente Trizol (T) para diferentes quantidades de cochonilhas (1C, 3C e 5C). (M) Marcador de peso molecular 100pb.

A concentração e a qualidade do extrato requerida às reações de RT-PCR também foram determinadas para avaliar as condições da extração. Os dois métodos geraram produtos de boa qualidade e quantidade (Tabela 4). Observa-se que, quanto maior a quantidade de insetos, maior a concentração de RNA total e que a qualidade das amostras se mantém. Além disso, Sether e colaboradores (2001) conseguiram amplificação viral de 50 insetos, utilizando kit comercial de extração para RNA. Todas essas informações induziram pensar que, utilizando muitos insetos, o isolamento do vírus seria mais garantido devido à baixa carga viral nas amostras. Entretanto, nas amostras com um número superior a três cochonilhas, não foi possível obter *amplicon* do vírus por RT-PCR.

Tabela 4 Resultados obtidos por espectrofotometria de UV na comparação de dois protocolos com diferentes quantidades de cochonilha, para determinar o grau de pureza e a concentração média de RNA total.

Nº cochonilha/protocolo	Concentração de ácidos nucleicos (ng/100mg) ¹	Grau de pureza (A260/A280) ¹	Concentração de RNA total (ng/μl) ¹
1C/ Gibbs e Mackenzie	603	1,8	60
1C/ Trizol®	774	1,88	66
3C/ Gibbs e Mackenzie	808,5	2,02	174
3C/ Trizol®	927	1,84	136

¹ Média de três repetições obtidas de 24 insetos.

Provavelmente a explicação seja a concentração de corantes nas amostras proveniente da constituição das cochonilhas. Foi observado que quanto maior o número de insetos maior a intensidade de cor no extrato. Mesmo aumentando as etapas de purificação em ambos os métodos de extração não foi possível limpar o

pellet, além de aumentar as chances de perdas de RNA viral que já era escasso. Amostras que contém fenol ou substâncias com estrutura semelhante, como os corantes encontrados em cochonilhas, podem ser fortes interferentes na reação de PCR.

Segundo Panzzini et al. (2009), os constituintes da saliva de insetos são produtos da dieta não utilizados, que são absorvidos para dentro da hemolinfa e, em seguida, para as glândulas salivares por meio das quais são excretados. Assim, o excesso de água e de aminoácidos absorvidos da dieta, corantes e muitos metabólitos radioativos podem ser recuperados na saliva, indicando a função excretora. Pode ser também dessa forma a obtenção de substâncias pelos insetos que interferem na PCR.

Assim o passo fundamental para detecção viral do inseto é a quantidade de cochonilha. Por meio dos métodos de Gibbs e Mackenzie ou Trizol[®], utilizando apenas um inseto, a amplificação do RNA viral foi perfeita.

Outras etapas do protocolo também sofreram pequenas alterações, quando comparado em plantas. A coleta dos insetos foi realizada diretamente no tubo, seguida da trituração da cochonilha diretamente no reagente ou tampão. Isso tornou ágil o processo e diminuiu as chances de degradação do RNA, o que é frequente para as plantas nessa etapa. A quantidade de Trizol[®] foi reduzida à metade, quando comparado com extrações em plantas. Em relação às condições de armazenamento e tempo após a coleta dos insetos, novos estudos devem ser realizados, já que as cochonilhas utilizadas neste trabalho eram coletadas vivas dos abacaxizeiros no momento da extração.

4.7.2 Diagnóstico viral por RT-PCR

Após a extração do RNA total e tratamento com DNase conforme protocolo para plantas, prosseguiu-se para RT-PCR. A metodologia empregada foi a mesma. Como controle positivo, foram utilizadas plantas doentes das quais as cochonilhas foram retiradas. Usando-se o par de *primers* degenerados para complexo PMWaV, foi

observado *amplicon* em 350pb referente ao vírus tanto no vetor (cochonilha) quanto na planta hospedeira da qual foi obtida. A mesma banda foi verificada no controle positivo, planta infectada, e não foi observada no controle negativo, planta sadia. As plantas controles foram selecionadas previamente também pela técnica de RT-PCR (Figura 24).

