



**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DO *Cowpea aphid-
borne mosaic virus* (CABMV) QUE INFECTAM
MARACUJAZEIROS**

NAASOOM LUIZ SANTOS MESQUITA

2020

NAASOOM LUIZ SANTOS MESQUITA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DO *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
(CABMV) QUE INFECTAM MARACUJAZEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. D.Sc. Quelmo Silva de Novaes

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA
BAHIA – BRASIL
2020

M545c

Mesquita, Naasoom Luiz Santos.

Caracterização de estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. (CABMV) que infectam maracujazeiros. / Naasoom Luiz Santos Mesquita, 2020.

55f.

Orientador (a): D. Sc. Quelmo Silva de Novaes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia. Vitória da Conquista, 2020.

Inclui referência F. 45 – 55.

1. Endurecimento dos frutos do maracujazeiro. 2. *Passiflora edulis*. 3. *Potyvirus*.
I. Novaes, Quelmo Silva de. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. T.

CDD: 634.425

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia

Campus de Vitória da Conquista - BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DO *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) QUE INFECTAM MARACUJAZEIROS**”.

Autor: Naasoom Luiz Santos Mesquita.

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:



Prof. Quelmo Silva de Novaes, D.Sc., UESB
Presidente



Prof. Alcebiádes Rebouças São José, D.Sc., UESB



Prof. Alessandro de Magalhães Arantes, D.Sc., IFBaiano

Data de realização: 19 de Fevereiro de 2020.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383 – Fax: (77) 3424-1059
– Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre cuida de todas as coisas;

Ao meu orientador, professor Quelmo Silva de Novaes, pelos ensinamentos, apoio, incentivo, confiança e por todos os momentos de descontração;

Ao professor Armínio, pelos ensinamentos, incentivo e pelos momentos de descontração;

Ao Geraldo, pela amizade e pelos ensinamentos;

A minha esposa Poliana, que sempre esteve comigo, cobrando-me e incentivando-me na realização dos trabalhos;

A minha filha Luiza, por todos os momentos de alegria, sempre me fazendo sorrir;

Ao meu amigo Elismar, pela convivência e conselhos;

Ao meu amigo Bismarck, pelo apoio e pelas conversas jogadas fora;

Aos meus colegas de laboratório: Josy, Evanilton, Ian, Natália, Raphael e Patrícia;

Aos meus colegas de Pós-graduação: Manoel, Zenóbia, Carol, Fabrício, Genilson, José Renato, Maída e Tâmara;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), pela contribuição.

RESUMO

MESQUITA, N. L. S. **Caracterização de estirpes de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) que infectam maracujazeiros.** Vitória da Conquista - BA: UESB, 2020. 55p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)¹.

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro, causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é considerado a principal doença virótica que afeta a cultura do maracujazeiro. O presente trabalho foi desenvolvido objetivando a caracterização de estirpes de CABMV, obtidos em pomares de maracujazeiro da região de Vitória da Conquista e Ituaçu, BA. Para a aquisição das estirpes, foram realizadas coletas de plantas sintomáticas e assintomáticas em áreas produtoras dessas localidades. A caracterização biológica consistiu no estudo da reação de diversas espécies vegetais inoculadas mecanicamente com os diferentes isolados. A presença ou ausência do CABMV foi confirmada por meio do teste sorológico ELISA, do tipo PTA. Para comprovação da etiologia das estirpes, realizou-se o teste molecular RT-PCR, com uma amostra de cada estirpe. A seleção visual de plantas que exibiam sintomas severos do CABMV a campo permitiu a seleção de três estirpes de CABMV, que exibem sintomas típicos de anéis, necrose e encarquilhamento, sendo denominados de A, N e E, respectivamente. Por meio da seleção de plantas assintomáticas em lavouras severamente afetadas pelo CABMV, foram selecionadas duas possíveis estirpes fracas, denominadas FI e FII. A estirpe FI diferiu biologicamente das demais, apresentando mosaico amarelo ao ser inoculada em *Nicotiana benthamiana*, enquanto que, para as demais estirpes, verificou-se necrose sistêmica. A avaliação da severidade dos sintomas em acessos de maracujazeiro permitiu a classificação das estirpes em três grupos: fraco, formado pelas estirpes FI e FII; intermediário, formado pela estirpe A; e severo, formado pelas estirpes N e E.

Palavras-chave: Endurecimento dos frutos do maracujazeiro, *Passiflora edulis*, *Potyvirus*.

¹ Orientador: Quelmo Silva de Novaes, D.Sc., UESB.

ABSTRACT

MESQUITA, N. L. S. **Characterization of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) strains that infect passion fruit.** Vitória da Conquista - BA: UESB, 2020. 55p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia).

The passion fruit woodiness, caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), is considered the main viral disease affecting passion fruit crop. The present work was developed aiming at characterizing CABMV strains, obtained in passion fruit orchards of Vitória da Conquista and Ituaçu, BA. For the acquisition of viral strains, symptomatic and asymptomatic plants were collected in producing areas at these localities. The biological characterization consisted of studying the reaction of several mechanically inoculated plant species with the different isolates. Either the presence or absence of CABMV was confirmed by the PTA ELISA. To prove the etiology of the strains, the RT-PCR molecular test was performed, with a sample of each strains. Visual selection of plants that exhibited severe CABMV symptoms in the field allowed the selection of three CABMV strains exhibiting typical symptoms such as ring, necrosis, and curling of leaves, referred to as A, N, and E, respectively. By selecting asymptomatic plants in crops severely affected by CABMV, two possible weak strains were selected, namely FI and FII. The FI strain differed biologically from the others by showing yellow mosaic when inoculated in *Nicotiana benthamiana*, for the other strains there was systemic necrosis. The evaluation of the severity of symptoms in passion fruit accessions allowed the classification of isolates into three groups: weak, formed by strains FI and FII, intermediate, formed by strain A, and severe, formed by strains N and E.

Keywords: hardening of the passion fruit, *Passiflora edulis*, *Potyvirus*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Plantas utilizadas para filtrar e separar isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).....31
- Tabela 2** – Avaliação sintomatológica de plantas hospedeiras inoculadas com lesões locais de *Chenopodium amaranticolor*.....33
- Tabela 3** – Avaliação sintomatológica de plantas de *Passiflora edulis* enxertadas e inoculadas com plantas com sintoma de mosaico leve ou assintomáticas coletadas em campo (Ituaçu - BA).....34
- Tabela 4** – Avaliação sintomatológica e sorológica de plantas-teste inoculadas com extratos de bolhas obtidas de plantas de maracujazeiro infectadas por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).....35
- Tabela 5** – Avaliação sintomatológica e sorológica de plantas inoculadas mecanicamente com diferentes estirpes de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).....40
- Tabela 6** – Avaliação sintomatológica e sorológica de espécies e acessos de maracujazeiro inoculados com diferentes estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).....42
- Tabela 7** – Eficiência de transmissão mecânica do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) entre plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2 e *Canavalia ensiformis*.....43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Expressão de sintomas do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em plantas de maracujazeiro, mosaico leve (A), mosaico e bolhas (B), anéis (C), encurquilhamento (D) e necrose (E).....21
- Figura 2** – Preparo de inóculos para transmissão mecânica por meio da maceração de folhas de plantas infectadas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, em almofariz (A) e em sacos plásticos de polipropileno (B).....24
- Figura 3** – Expressão de sintomas em *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo inoculado com extrato de plantas de maracujazeiro infectadas pelo CABMV.....30
- Figura 4** – Sintomas em *C. amaranticolar* inoculados com extrato de plantas de maracujazeiro, infectadas por *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, que exibiam sintomas de mosaico leve (A e C), anéis (B) e necrose (D).....32
- Figura 5** – Expressão de sintomas em *N. clevelandii*, quando inoculada com estirpes de *Cowpea aphid borne mosaic virus* (A). *N. benthamiana*, exibindo mosaico (B) e necrose sistêmica (C). Aspecto geral de duas plantas de *N. benthamiana* inoculadas com a estirpe FI (à esquerda) e com as demais estirpes (à direita).....37
- Figura 6** – Expressão de sintomas em plantas de *Nicotiana rustica* (A) e *Datura stramonium* (B) inoculadas com a estirpe E de *Cowpea aphid borne mosaic virus*.....37
- Figura 7** – Expressão de sintomas em *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2 após inoculação com estirpes do CABMV, lesões locais necróticas (A), invasão sistêmica (B) e morte da planta (C).....38
- Figura 8** – Reação de plantas de *Crotalaria juncea* inoculadas com estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, planta assintomática (A), e com sintomas de mosaico (B).....39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 A cultura do maracujazeiro	10
2.2 Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro	12
2.3 Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)	14
2.4 Detecção de vírus em plantas	16
2.4.1 Gama parcial de hospedeiros	16
2.4.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	17
2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Obtenção e filtragem das estirpes virais	20
3.2 Caracterização biológica	23
3.2.1 Plantas-teste	23
3.2.2 Inoculação mecânica	23
3.2.3 Fonte de inóculo	24
3.3 Avaliação quanto à sintomatologia	25
3.4 Detecção por PTA-ELISA	25
3.5 Eficiência da transmissão mecânica	26
3.6 Detecção molecular	27
3.6.1 Extração de ácido nucleico	27
3.6.2 Reação de RT-PCR	27
3.6.3 Purificação do produto da PCR e sequenciamento	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Obtenção dos isolados virais	29
4.2 Filtragem em diferentes hospedeiros	29
4.3 Seleção de possíveis estirpes fracas	33
4.4 Caracterização biológica	35
4.4.1 Gama de hospedeiros	35
4.5 Eficiência da transmissão mecânica	43

5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence ao gênero *Passiflora*, família Passifloraceae, que se constitui de aproximadamente 650 espécies e 20 gêneros (NUNES; QUEIROZ, 2007). Apesar da grande variedade de espécies, poucas são cultivadas em função de suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais.

O maracujá-amarelo é o mais cultivado e comercializado no Brasil, seus frutos são utilizados, principalmente, para a produção de sucos, sorvetes, vinhos, licores ou doces (CARVALHO e outros, 2015). Seu cultivo tem despertado grande interesse de fruticultores, devido a sua rápida produção em relação a outras frutíferas e a sua grande aceitação no mercado (COELHO e outros, 2011).

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de maracujá amarelo (ABRAFRUTAS, 2019). Em 2018, a produção brasileira foi de, aproximadamente, 602,651 mil toneladas, com produtividade média de 14,103 t ha⁻¹ e área plantada de, aproximadamente, 43,248 mil hectares, e um valor de produção estimado em cerca de R\$ 1,015 bilhões (IBGE, 2019). A região Nordeste vem liderando a produção brasileira de maracujá, seguida pelas regiões Sudeste, Sul, Norte e Centro-Oeste (IBGE, 2019). O estado da Bahia destaca-se como o maior produtor nacional de maracujá, sendo responsável por cerca de 26,7% da produção. Em 2018, a Bahia produziu 160.902 t de maracujá e gerou cerca de R\$ 194,8 milhões (IBGE, 2019).

No entanto, o rendimento dessa cultura é considerado baixo, sobretudo, devido a problemas fitossanitários, como os causados pelo vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (GONÇALVES e outros, 2018).

A doença endurecimento dos frutos é a mais importante virose do maracujazeiro em todo o mundo. No Brasil, a doença é causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO e outros,

2004; NASCIMENTO e outros, 2006), um vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*, família Potyviridae, que tem como hospedeiras espécies de *Passiflora* e de leguminosas, podendo infectar, ainda, espécies das famílias Solanaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae e Cucurbitaceae (VIANA e outros, 2003).

O CABMV é transmitido por várias espécies de pulgões, de forma não persistente, não-circulativa (RODRIGUES e outros, 2016), e atualmente é encontrado em todas as regiões produtoras de maracujá no país.

