

**VIROSES DO MARACUJAZEIRO: INCIDÊNCIA NA ALTA
PAULISTA – SP; DANOS CAUSADOS PELO “PASSION FRUIT
WOODINESS VIRUS” (PWV) E SINTOMATOLOGIA DO
“CUCUMBER MOSAIC VIRUS” (CMV)**

RICARDO GIORIA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo- Brasil
Novembro- 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Gioria, Ricardo

Virose do maracujazeiro: incidência na alta paulista - SP; danos causados pelo
" *Passion fruit woodiness virus*" (PWV) e sintomatologia do " *Cucumber Mosaic Virus*"
(CMV) / Ricardo Gioria. - - Piracicaba, 1999.
67 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Doença de planta 2. Endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro 3. Estufa 4.
Maracúja amarelo 5. Mosaico-do-pepino 6. Produção vegetal 7. Relação planta-
patogeno 8. Virus de planta I. Título

CDD 634.425

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

A meus pais, Eloy e Olene, e a
Vanessa, pelo apoio
paciência e compreensão,
com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente em nossas vidas;

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende, pela orientação desta dissertação, contribuição no desenvolvimento crítico, incentivo, paciência e amizade;

À Prof^a Lilian Amorin, pelas sugestões dadas a esta dissertação;

Ao Prof. Elliot W. Kitajima, pelas fotos utilizadas neste trabalho e pelo auxílio nos trabalhos desenvolvidos no núcleo de microscopia da ESALQ/USP;

À Eng^a. Agrônoma Gisleine G. Bosquê, pelo grande apoio dado no desenvolvimento dos trabalhos de campo realizados na região da Alta Paulista.

À associação de fruticultores de Vera Cruz, AFRUVEC, pelo empenho e apoio dado a este trabalho;

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla.

Ao Sr. Pedro C. Arthuso, pelo auxílio na manutenção dos trabalhos desenvolvidos em casa-de-vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP;

Aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pela amizade e contribuição na obtenção deste título;

Aos colegas do curso de Mestrado em Fitopatologia da ESALQ/USP, pelo apoio e amizade, em especial ao grande amigo Paulo Rogério Parente Dias;

Ao Bioex/CNPq e Pronex, pelo auxílio financeiro e a FAPESP, pela concessão de bolsa de estudos que tornaram este trabalho possível;

À bibliotecária Eliana M. G. Sabino, pela revisão da bibliografia desta dissertação;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho;

Finalmente agradeço à minha família e a Vanessa A. Bazana, por toda paciência, incentivo, compreensão e amor.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Obtenção de plantas-teste	10
3.2 Isolados do PWV.....	11
3.3 Inoculação mecânica.....	11
3.4 Técnicas utilizadas na detecção e identificação dos vírus	11
3.4.1 Avaliação de sintomas.....	11
3.4.2 PTA-ELISA.....	12
3.4.3 “Western-blot”.....	14
3.4.4 Microscopia eletrônica.....	16
3.5 Avaliação da incidência de viroses em maracujazeiro	17
3.5.1 Locais das avaliações	17
3.5.2 Número e coleta de amostras	17
3.5.3 Levantamento da população de trapoeraba (<i>Commelina sp</i>) entre as linhas de plantio.....	18
3.6 Avaliação do efeito do PWV no desenvolvimento do maracujazeiro em casa-de-vegetação	18
3.7 Avaliação de danos causados pelo PWV em telado	19
3.7.1 Construção do telado	19
3.7.2 Preparo das mudas	20
3.7.3 Transplante das mudas e condução do plantio	20
3.7.4 Avaliação de danos	23

3.8 Avaliação da distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas	24
3.8.1 Teste biológico	27
3.8.2 “Western-blot”	28
3.9 Transmissão do CMV para mudas de maracujazeiro.....	28
3.10 Análise estatística dos dados obtidos	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Incidência de viroses.....	30
4.2 Efeito do PWV no desenvolvimento do maracujazeiro em casa-de- vegetação	36
4.3 Danos causados pelo PWV em telado	39
4.4 Transmissão e distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas	45
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Mosaico e deformação foliar causada pelo PWV (a); mosaico foliar amarelo intenso causado pelo CMV (b); clareamento de nervuras causado pelo Rhabdovirus (c); folha superior sadia e folha inferior com mosaico amarelo brilhante causado pelo PFYMV (d); mosaico leve causado pelo PGMV (e); manchas verdes em folhas senescentes (f) e frutos (g) causados pelo Rhabdovirus da pinta verde do maracujazeiro.....	13
2 Vista geral do telado localizado na região produtora de Lucianópolis, SP.....	21
3 Croqui da distribuição das plantas no telado no município de Lucianópolis, SP	22
4 Classificação de frutos de maracujazeiro baseada no critério da Associação de Fruticultores de Vera Cruz (AFRUEC).....	25
5 Regiões de um ramo de maracujazeiro infectado com o CMV no campo: região assintomática na parte mais velha do ramo (1); região contendo a primeira folha sintomática (2); região contendo a última folha sintomática (3) e ponta assintomática do ramo (4).....	26
6 Micrografia eletrônica de secção de folha de maracujazeiro com sintomas de clareamento de nervuras mostrando grupos de partículas do tipo Rhabdovirus (*) na cavidade perinuclear de uma célula do parênquima do mesófilo. A seta mostra uma partícula em processo de morfogênese (brotação). N-núcleo (X 91.800)	35

- 7 Área foliar média de plantas sadias (S) e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP) em casa-de-vegetação. Barras com letras distintas, dentro de cada experimento (outubro/novembro de 1998, janeiro/fevereiro de 1999 e julho/agosto de 1999), diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey 38
- 8 Evolução do índice de área foliar (LAI)* em função do tempo a partir do 9º mês após o transplante, para as plantas inoculadas, mecanicamente com o PWV, aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses e aquelas infectadas naturalmente entre 7 e 8 (D) meses após o transplante em telados. x = valores médios estimados em cada avaliação. Linhas representam a evolução do LAI utilizando-se o modelo de ajuste monomolecular 42
- 9 Número de frutos e produção média por planta de maracujazeiro após inoculação mecânica com o PWV aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses e infecção natural entre 7 e 8 meses (D) após o transplante em telado. Barras com letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey 44
- 10 Índice de área foliar (IAF) e produção correspondente das plantas de maracujazeiro submetidas a inoculação mecânica e naturalmente infectadas com o PWV sob telado (pontos) e relação entre as variáveis (linha) estabelecida após regressão linear entre produção (variável dependente - y) e índice de área foliar (variável independente - x). R^2 representa o coeficiente de determinação da regressão linear 47

- 11 Testes de "Western-blot" de amostras de folhas cotiledonares inoculada (a); folhas do ponteiro (b) e sistema radicular (c) de 10 plantas de maracujazeiro inoculadas na fase cotiledonar com o CMV. (M) marcador de peso molecular; (+) controle positivo ; (-) controle negativo e (1 a 10) plantas de maracujazeiro inoculadas com o CMV 48
- 12 Teste de "Western-blot"* de subamostras obtidas de ramo de maracujazeiro infectado com o CMV em campo. (M) marcador de peso molecular; (+) controle positivo ; (-) controle negativo; (1, 2, 3 e 4) subamostras obtidas das regiões F1, F2, F3 e F4, respectivamente..... 50