Pela primeira vez no Brasil, foi detectada, por meio de técnicas moleculares, a presença do complexo viral causador da murcha do abacaxizeiro em cochonilhas *Dysmicoccus brevipes*. Esse resultado é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença no campo e previsão da ocorrência potencial da doença, mediante a análise da população dos insetos vetores presentes nas áreas de plantio.

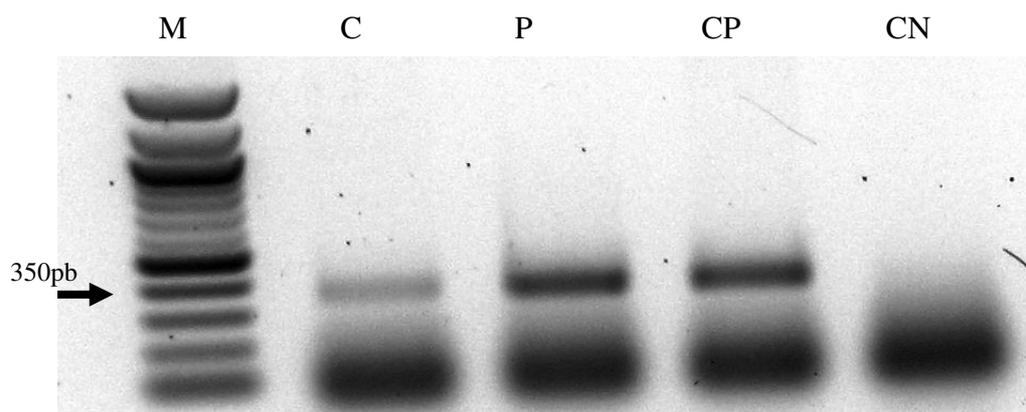


Figura 54 *Amplicon* em 350 pb do *primer* genérico para controle positivo da planta doente (CP), controle negativo de planta sadia (CN), planta doente da qual foi retirado inseto (P) e cochonilha (C). (M) Marcador de peso molecular 100bp.

As três estirpes do vírus, PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, encontradas em abacaxizeiros do Espírito Santo, conforme demonstrado por Peron e colaboradores (2009), foram confirmadas neste estudo por meio de *primers* degenerados e específicos e também foram encontradas nos insetos por RNA extraído de diferentes métodos de extração (Figura 25). Os resultados obtidos de *primers* específicos reafirmam que o vírus está presente às cochonilhas, indicando ser de fato a *D. brevipes* um dos seus vetores.

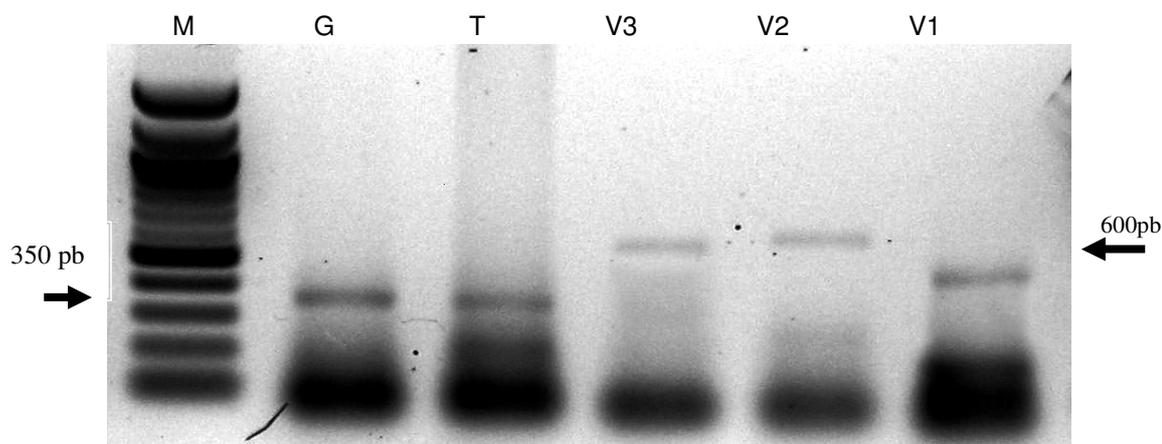


Figura 65 *Amplicon* do *primer* genérico em 350pb característico do PMWaV, pelos protocolos de extração de (D) Gibbs e Mackenzie e (T) reagente Trizol. (V1) vírus 1 (495 pb), (V2) vírus 2 (609pb) e (V3) vírus 3 (600pb) em cochoniha. (M) Marcador de peso molecular 100pb.