Além de reduzir a vida útil dos pomares de *P. edulis* de 36 para 18 meses, maracujazeiros infectados pelo CABMV apresentam sintomas de mosaico, com intensidade variável, às vezes, acompanhado de bolhosidade, rugosidade e deformação do limbo foliar (CORREA e outros, 2015). As plantas afetadas, normalmente, apresentam crescimento reduzido (TOMOMITSU e outros, 2014). Os frutos afetados ficam deformados e menores, o pericarpo fica com uma espessura irregular e consistência endurecida, com grande redução na cavidade da polpa (FISCHER; KIMATI; REZENDE, 2005).

A identificação e caracterização biológica e molecular de estirpes de CABMV que causam o endurecimento dos frutos em maracujazeiro são importantes para a determinação precisa desse agente etiológico, além disso, o estudo da interação patógeno-hospedeiro possibilita avanços na aplicação de métodos de controle, sobretudo para programas de melhoramento genético, visando obtenção de plantas resistentes ao vírus.

Diante do exposto e devido à importância socioeconômica da cultura do maracujazeiro à região Sudoeste da Bahia, esta pesquisa teve como objetivo realizar a caracterização de estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* que infectam o maracujazeiro amarelo na região de Vitória da Conquista e Ituaçu, Bahia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do maracujazeiro

O gênero *Passiflora*, trivialmente conhecido como maracujá, é destaque na família Passifloraceae devido às inúmeras espécies (aproximadamente 520) e à sua importância econômica. A biodiversidade do gênero está amplamente representada nas Américas, onde Colômbia e Brasil abrigam aproximadamente 170 e 150 espécies, respectivamente (CERQUEIRA-SILVA e outros, 2018).

No Brasil, a espécie com maior expressão comercial é a *Passiflora edulis* Sims, conhecida como maracujazeiro amarelo, que ocupa mais de 90% dos pomares brasileiros de maracujá. No entanto, outras espécies como a *P. alata* Curtis, *P. setacea* D. C. e *P. cincinnata* Mast. também atingem escala comercial como frutífera (OLIVEIRA; FALEIRO; JUNQUEIRA 2017).

O maracujá amarelo é uma dicotiledônea que apresenta sistema radicular pouco profundo, folhas lobadas e verdes com gavinhas, gema florífera e gema vegetativa na axila da folha. A flor é hermafrodita com estigmas localizados acima das anteras, o fruto tem formato variado, podendo ser globoso, ovoide, oblongo e piriforme (DANTAS e outros, 2006).

O maracujá possui características medicinais e ornamentais, mas é principalmente utilizado na alimentação humana. O consumo é feito *in natura* ou em forma de sucos, doces, geleias, sorvetes e licores. Apresentam frutos grandes com polpa ácida de cor alaranjada e aromática (BEZERRA, FREDO; MELETTI, 2016).

O maracujazeiro está entre as fruteiras tropicais mais plantadas no Brasil e é de grande importância social e econômica, por ser cultivado predominantemente por pequenos produtores, apresentar boa rentabilidade

econômica e elevado nível de empregabilidade (MELETTI, 2011; COELHO; AZEVÊDO; UMSZA-GUEZ, 2016; FALEIRO e outros, 2016).

O maracujazeiro é uma planta de clima tropical e subtropical, podendo ser cultivado, sob condições ideais, em regiões com temperatura média entre 25 e 26 °C e precipitação pluviométrica entre 1.200 a 1.400 mm, bem distribuída ao longo do ano. A altitude do cultivo recomendada é entre 100 e 1000 m, a umidade relativa do ar deve ser baixa e a luminosidade alta. A planta necessita de 11 horas de luz/dia para entrar em floração para produção de frutos com ótimo aspecto, sabor e aroma (FRAIFE FILHO e outros, 2010).

O cultivo do maracujá-amarelo ocorre em ciclos de expansão e retração, que são ditados ora por regras econômicas ora pela natureza, sendo que os principais indicadores desses ciclos são: redução ou ampliação da área plantada e da quantidade produzida (BEZERRA; FREDO; MELETTI, 2016). As fases de retração da cultura geralmente ocorrem devido à grande incidência de problemas fitossanitários (MELETTI; KAVATI; CAVICHIOLI, 2010). Este é o principal fato que caracteriza o cultivo do maracujá-amarelo como uma atividade nômade.

Dentre as doenças comuns que afetam o maracujá, destacam-se a ocorrência generalizada no território nacional ou a dificuldade de controle para: antracnose (*Glomerella cingulate*); anamorfo (*Colletotrichum gloeosporioides*); verrugose (*Cladosporium cladosporioides* e *C. herbarum*); fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*); podridão de colo e raízes (*Fusarium solani*); bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*); e endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*) (FISCHER; REZENDE 2008; CERQUEIRA-SILVA e outros, 2018).

No Brasil, o endurecimento dos frutos é a principal doença virótica (YUKI e outros, 2006). Além dos vírus que ocasionam a doença endurecimento dos frutos, há relatos de outros vírus ocorrendo em maracujazeiro como o *Purple granadilla mosaic virus* (PGMV) (CHAGAS e

outros, 1984), *Passion fruit yellow mosaic virus* (PYMV) (CRESTANI e outros, 1986), *Passion fruit vein clearing virus* (PVCV) (KITAJIMA e outros, 1986), *Maracuja mosaic virus* (MarMV) (FRIBOURG e outros, 1987), *Passiflora latente virus* (PLV) (PARES e outros, 1997), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (BARBOSA e outros, 1999), *Passion fruit green spot virus* (PFGSV) (KITAJIMA e outros, 2003), *Passion flower little leaf mosaic virus* (PLLMV) (NOVAES e outros 2003), *Passion fruit severe leaf distortion virus* (PSLDV) (FERREIRA e outros, 2010) e *Melochia yellow mosaic virus* (MeLYMV) (SPADOTTI e outros, 2019a).

2.2 Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro

A virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foi descrita inicialmente na Austrália, e foi causada pelo *Passion fruit woodness virus* (PWV), no entanto, apresenta vários agentes etiológicos em diferentes regiões do globo terrestre, sendo causada pelo *East asian passiflora virus* (EAPV) (IWAI e outros, 2006), no Sudeste do continente asiático; pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), na África do Sul e no Brasil (MLOTSHWA e outros, 2002; NASCIMENTO e outros, 2006); e pelo *Ugandan Passiflora virus* (UPV), em Uganda (OCHWO-SSEMAKULA e outros, 2012), todos pertencentes ao gênero *Potyvirus*, família Potyviridae.

A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1970, ocorrendo em plantios comerciais de maracujá doce (*P. alata*) e de maracujá amarelo (*P. edulis*) em Feira de Santana, estado da Bahia (VIANA e outros, 2003). Posteriormente, sua ocorrência foi relatada nas demais regiões produtoras do país. Em todos os casos, análises baseadas em características biológicas e sorológicas identificaram o PWV como agente etiológico da doença (BEZERRA e outros, 1995; CHAGAS e outros, 1981; CHAGAS e outros, 1992; COSTA, 1996; INOUE e outros, 1995; TRINDADE e outros,

1999). No entanto, análises moleculares de diversos isolados previamente identificados, como PWV, demonstraram na verdade ser isolados de CABMV (BRAZ e outros, 1998; SANTANA e outros, 1999; NASCIMENTO e outros, 2004; NASCIMENTO e outros, 2006).

Plantas infectadas com essa virose apresentam mosaico comum, enrugamento, bolhosidade, distorção e redução na área foliar, comprometendo a produção (NOVAES; REZENDE, 2005). Os frutos afetados se tornam pequenos, deformados e seu pericarpo apresenta-se endurecido, por causa da lignificação das paredes internas. Com isso, o espaço interno do fruto torna-se menor do que nos frutos sadios, o que reduz a quantidade de polpa (VIANA, 2007).

O controle da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é dificultado, sobretudo, porque as espécies de *Passiflora* exploradas comercialmente não são resistentes ao vírus ou tolerantes à doença. Além disso, o controle químico do inseto vetor não é eficiente, pelo fato do vírus ser transmitido de maneira não persistente e as espécies de afídeos vetores não colonizarem o maracujazeiro (FISCHER; REZENDE, 2008).

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando o controle do vírus do endurecimento dos frutos. Estudos realizados por Alfenas e outros (2005) e Trevisan e outros (2006) demonstraram que o uso de plantas transgênicas pode ser um método eficiente para o controle dessa virose. Entretanto, Alfenas e outros (2005) relataram que as plantas transgênicas foram resistentes apenas ao isolado utilizado para a transformação. Já o uso de plantas enxertadas (CAVICHIOLO e outros, 2011) e a técnica de premunização (NOVAES; REZENDE, 2003, MAIA e outros, 2017) não se mostraram adequadas para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro.

De acordo com Rodrigues e outros (2014), a dificuldade de impedir o estabelecimento do CABMV em pomares, mesmo quando o maracujá é cultivado distante das regiões onde o vírus é endêmico, indica a possível

existência de fontes importantes de inóculos naturais do CABMV que ainda não foram descobertos.

Como ainda não há controle da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, devem ser empregadas táticas de manejo, como: produção de mudas em viveiros telados; erradicação de pomares antigos; cuidados na poda para prevenir a transmissão mecânica do vírus; e controle de espécies de Fabaceae, possíveis reservatórios naturais do vírus (FISCHER; REZENDE, 2008). Sampaio e outros (2008) ressaltam a importância da adoção dessas técnicas para viabilizar economicamente a produção em locais com ocorrência de CABMV, e destaca que o plantio tardio das mudas contribuiu para a redução das perdas, pois, quanto mais cedo as plantas se infectarem, maiores serão as perdas.

Experimentos de campo realizados por Spadotti e outros (2019b), nos estados da Bahia e São Paulo, demonstraram que o *roguing* sistemático de plantas afetadas pelo CABMV foi significativamente eficiente para o controle dessa virose. No entanto, essa prática cultural só pode ser recomendada para o controle da doença, caso seja aplicada em escala regional por todos os produtores de maracujá.

2.3 Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)

As espécies virais causadoras do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV, CABMV, EAPV e UPV) pertencem ao gênero *Potyvirus* da família Potyviridae (CERQUEIRA-SILVA e outros, 2014).

Os Potyviridae são encontrados em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas. Todos os potyvírus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes à família (BERGER, 2005).

Espécies do gênero *Potyvirus* possuem partícula viral alongada, flexuosa, com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de largura. Seu genoma é composto por uma molécula de fita simples de RNA senso positiva, com aproximadamente 10 kb de comprimento, apresentando uma proteína denominada VPg ligada ao terminal 5' e uma cauda poli(A) no terminal 3' (KNELLER; RAKOTONDRAFARA; MILLER, 2006). O genoma do CABMV apresenta uma fase de leitura aberta - Open Reading Frame (ORF), que codifica para a síntese de uma grande poliproteína, a qual é clivada em aproximadamente 10 proteínas (CHUNG e outros, 2008).

O critério para demarcação de espécies dos *Potyvirus* com relação ao genoma deve ter identidade da sequência de aminoácidos da capa proteica menor que 80%, identidade da sequência de nucleotídeos do genoma completo menor que 85% e diferentes sítios de 7 clivagem da poliproteína (NICOLINI, 2011). Critérios como gama de hospedeiros, características de patogenicidade e citopatológicas, como diferentes tipos de inclusões e propriedades sorológicas podem ser usados em nível de gênero, porém, atualmente não servem para identificar espécies de *Potyvirus*, sendo necessário sequenciamento completo do genoma ou do gene da capa proteica (CHUNG e outros, 2008).

Isolados de CABMV infectam naturalmente leguminosas como *Arachis hypogea* (PIO-RIBEIRO e outros, 2000), *Crotalaria juncea* (FREITAS e outros, 2002), *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* (NASCIMENTO e outros, 2006), *Canavalia rosea* (KITAJIMA e outros, 2008) e *Cassia hoffmannseggii* (NICOLINI e outros, 2012). A transmissão natural do CABMV ocorre por meio de afídeos, principalmente pelas espécies *Mysus persicae* Sulz e *Aphis gossypii* Glover, sendo a relação vírus vetor do tipo não persistente, não circulativa, ou seja, tanto a aquisição como a inoculação do vírus pelo inseto são rápidas e restritas ao canal alimentar, ocorrendo em questão de segundos, durante as picadas de prova (YUKI e outros, 2006).