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Incidência do " <i>Passion fruit woodiness virus</i> " (PWV), do " <i>Cucumber mosaic virus</i> " (CMV) e do vírus do clareamento das nervuras (Rhabdovirus) em amostras coletadas em 45 pomares de maracujazeiro localizados em 9 municípios na Alta Paulista, SP	31
2 Incidência do " <i>Cucumber mosaic virus</i> " (CMV) em maracujazeiros em função da população de trapoeraba (<i>Comellina sp</i>) infectada entre as linhas de plantio	37
3 Peso fresco da parte aérea, do sistema radicular e total, de plantas de maracujazeiro sadias e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP), em 3 experimentos distintos realizados em casa-de-vegetação.....	40
4 Peso seco da parte aérea, do sistema radicular e total, de plantas de maracujazeiro sadias e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP), em 3 experimentos distintos realizados em casa-de-vegetação	41
5 Parâmetros (b1, b2, b3) e coeficiente de determinação (R ²) da função monomolecular, ajustada aos dados de evolução do índice de área foliar em função do tempo, para os 4 tratamentos: inoculação de plantas de maracujazeiro com o PWV aos 2, 4 e 6 meses e infecção natural entre 7 e 8 meses após o transplante em telado	43

- 6 Porcentagem média de frutos 1A, 2A, 3A, Campeão (CP), endurecido (END) e indústria (IND) produzidos por planta de maracujazeiro após inoculação mecânica com o PWV aos 2, 4 e 6 meses e infecção natural entre 7 e 8 meses após o transplante em telado 46
- 7 Número médio de lesões locais em cotilédones de plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) inoculadas com extratos de subamostras de folhas (F1, F2, F3 e F4) e de ramos (R1, R2, R3 e R4) obtidos de 5 ramos de maracujazeiros com sintomas de CMV coletados em campo 51

**VIROSES DO MARACUJAZEIRO: INCIDÊNCIA NA ALTA PAULISTA – SP;
DANOS CAUSADOS PELO “*PASSION FRUIT WOODINESS VIRUS*” (PWV) E
SINTOMATOLOGIA DO “*CUCUMBER MOSAIC VIRUS*” (CMV)**

Autor: RICARDO GIORIA

Orientador: Prof. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

RESUMO

Esse trabalho apresenta resultados referentes a incidência de viroses na região da Alta Paulista, SP, e danos causados pelo “*Passion fruit woodiness virus*” (PWV) em maracujazeiros, avaliando-se plantas em casa-de-vegetação e em telado em Lucianópolis (SP). Em adição, foram realizados estudos sobre a distribuição do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) em áreas sintomáticas e assintomáticas de ramos de plantas infectadas em campo.

Foram visitadas 45 pomares, constituídos por aproximadamente 75.000 plantas, abrangendo 9 municípios. Foram avaliadas visualmente 991 plantas, coletando-se 310 amostras para análise laboratorial. Com base nas avaliações visuais, observaram-se plantas exibindo sintomas semelhantes aos descritos para o Rhabdovirus causador do clareamento de nervuras, o CMV e o PWV. As amostras coletadas, com sintomas característicos daqueles induzidos pelo CMV e PWV, reagiram com os respectivos antissoros contra esses vírus em PTA-ELISA, sendo suas incidências estimadas em 40,7% e 71,8%, respectivamente. No caso do clareamento de nervuras, foram analisados cortes ultra finos de tecidos de apenas 10 amostras, entre as 57 sintomáticas observadas em campo. Em todas elas foram encontradas partículas do tipo Rhabdovirus. Com base nestes dados

estimou-se que a incidência desta virose foi da ordem de 5,8%.

O CMV, segundo vírus em incidência nos plantios da região, apesar de ser um vírus cosmopolita, infectar mais de 80 espécies vegetais, ser transmitido por diversas espécies de afídeos de forma não persistente e já ter sido relatado em maracujazeiro em diversas partes do mundo, parece possuir importância reduzida pois tem distribuição aparentemente limitada nos ramos. Testes biológicos e serológicos de PTA-ELISA e “Western-blot” demonstraram que esse vírus encontra-se aparentemente restrito apenas a trechos sintomáticos dos ramos de plantas de maracujazeiro. Estudos adicionais para melhor compreensão desse fenômeno estão em andamento.

As avaliações de danos causados por 4 isolados do PWV de diferentes origens (Minas Gerais, Pernambuco, Ceará e São Paulo) em plantas em casa-de-vegetação apontaram reduções de até 50% em área foliar, pesos fresco e seco da parte aérea e do sistema radicular. Em telado, compararam-se o desenvolvimento e a produção de plantas inoculadas mecanicamente aos 2, 4 e 6 meses e infectadas naturalmente entre 7 e 8 meses após o transplante. Estas últimas representavam os controles sadios que foram casualmente infectadas devido a possível entrada de afídeos dentro do telado. Avaliações de desenvolvimento das plantas dos diferentes tratamentos indicaram que o índice de área foliar (IAF) estabilizou, próximo aos 12 meses após o transplante, ao redor de 4,4, 3,8, 5,6 e 10,0 respectivamente. Os resultados de produção, avaliada com base no peso e número de frutos por planta, realizada durante 5 meses, indicaram que as plantas infectadas aos 2, 4, 6 e entre 7 - 8 meses produziram, em média, 16, 20, 44 e 77 frutos e 2,4, 3,4, 6,9 e 12,9 kg, respectivamente. Quanto mais tarde ocorreu a infecção, maior a quantidade de frutos para a mesa e menor a daqueles endurecidos ou destinados à indústria. Esses resultados são sugestivos de que a retirada sistemática de plantas doentes nos 6 a 8 primeiros meses após o transplante, pode ser uma alternativa para minimizar os danos causados pelo PWV nos maracujazais, enquanto medidas duradouras de controle não são desenvolvidas.

**PASSIONFLOWER VIRUSES: INCIDENCE IN THE NORTHWEST REGION
OF SÃO PAULO STATE; DAMAGE CAUSED BY THE *PASSION FRUIT
WOODINES VIRUS (PWV)* AND SINTOMATOLOGY CAUSED BY
*CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)***

Author: RICARDO GIORIA

Adviser: Prof. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

SUMMARY

A survey was carried out for evaluating the relative incidence of *Passion fruit woodiness virus (PWV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)* and a Rhabdovirus like-particles causing vein clearing symptoms in passionflower plantings in the Northwest region of the State of São Paulo, Brazil. Forty five orchards, totaling approximately 75,000 plants, were visited and 991 randomly chosen plants were visually inspected for characteristic symptoms induced by these viruses. Samples from 310 plants were collected and analyzed by PTA-ELISA using antisera against *Passion fruit woodiness virus (PWV)* and *Cucumber mosaic virus (CMV)*. Ten samples with vein clearing symptoms were examined on thin section in the electron microscope, to confirm the association with Rhabdovirus like particles. PWV and CMV were the most frequently found viruses, with incidences of 71,8% and 40,7%, respectively. Incidence of vein clearing apparently associated with a possible Rhabdovirus was 5,8%.