Os resultados também indicam que o diagnóstico molecular seja mais eficiente no inseto. Foi observado que, em apenas um inseto, havia a presença das três estirpes do PMWaV, mostrando que o diagnóstico específico das estirpes pode ser realizado nas cochonilhas. Isso pode ser explicado em razão do movimento do inseto na planta, sugando diferentes áreas, e de a avaliação na planta ser mais localizada. A análise no inseto também é mais simples devido ao processo de extração e mostrou-se mais segura para diagnóstico de infecção viral na plantação.

Foi observada no decorrer dos experimentos com plantas e insetos a especificidade dos métodos de extração para determinadas amostras, assim como a utilização de oligonucleotídeos degenerados nas análises para obtenção de resultados confiáveis. Essa informação é de grande relevância já que possibilita a escolha do método de diagnóstico no vetor e nas diferentes partes das plantas, levando em consideração as condições de armazenamento das amostras e a realização das análises com menor custo (Tabela 5).

Tabela 5 Características dos protocolos de extração no que se refere a custo, material utilizado e toxicidade.

Protocolo	Fenol	Tempo execução	Custo	Material indicado
Doyle e Doyle	Utiliza	14 horas	oneroso	Região aclorofilada
Gibbs e Mackenzie	Não utiliza	2 horas	menor	Cochonilha
Trizol	utiliza	2 horas	mediano	Região clorofilada, cultura tecidos, raiz e cochonilha

Nas análises com os insetos recomenda-se a utilização do método de Gibbs e Mackenzie, que é eficiente e utiliza no processo reagentes com menor toxicidade e menor custo. Em relação a amostras provenientes de planta ou de cultura de tecidos deve-se utilizar o método de Trizol® modificado. A escolha do método de extração ideal à amostra, aliado a utilização de oligonucleotídeos degenerados faz da metodologia de diagnóstico do complexo viral ser mais acessível financeiramente, confiável e suficiente para seleção de mudas saudáveis para propagação do abacaxizeiro. Além disso, disponibiliza uma metodologia de diagnóstico aos Laboratórios que os permite atender as exigências da Portaria nº 47 de 02 março/2009 do Ministério da Agricultura, para a comercialização de mudas de abacaxizeiros com nível zero de tolerância ao PMWaV.

5 CONCLUSÕES

A metodologia para detecção do complexo viral no abacaxizeiro utilizando *primers* degenerados foi padronizada, apresentando eficiência e com custo de execução inferior à utilização de *primers* específicos.

Verificou-se que a origem da amostra interfere nos resultados. Para amostras de culturas de tecido *in vitro*, tecido foliar da região clorofilada e da raiz, o melhor resultado foi obtido com a utilização do protocolo de extração do Trizol®, e para tecidos da parte aclorofilada das folhas o método de Doyle e Doyle modificado. Nas amostras coletadas de plantas no campo, a utilização destes métodos foi possível detectar o vírus em diferentes partes da planta, como raiz, folhas jovens, gemas apicais e região clorofilada das folhas. Nas folhas mais velhas das plantas (“A” e “B”), não foi possível detectar os vírus.

As amostras quando mantidas em condições ambientes devem ser processadas no laboratório em até 48 horas após a coleta. Entretanto, quando armazenadas em freezer com temperatura entre -20°C e -80°C, as amostras podem ser processadas ou utilizadas em contraprovas por até 30 dias.

Plantas sem sintomas de murcha (assintomática) não garantem ausência do vírus, sugerindo que mudas dessas plantas estejam infectadas, sendo importante forma de disseminação da doença para outras plantações.