A transmissão mecânica do vírus ocorre por meio da enxertia e por ferramentas contaminadas, não há transmissão via sementes de maracujazeiro (NARITA e outros, 2011). No entanto, para o CABMV do *Vigna unguiculata* (caupi), Bashir e Hampton (1996) e Salem (2010) verificaram que é possível a transmissão via semente, embora seja baixa.

2.4 Detecção de vírus em plantas

A identificação e caracterização de vírus de plantas podem ser realizadas por vários métodos que envolvem suas propriedades morfológicas, físicas, biológicas, citológicas, sorológicas e moleculares (LIMA e outros, 2013).

2.4.1 Gama parcial de hospedeiros

O estudo da gama de hospedeiros é uma técnica biológica para caracterização e estudo de viroses em plantas. Consiste na inoculação mecânica ou natural de vírus em uma série de espécies e variedades de plantas, que apresentam sintomas característicos para determinado vírus, em condições controladas de casa de vegetação. O diagnóstico é feito com base na comparação dos sintomas observados com aqueles relatados na literatura (SILVA, 2017).

Os vírus das plantas têm faixas de hospedeiros limitadas e específicas. Se uma espécie de planta específica for extensivamente pesquisada, provavelmente serão encontrados vários vírus que a infectam. No entanto, cada vírus irá infectar uma combinação única de espécies de plantas e, dessa forma, a gama de hospedeiros tem sido utilizada tradicionalmente para identificar vírus (DAWSON; HILF, 1992).

O teste de gama de hospedeiros apresenta custo reduzido, pois basta apenas um espaço em casa de vegetação para o cultivo de plantas e material para inoculação. Embora auxilie bastante na identificação e na caracterização biológica dos vírus, em razão das variações naturais resultantes da ação de fatores ligados ao vírus, às plantas e às condições climáticas, o estudo de gama de plantas hospedeiras raramente deve ser usado como único método para diagnóstico conclusivo. Além do tempo longo para a observação dos resultados, o número de espécie de vírus aumentou logaritmicamente, impossibilitando sua identificação por esse método (DIANESE; MEDEIROS, 2015; LIMA, 2015).

2.4.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ELISA é uma técnica sorológica muito específica e sensível, introduzida no estudo e identificação de vírus de plantas na década de 1970 (CLARK; ADAMS, 1977; VOLLER e outros., 1976). Embora os métodos tradicionais (em particular inoculações de plantas hospedeiras e microscopia eletrônica) ainda sejam usados para diagnóstico de vírus em laboratórios de rotina, a adoção mundial do ELISA, nos anos 1970-80, foi um grande avanço e mudou a face do diagnóstico viral (BOONHAM e outros, 2014).

A técnica ELISA é baseada no princípio básico no qual os antígenos do vírus são reconhecidos por seus anticorpos específicos (IgG) em associação com propriedades colorimétricas. O método ELISA é geralmente realizado em uma placa de poliestireno de 96 poços, adicionando antígenos e anticorpos aos poços em uma sequência estabelecida, envolvendo vários estágios. No estágio final, as reações positivas são detectadas, quando um substrato incolor, geralmente fosfato de p-nitrofenil, sofre uma alteração química, resultando em um produto de cor amarela, como resultado da exposição à enzima fosfato alcalina ligada ao anticorpo. O grau de mudança de cor indica o grau de reatividade, o qual é lido por um aparelho leitor de placas de ELISA. É sempre recomendável incluir um antígeno homólogo

para o anticorpo específico do vírus e extratos de plantas saudáveis para comparar as leituras de absorção e obter uma interpretação correta dos resultados (LIMA e outros, 2012).

O ELISA pode ser chamado de direto ou indireto, dependendo do tipo de anticorpo que é acoplado à enzima. O teste de ELISA indireto ou placa tratada com antígeno (PTA-ELISA) foi desenvolvido a fim de evitar o inconveniente e a dificuldade de conjugar a enzima com as IgGs específicas para cada vírus. Por essa razão, o teste ELISA indireto requer anticorpos produzidos em dois animais diferentes. Esse teste é menos sensível e menos específico que o ELISA direto ou ELISA sanduíche duplo (DAS-ELISA) (LIMA, 2015).

No formato direto, o antígeno alvo é detectado pelo conjugado enzimático de anticorpos homólogos (antígenos específicos). No formato indireto, anticorpos homólogos não marcados (ABs1) são empregados para capturar os antígenos alvo e, em seguida, os complexos antígeno-anticorpo são detectados pelos conjugados enzimáticos com outros anticorpos produzidos contra ABs1. Esses segundos anticorpos marcados com enzima reagem especificamente com os domínios constantes do antígeno (SHCHERBAKOVA, 2007).

2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ensaio de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), em diferentes formatos e combinações, têm sido aplicados com mais frequência para a detecção, identificação e diferenciação de vírus de plantas, devido aos seus níveis mais altos de sensibilidade, confiabilidade, reprodutibilidade e rapidez (NARAYANASAMY, 2017).

A técnica de PCR é usada para amplificar os fragmentos de DNA desejados com sequências finais conhecidas, envolvendo basicamente as seguintes etapas: a) Extração do DNA que contém o fragmento a ser

amplificado; b) Obtenção dos primers específicos para reconhecimento das extremidades do fragmento a ser amplificado; c) Amplificação dos fragmentos através do uso de um termociclador; d) Eletroforese em gel de agarose para detectar os fragmentos de DNA amplificados e estimar seus tamanhos em números de bases de DNA; e) Observação do produto amplificado, em gel de agarose, após sua coloração, através de um transiluminador ultravioleta (LIMA, 2015).

Vírus de plantas que possuem o seu genoma do tipo RNA são encontrados predominantemente, esses genomas de RNA precisam ser transcritos, usando transcrição reversa (RT), em DNA complementar (cDNA), antes da amplificação por PCR (NARAYANASAMY, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em ambiente protegido com tela antiafídica e cobertura plástica, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Vitória da Conquista, região sudoeste do Estado, localizado a 14°51' de Latitude Sul e 40°50' de Longitude Oeste, em altitude média de 941m. O clima, conforme classificação de Köppen, é do tipo Cwa (tropical de altitude), com precipitação média anual de 758 mm, concentrada nos meses de novembro a março, temperatura média de 25 °C, com a média máxima e a média mínima variando de 26,2 e 16,4 (INMET, 2018).

As análises moleculares foram realizadas em parceria com o laboratório de virologia da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

3.1 Obtenção e filtragem das estirpes virais

Para a obtenção das estirpes virais, foram selecionadas plantas com diferentes sintomas do endurecimento dos frutos em lavouras de Vitória da Conquista e Ituaçu, BA. Nas plantas com diferentes sintomatologias (Figura 1), mosaico leve (ML), mosaico mais bolhas (MB), anéis (A), necrose (N) e encurvilhamento (E), foram retiradas parte de suas folhas e inoculadas mecanicamente em hospedeiros de lesão local, *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, *Chenopodium quinoa* L. e *Phaseolus vulgaris* L. cv. Jalo.

Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e o aparecimento dos sintomas foi acompanhado diariamente.

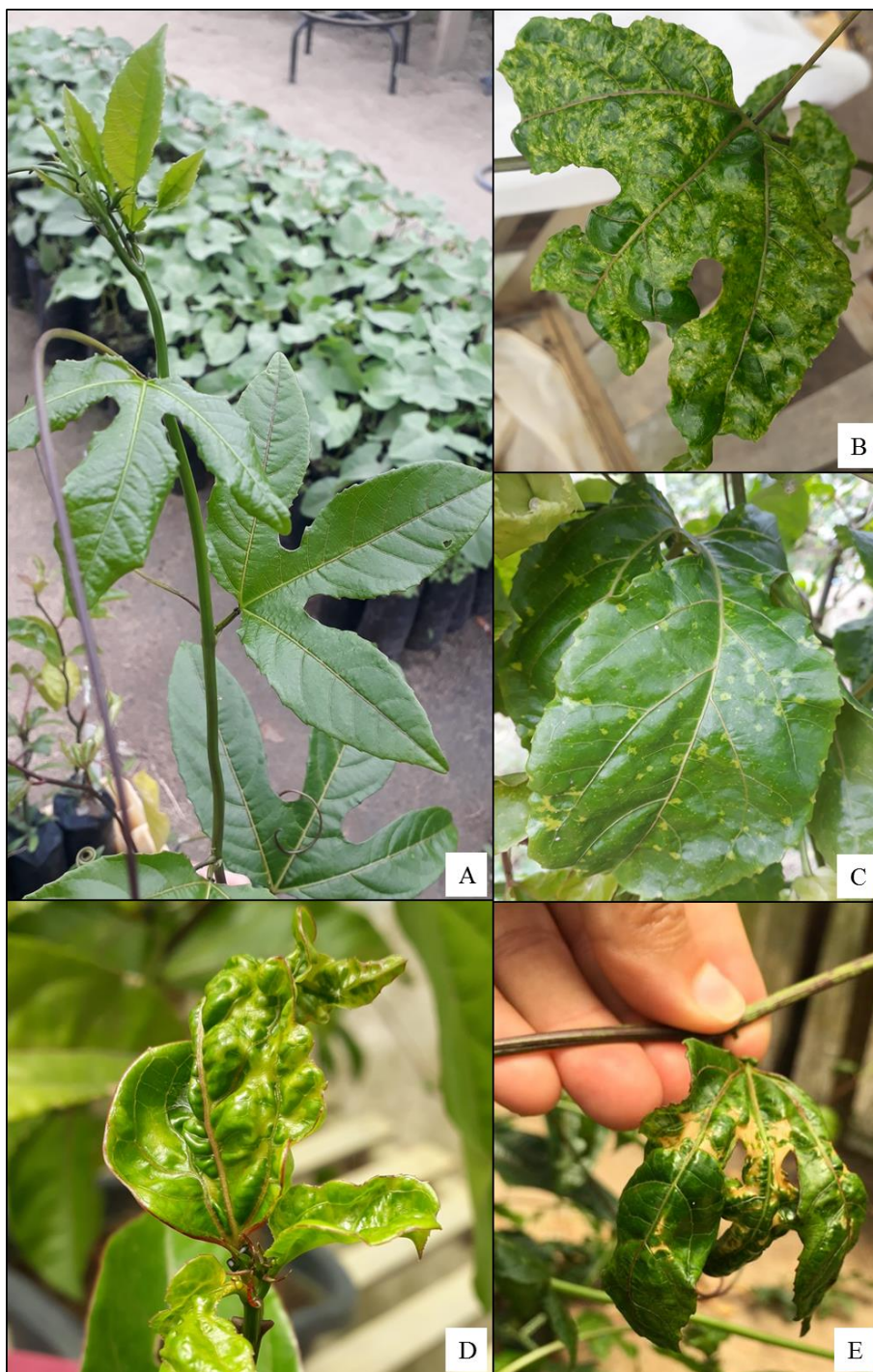


Figura 1 – Expressão de sintomas do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em plantas de maracujazeiro, mosaico leve (A), mosaico e bolhas (B), anéis (C), encurvamento (D) e necrose (E).

Lesões locais obtidas em *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* e *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo foram individualmente retiradas de suas folhas com o auxílio de vazadores, com diâmetro de 6 mm. Dois discos de cada folha foram macerados em almofariz na presença de duas gotas de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, para a extração do inóculo viral. Cada extrato foi inoculado individualmente nas duas primeiras folhas das plantas-teste, sendo as inoculações realizadas em folhas previamente polvilhadas com carbureto de silício (carborundum) 400 mesh, friccionando-as com o dedo indicador, umedecido no inóculo. Após a inoculação, as plantas foram lavadas para retirar o excesso de inóculo e abrasivo, e mantidas em ambiente protegido para posteriores avaliações.