Although CMV was the second virus in incidence, its importance is apparently small, because the virus has limited distribution in the passionflower stems. Biological and serological (PTA-ELISA and Western-blot) assays showed that CMV was apparently restricted to symptomatic parts of the stems from

infected plants in the field. Further studies for better understanding of this phenomenon are underway.

Studies were also done to evaluate the effect of PWV infection on plant development in the greenhouse and yield losses under screenhouse in the field. In the greenhouse, plants mechanically inoculated with four isolates of PWV showed 50% reduction in leaf area and fresh and dry weight of upper part and root system, independently of the virus isolate. Passionflower plants grown under screenhouse were mechanically inoculated with PWV at 2, 4 and 6 months after transplanting. Healthy control plants were naturally infected by PWV 7 to 8 months after transplanting, due to accidental entrance of aphids into the greenhouse. Leaf area indexes (LAI) for plants inoculated at different age were stabilized at 4,4, 3,8, 5,6 and 10,0, respectively, 12 months after transplanting. Fruits harvested during 5 months indicated that plants infected at 2, 4, 6 and between 7 and 8 months after transplanting showed average yields of 2,4, 3,4, 6,9 and 12,9 kg, respectively. The number of woody fruits was drastically reduced on later infected plants. These results are indicative that systematic elimination of diseased plants during the first 6 to 8 months after transplanting can be an option to minimize the damage caused by PWV in passionflower orchards, while more permanent control measures are not developed.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.), seguido de Peru, Colômbia, Índia e Quênia (FNP, 1998), com uma área plantada, em 1994, em torno de 33.000 ha (FNP, 1999), tem apresentado uma evolução técnica nesta cultura ao longo dos últimos 20 anos (Piza Jr. & Rezende, 1993). As regiões Nordeste e Sudeste do país respondem por aproximadamente 49% e 20% desta área, respectivamente. Apesar do Nordeste representar a maior área produtora, é na região Norte que se encontra o maior estado produtor, o Pará, com aproximadamente 25% de toda área cultivada com maracujazeiros no Brasil (FNP, 1999).

A cultura dessa frutífera vem servindo de suporte econômico principalmente para pequenos produtores em função do escalonamento de produção e, conseqüentemente, da receita recebida. Dados fornecidos pelo CEAGESP, contabilizaram que, em 1998 comercializaram-se 19.570 ton de maracujá ao preço médio de R\$ 0,88/kg, sendo o maracujá azedo ou amarelo responsável por aproximadamente 92% deste volume. Do total comercializado no Estado de São Paulo em 1999, mais de um terço é oriundo da região da Alta Paulista, que possui atualmente 522 ha plantados com maracujazeiro (informação EDR/CATI, Marília, SP).

Com a expansão da cultura em São Paulo passaram a aparecer os problemas fitossanitários, entre os quais as doenças de etiologia viral, uma das possíveis causas da redução da área cultivada de 1.559 ha em 1996 para, 522 ha em 1999, somente na região da Alta Paulista (informação EDR/CATI, Marília, SP).

Entre os vírus que podem afetar a cultura do maracujazeiro já relatados no Brasil, pode-se mencionar o do endurecimento dos frutos ("*Passion fruit woodiness virus*" - PWV), o do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*" - CMV), o do clareamento das nervuras (Rhabdovirus), o do mosaico amarelo ("*Passionfruit yellow mosaic virus*" - PFYMV), o do mosaico do maracujá roxo ("*Purple granadilla mosaic virus*" - PGMV) e o vírus causador da pinta verde (Rhabdovirus) (Kitajima et al., 1986; Chagas, 1991; Rezende, 1994; Kitajima et al., 1997). Este último foi recentemente constatado na região de Vera Cruz associado com perdas de até 100% em pomares severamente afetados.

Entre esses vírus, o que causa o endurecimento dos frutos parece ser o mais importante em todas as áreas produtoras de maracujá, não só no Brasil, como em outros países onde ocorre. No estado do Ceará, Bezerra & Lima (1992) constataram incidência de 60% a 80% do PWV em plantios comerciais na região da Serra da Ibiapaba. Embora não existam dados dessa natureza para os demais estados brasileiros, todos os que escreveram sobre o assunto sempre apontaram a predominância do PWV nos plantios de maracujazeiro (Kitajima et al., 1986; Chagas, 1991; Rezende, 1994).

Os prejuízos causados pelo PWV na cultura do maracujazeiro são considerados graves na Austrália e em Pernambuco, onde atribuiu-se a ele queda de produtividade e redução na área cultivada e na vida econômica do pomar (Peasley & Fitzell, 1981; Pares et al., 1985; Costa et al., 1995). Em São Paulo, não se tem estudos quantitativos de danos causados pelo PWV, embora o vírus esteja disseminado por todas as regiões produtoras dessa frutífera. Informações sobre danos causados pelos demais vírus são inexistentes, havendo apenas informações generalizadas, em Taiwan, de produções de 9.000 kg/ha e 13.900 kg/ha em campos com 89% e 59% de plantas infectadas com diferentes vírus, respectivamente (Chang et al., 1992).

Assim, o presente trabalho teve por objetivos: estudar a incidência dos diferentes vírus em culturas de maracujazeiro em regiões produtoras da Alta Paulista; avaliar os efeitos de isolados do PWV, de diferentes regiões do Brasil, no

desenvolvimento de plantas de maracujazeiro em casa-de-vegetação e quantificar os danos causados pelo PWV em maracujazeiro, em relação ao desenvolvimento e a produção das plantas, em condições de campo. Em adição foram realizados estudos sobre a distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas de ramos de plantas infectadas em campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Passiflora é um dos gêneros das mais de 600 espécies tropicais e subtropicais comumente denominadas por maracujá e membro da família Passifloraceae (Salomão & Andrade, 1987). Entre essas espécies, mais de 150 são indígenas do Brasil, dentre as quais mais de 60 produzem frutos que podem servir como alimento ou no preparo de sucos (Hoehne, 1946). Com importância econômica pelo seu maior cultivo destacam-se o maracujá amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) o maracujá roxo (*P. edulis* Sims.) e o maracujá doce (*P. alata* Ait.) (Silva & São José, 1994).

Muitos são os gêneros de vírus relatados mundialmente que possuem espécies causando infecção em plantas do gênero *Passiflora* podendo-se citar: *Carlavirus* (Pares et al., 1997), *Cucumovirus* (Magee, 1948), *Geminivirus* (Brown, 1993), *Nepovirus* (Koenig & Fribourg, 1986), *Potyvirus* (McKnight, 1953), *Rhabdovirus* (Batista et al., 1981; Kitajima et al., 1997), *Tobamovirus* (Fribourg et al., 1987), e *Tymovirus* (Crestani et al., 1984 e 1986). Entre esses, 4 possuem espécies já relatadas no Brasil sendo respectivamente o *Cucumovirus* do mosaico do pepino (Colariccio et al., 1987), o *Potyvirus* causador do endurecimento dos frutos (Yamashiro & Chagas, 1979, Chagas et al., 1981), os *Rhabdovirus* do clareamento das nervuras (Batista et al., 1981) e o causador da pinta verde (Kitajima et al., 1997) e o *Tymovirus* causador do mosaico amarelo encontrado no município de Cachoeira de Macacu, Estado do Rio de Janeiro (Crestani et al., 1984 e 1986). Acrescente-se a estes o vírus do mosaico do maracujá roxo, relatado no Brasil na região de Cotia, Estado de São Paulo, mas que ainda não se encontra caracterizado taxonomicamente (Chagas et al., 1984 a).