Na indexação de plantas em cultura de tecidos, foi detectada a presença do vírus em 15% das amostras avaliadas, evidenciando que mudas de cultura de tecidos poderão contribuir para a disseminação da doença, havendo assim a necessidade da sua certificação para atender às exigências fitossanitárias.

A técnica para diagnóstico viral ficou padronizada em cochonilhas usando tanto *primers* degenerados quanto específicos. Sendo possível a detecção do vírus a partir do protocolo de extração de Gibbs e Mackenzie e reagente Trizol®.

Pela primeira vez foi detectado o PMWaV em cochonilhas da espécie *Dysmicoccus brevipes*, considerado vetor do vírus. Esse resultado é importante para estabelecer estratégias de manejo da doença no campo. Foi observado também que em apenas um inseto havia a presença das 3 estirpes do PMWaV, indicando que, o diagnóstico específico das estirpes pode ser realizado nas cochonilhas.

Uma nova metodologia desenvolvida nesta pesquisa mostra-se viável para o diagnóstico da doença e indexação de material propagativo, bem como a detecção dos vírus nos insetos vetores.

6 REFERÊNCIAS

- Ampelovirus. ViralZone. Disponível em: <http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/285.html>. Acesso em: 20 fev. 2011.
- BARTHOLOMEW. **The Biology OF *Ananas comosus var. comosus* (Pineapple)**. Australia, 2008.
- BARBOSA, M.C. **Atuação do ácido naftoxiacético, ácido indolbutírico, ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro “gomo-de-mel”**. 2009. Dissertação (Mestrado) - ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”, Piracicaba, 2009.
- BEARDSLEY, J.W. The pineapple mealybugs complex; taxonomy, distribution and relationships. **Acta-hortic**. Leuven, v. 334, p. 383-386, 1993.
- BEN-DOV, Y. *Dysmicoccus brevipes*. **ScaleNet**, 2004. Disponível em: <<http://198.77.169.79/catalogs/pseudoco/Dysmicoccusbrevipes.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2011.
- BOEVINK, P.; OPARKA, K.J. Update on Virus-Host Interactions during Movement Virus-Host Interactions during Movement Processes. **Plant Physiology**. Lancaster, v.138, p.1815-1821, 2005.
- BOGO, A.; MANTLE, P. Oligossacarídeos em *honeydew* das Cochonilhas *Coccus hesperidum* L. e *Stigmacoccus* sp. no Brasil. **An. Soc. Entomol. Bras.** v.29, n.3, p. 589-595, 2000.
- BORROTO-FERNANDEZ, J.A.; COSTA, T.A.; LAIMER, M. RT-PCR Detection and protein-protein interaction of viral components of *pineapple mealybug wilt associated virus 2* in Cuba. **Journal of Plant Pathology**. Pisa, v.89, n.3, p.435-439, 2007.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA, 1998.
- CABRAL, J.R.; SOUZA, J.S.; FERREIRA, F.R. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2000.
- CARVALHO, R.Z.; LAZZARI, S.M.N. **Sugadores de seiva (Aphidoidea)**. EMBRAPA. Brasília, p. 771-772, 2009.
- CASTRO H.S. **Ecotoxilogia de *Bacillus thuringiensis***. KL3. Brasília. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n. 38, ano XI, 2010.

CARTER, W. Review: ants and pineapple mealybug wilt. The Pineapple Mealybug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology**. St Paul, v. 23, p. 207–242, 1933a.

CARTER, W. Some etiological aspects of mealybugs wilt. **Phytopathology**. St Paul, v. 35, p. 305-315, 1945.

CHAVES, A.L.R. **Interação do *Lettuce mosaic virus* (LMV) x Afídeos vetores nas regiões produtoras de alface (*Lactuca sativa* L.) do cinturão verde de São Paulo**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto Biológico, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

CHOAIRY, S.A.; OLIVEIRA, E.F. de; SANCHES, N.F. **Pragas do abacaxi e seu controle**. Circular Técnica. João Pessoa. Embrapa/EMEPA, 1984. 22p. (EMEPA Circular Técnica, 2).