No intuito de selecionar estirpes fracas do CABMV, foram realizadas inoculações individuais com o extrato de 45 bolhas retiradas de áreas saudáveis de folhas de maracujazeiro com sintomas de mosaico, obtidas em áreas de cultivo em Vitória da Conquista, BA. Os extratos de 20 bolhas foram inoculados, respectivamente, em 20 mudas de *Passiflora edulis*, outros 20 foram inoculados em 20 plantas *Canavalia ensiformis*, e cinco foram inoculados em plantas *Chenopodium amaranticolor*. As plantas foram avaliadas quanto à expressão de sintomas aos 15 e 20 dias após a inoculação.

Visando a seleção de possíveis estirpes fracas em áreas severamente afetadas pelo CABMV, plantas assintomáticas ou com mosaico leve foram coletadas em quatro áreas de cultivo de maracujazeiro afetadas pelo CABMV em Ituaçu, BA. A partir dessas plantas, obteve-se material vegetal para realização de inoculações mecânicas e enxertia de folhas em 14 mudas de maracujazeiro amarelo, sendo avaliadas posteriormente quanto à expressão de sintomas. Após a avaliação sintomatológica, plantas assintomáticas ou que expressaram sintomas leves foram selecionadas e o extrato de suas folhas foi inoculado mecanicamente em *Chenopodium amaranticolor* e maracujazeiro.

3.2 Caracterização biológica

3.2.1 Plantas-teste

As estirpes selecionadas, conforme descrito no item 3.1, foram inoculadas em vários cultivares de maracujazeiro: BRS gigante amarelo, BRS sol do cerrado, FB 200, FB 300 e o acesso roxo; e as espécies *P. edulis* Sims, *P. cincinnata* Mast., *P. foetida* L. e *P. setacea* D. C., *Canavalia ensiformes* (L.) D. C., *Chenopodium amaranticolor* Coste & A. Reyn., *Chenopodium quinoa* Willd., *Crotalaria juncea* L., *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana clevelandii* A. Gray, *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana tabacum* L. cvs. Havan, Sansum, Turkish, TNN, TNT e Xanthi, *Phaseolus vulgaris* L. cvs. Preto G-2 e Jalo.

As sementes das plantas-teste foram semeadas em sacos plásticos pretos de polietileno, próprios para mudas, com furos na parte lateral inferior, nas dimensões de 10 x 15 cm ou em vasos com capacidade de 2 litros, com substratos devidamente adubados. Foram semeadas duas sementes em cada saco plástico/vaso. Quando as plantas apresentaram aproximadamente 5 centímetros de altura ou duas folhas definitivas, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por saco plástico/vaso. As irrigações foram realizadas diariamente, de acordo com a necessidade das mudas.

3.2.2 Inoculação mecânica

Os inóculos para transmissão mecânica foram preparados por meio da maceração de folhas infectadas em almofariz (Figura 2A) ou em sacos plásticos de polipropileno, com dimensões de 10 x 15 cm (Figura 2B), em

presença de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, na diluição de 1:20 (peso:volume). As inoculações foram realizadas nas folhas das plantas-teste, previamente polvilhadas com carbureto de silício (carborundum), friccionando-as com o dedo indicador, umedecido no inóculo. Em seguida, as folhas foram lavadas para a retirada do excesso de abrasivo e de inóculo.

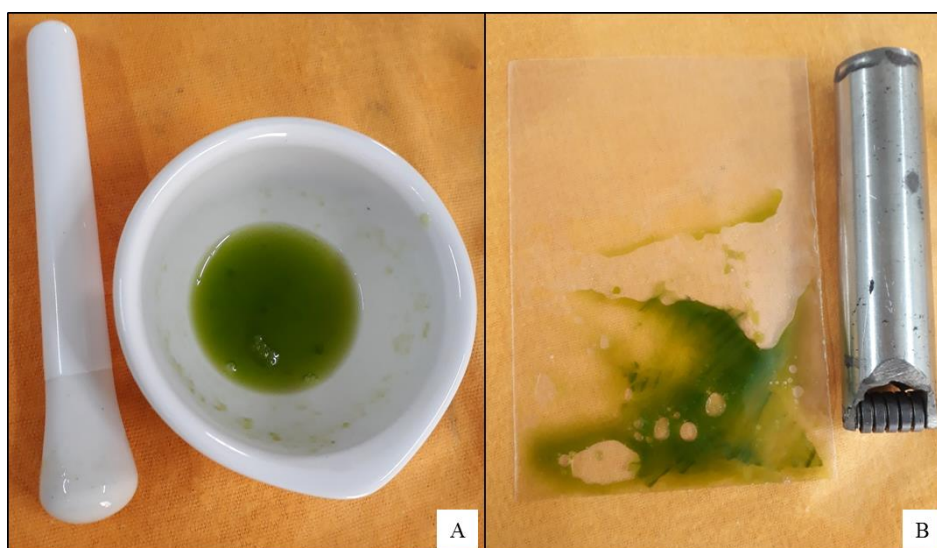


Figura 2 – Preparo de inóculo para transmissão mecânica por meio da maceração de folhas infectadas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, em almofariz (A) e em sacos plásticos de polipropileno (B).

3.2.3 Fonte de inóculo

Plantas de maracujazeiro amarelo com a presença de sintomas semelhantes àqueles provocados pelo CABMV, previamente inoculadas, conforme item 3.2.3, foram mantidas em ambiente protegido, como fonte de inóculo.

3.3 Avaliação quanto à sintomatologia

Todas as plantas-teste inoculadas foram avaliadas semanalmente quanto à manifestação de sintomas. Adicionalmente, a severidade dos sintomas foliares foi avaliada em *Canavalia ensiformes*, *Crotalaria juncea* e maracujazeiros, por meio de uma escala de notas de 1 a 4, proposta por Sousa (2005), sendo: 1) sem sintomas, 2) mosaico leve sem deformações foliares, 3) mosaico severo sem deformação foliar e 4) mosaico severo, bolhosidade e deformações foliares.

3.4 Detecção por PTA-ELISA

A presença ou ausência do CABMV foi confirmada por meio do teste sorológico ELISA (“*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), do tipo PTA (“*Plate Trapped Antigen*”), conforme protocolo desenvolvido por Mowat e Dawson (1987), com algumas modificações.

Amostras individuais de tecido vegetal de todas as plantas testadas, utilizadas no experimento, foram coletadas e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sendo maceradas em saco plástico de polipropileno, com dimensões de 15 x 18 cm, e diluídas em tampão carbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6), na proporção 1:20. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de cada amostra por pocinho, em uma placa de ELISA, sendo dois pocinhos por amostra. Foram utilizadas amostras de plantas de maracujá e feijão de porco, infectadas com o CABMV como controle positivo, e amostras de plantas sadias como controle negativo.

A placa foi incubada por 24 horas, a 4 °C em geladeira, e depois lavada três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20 L⁻¹).

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de antissoro policlonal, produzido em coelho e específico contra os vírus em análise, diluído 1:1.000 em tampão Tris-HCl (0,2 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2). O antissoro foi cedido pelo Laboratório de Virologia da ESALQ/USP. Depois de um período de incubação de 1,5 horas, a 37 °C, a placa foi novamente lavada por três vezes com PBS-Tween.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de imunoglobulina G (IgG), conjugada com fosfatase alcalina, diluída 1: 32.000 em tampão Tris-HCl, pH 7,2, em cada pocinho. A placa foi incubada por mais 1,5 h, a 37 °C, sendo novamente lavada e adicionados 100 µL de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA N-9389), diluído em tampão dietanolamina, pH 9,8 (0,6 mg mL⁻¹). Após incubação (20 a 60 minutos), à temperatura ambiente, no escuro, a absorbância de cada um dos pocinhos foi medida no leitor de ELISA, modelo Expert Plus, utilizando-se filtro de 405 nm, sendo considerada positiva, quando o valor médio da absorbância exceder em duas vezes e meio o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

3.5 Eficiência da transmissão mecânica

Foram realizados testes de transmissão mecânica do CABMV entre plantas de *Canavalia ensiformes*, *Nicotiana benthamian*, *Passiflora edulis* e *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2. As inoculações foram realizadas mecanicamente e as avaliações foram realizadas visualmente com base nos sintomas e por teste PTA-ELISA.

3.6 Detecção molecular

Para comprovação da etiologia das estirpes estudadas, foi realizado o teste molecular de PCR, com uma amostra de cada estirpe.

3.6.1 Extração de ácido nucleico

A extração do RNA foi realizada a partir do vírus purificado, utilizando-se o kit Pure Link® Viral RNA/DNA (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi checada utilizando-se espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific).

A síntese das moléculas de DNA complementares (cDNA) foi realizada com a enzima M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6.2 Reação de RT-PCR

Para a reação de amplificação de DNA, através da PCR (Polymerase Chain Reaction), foram utilizados 5 µL do cDNA sintetizado e primers específicos, CIRev (5'- ACICCRTTYTCDATDATRRTTIGTIGC-3') e CIFor (5'-GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC-3'), desenhados para o anelamento em porções genômicas de espécies de *Potyvirus*, que amplificam fragmentos de DNA de, aproximadamente, 700 pb. As amplificações da PCR serão realizadas em termociclador programado para 5 minutos, a 92 °C, seguido de 40 ciclos de 50 segundos a 92 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto e 30 segundos a 72 °C, com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C e finalizando a 4°C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose (1%) corados com brometo de etídeo e visualizados na presença de luz ultravioleta.

3.6.3 Purificação do produto da PCR e sequenciamento

O amplicon obtido foi purificado utilizando-se o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e enviado para sequenciamento à Empresa Macrogen (Seoul, Coreia). As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e CLUSTAL Interative W (THOMPSON e outros, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos isolados virais

Para a obtenção dos isolados virais do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), foram selecionadas plantas em seis pomares de maracujazeiro amarelo, sendo dois localizados no município de Vitória da Conquista – BA e quatro em Ituaçu- BA. A seleção foi baseada na avaliação sintomatológica, sendo coletadas tanto plantas assintomáticas quanto plantas com sintomas severos. Em Ituaçu, foram coletadas duas plantas com sintomas severos de encarquilhamento e quatorze plantas assintomáticas ou exibindo mosaico leve nas folhas. Em Vitória da Conquista, foram selecionadas plantas com sintomas leves e severos, apresentando mosaico leve, mosaico e bolhas, anéis e com sintomas de necrose de folhas.

4.2 Filtragem em diferentes hospedeiros

Extratos das plantas selecionadas, conforme item 3.1 (expressando sintomas de mosaico leve (ML), mosaico mais bolhas (MB), anéis (A), necrose (N) e encarquilhamento (E)), foram inoculados mecanicamente em hospedeiros de lesão local, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* L. e *Phaseolus vulgaris* L. cv. Jalo.

Plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo exibiram lesões locais cloróticas (Figura 3A) sete dias após inoculação e evolução para início de invasão sistêmica restrita à folha, após dez dias (Figura 3B). Plantas de *Phaseolus lunatus*, inoculadas com dois isolados de CABMV, também exibiram lesões locais cloróticas (GUSMÃO, 2010).