Das virose já relatadas no Brasil, apenas as causadas pelo CMV e, principalmente, pelo PWV assumem importante papel nos maracujazais, pelos constantes relatos de ocorrência e possíveis danos à cultura. As demais não parecem prejudiciais aos maracujazais, exceção da pinta verde, causada por um possível Rhabdovirus, que foi recentemente responsável por danos de até 100% em área produtoras da região da Alta Paulista (Kitajima et al., 1997). Esses danos foram atribuídos principalmente a um provável desbalanço populacional do vetor do vírus, o ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes. A adoção de medidas de controle do ácaro, com possível restabelecimento do equilíbrio populacional, associada com o fato de a infecção com o vírus da pinta verde ficar restrita ao local de alimentação do vetor, praticamente eliminaram o problema na cultura do maracujazeiro. O Rhabdovirus causador do clareamento de nervuras apresenta uma incidência aparentemente inexpressiva enquanto que o PFYMV e o PGMV, parecem ter ficado, até o momento, restritos aos respectivos locais do primeiro relato.

A presença do CMV em maracujazeiro foi relatada pela primeira vez em 1948 na Austrália (Magee, 1948). Desde então esse vírus já foi constatado em plantas de *Passiflora* na Califórnia (Teakle et al., 1963), no Japão (Yonaha et al., 1979) e no Brasil (Chagas et al., 1984b; Colariccio et al., 1987). Devido ao fato desse vírus ser de distribuição mundial, infectar centenas de espécies vegetais e ser transmitido de forma não persistente por afídeos, acreditava-se, a princípio, que poderia causar doença de importância para a cultura do maracujazeiro. Essa suspeita não parece ter se confirmado até o momento.

O CMV é o vírus tipo do gênero *Cucumovirus*, apresentando partículas isométricas de aproximadamente 29 nm de diâmetro, com ácido nucléico constituído por 4 segmentos de fitas simples de RNA, sendo o RNA-4 subgenômico. Foi relatado pela primeira vez como agente causal de doença de plantas há mais de 80 anos. Encontra-se distribuído mundialmente e possui ampla gama de hospedeiros, infectando espécies de mais de 80 famílias, que abrangem desde hortaliças até plantas frutíferas e ornamentais, causando em

alguns casos danos expressivos (Palukaitis et al., 1992). Não há relatos sobre danos e formas de controle do CMV em maracujazeiro .

Os sintomas causados pelo CMV caracterizam-se principalmente por mosaico amarelo intenso, acompanhado de anéis e/ou semi-anéis amarelo-intenso e em alguns casos, deformações foliares. Também tem sido atribuída a esse vírus eventual deformação e endurecimento de frutos, semelhante ao já relatado para o PWV (Taylor & Kimble, 1964). Pontuações cloróticas também podem ocorrer nas nervuras induzindo leve deformação do limbo foliar (Colariccio et al., 1987). Taylor & Kimble (1964) apontaram que os sintomas causados pelo CMV, em plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, na Austrália, apresentavam uma distribuição limitada. No Brasil, Colariccio et al. (1992) e Rezende (1994) apontaram que ramos de maracujazeiros infectados com o CMV apresentam tendência generalizada de recuperação de sintomas. Em contraposição, relato recente sobre a incidência do CMV em maracujazeiros no Estado do Paraná apontou a ocorrência de sintomas mais duradouros em plantas inoculadas experimentalmente (Barbosa et al., 1999). Teakle et al. (1963), em experimentos com espécies de *Passiflora*, cultivadas principalmente como ornamentais na Califórnia, constataram sintomas sistêmico do CMV em plantas de *P. caerulea*, mas não em *P. edulis*, *P. foetida*, *P. incarnata*, *P. suberosa* e *P. subpertata* (*P. alba*).

Experimentalmente a transmissão mecânica deste vírus para plantas de *P. edulis* tem sido possível, porém problemática. Taylor & Kimble (1964) não tiveram sucesso na transmissão mecânica do CMV para plantas de *P. edulis*. No entanto, quando este coexistia com o PWV na fonte de inóculo, a transmissão foi possível através de afídeos. Transmissões mecânicas, no Brasil, só ocorreram com sucesso quando plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram inoculadas no estádio de 2 a 4 folhas (Colariccio et al., 1987). Problemas dessa natureza não parecem ter sido encontrados por Barbosa et al. (1999) na transmissão experimental do CMV por afídeos e mecanicamente.

O PWV possui ampla distribuição geográfica, tendo sido primeiramente relatado na Austrália (McKnight, 1953). Posteriormente foi encontrado em várias outras regiões do mundo (Kitajima et al., 1986), inclusive recentemente no Japão (Iwata et al., 1996). No Brasil, o PWV foi constatado pela primeira vez no final da década de 70, no estado da Bahia (Yamashiro & Chagas, 1979; Chagas et al., 1981). Mais tarde foi relatado nos estados de Pernambuco (Loreto & Vital, 1983), Ceará, Sergipe (Kitajima et al., 1986), São Paulo (Chagas et al., 1992), Minas Gerais (São José et al., 1994), Distrito Federal (Inoue et al., 1995) e Pará (Trindade et al., 1999). Suspeita-se que a introdução do PWV no Estado do Pará ocorreu através de mudas infectadas adquiridas dos Estados da Bahia e Minas Gerais, onde o vírus já ocorre há mais tempo (Trindade et al., 1999).

Os sintomas causados pelo PWV em maracujazeiro no Brasil são bastante semelhantes aos relatados na Austrália, onde o vírus foi primeiramente constatado (McKnight, 1953). Maracujazeiros infectados pelo PWV mostram sintomas generalizados de mosaico foliar, com intensidade variável, podendo vir acompanhado de bolhas, rugosidades e deformações do limbo foliar. As plantas afetadas podem apresentar-se com o crescimento retardado, bem como encurtamento dos entrenós. Os frutos podem ficar deformados e menores do que os produzidos por plantas sadias. O pericarpo fica com espessura irregular e consistência endurecida. Com o espessamento do pericarpo há uma redução na cavidade da polpa (Taylor & Greber, 1973; Chagas et al., 1981; Kitajima et al., 1986; Piza Jr. & Rezende, 1993).

Os sintomas da doença nos frutos não são específicos da infecção com o PWV, o que os torna de valor reduzido para diagnóstico. Infecções de maracujazeiros com o CMV, conforme apontado anteriormente, também podem ocasionar o aparecimento de frutos menores, deformados e endurecidos (Taylor & Kimble, 1964; Colariccio et al., 1987). Picadas de insetos e fatores nutricionais também podem estar associados a esse tipo de sintoma nos frutos.