COSTA, A. M.; MARTINS, C. **Estrutura e evolução dos genomas**. Informação Tecnológica. Embrapa Cerrados. Brasília, 2009.

CULIK, M. P. ; VENTURA, J. A. Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of pineapple in the State of Espírito Santo, Brazil. **Acta Horticulturae**. Leuven, v. 822, p. 215-218, 2009.

CULIK, M. P.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A.; WOLFF, V. R. S. Diaspididae (Hemiptera: Coccoidea) of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Insect Science**. Tucson, v. 8, p. 1-6, 2008.

CULIK, M.P., MARTINS, D.S., VENTURA, J.A., PERONTI, A.L.B.G., GULLAN, P.Y. & KONDO, T. Coccidae, Pseudococcidae, Ortheziidae, e Monophlebidae (Hemiptera: Coccoidea) do Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**. Campinas. v.7, n.3, 2007.

CULIK, M. P.; PENNY J. GULLAN, J.P. A new pest of tomato and other records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Espírito Santo, Brazil. **Zootaxa**. London, v. 964, p. 1–8, 2005.

CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. **Abacaxi para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa, 1994. 41p.

DOUGLAS, N., KRÜGER, K. Transmission efficiency of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Europa Journal Plant Pathology**. South Africa, v.122, p.207–212, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. Gaithersburg, v.12, p. 13-15, 1990.

DOWNIE, D.A.; GULLAN, P.G. Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher Classification. **Systematic Entomology**. Oxford, v.29, p.238–259, 2004.

FRANCO, J.C., SILVA, E.B.; CARVALHO, J. P. **Cochonilhas-algodão (Hemiptera: Pseudococcidae) associadas aos citrinos em Portugal**. ISA. Lisboa, 2000.

GAMBLEY, C.F., STEELE, V., GEERING, A.D.W.; HOMAS, J.E., The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australian Plant Pathology**. South Perth, v.37, p.95-105, 2008a.

GIACOMELLI, E.J. **Curso de abacaxicultura em nível de pós-graduando: resumo das aulas teóricas**. Recife: UFRP, 1969. 89p. Mimeografado.

GILL, R.J. Pineapple mealybug *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell). 1976. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5119040>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

GÓIS, L.A.P. **Diversidade de microsporídeos (Microsporidia) em cochonilhas (Homoptera; Pseudococcidae; Planococcus citri) praga de citrinos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental) - Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Animal Universidade de Lisboa, Lisboa 2008.

GOMES, J.A.; VENTURA, J.A.; ALVES, F. de L.; ARLEU, R.J.; ROCHA, M.A.M.; SALGADO, J.S. **Recomendações técnicas para a cultura do abacaxizeiro**. Incaper, 28p. (Documentos, 122). Vitória, 2003.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C. Consumo alimentar de *Chrysoperla externa* sobre as diferentes fases de desenvolvimento de *Dysmicoccus brevipes*, em laboratório. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, v.36, n.2, 2001.

GUTIERREZ, M. A. P. **Interação inseto-planta**. EMBRAPA. Brasília, p. 221-222, 2009.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. **Phytopathology**. St Paul, v.79, n.12, p.1337-1341, 1989.

HAMBLETON, E.J. **Notas sobre Pseudococcinae de importância econômica no Brasil com a descrição de quatro espécies novas**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.6, n. 13, p. 105-120, 1935.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). SIDRA (Sistema IBGE de Recuperação Automática). **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso: 12 dez. 2010.

ITO, K. Additional immunological evidence supporting the vírus nature of mealybugs wilt. **Pineapple Reserch Institute News**, v. 10, p. 158-162, 1962.

JANH, G. C. Gray pineapple mealybugs, *Dysmicoccus neobrevipes* Baerdsley (Homoptera: Pseudococcidae), inside closed pineapple blossom cups. **Proc. Haw. Entomol. Soc.** Honolulu, v. 32, p. 147-148, 1995.

JANH, C.G.; BEARDSLEY, J. W.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H. A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. **Proc. Haw. Entomol. Soc.** Honolulu, v.36, p.9-28, 2003.