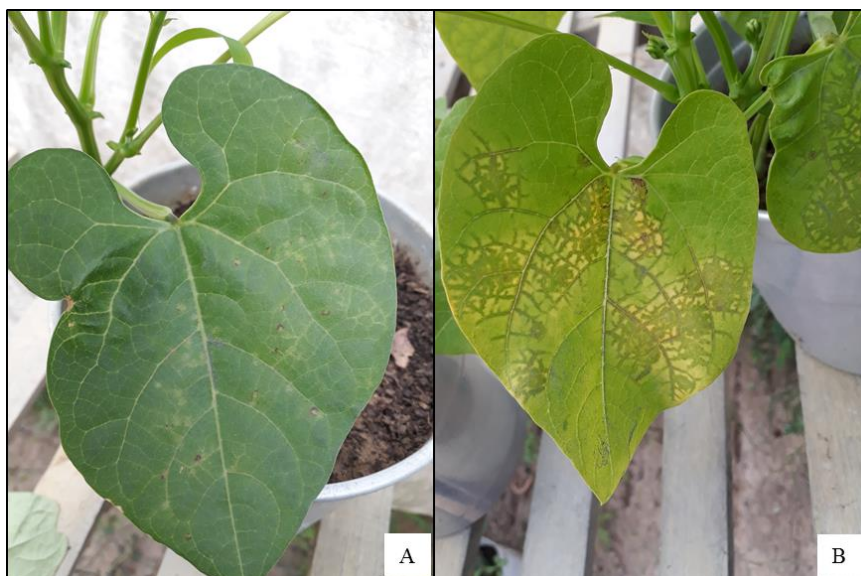


Figura 3 – Expressão de sintomas em *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo inoculado com extrato de plantas de maracujazeiro infectadas pelo CABMV, (A) sete dias e (B) dez dias após inoculadas.

Posteriormente, as folhas dessas plantas onde havia lesões, assim como a planta assintomática foram coletadas e testadas por ensaio PTA-ELISA. Todas as plantas de feijão Jalo com sintomas foram positivas, já a assintomática, negativa (Tabela 1).

Nas espécies *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, os sintomas observados foram de lesões locais cloróticas, no entanto, apenas *C. amaranticolor* foi promissor na caracterização biológica dos isolados, apresentando lesões locais características. Essa planta, ao ser inoculada com extrato de plantas de maracujazeiro com sintomas de mosaico leve, desenvolveu lesões locais cloróticas de coloração intensa e de maior diâmetro, quando comparadas às lesões dos demais isolados (Figura 4 A e C).

Tabela 1 – Plantas utilizadas para filtrar e separar os isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

Plantas indicadoras	Sintomatologia em maracujazeiro	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas de acordo com os sintomas	
			SS	LLC
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	ML	8	6	2
	MB	5	1	4
	A	5		5
	N	8	1	7
	E	5	1	4
<i>Chenopodium chinoa</i>	ML	2	1	1
	MB	2	2	
	A	2	1	1
	N	2		2
	E	2		2
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Jalo	ML	2	1	1
	MB	2		2
	A	2		2
	N	2		2
	E	2		2

ML - mosaico leve, MB - mosaico e bolhas, A - anéis, N - necrose, E - encarquilhamento, SS - sem sintoma e LLC - lesão local clorótica.

O extrato das folhas de maracujazeiros que apresentavam anéis de halo amarelo e centro esverdeado após inoculação em *C. amaranticolor* ocasionou a mesma sintomatologia neste hospedeiro, conforme indicado nas setas (Figura 4B). Já as plantas de maracujazeiro que exibiam sintomas severos com necrose, após inoculação do seu extrato em *C. amaranticolor*, houve expressão de lesões locais pequenas e em maior quantidade em comparação aos outros isolados (Figura 4D). Silva (2017) também verificou diferenças quanto ao número e tamanho das lesões locais exibidas em folhas de *C. amaranticolor*, inoculadas com dois isolados de *Cowpea severe mosaic virus*.

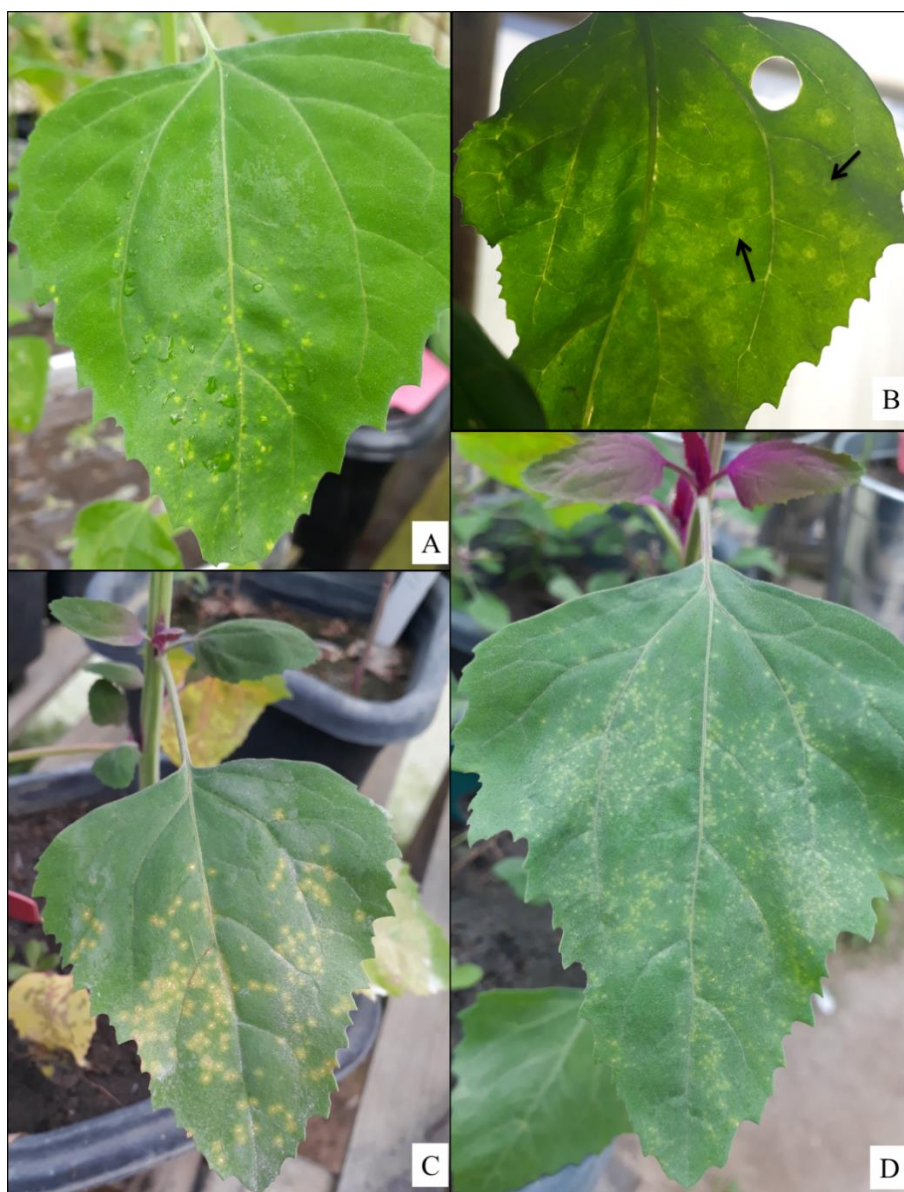


Figura 4 – Expressão de sintomas em *Chenopodium amaranticolor* inoculados com extrato de plantas de maracujazeiro, infectadas por *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, que exibiam sintomas de mosaico leve (A e C), anéis (B) e necrose (D).

Visando a separação de estirpes pela sintomatologia, 150 plantas de *Canavalia ensiformis*, 129 de *Passiflora edulis* e 25 de *Crotalaria juncea* foram inoculadas com extrato de lesões locais, obtidas em *C. amaranticolor*

(Tabela 2). As lesões locais foram obtidas a partir de inoculações com extrato de plantas com diferentes sintomatologias, obtidos a campo.

Nessa etapa, não houve infecção das plantas de *C. juncea*, elas não exibiram sintomas e a ausência de infecção foi confirmada pelo PTA-ELISA. Observou-se, ainda, que a transmissão do CABMV de um hospedeiro de lesão local *C. amaranticolor* para *C. ensiformes* e *P. edulis* foi baixa, sendo de 20 e 18%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação sintomatológica de plantas hospedeiras inoculadas com lesões locais de *Chenopodium amaranticolor*

Plantas hospedeiras	S.m	Nº de plantas testadas	Nº de plantas de acordo com a escala de sintomas				PTA-ELISA	
			1	2	3	4	+	-
<i>Canavalia ensiformis</i>	ML	18	14	1	3		4	14
	MB	34	28	2	4		6	28
	A	15	10		5		5	10
	N	68	59	3	6		12	56
	E	15	12		3		3	12
<i>Passiflora edulis</i>	ML	18	16	1	1		2	16
	MB	35	30	1	3	1	5	30
	A	19	16	1	2		3	16
	N	46	36	5	3	2	11	35
	E	11	9			2	2	9
<i>Crotalaria juncea</i>	ML	5	5					5
	MB	5	5					5
	A	5	5					5
	N	5	5					5
	E	5	5					5

S.m - sintomatologia em maracujazeiro, ML - mosaico leve, MB - mosaico e bolhas, A - anéis, N - necrose, E - encarquilhamento.

4.3 Seleção de possíveis estirpes fracas

De acordo com Muller e Costa (1987), a seleção de plantas sadias em plantios severamente afetados pela virose deve ser priorizada em programas de premunização, pois o efeito protetor da estirpe fraca já vem sendo testado naturalmente em campo.

Utilizando essa técnica, plantas assintomáticas ou com mosaico leve foram selecionadas em quatro áreas de cultivo severamente afetadas pelo CABMV em Ituaçu-Bahia. Após transmissão mecânica e por enxertia, oito plantas foram selecionadas como possíveis estirpes fracas. Utilizando enxertia, três plantas apresentaram mosaico leve e uma assintomática e por inoculação mecânica, duas plantas apresentaram mosaicos leves e outras duas assintomáticas (Tabela 3). Dessas oito plantas, apenas as cinco com sintomas de mosaico leve mostraram ser positivas em teste PTA-ELISA, demonstrando, assim, que as plantas assintomáticas não estavam infectadas pelo vírus.

Após filtragem dessas cinco plantas em *C. amaranticolor* e inoculações sucessivas e individuais em mudas de maracujazeiro amarelo, foi possível selecionar duas estirpes que apresentavam sintomas leves, sendo denominadas como fraca I (FI) e fraca II (FII). Os isolados, até então selecionados, foram mantidos em casa de vegetação e, posteriormente, inoculados em diferentes espécies de plantas.

Tabela 3 – Avaliação sintomatológica de plantas de *Passiflora edulis* enxertadas e inoculadas com extrato de plantas com sintoma de mosaico leve ou assintomáticas, coletadas em campo (Ituaçu-BA)

Métodos de transmissão	Nº de plantas testadas	Nº de plantas de acordo com a escala de sintomas				PTA-ELISA	
		1	2	3	4	+	-
Enxertia	14	1	3	4	6	13	1
Inoculação mecânica	14	2	2	9	1	12	2

A seleção de estirpes fracas, a partir de áreas atípicas de folhas infectadas por vírus, já foi utilizada para obtenção de estirpes fracas de *Papaya ringspot virus* (REZENDE e outros, 1994) e *Passion fruit woodiness virus* (NOVAES; REZENDE, 2003).

No entanto, no presente estudo, não se obteve êxito na seleção de uma possível estirpe fraca, quando essa técnica foi utilizada. Das 40 plantas inoculadas com extrato, retiradas de áreas saudáveis de plantas de

maracujazeiro com sintomas de mosaico (item 3.1), apenas as sintomáticas apresentaram resultado positivo no ELISA (Tabela 4), três plantas de maracujazeiro foram selecionadas apresentando mosaico leve, entretanto, após reinoculações sucessivas em mudas de maracujazeiro, o mosaico leve não foi mantido e as plantas demonstraram sintomas severos da doença. As cinco plantas de *Chenopodium amaranticolor* também foram inoculadas individualmente com o extrato de cinco bolhas, obtido de plantas de maracujazeiro, e avaliadas quinze dias após a inoculação, no entanto, não apresentaram lesões locais (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação sintomatológica e sorológica de plantas teste inoculadas com extratos de bolhas obtidas de plantas de maracujazeiro infectadas por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

Plantas-teste	Nº de plantas inoculadas	Sintomas				PTA-ELISA	
		SS	ML	MS+B	LLC	+	-
<i>C. ensiformis</i>	20	14	-	6	-	6	14
<i>P. edulis</i>	20	10	3	7	-	10	10
<i>C. amaranticolor</i>	5	5	-	-	-	-	-

SS - sem sintoma, ML - mosaico leve, MS + B - Mosaico severo e bolhas, LLC - lesão local clorótica.