O PWV, como já mencionado, pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviriidae*, cujas partículas do tipo flexuosa medem 670 - 750 nm de

comprimento por 12 - 15 nm de diâmetro. Apresenta RNA de fita simples, positiva, produzindo inclusões do tipo cata-vento que são características do gênero (Taylor & Greber, 1973). Esse vírus infecta pelo menos 44 espécies de dicotiledôneas. Deste total, 10 são espécies de *Passiflora* e 18 de leguminosas, dentre as quais encontram-se o amendoim (*Arachys hypogaea* L.), a crotalária (*Crotalaria juncea* L.), a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e alguns feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.), porém, para essas espécies não se conhecem relatos de infecção natural associada com danos econômicos. Estudos efetuados com 6 isolados do PWV, obtidos de diferentes estados brasileiros, não demonstraram diferenças significativas quanto aos sintomas induzidos em diferentes espécies de leguminosas e em maracujazeiros (Gioria & Rezende, 1996). O PWV não é transmitido por sementes de maracujazeiro, porém há um relato de sua transmissão por sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Preto 153) (Costa, 1985). No campo a transmissão natural se dá por meio de afídeos, principalmente *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover (Chagas et al., 1981), sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente (Taylor & Greber, 1973). Outras espécies como *Aphis solanella*, *Toxoptera citricidus* Kirk., *Uroleucon ambrosiae* e *U. sonchii* também podem transmitir o PWV como demonstrado por Costa et al. (1995).

O controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na Austrália tem sido feito satisfatoriamente através do uso de híbridos de maracujazeiros amarelo e roxo, que são mais tolerantes à doença (Taylor & Greber, 1973). Em muitos casos o controle também tem sido alcançado por meio de híbridos tolerantes infectados com estirpes fracas premunizantes, cujas pesquisas iniciais foram feitas por Simmonds (1959). Em Taiwan, propostas de utilização de mudas saudáveis, em substituições anuais de plantas atacadas em campo, embora trabalhosa, indicou ser uma medida de controle capaz de reduzir a incidência de viroses em geral e minimizar danos de produção (Chang et al., 1992). No Brasil, todos aqueles que escreveram sobre essa doença fizeram recomendações no sentido de se evitar a disseminação do vírus para áreas ainda indenidas ou para

minimizar o problema nas regiões onde a doença ocorre. Além disso, apontaram algumas linhas de trabalho para o desenvolvimento de métodos de controle através de resistência ou tolerância e premunização com estirpes fracas (Kitajima et al., 1986; Chagas et al., 1991; Rezende, 1994). Estudos nessas linhas de abordagem do problema encontram-se em andamento no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba (Q. S. Novaes, informação pessoal).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de plantas-teste

Nos estudos conduzidos em casa-de-vegetação, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", foram utilizadas plantas de maracujazeiro amarelo 'Sul Brasil' (*P. edulis* f. *flavicarpa*), de fumo (*Nicotiana tabacum* L. cv Turkish) e de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L. cv. Caserta).

Com o objetivo de ter constante disponibilidade de plantas-teste, as sementeiras foram feitas a intervalos de 15 a 20 dias. Para isso utilizaram-se vasos de alumínio de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, cheios de terra misturada com composto de matéria orgânica e adubo mineral. Tanto os vasos como a terra empregada para plantio foram autoclavados a 121°C por 2 horas. Na sementeira do maracujazeiro e do fumo foram colocadas várias sementes por vaso. Após a germinação, quando as mudas atingiram 2 cm de altura, foram transplantadas para vasos de mesmo tamanho, colocando-se 2 plantas em cada um. No caso da abobrinha de moita 'Caserta' foram colocadas 4 sementes por vaso, sendo mantidas, após a germinação, 2 plantas em cada um. As plantas-teste foram freqüentemente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia por vaso.

3.2 Isolados do PWV

Para os testes em casa-de-vegetação foram utilizados 4 isolados do PWV, coletados em plantios comerciais de maracujazeiro de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Ceará (CE) e Pernambuco (PE). Esses isolados foram mantidos individualmente em plantas de maracujazeiro, em casa-de-vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ/USP.

Para o teste em campo utilizou-se um isolado do PWV coletado na própria localidade do experimento.

3.3 Inoculação mecânica

A inoculação dos isolados do PWV e do CMV em plantas-teste foi feita mecanicamente. Inóculos dos vírus foram obtidos a partir de folhas de maracujazeiro infectadas, macerando-as em almofariz, em presença de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio até atingir a mesma molaridade. As inoculações foram feitas nas folhas das plantas-teste previamente polvilhadas com carborundum, friccionando-as com o indicador umedecido no inóculo. Em seguida lavaram-se as folhas para a retirada do excesso de abrasivo e de inóculo.

3.4 Técnicas utilizadas na detecção e identificação dos vírus

3.4.1 Avaliação de sintomas

Todas as plantas observadas em campo foram inicialmente avaliadas com base nos sintomas descritos para as diferentes viroses do maracujazeiro (Pares et al., 1985; Kitajima et al., 1986; Rezende, 1994; Kitajima et al., 1997). Caracterizando o endurecimento dos frutos principalmente por sintoma de

mosaico foliar de intensidade variada, induzindo a deformação de folhas e formação de bolhas (Figura 1a); o mosaico do pepino pela presença de mosaico amarelo intenso com eventual aparecimento de anéis e/ou semi-anéis de mesma coloração (Figura 1b); o clareamento de nervuras, por internódios curtos, folhas pequenas e coriáceas e, principalmente, clareamento de nervuras (Figura 1c); o mosaico amarelo do maracujazeiro pela presença de mosaico amarelo brilhante ou clorose intensa de nervuras (Figura 1d); o mosaico do maracujá roxo por leve mosaico, praticamente exclusivo a maracujá roxo (Figura 1e) e a pinta verde do maracujazeiro sendo caracterizado por pequenas manchas verdes em frutos maduros (Figura 1f) e folhas senescentes (Figura 1g) e lesões necróticas em ramos. Vale ressaltar que para o caso do clareamento de nervuras o principal sintoma utilizado para sua distinção foi o próprio clareamento de nervuras (Figura 1c).

3.4.2 PTA-ELISA

A indexação para a presença do PWV e do CMV foi feita através do teste serológico de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"), do tipo PTA ("Plate Trapped Antigen"), com algumas modificações da forma descrita por Mowat & Dawson (1987). Utilizaram-se antissoros para o PWV e o CMV, existentes no laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP. Amostras individuais de tecido vegetal foram maceradas em almofariz na presença de tampão carbonato (0,015 M Na_2CO_3 , 0,035 NaHCO_3 , pH 9,6), na diluição de 1:20, sendo então colocados 100 μL destas amostras, por pocinho, em uma placa de ELISA, usando o mínimo de 2 pocinhos por amostra. Promoveu-se a incubação por 1,5 hora a 37°C , seguida de 3 lavagens consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl , 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl , pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20/L), adicionando-se posteriormente 100 μL de antissoros específicos diluído 1:1000 em tampão Tris-HCl, (0,2 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl , pH 7,2). Novamente a placa de