JRC. **Análise de amostras de alimentos na presença de organismos geneticamente modificados.** Sessão 4. Ispra, 2003.

KEHR, J.; BUHTZ, A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. **Journal of Experimental Botany.** Germany, v.59, n.1, p. 85–92, 2008.

KNIPE, D.M. HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.E., LAMB, R. A., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B., STRAUS, S.E. **Fields Virology.** 4ª ed., v. I e II, Filadelfia, 2002.

KUNIYUKI, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M.; WILLINK, C. G.; NOVO, J. P. S; YUK, V. A. Transmissão experimental do Grapevine vírus B pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). **Summa Phytopathologia.** Botucatu, v.32, n.2, 2006.

LACERDA, J. T.; CARVALHO, R.A.; OLIVEIRA, E. F. Cochonilhas *Dysmicoccus brevipes*: a praga cosmopolita da abacaxicultura. **Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v.3, n.2, p.15-21, 2009.

MACKENZIE, A.; GIBBS, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods.** Amsterdam, v.63, p.9-16, 1997.

MANICA, I. **Abacaxi: do plantio ao mercado.** Ed. Cinco Continentes. Porto Alegre, 122p., 2000.

MAU, R.F.L.; KESSING, J.L.M. ***Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)** - Extension Entomologist. Honolulu, 2007.

MATOS, A.P. **Abacaxi. Fitossanidade.** Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Cruz das Almas, 2000, 77p.

MATOS, A.P.; Reinhardt, D.H.R.C.; Cunha, G.A.P.; Cabral, J.R.S.; Souza, L.F.S.; Sanches, N.F.; Almeida, O.A. **A cultura do abacaxi.** Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2ª ed. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 91 p. (Coleção Plantar: 49).

MATOS, A.P.; SANCHES, N.F.; SOUZA, L.F. S; ELIAS JÚNIOR, E.; TEIXEIRA, F.A.; GOMES, D.C.; CORDEIRO, D. G. **Proposta de um sistema de produção**

integrada para a cultura do abacaxi. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 2007.

MELZER, M.J.; KARASEV, A.V; SETHER, D.M.; HU, J.S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. **Journal of General Virology.** London, v.82, p.1–7, 2001.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; BORTH, W; HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology Methods.** Holanda. v.153, p. 707-714, 2008.

MENEZES, E.B. **Bioecologia e controle de cochonilha-farinhosa do abacaxi, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893) Ferris, 1950.** Piracicaba. ESALQ-USP, 1973. 69p.

MILLER, D.R. Selected scale insect groups (HEMIPTERA: COCCOIDEA) in the southern region of the United States. **Florida Entomologist.** Gainesville, v. 92, p. 482-501, 2005.

MISSIURA, F.B. **Alterações metabólicas promovidas pelo Papaya ringspot virus – type W em plantas de melancia.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2005.

MORANDI FILHO, W. J. **Cochonilhas-farinhentas associadas à videira na Serra Gaúcha, bioecologia e controle de *Planococcus citri* (Risso,1813) (Hemiptera: Pseudococcidae).** 2008. 91f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

NAIS, J. **Aspectos biológicos de *Azya luteipes* Mulsant, 1850 (Coleoptera:Coccineliidae) em *Coccus viridis* Green, 1889 (Hemiptera:Coccidae).** 2008. 28f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

NIEHL, A.; HEINLEIN M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. **Protoplasma.** Wien, 2010.

PANZINNI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição dos insetos: Base para o manejo integrado de pragas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 1.164p.

PERON, F.N.; FERNANDES, P.M.B.; VENTURA, J.A. Detecção de PMWAV-1 e PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. **Tropical Plant Pathology.** Lavras-MG, v.34 (suplemento), p.268, 2009.

PERON, N.F. **Diagnóstico Molecular e Imunoenzimático de *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) em diferentes genótipos de abacaxizeiro.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropopagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/ FAEPE. Curso de Pós-Graduação – Plantas Medicinais: Manejo, Uso e Manipulação, 2005.

PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. **L'ananas, sa culture, ses produits**. Paris, 526p, 1984.

REINHARDT, D. H. **Abacaxi: produção, pós-colheita e mercado**. "In:" SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA. 11ª Fortaleza. Instituto Frutal, 2004. Fortaleza: Centro de Convenções, 2004.

REINHARDTE, D.H.; SOUZA, L. F. S. DA; CABRAL, J.R.S. **Abacaxi. Produção: aspectos técnicos**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2000, 77 p.

ROCHA, J.M. Combate às pragas do abacaxi. **São Paulo Agrícola**, São Paulo, v. 2, n. 17, p. 12, 1960.

SACCAGGI, D.L., KRUGER, K., PIETERSEN, G. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). **Bulletin of Entomological Research**, Pretoria, n. 98, p. 27–33, 2008.

SANCHES, N.F. **Manejo Integrado da Cochonilha do Abacaxi**. Abacaxi em Foco. n.35. Embrapa Mandioca Fruticultura Tropical. Cruz das Almas, 2005.

SANCHES, N.F.; DIAMANTINO, E.P. **Índices de infestação da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) em abacaxizeiro sob regime de irrigação**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 1997, Salvador, BA. Resumos. p.220. Sociedade Entomológica do Brasil, 1997.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; MATIOLI, J.C.; CIOCIOLA, A.I. Efeitos de fatores climáticos sobre a cochonilha-do-abacaxi *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893) (Homoptera, Pseudococcidae) nas principais regiões produtoras do Estado de MG. "In:" **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 13, 1991, Recife, PE. Resumos... Recife: SEB, p.181, 1991.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; CHALFOUN, S.M. Pragas e doenças que afetam o abacaxizeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.195, p. 49-57, 1998.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; REIS, P.R. **A cochonilha e a murcha do abacaxizeiro. Informe Agropecuário**. Lavras, v.130, n.11, p.37-41, 1985.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; ROSSI, M.M. Eficiência comparativa de alguns inseticidas e métodos de aplicação no controle da cochonilha-do-abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.6, p.843-848, 1991.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; SOUSA, B.M. de. Eficiência dos inseticidas Fenitrothion e Fenpropratrín em diferentes modalidades de aplicação no controle da cochonilha-do-abacaxi *Dysmicoccus brevipes* Cockerell, 1893 (Homoptera: Pseudococcidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.1, n.22, p.176-181, 1993.

SANTA CECÍLIA, L. V. C., GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C., SOUZA, B., SILVA, J. R. Teores de fenóis associados ao complexo cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (COCKERELL, 1893) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) versus Murcha-do-abacaxizeiro. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.25, n.2, p.467-470, 2001.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; COLEN, K.G.F.; MORAES, J.C.; BONETTI FILHO, R.Z.; CARNEVALE, A.B. Determinação de injúrias e danos da cochonilha pulverulenta *Dysmicoccus brevipes* (COCKERELL, 1893) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) ao abacaxizeiro. **Ciência agrotec.**, Lavras, v.25, n.3, p.525-532, 2001.

SANTA CECÍLIA, L.V.C.; REIS, P.R. A cochonilha e a murcha do abacaxizeiro. **Informe Agropecuário**, v.130, n.11, p.37-41, 1985.

SANTA-CECÍLIA, L.V. C; BUENO, V.H.P.; PRADO, E. Desenvolvimento de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.28, n.5, p.1015-1020, 2004.

SANTA CECILIA, L.V.C. **Efeitos de fatores climáticos e da época de plantio do abacaxizeiro sobre a cochonilha pulverulenta *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell,1893) (Homoptera: Pseudococcidae) nas principais regiões produtoras do Estado de Minas Gerais.** 1990. 114p. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1990.

SANTA CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, B.; SOUZA, J. C.; PRADO, E.; MOINO JUNIOR, A.; FORNAZIER, M. J.; CARVALHO, G. A. **Cochonilhas-farinentas em cafeeiros:** bioecologia, danos e métodos de controle. Belo Horizonte: CTSM-Epamig, 2007. 40 p. (Boletim técnico, 79).