4.4 Caracterização biológica

4.4.1 Gama de hospedeiros

As estirpes selecionadas, denominadas fraca I (FI), fraca II (FII), anéis (A), necrótica (N) e encarquilhamento (E), foram inoculadas em diferentes espécies de plantas.

Os resultados da gama de hospedeiros podem constituir-se em um componente essencial da classificação, pois diferenças biológicas como severidade e indução de necrose, dentre outras, são informações relevantes na distinção de grupos de isolados (TRUTA e outros 2004). A estirpe FI, por exemplo, diferiu biologicamente das demais, apresentando mosaico amarelo

ao ser inoculada em *N. benthamiana* (Figura 5B), enquanto que, para as demais estirpes, verificou-se necrose sistêmica (Figura 5C). Maia e outros (2017) também observaram mosaico leve em *N. benthamiana*, inoculada com estirpes fraca e severa do CABMV; já Mundembe (2005) verificou sintomas de mosaico e distorção foliar.

Plantas de *N. glutinosa* (15), *N. tabacum* cvs. Havana (15), Turkish (15), Samsun (15), TNN (15), TNT (15) e Xanthi (15), e *Gomphrena globosa* (30) não expressaram sintomas ao serem inoculadas com as diferentes estirpes e a ausência do CABMV foi confirmada por PTA-ELISA. Maia e outros (2017) também verificaram que biótipos de CABMV, obtidos do feijoeiro caupi e maracujazeiro, não infectam *G. globosa*.

Nicotiana clevelandii reagiu com aparecimento de lesões locais necróticas para todas as estirpes testadas (Figura 5A), diferentemente do observado por Gioria (2003), em que essa espécie não expressou sintomas ao ser inoculada com um isolado do *Passion fruit woodiness virus*.

Para *Nicotiana rustica* e *Datura stramonium*, verificou-se a ocorrência de anéis amarelos de centro esverdeado 12 dias após a inoculação com a estirpe do encarquilhamento (Figura 6). Os anéis presentes em *N. rustica* e *D. stramonium* foram inoculados em dez e quatro plantas de *P. edulis*, respectivamente, e duas plantas de *N. benthamiana* para cada. Não houve manifestação de sintomas e a ausência do CABMV foi confirmada por PTA-ELISA pra todas essas plantas, sugerindo, assim, que a expressão dos sintomas relatados anteriormente pode estar relacionada a uma infecção por outro vírus. Para as demais estirpes, não houve manifestação de sintomas nessas espécies e os resultados do PTA-ELISA foram negativos.

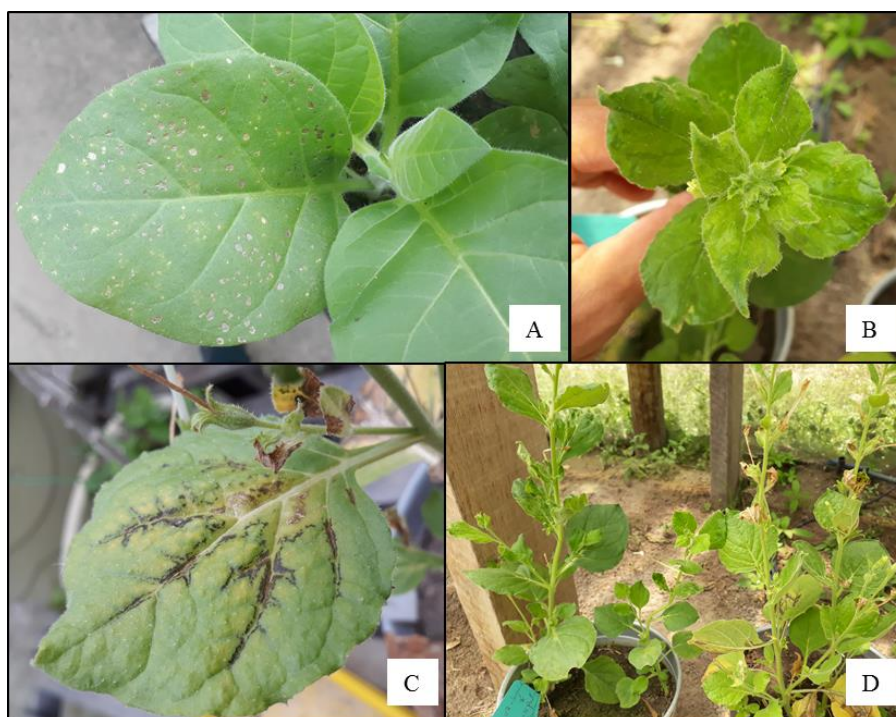


Figura 5 – Expressão de sintomas em *N. clevelandii* inoculada com estirpes de CABMV (A). *N. benthamiana* exibindo mosaico (B) e necrose sistêmica (C). Aspecto geral de duas plantas de *N. benthamiana* inoculadas com a estirpe FI (à esquerda) e com as demais estirpes (à direita).

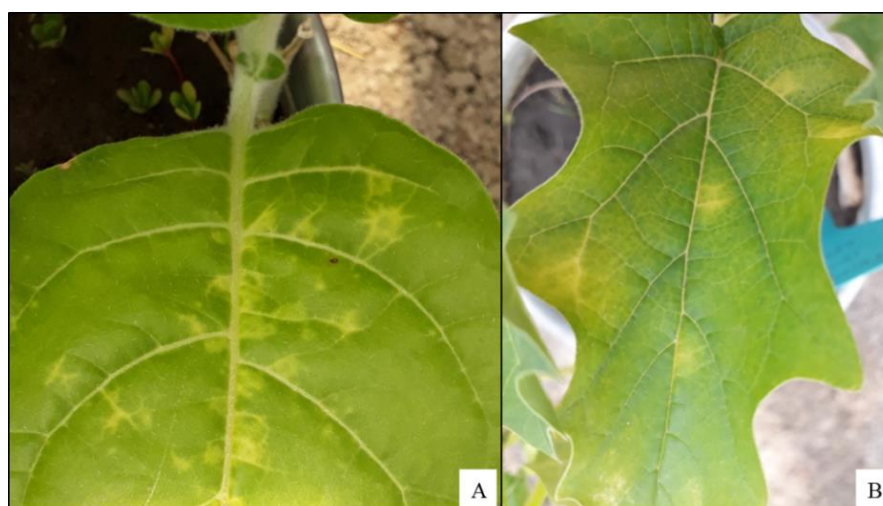


Figura 6 – Expressão de sintomas em plantas de *Nicotiana rustica* (A) e *Datura stramonium* (B) inoculadas com a estirpe E do *Cowpea aphid borne mosaic virus*.

Phaseolus vulgaris cv. Preto G-2, quando inoculado na fase de desenvolvimento das folhas cotiledonares, teve uma reação de hipersensibilidade, exibindo lesões locais necróticas quatro dias após inoculação com as diferentes estirpes (Figura 7A), e invasão sistêmica (Figura 7B) e morte da planta (Figura 7C) cerca de 7 a 10 dias após a inoculação. Gioria e Rezende (1996) e Gioria (2003) também verificaram a ocorrência de reação de hipersensibilidade para essa cultivar, quando inoculada com isolados de CABMV.

Verificou-se, ainda, que inoculações tardias em plantas com 2 trifólios expandidos prolongaram o período de manifestação dos sintomas na cv. Preto G-2, levando de 15 a 20 dias para expressar a necrose sistêmica.

P. vulgaris cv. Jalo exibiram lesões locais cloróticas (Figura 3A) em 60, 80, 100, 80 e 100% das plantas inoculadas, respectivamente, com as estirpes FI, FII, A, N e E, enquanto que as demais plantas foram assintomáticas. Nas plantas sintomáticas, verificou-se evolução para invasão sistêmica restrita à folha (Figura 3B), após 10 dias do aparecimento das lesões locais cloróticas. Gioria e Rezende (1996) também obtiveram sintomas locais na cv. Jalo, quando inoculada com seis isolados de CABMV. Já Kitajima e outros (2008) verificaram não haver infecção das cultivares de *P. vulgaris*, Jalo, Carioca e Black Turtle 2, quando inoculadas com um isolado de CABMV oriundo de *Canavalia rosea*.

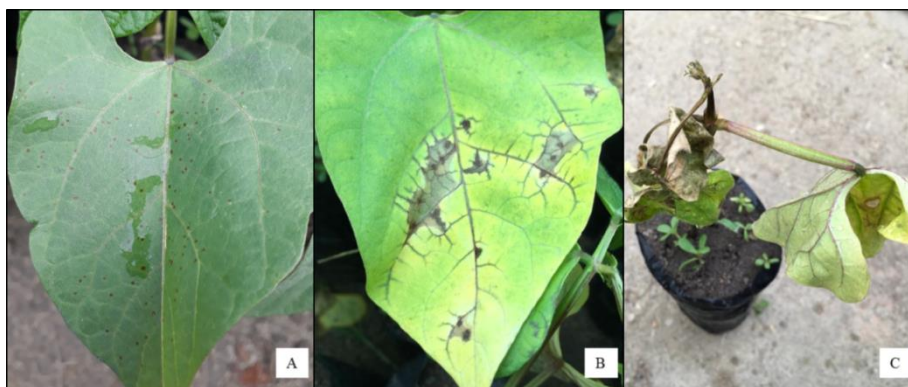


Figura 7 – Expressão de sintomas em *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2 após inoculação com estirpes do CABMV, lesões locais necróticas (A), invasão sistêmica (B) e morte da planta (C).

Plantas de *Crotalaria juncea*, avaliadas vinte dias após inoculação, não exibiram sintomas, quando inoculadas com a estirpe FI, e houve aparecimento de mosaico ao serem inoculadas com as estirpes A, N e E (Figura 8). A infecção pelo CABMV foi confirmada por PTA-ELISA para todas as plantas (Tabela 5). Esse vírus infecta naturalmente as espécies *C. juncea*, *C. paulina*, *C. zanzibarica* (FREITAS e outros, 2002), *C. incana* e *C. spectabilis* (GONZÁLEZ-SEGNANA e outros, 2013).

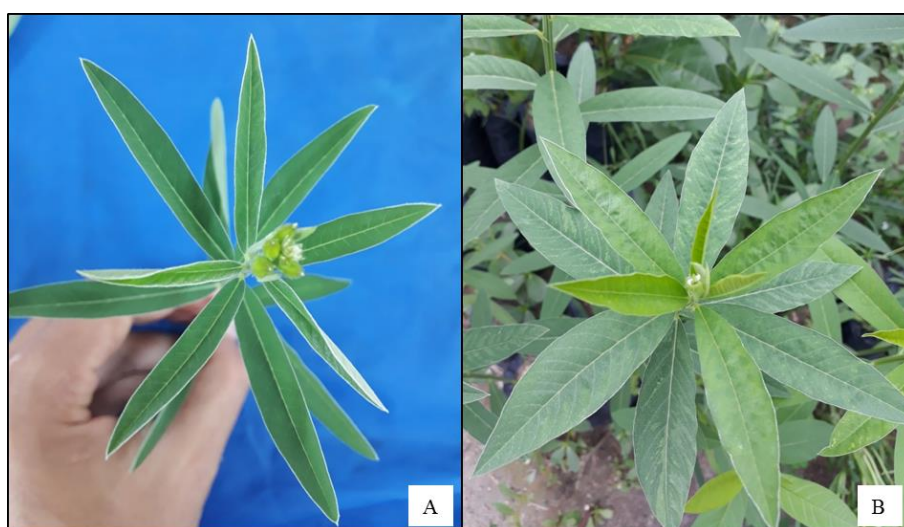


Figura 8 – Reação de plantas de *Crotalaria juncea* inoculadas com estirpes do Cowpea aphid-borne mosaic virus, planta assintomática (A), e com sintomas de mosaico (B).