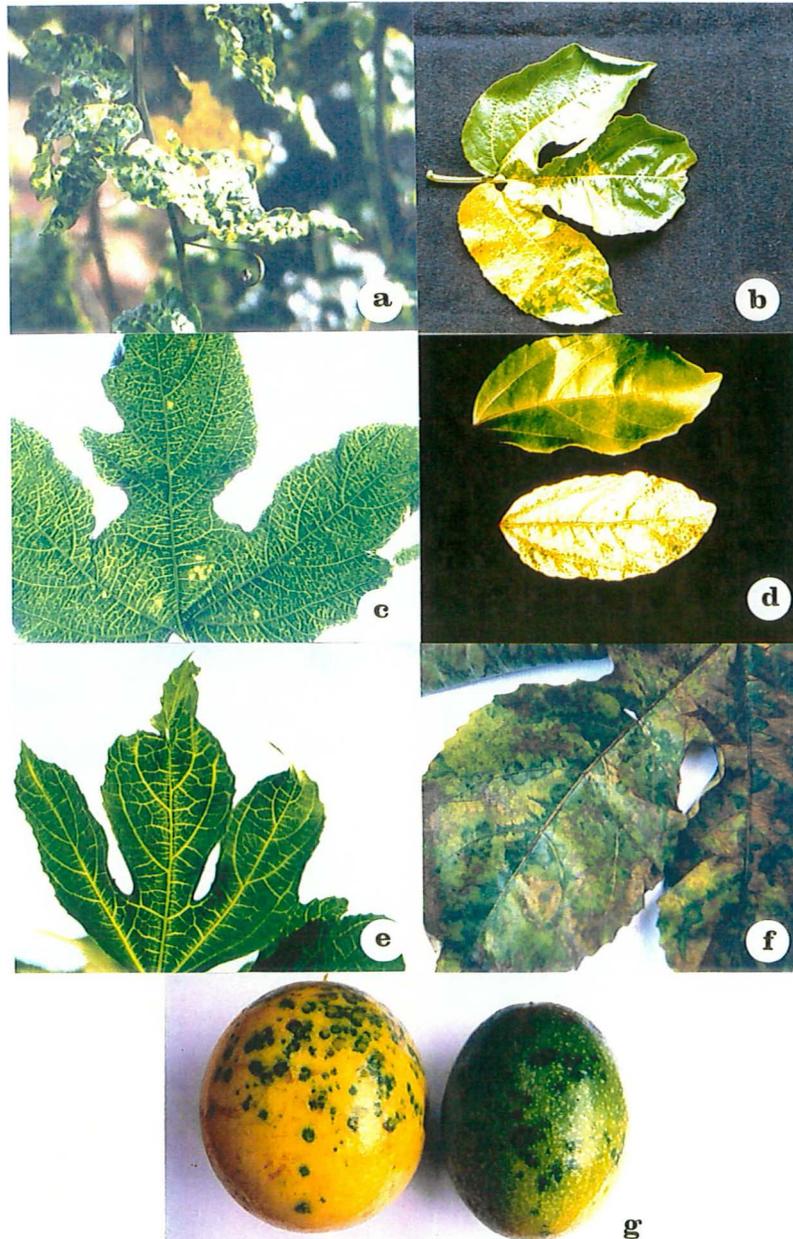


Figura 1. Mosaico e deformação foliar causada pelo PWV (a); mosaico foliar amarelo interiso causado pelo CMV (b); clareamento de nervuras causado pelo Rhabdovirus (c); folha superior sadia e folha inferior com mosaico amarelo brilhante causado pelo PFYMV (Foto E.W. Kitajima) (d); mosaico leve causado pelo PGMV (Foto E.W. Kitajima) (e); manchas verdes em folhas senescentes (f) e frutos (g) causadas pelo Rhabdovirus da pinta verde do maracujazeiro.

ELISA foi incubada por 1,5 hora a 37°C e lavada com PBS-Tween 3 vezes consecutivas. Posteriormente 100 µL de imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em tampão Tris-HCl, pH 7,2 foram adicionados em cada pocinho, promovendo-se a incubação e as lavagens como detalhadas para as fases anteriores. Decorrido o período de 1,5 h foram colocados 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA N-9389), diluído em dietanolamina (0,6 mg/mL), em cada pocinho. O substrato foi incubando à temperatura ambiente, no escuro, por 30 a 60 minutos. A reação foi avaliada medindo-se a absorbância a 405 nm em leitor de ELISA da marca Metertech Σ 960. Uma amostra foi considerada positiva quando seu valor de absorbância foi superior a 3 vezes o valor de absorbância de extratos de plantas sabidamente sadias. Amostras de plantas infectadas com cada um dos dois vírus a serem testados, denominadas controles positivos, e amostras de plantas sadias, controles negativos, foram utilizadas em cada teste.

3.4.3 “ Western-Blot”

A técnica serológica de “Western-blot” foi utilizada principalmente nos estudos relacionados com a infecção do maracujazeiro com o CMV, seguindo-se o protocolo descrito por Conci (1999). Inicialmente extraíram-se as proteínas totais de tecidos foliares, macerado-os em tampão TE 1X (TRIS 1,0 M, pH 7,4, EDTA 0,5 M, pH 8,0) na proporção de 0,25 g de amostra para 500 µL de tampão. Duzento µL desta suspensão foram misturados com igual volume de tampão de dissociação (TRIS 0,5 M, pH 6,8; SDS 5%; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 5%). A desnaturação das proteínas foi completada incubando-se as amostras em água fervente, por 5 minutos, seguida de centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se um aparelho “Bio Rad Mini Protean II”. O gel de separação foi composto por acrilamida 12,5%, água

destilada, TRIS 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,1% e TEMED 0.033% e o gel de empilhamento por acrilamida 4%, água destilada, TRIS 1,0 M, pH 6,8, SDS 1%, APS 1% e TEMED 0,05%. Cada canaleta do gel recebeu 10 µL da amostra a ser analisada. Uma canaleta recebeu 10 µL de proteínas marcadoras, com peso molecular na faixa de 10 kDa a 250 kDa (Rainbow, Amersham LIFE SCIENCE). Promoveu-se a eletroforese por 20 minutos a 95 Volts, até a linha frontal do azul de bromofenol atingir o gel separador. Em seguida a voltagem foi elevada para 125 Volts. A corrida foi interrompida quando as amostras chegaram na base do gel.

Posteriormente as proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, empregando-se tampão de transferência (TRIS 1,0 M, glicine 1,5%, metanol 20%). A transferência foi feita em um aparelho "Bio Rad Mini trans-blot cell", por 90 minutos a 0,25 mA.

A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação serológica, a fim de revelar a presença da proteína da capa protéica do vírus analisado. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 minutos com TBS (TRIS 0,002 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M)/Tween 20 (0,05%). Em seguida foi incubada em TBS/Tween contendo 7,5% de leite em pó desnatado, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Transferiu-se a membrana para uma suspensão de anticorpo específico contra o vírus a ser testado, diluído 1:1.000, em TBS/Tween contendo leite em pó desnatado 7,5%; incubando-a sob agitação constante, durante de 3 a 4 horas, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 2 a 3 minutos, 3 vezes, consecutivamente, com TBS/Tween. A seguir a membrana foi incubada, por 2 a 3 horas sob agitação constante à temperatura ambiente, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em TBS/Tween + leite em pó desnatado 7,5%. Depois desse período lavou-se 2 a 3 vezes a membrana em TBS/Tween, durante 2 a 3 minutos cada vez. Finalmente adicionou-se o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitro blue tetrazolium, pH 9,5 (NBT/BCIP - SIGMA B-5655), diluído em água destilada na proporção de uma pastilha de

NBT/BCIP para 10 ml de água. Parou-se a reação lavando-se a membrana com água destilada. Uma reação foi considerada positiva quando a proteína revelada pela reação serológica apresentava peso molecular similar ao conhecido para a proteína da capa protéica do vírus analisado.