SANTOS, K.C.; ANDRADE, E. C. **Detecção do vírus que causa a murcha do abacaxi através de rt-pcr, utilizando primers específicos e degenerados.** In: Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 3, Cruz das Almas: Embrapa, 2009, **Anais**,... Cruz das Almas: Embrapa, 2009.

SETHER, D. M.; BORTH, W. B.; MELZER M. J.; HU, J. Spatial and temporal incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. **Plant Disease**, St Paul, v.94, n. 2, p.196-200, 2010.

SETHER, D., M.; HU, J. S. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure Are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. **Phytopathology**. St Paul, n. 9, v. 92, p.928-935, 2002.

SETHER, D.M.; ULLMAN, D.M.; HU, J.S. Transmission of *Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus* by Two Species of Mealybug (*Dysmicoccus* spp.). **Phytopathology**. St Paul, v. 88, n. 11, 1998.

SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE, F.; KISLAN, M.M.; BUSTO, J.L.; HU, J.S. Differentiation, Distribution, and Elimination of Two

Different Pineapple mealybug wilt-associated viruses Found in Pineapple. **Plant Disease**. St Paul, v.85, n.8, p.856-864, 2001.

SETHER, D. M; MELZER, M.J.; BUSTO, J. Diversity and Mealybug Transmissibility of Ampeloviruses in Pineapple. **Plant Disease**. St Paul, v.89, n.6, p.450-456, 2005.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B.B.; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* with family Closteroviridae members. **Virus Genes**. Boston, v. 38, p. 414-420, 2009.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, R.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitas e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Serviço de Defesa Sanitária Vegetal, 1968.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, Weighting and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction Primers. **Entomological Society of America**. College Park, v. 87, n. 06, p. 651-701, 1994.

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, J. C.; PRADO, E. Cochonilhas-farinhas (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) em cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em Minas Gerais. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 104-107, 2008.

SU, S.; LIU, Z.; CHEN, C.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHU, L.; MIAO, L.; WANG, X.; YUAN, M. Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. **The Plant Cell**. Beijing, v. 22, p.1373-1387, 2010.

TEIXEIRA, F. N. **Leprose do Citros: interações planta x vírus x vetor**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2008.

ULLAH, G.M.R.; ALAM, M.S.; DAS, H.R. Some aspects of biology of pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Homoptera: Pseudococcidae). Chittagong. **University Studies Science**, v.17, n.1, p.77-81. 1993.

ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L.; GUNASINGHE, U.B.; EBESU, R.H. Serology of a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology**. St Paul, v.79, n.12, p.1341-1345, 1989.

VASCONCELOS, S. **Zoologia dos Invertebrados Superiores**. Lavras, 2008. Disponível em <http://www.den.ufla.br/Professores/Luis/Disciplinas/morfologia_interna.htm>. Acesso em: 03 set. 2010.

VENTURA, J. A., CABRAL, J. R. S., MATOS, A. P. de, COSTA, H. “Vitória”: nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Incaper, 4 p. (Documentos, 148), Vitória, 2006.

VENTURA, J. A.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P.; COSTA, H. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**. Leuven, v. 822, p. 51-54, 2009.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, v.2. 2002. p. 445-487.

VENTURA, J.A. & H. COSTA. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, banana e mamão, p. 279-352. In L. Zambolim (ed.) **Manejo integrado; fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa, UFV, 672p, 2002.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Sci.**, v.44, p.1920-1934, 2004.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.47, p.177-206, 2009.

WILLIAMS, D.J. A synopsis of the subterranean mealybug genus *Neochavesia* (Hemiptera: Pseudococcidae: Rhizoecinae). **Journal of Natural History**. Basel, v.38, n.22, p.2883-2899, 2004.

WILLIAMS, D.J.; GULLAN, P.J. Family-group names proposed in the family *Pseudococcidae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). **Zootaxa**. London, p.66–68, 2010.

WILLIAMS, D.J.; WATSON, G.W. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region: The Mealybugs (Pseudococcidae). **International Institute of Entomology**, London, v.260, 1988a.