Tabela 5 – Avaliação sintomatológica e sorológica de plantas inoculadas mecanicamente com diferentes estirpes de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

Plantas-Teste	Es	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas de acordo com os sintomas					PTA-ELISA		
			SS	M	An	LLC	LLN	NS	+	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	FI	5	1			4			nt	nt
	FII	5	2			3			nt	nt
	A	5	1		4				nt	nt
	N	5				5			nt	nt
	E	5				5			nt	nt
<i>Chenopodium chínoa</i>	FI	2	1			1			nt	nt
	FII	2				2			nt	nt
	A	2	1			1			nt	nt
	N	2				2			nt	nt
	E	2				2			nt	nt
<i>Crotalaria juncea</i>	FI	4	4						4	
	FII	nt								nt
	A	2		2					2	
	N	4		4					4	
	E	4		4					4	
<i>Datura stramonium</i>	FI	5	5							5
	FII	5	5							5
	A	5	5							5
	N	3	3							3
	E	5			5					5
<i>N. benthamiana</i>	FI	6	2	4					4	2
	FII	10	1					9	8	2
	A	6	1					5	5	1
	N	6	1					5	5	1
	E	10						10	10	
<i>N. clevelandii</i>	FI	3					3		nt	nt
	FII	3					3		nt	nt
	A	3					3		nt	nt
	N	3	1				2		nt	nt
	E	3	1				2		nt	nt
<i>N. rustica</i>	FI	5	5							5
	FII	5	5							5
	A	5	5							5
	N	5	5							5
	E	5			5					5
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Jalo	FI	5	2			3			nt	nt
	FII	5	1			4			nt	nt
	A	5				5			nt	nt
	N	5	1			4			nt	nt
	E	5				5			nt	nt
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Preto G-2	FI	20	4				16	16	16	4
	FII	10					10	10	10	
	A	14	1				13	12	12	2
	N	7	1				6	6	6	1
	E	10					10	10	10	

Es - estirpes, SS - sem sintomas, M - mosaico, An - anéis, LLC - lesão local clorótica, LLN - lesão local necrótica, NS - necrose sistêmica e nt - não testado.

As estirpes de CABMV foram inoculadas em alguns acessos de maracujazeiro: FB-300, FB-200, BRS-SC, BRS-GA e roxo, e nas espécies: *P. cincinnata*, *P. foetida* e *P. setacea* (Tabela 6).

Plantas de *P. setacea* não exibiram sintomas, quando inoculadas com as diferentes estirpes, a não infecção foi confirmada por PTA-ELISA, o que já era esperado, uma vez que esta espécie é resistente a esse vírus (SACOMAN e outros, 2018).

Uma planta é considerada portadora de uma estirpe fraca de um vírus quando apresenta reação positiva no teste sorológico e apresenta-se assintomática ou com mosaico leve (NOVAES, 2002). Observou-se que as estirpes FI e FII, ao serem inoculadas nos acessos e nas diferentes espécies de maracujazeiro, manifestaram sintomas de mosaico leve ou foram assintomáticas. No entanto, algumas dessas plantas apresentaram reação negativa no teste PTA-ELISA. As estirpes (A, N e E) do CABMV reproduziram sintomas severos com notas (3 e 4) ao serem inoculados nos diferentes acessos e espécies de maracujazeiro (Tabela 6).

A estirpe E de encarquilhamento, ao ser inoculada nos acessos BRS-GA, BRS-SC, FB-200 e roxo, passou essa característica, no entanto, a presença do vírus por PTA-ELISA foi confirmada apenas no acesso BRS-SC. Todos os acessos de maracujazeiro testados expressaram sintomas de necrose após inoculados com a estirpe N.

De acordo com Novaes e Rezende (2005), resultados negativos do PTA-ELISA, obtidos em plantas de maracujazeiro previamente inoculadas com o CABMV, podem estar relacionados à má distribuição ou baixa concentração do vírus nesse hospedeiro. Estes autores verificaram que esse teste foi positivo para 28 e 35,3% das amostras retiradas de maracujazeiros inoculados com duas estirpes fracas do CABMV, já em plantas de *Crotalaria juncea*, inoculadas com as mesmas estirpes, 100% das amostras foram positivas.

Tabela 6 – Avaliação sintomatológica e sorológica de espécies e acessos de maracujazeiro inoculados com diferentes estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)

Plantas indicadoras	Es.	Nº de plantas testadas	Nº plantas de acordo com a escala de sintomas				PTA-ELISA	
			1	2	3	4	+	-
<i>P. cincinnata</i>	FI	4	4					4
	FII	4	3	1			1	3
	A	2		2			2	
	N	4	2	2			2	2
	E	2	1			1	1	1
<i>P. foetida</i>	FI	5	2	3			3	2
	FII	5	1	4			5	
	A	5	1	3	1		4	1
	N	5	1		4		4	1
	E	5		3	2		5	
<i>P. setacea</i>	FI	3	3					3
	FII	3	3					3
	A	3	3					3
	N	3	3					3
	E	3	3					3
BRS-GA	FI	2	1	1			2	
	FII	2	1	1			1	1
	A	2			2		1	1
	N	2	2					2
	E	2				2		2
BRS-SC	FI	2	1	1			2	
	FII	2	2					2
	A	2	1	1			1	1
	N	2	1		1		1	1
	E	2				2	2	
Roxo	FI	2	1	1			1	1
	FII	2	2					2
	A	2			2		2	
	N	2			2		2	
	E	2				2		2
FB-300	FI	2	1	1			1	1
	FII	2	2					2
	A	2			2		2	
	N	2			2		2	
	E	2	2					2
FB-200	FI	2	2					2
	FII	2		2			1	1
	A	2			2		1	1
	N	2	1		1		1	1
	E	2				2		2

Es - estirpes, nt - não testado.

A análise molecular confirmou que os isolados obtidos neste estudo são estirpes do CABMV.

4.5 Eficiência da transmissão mecânica

A eficiência de transmissão mecânica entre as espécies *Nicotiana benthamiana*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2 e *Canavalia ensiformis* foi avaliada. Para essas comparações, plantas sintomáticas de *C. ensiformes* e *P. edulis* foram coletadas a campo e as plantas de *P. vulgaris* e *N. benthamiana* foram obtidas em casa de vegetação, através de inoculação mecânica. Após confirmação da infecção pelo CABMV por PTA-ELISA, realizou-se inoculações entre as espécies.

A transmissão mecânica do CABMV de plantas de *C. ensiformes*, infectadas pelo CABMV para plantas de *N. benthamiana*, foi de apenas 20%, e para plantas de *P. edulis* não ocorreu a transmissão (Tabela 7). De acordo com Nascimento e outros (2006), isolados de CABMV podem infectar leguminosas como *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* e outros hospedeiros, no entanto, diferem em sua capacidade de infectar maracujazeiro.

A transmissão do CABMV de plantas de *N. benthamiana*, para plantas de *C. ensiformes*, foi de 80% e entre as demais espécies a eficiência de transmissão mecânica do vírus foi de 100% (Tabela 7).

Tabela 7 – Eficiência de transmissão mecânica do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) entre plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Passiflora edulis*, *Phaseolus vulgaris* cv. Preto G-2 e *Canavalia ensiformis*

Fonte de inóculo	Nº de plantas inoculadas/ nº de plantas infectadas (% de transmissão)			
	<i>N. benthamiana</i>	<i>P. edulis</i>	Preto G-2	<i>C. ensiformis</i>
<i>N. benthamiana</i>	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)	5/4(80%)
<i>P. edulis</i>	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)
Preto G-2	nt	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>C. ensiformis</i>	5/1(20%)	5/0(0%)	5/5(100%)	5/5(100%)

nt - não testado.

5. CONCLUSÃO

Na região de Vitória da Conquista e Ituaçu, BA, são encontradas pelo menos cinco estirpes do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em maracujazeiros, as quais estão classificadas biologicamente em três grupos:

- Fraco, formado pelos isolados FI e FII, provocando apenas mosaico leve nas folhas;
- Intermediário, formado pelo isolado A, provocando anéis nas folhas; e
- Severo, formado pelos isolados N e E, os quais provocam necrose e encarquilhamento, respectivamente, nas folhas do maracujazeiro.

REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS. **Associação brasileira de produtores e exportadores de frutas e derivados**. Disponível em: <https://abrafrutas.org>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing an RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* are resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2005.

BARBOSA, C. J.; STENZEL, N. M. C.; JACOMINO, A. P. Identificação do vírus do mosaico do pepino ("cucumber mosaic virus") em maracujazeiro amarelo no Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 193-193, 1999.

BASHIR, M.; HAMPTON, R. O. Detection and identification of seed-borne viruses from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) germplasm. **Plant Pathology**, v. 45, p. 54-58, 1996.

BERGER, P. H.; ADAMS, M. J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A. A.; HAMMOND, J.; HILL, J. H; et al. Family Potyviridae. p. 819-841. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL L. A. (Eds) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Elsevier Academic Press, London. 2005.

BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A.; XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 553-560, 1995.

BEZERRA; L. M. C.; FREDO, C. E; MELETTI, L. M. M. Cultivo de maracujá-amarelo no estado de São Paulo: principais características a partir do Levantamento das Unidades de Produção Agropecuária, ano-safra 2007/2008. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 46, n. 2, 2016.

BOONHAM, N.; KREUZE, J.; WINTER, S.; VAN DER VLUGT, R.; BERGERVOET, J.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to Next Generation Sequencing. **Virus Research**, v. 186, p. 20-31, 2014.

BRAZ, A. S. K.; SANTANA, E. N.; ZAMBOLIM, E. M.; COSTA, A. F.; OTONI, W. C., ZERBINI, F. M. Molecular characterization of two isolates of South African Passiflora virus infecting passionfruit in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 3, p. 146, 1998.

CARVALHO, S. L. C.; STENZEL, N. M. C.; AULER, P. A. M. Maracujá amarelo, recomendações técnicas para cultivo no Paraná. **Boletim técnico**. IAPAR, Londrina, n. 83, p. 54, 2015.

CAVICHIOLI, J. C.; CORRÊA, L. S.; NARITA, N.; KASAI, F. S. Incidência e severidade do vírus do endurecimento dos frutos e maracujazeiros enxertados em pé-franco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.1, p.411-414, 2011.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, A. P.; CORRÊA, R. X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 2, p. 261-270, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; DE JESUS, O. N.; DOS SANTOS, E. S. L.; DE SOUZA, A. P. Passion fruit (*Passiflora* spp.) breeding, p. 929–951. In: AL-KHAYRI J.; JAIN S.; JOHNSON D. (eds) **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. Springer, Cham, 2018.

CHAGAS, C. M.; JOAZEIRO, P. P.; KUDAMATSU, M.; VEGA, J. Mosaico do maracujá-roxo, uma nova virose no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 241-247, 1984.

CHAGAS, C. M.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 259-268, 1981.

CHAGAS, C. M.; REZENDE, J. A. M.; COLARICCIO, A. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 14, p. 187-290, 1992.

CHUNG, B. Y. W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal General Virology**, v. 34, p. 475-483, 1977.

COELHO, A. A.; OLIVEIRA, E. M. S.; RESENDE, E. D.; THIÉBAUT, J. T. L. Dimensionamento amostral para a caracterização da qualidade pós colheita do maracujá-amarelo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.1, p. 23-28, 2011.

COELHO, E.M; AZEVÊDO, L.C; UMSZA-GUEZ, M.A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 323-336, 2016.

CORREA M. F.; PINTO, A. P. C.; REZENDE, J. A. M.; HARAKAVA, R.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of sweet passion fruit (*Passiflora alata*) and reactions of the transgenic plants to *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, n. 4, p. 813-821, 2015.

COSTA, Antonio Félix. **Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus *Passiflora edulis* f. *flavicarpa***. 129 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

CRESTANI, O. A.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T.; MARINHO, V. L. A. Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. **Phytopathology**, v. 76, n. 9, p. 951-955, 1986.