3.4.4 Microscopia eletrônica

Para os casos de vírus para os quais não se dispõem de antissoros para a indexação sorológica, foram feitos estudos de microscopia eletrônica. Neste caso foram utilizadas as técnicas de imersão foliar rápida ("leaf dip") e/ou observações de cortes ultra finos de tecidos de plantas doentes (Kitajima & Nome, 1999). As amostras foram examinadas em um microscópio de transmissão Zeiss EM 900, do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

Amostras para análise por "leaf dip" foram preparadas macerando-se tecido sintomático em tampão fosfato 0,1 M. Uma gota (30 - 50 μ L) desta suspensão foi depositada em "parafilm", sobre a qual foi colocada uma telinha de microscopia eletrônica de transmissão. Após 3 a 5 minutos a telinha foi removida e lavada em água destilada, três vezes consecutivas. A contrastação foi feita com solução de acetato de uranila 1% durante 2 a 3 minutos.

Para a observação de cortes ultra finos as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos de 1 a 3 mm² e pré-fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato ou fosfato 0,05 M, pH 7,2) por pelo menos 60 minutos. Promoveu-se a lavagem do tecido pré-fixado em tampão cacodilato 0,05 M, por 10 minutos, três vezes consecutivas. Para pós-fixação utilizou-se OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 1 a 2 horas. Decorrido este período lavou-se a amostra com água destilada, fixando-a, em seguida, com acetato de uranila 1% durante uma noite. A amostra fixada foi desidratada em acetona (um vez, por 10 minutos, em acetona 30, 50, 70, 90%, e três vezes por 10 minutos em acetona 100%) e infiltrada com mistura 1:1 de acetona/Spurr por 3 a 4 horas, e posteriormente apenas com Spurr durante

a noite. O tecido fixado foi colocado em formas de silicone cheias de resina pura, cuja polimerização foi feita em estufa a 70°C, durante 48 horas.

Obtiveram-se cortes ultra-finos (50 - 100 nm) em ultramicrótomo Reicher, Ultracut E com navalha de diamante Diatone. Estes foram colocados em telinhas de microscopia eletrônica, contrastando-se as secções em acetato de uranila 3% por 15 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. As telinhas foram lavadas através da imersão (20 vezes) em água destilada, repetindo-se o procedimento três vezes consecutivas. Examinaram-se os cortes em microscópio eletrônico de transmissão.

3.5 Avaliação da incidência de viroses em maracujazeiro

3.5.1 Locais das avaliações

Os estudos sobre a incidência das viroses que afetam o maracujazeiro foram feitos em plantios comerciais na região Centro Oeste Paulista, envolvendo os municípios de Duartina, Fernão, Garça, Lácio, Lucianópolis, Lupércio, Marília, Oriente e Vera Cruz.

3.5.2 Número e coleta de amostras

Os pomares a serem visitados foram escolhidos, preferencialmente, em pontos extremos dos diversos municípios (regiões norte, sul, leste e oeste). Adotou-se como forma de amostragem as seguintes etapas: a) percorreu-se a área com a finalidade de reconhecimento da mesma; b) estabeleceu-se um intervalo de aproximadamente 10 m entre plantas a serem avaliadas visualmente; c) avaliou-se, visualmente, cada planta escolhida para os seguintes vírus: PWV, CMV, PFYMV, PGMV, pinta verde (Rhabdovirus) e clareamento de nervuras (Rhabdovirus); d) a cada 3 plantas avaliadas visualmente, coletaram-se amostras foliares e/ou de frutos, da terceira planta. Estas foram colocadas em sacos

plásticos devidamente etiquetados, para comprovação de infecção em laboratório, empregando-se técnicas serológicas e/ou de microscopia eletrônica. A amostragem do pomar geralmente seguiu a forma de um W.

3.5.3 Levantamento da população de trapoeraba (*Commelina sp*) entre as linhas de plantio.

Durante o as inspeções para avaliar a incidência de viroses em maracujazais, constatou-se em muitos pomares a presença da erva daninha trapoeraba (*Commelina sp*) com sintomas de mosaico. Amostras de plantas sintomáticas foram submetidas a PTA-ELISA, com antissoro específico contra o CMV, comprovando-se a presença desse vírus. Face a esta observação, procurou-se avaliar a incidência de trapoeraba entre as linhas de plantio, com a finalidade de se observar possíveis correlações com a presença do CMV em plantas de maracujazeiros.

A incidência de trapoeraba foi estimada selecionando-se 5 áreas entre as linhas de plantio, com 1 m², representativas do pomar. Nas áreas selecionadas, estimou-se visualmente a incidência de trapoeraba, sendo posteriormente obtida a média. Considerou-se incidência baixa quando as entrelinha apresentavam de 0% à 30% de recobrimento pela planta daninha, média de 30% a 60% e alta, acima de 60%.

3.6 Avaliação do efeito do PWV no desenvolvimento do maracujazeiro em casa-de-vegetação

Mudas de maracujazeiro amarelo 'Sul Brasil', com 4 folhas definitivas completamente expandidas, foram mecanicamente inoculadas com 4 isolados do PWV (São Paulo, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco). Cada um dos isolados foi inoculado separadamente em 5 plantas. O mesmo número de plantas foi inoculado apenas com o tampão para servir de controle.

Devido a homogeneidade das condições experimentais em casa-de-vegetação optou-se por um delineamento inteiramente casualizado, onde cada planta representou uma parcela.

Ao término do experimento foram avaliadas a área foliar, o número de folhas com sintomas e assintomáticas, o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular após toda a retirada do solo em água corrente, e o peso seco das mesmas partes. A área foliar foi medida com o auxílio de um medidor de área foliar portátil (Li-Cor L1-3000 A). O peso seco foi obtido após secagem das partes em sacos de papel, quando pesagens sucessivas indicaram peso constante. Para pesagem, utilizou-se uma balança semi-analítica.

Efetuaram-se 3 repetições do experimento, respectivamente, nos meses de outubro/novembro de 1998, janeiro/fevereiro e julho/agosto de 1999.

3.7 Avaliação de danos causados pelo PWV em telado

Os estudos de avaliações de danos causados pelo PWV em maracujazeiro foram executados em condições de telado, para evitar infecções indesejáveis que poderiam dificultar as comparações entre plantas sadias e aquelas sabidamente infectadas apenas com esse vírus. Esse experimento foi conduzido na propriedade Nossa Senhora Aparecida, do senhor José Yamagucci, localizada no município de Lucianópolis. A escolha dessa área foi efetuada com o auxílio dos profissionais da Associação de Fruticultores da Região de Vera Cruz (AFRUEC).

3.7.1 Construção do telado

O telado foi construído numa área previamente preparada para o plantio de maracujazeiros, de acordo com as técnicas convencionais da cultura para condução em espaldeira com fio de arame com 2,0 m de altura. O campo possuía área de 1.288 m² (28 m x 46 m), com 2,5 m de altura. A estrutura do telado que

serviu de suporte para a tela mosquiteiro foi feita de arame. A construção do telado ocorreu nos meses de novembro e dezembro de 1997. Na figura 2 é apresentada uma vista do telado.