DANTAS, A. C. V. L.; LIMA, A. A.; GAÍVA, H. N. **Cultivo do Maracujazeiro**. Brasília: editora LK, 2006, p.10.

DAWSON, W. O.; HILF, M. E. Host-Range Determinants of Plant Viruses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 527-555, 1992.

DIANESE, E. C.; MEDEIROS, R. B. Diagnose de vírus de plantas. In: MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P; DIANESE, E. C.; COSTA, C. L.; SGRO, J. Y. **Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle**. Brasília: Ed. UnB, 2015, p. 475-509.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. **Importância socioeconômica e cultura do maracujá**. Brasília, DF: Embrapa, 2016, p. 15-22. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

FERREIRA, S. S.; BARROS, D. R.; DE ALMEIDA, M. R.; ZERBINI, F. M. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel

begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, v. 59, p. 221-230, 2010.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, Kagawa, v. 2, p. 1-19, 2008.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005, p. 467-474.

FRAIFE FILHO, G. A.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Maracujá**. Publicado no site da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira/CEPLAC. 2010. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>. Acesso em: 14 jan. 2020.

FREITAS, D. S.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; VEGA, J. Molecular characterization and evolutionary relationships of a potyvirus infecting Crotalaria in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 147, p. 411-417, 2002.

FRIBOURG, C. E.; KOENIG, R.; LESEMANN, D. E. A new tobamovirus from *Passiflora edulis* in Peru. **Phytopathology**, v. 77, n. 3, p. 486-491, 1987.

GIORIA, R. **Caracterização biológica, serológica e molecular de uma estirpe do *Passion fruit woodiness virus* (PWV) que infecta sistemicamente algumas cucurbitáceas**. 2003. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Reação de diferentes espécies, principalmente leguminosas, a seis isolados do Vírus do Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 4, Piracicaba, 1996. **Resumo**. São Paulo: USP, 1996, p. 437.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; et al. Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and leaf anatomical response under controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p. 166-178, 2018.

GONZÁLEZ-SEGNANA, L. R.; ESQUIVEL FARIÑA, A.; GONZÁLEZ, D. D.; MELLO, A. P. O.; REZENDE, J. A.; KITAJIMA, E. W. Alternative hosts of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in sesame (*Sesamum*

indicum) crops grown in Paraguay. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 6, p. 539-542, 2013.

GUSMÃO, L. O. **Avaliação da resistência de genótipos de fava (*Phaseolus lunatus* L.) ao Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)**. 2010. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia)- Universidade Federal de Alagoas Centro de Ciências Agrárias, Alagoas, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola municipal 2018**. Culturas Temporárias e Permanentes. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba>. Acesso em: 15 jan. 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Estadual 2018**. Maracujá. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15 jan. 2019.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Normal climatológica de 1981-2010**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>. Acesso em: 29 dez. 2019.

INOUE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of *Passionfruit woodiness virus* isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 479-487, 1995.

IWAI, H.; YAMASHITA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, M. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species East Asian *Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. **Archives of virology**, New York, v. 151, n. 4, 811-818, 2006.

KITAJIMA, E. W.; DE ALCANTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE J. A. M.; ZERBINI, F. M. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 743-747, 2008.

KITAJIMA, E. W., REZENDE, J. A. M., & RODRIGUES, J. C. V. *Passion fruit green spot virus* vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. **Experimental & applied acarology**, v. 30, n. 1-3, p. 225-231, 2003.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; CRESTANI, O. A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 409-432, 1986.

KNELLER, E. L.; RAKOTONDRAFARA, A. M.; MILLER, W. A. Cap-independent translation of plant viral RNAs. **Virus Research**, v. 119, p. 63–75, 2006.

LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; RADAELLI, P.; SILVA, A. K. F.; SILVA, F. R. A technique combining immunoprecipitation and RT-PCR for RNA plant virus detection. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 7-8, p. 426-433, 2013.

LIMA, J. A. A., NASCIMENTO, A. K. Q.; RADAELLI, P.; PURCIFULL, D. E. Serology applied to plant virology. In: MOSLIH AL-MOSLIH (Ed.). **Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases**. Rijeka: In Tech, 2012. p. 70-94.

LIMA, J. A. A. **Virologia essencial e viroses em culturas tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2015. 605p.

MAIA, L. M.; LIMA, J. A. D. A.; NASCIMENTO, A. K. Q. D.; RABELO FILHO, F. D. A. C. Biological differences and unilateral cross-protection between biotypes of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 310-317, 2017.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; KAVATI, R.; CAVICHIOLI, J. C. História da fruticultura paulista: maracujá. In: DONADIO, L. C. (Org.). **História da fruticultura paulista**. Jaboticabal: SBF, v. 1, p. 256-284, 2010.

MLOTSHWA, S.; VERVER, J.; SITHOLE-NIANG, I.; VAN KAMPEN, T.; VAN KAMMEN, A.; WELLINK, J. The genomic sequence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and its similarities with other potyviruses. **Archives Virology**, New York, v.147, p.1043–1052, 2002.

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 233-247, 1987.

MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. **Phytophylactica**, v. 19, n. 2, p. 197-198, 1987.

MUNDEMBE, R. **Characterisation of *Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)* and evaluation of pathogen derived resistance to the virus.** 2005. 162 p. Thesis (Doctor of Philosophy). Faculty of Science, University of Zimbabwe.

NARAYANASAMY. P. **Microbial Plant Pathogens: Detection and management in seeds and propagules.** 2017. p. 447-618.

NARITA, N. Y.; VALDIR, A.; PAVAN, M. A. Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, p.221, 2011.

NASCIMENTO, A.V, S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)* is widespread in passion fruit in Brazil and causes passion fruit woodiness disease. **Archives in Virology**, New York, 151, p. 1797–1809, 2006.

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 378-383, 2004.

NICOLINI, C. **Análise molecular da adaptabilidade hospedeira de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e caracterização de um novo tymovírus infectando *Cassia hoffmannseggii*.** 2011. 60 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

NICOLINI, C.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; MELO, F. L.; OLIVEIRA, V. C.; GUIMARÃES, F. C.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA E. W.; REZENDE, J. A. M.; NAGATA, T. A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil. **Virus genes**, v. 45, n. 1, p. 190-194, 2012.

NOVAES, Q. S., FREITAS-ASTUA, J., YUKI, V. A., KITAJIMA, E. W., CAMARGO, L. E. A., & REZENDE, J. A. M. Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. **Plant pathology**, v. 52, n. 5, p. 648-654, 2003.

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

NOVAES, Q. S., REZENDE, J. A. M. Protection between strains of *Passion fruit woodiness virus* in sunnhemp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 307-311, 2005.

NOVAES, Q. S. **Seleção de estirpes fracas do Passion Fruit Woodiness Virus e tentativas de premunização para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro**. 2002. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta botânica brasileira**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 499-502, 2007.

OCHWO-SSEMAKULA, M., SENGGOBA, T., HAKIZA, J. J., ADIPALA, E., EDEMA, R., REDINBAUGH, M. G., ARITUA, V., AND WINTER, S. Characterization and distribution of a potyvirus associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. **Plant Disease**, v.96, p.659-665, 2012.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Importância dos maracujás (*Passiflora* L. spp.) e seu uso comercial. **Revista RG News**, v. 3, n. 3, p. 72-81, 2017.

PARES, R. D.; GUNN, L. V.; KESKULA, E. N.; MARTIN, A. B.; TEAKLE, D. S. Occurrence of *Passiflora* latent carlavirus in cultivated and wild *Passiflora* species in Australia. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 348-350, 1997.

PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S. S.; PAPPU, H. R.; ANDRADE, G. P.; REDDY, D. V. R. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Disease**, v. 84, p. 760-766, 2000.

REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.F.; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus causador do mosaico da abobrinha presentes em bolhas que atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 55-61, 1994.

RODRIGUES, L. K.; CHAVES, A. L. R.; DAMATTO, E. R.; EIRAS, M. Epidemiological aspects of the transmission and management of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in a passion fruit orchard. **Journal of Plant pathology**, v. 98, n. 3, p. 531-539, 2016.

RODRIGUES, L. K.; SILVA, L. A.; GARCÊZ, R. M.; CHAVES, A. L. R.; DUARTE, L. M. L.; GIAMPANI, J. S.; EIRAS, M. Phylogeny and recombination analysis of Brazilian yellow passion fruit isolates of *Cowpea*

aphid-borne mosaic virus: origin and relationship with hosts. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 31-41, 2014.

SACOMAN, N. N.; VIANA, A. P.; CARVALHO, V. S.; SANTOS, E. A.; RODRIGUES, R. Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in in vitro germinated genotypes of *Passiflora setacea*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 1: e-607, 2018.

SALEM, N. M.; EHLERS, J. D. ROBERTS, P. A.; NGA, J. C. K. Biological and molecular diagnosis of seedborne viruses in cowpea germplasm of geographically diverse sub-Saharan origins. **Plant Pathology**, v. 59, p. 773-784, 2010.

SAMPAIO, A. C.; SCUDELLER, N.; FUMIS, T. F.; ALMEIDA, A. M.; PINOTTI, R. N.; Garcia, M. J. M.; PALLAMIN, M. L.. Manejo cultural do maracujazeiro-amarelo em ciclo anual visando à convivência com o vírus do endurecimento dos frutos: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p.343-347, 2008.

SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; ZAMBOLIM, E. M.; ZERBINI, F. M. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 4, p. 153, 1999.

SHCHERBAKOVA, L. A. Advanced methods of plant pathogen diagnostics. In: **Comprehensive and Molecular Phytopathology**. Elsevier, 2007. p. 75-116.

SILVA, A. K. F. **Variabilidade entre isolados de *Cowpea severe mosaic virus* por meio de caracterização biológica, sorológica e molecular**. 2017. 82 f. Tese (Doutora em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SOUSA, M. A. F. **Avaliação da produtividade, incidência e severidade de doenças em frutos de 17 genótipos de maracujazeiro-amarelo, cultivados no Distrito Federal**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

SPADOTTI, D. M. A.; BELLO, V. H.; FAVARA, G. M. *et al.* *Passiflora edulis*: new natural host of *Melochia yellow mosaic virus* in Brazil. **Australasian Plant Disease**. Notes, v. 14, n. 23, p. 22-23, 2019a.

SPADOTTI, D. M. A.; FAVARA, G. M.; NOVAES, Q. S.; MELLO, A. P. O. A.; FREITAS, D. M. S.; MOLINA, J. E.; REZENDE, J. A. M. Long-lasting systematic roguing for effective management of CABMV in passion

flower orchards through maintenance of separated plants. **Plant Pathology**, v. 68, n. 7, p. 1259-1267, 2019b.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMOMITSU, A. T.; CHAVES, A.L. R.; DUARTE, L. M.; EIRAS, M.; SANTOS, D. Y. A. C. Effect of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* on growth and quantitative variation of total phenolics and flavonoids from *Passiflora edulis* Sims. **Boletim Botânico**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 141-144, 2014.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J.; MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M.M. A.; REZENDE, J. A. M. Resistance to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, v. 90, p. 1026-1030, 2006.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.S.D.; KIMATI, H. Ocorrência do "*Passion fruit woodiness virus*" (PWV) em maracujazais no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 76-79, 1999.

TRUTA, A.A.C., SOUZA, A.R.R., NASCIMENTO, A.V.S., PEREIRA, R.C., PINTO, C.M.F., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 160-168. 2004.

VIANA, C. A. S. **Resistência de genótipos de maracujá-azedo á bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*) e a virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*)**. 2007. 230 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

VIANA, F. M. P; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle**. Embrapa Agroindústria Tropical, (Comunicado Técnico 86), 2003. 12 p.

VOLLER, A. A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E.; CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of General Virology**, v. 33, n. 1, p.165-167, 1976.

YUKI, V.A.; MIZOTE, F.A.; NARITA, N.; HOJO, H.; HOJO, H.; DELFINO, M.A.; OLIVEIRA, D.A. Epidemiologia do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na região produtor da Alta Paulista, SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 19, 2006.