3.7.2 Preparo das mudas

Nesse experimento foram utilizadas plantas de maracujazeiro amarelo de uma população melhorada IAC, cujas sementes foram cedidas pela Dra. Laura Molina Meletti, Seção de Fruticultura Tropical, IAC, Campinas. As mudas foram preparadas em viveiro da AFRUVEC, através da semeadura de 3 sementes em tubetes de poliestireno de 14,5 cm x 3,5 cm, contendo uma mistura de 3 partes de terra, 1 parte de esterco de curral peneirado e bem curtido, 3 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de cloreto de potássio. A semeadura foi feita em setembro de 97. Após a germinação foi efetuado o desbaste das mudas para permanência de uma plântula por tubete.

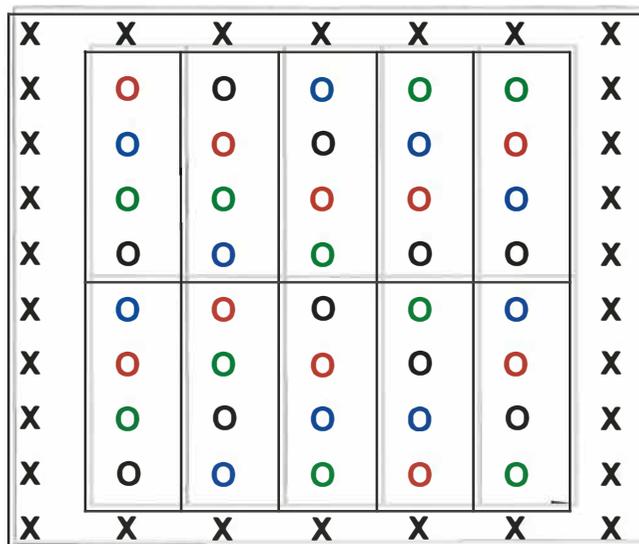
3.7.3 Transplante das mudas e condução do plantio

As mudas foram transplantadas em campo, sob condições de telado, no dia 17 de dezembro de 1997, quando atingiram o tamanho de aproximadamente 15 a 25 cm. Foram transplantadas 2 plantas por cova. Trinta dias após o transplante foi realizado o desbaste mantendo-se uma planta por cova. A área recebeu um total de 140 plantas, permanecendo com 70 após o desbaste. O espaçamento foi de 2 m entre linhas e 6 m entre plantas dentro das linhas. As duas linhas laterais, bem como as primeiras plantas de cada linha, nas cabeceiras, serviram de bordaduras. A distância das bordaduras das laterais do telado foi de 5,0 m (Figura 3).

O preparo das covas, desbaste das brotações, tutoramento e poda de formação foram feitos de acordo com as recomendações usuais para a cultura. O



Figura 2. Vista geral do telado localizado na região produtora de Lucianópolis, SP.



- = Plantas inoculadas aos 2 meses após o transplante.
- = Plantas inoculadas aos 4 meses após o transplante.
- = Plantas inoculadas aos 6 meses após o transplante.
- = Plantas inicialmente sadias, naturalmente infectadas entre o 7^o e 8^o mês.
- X = Plantas das bordaduras

Figura 3. Croqui da distribuição das plantas no telado no município de Lucianópolis, SP.

sistema de condução, conforme apontado anteriormente, foi efetuado em espaldeira vertical com 1 arame a 2,0 m de altura do solo. A polinização manual das flores iniciou-se em setembro de 1998 e prosseguiu até maio de 1999.

Os tratamentos culturais foram os usualmente recomendados para a cultura do maracujazeiro na região, envolvendo adubações e tratamentos fitossanitários.

3.7.4 Avaliação de danos

A avaliação dos danos causados pelo PWV foi feita comparando-se o desenvolvimento e a produção de frutos das plantas dos seguintes tratamentos: A) plantas inoculadas com o PWV aos 2 meses após o transplante; B) plantas inoculadas com o PWV aos 4 meses após o transplante; C) plantas inoculadas com o PWV aos 6 meses após o transplante e D) plantas sadias. As plantas do tratamento D deveriam permanecer sadias até o final do experimento, porém ocorreu a infecção entre o 7º e 8º mês, aparentemente em decorrência da possível entrada de afídeos no telado, infectando além deste tratamento, todas as plantas das bordaduras do experimento. O inóculo empregado foi o de um isolado do PWV obtido na própria região, comprovado por teste serológico, e mantido em plantas de maracujazeiro em casa-de-vegetação na ESALQ/USP.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 10 repetições. Cada bloco foi constituído por 4 plantas na linha, representando os diferentes tratamentos distribuídos ao acaso. Cada planta representou uma parcela. O experimento foi constituído por 40 plantas.

O desenvolvimento das plantas foi avaliado através de 4 medições de índice de área foliar (IAF) com espaços de, aproximadamente, 30 dias entre cada avaliação. As medições foram sempre efetuadas próximas às 12:00 h, com auxílio de um ceptômetro (ACCUPAR Light Interception Crop & Timber Canopy) (Chason et al., 1991).

A colheita iniciou-se na primeira quinzena de dezembro de 1998 e terminou na última quinzena de maio de 1999. Foram realizadas 3 colheitas por

semana durante este período. Os frutos colhidos de cada planta foram ensacados e identificados, sendo transportados até a AFRUVEC onde a produção total de cada planta foi contada e pesada. Em seguida os frutos de cada planta foram classificados qualitativamente, de acordo com o critério da AFRUVEC (Figura 4). Deve-se ressaltar que, na classificação dos frutos, aqueles que apresentavam pericarpo endurecido e deformado foram classificados como frutos endurecidos. Após a classificação os frutos foram contados dentro de cada categoria.

3.8 Avaliação da distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas

Conforme apontado anteriormente, a descrição dos sintomas causados pelo CMV em plantas de maracujazeiro apresenta certa controvérsia, embora a maioria dos autores que observaram essa doença apontem que os sintomas geralmente ficam restritos à regiões dos ramos (Taylor & Kimble, 1962; Colariccio et al., 1992, Rezende, 1994). Durante as visitas aos pomares do Centro Oeste do Estado de São Paulo, confirmaram-se as observações desses investigadores. Todas as plantas infectadas com o CMV apresentavam sintomas restritos à porções dos ramos, com remissão na porção terminal dos mesmos. Diante desse quadro, procurou-se investigar a distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas de ramos de plantas infectadas em campo.

Quinze ramos com sintomas característicos de CMV foram coletados em áreas produtoras, embalados, identificados e transportados para a ESALQ/USP. Cada ramo, devidamente identificado, foi dividido em 4 regiões, caracterizadas a partir da porção mais velha em direção ao ponteiro, da seguinte maneira: região 1, assintomática na base da haste; região 2, contendo a primeira folha sintomática; região 3, contendo a última folha sintomática e região 4, a ponta assintomática do ramo (Figura 5). Em cada uma destas regiões foram coletadas amostras de duas áreas distintas: ramo (R) e folha (F).

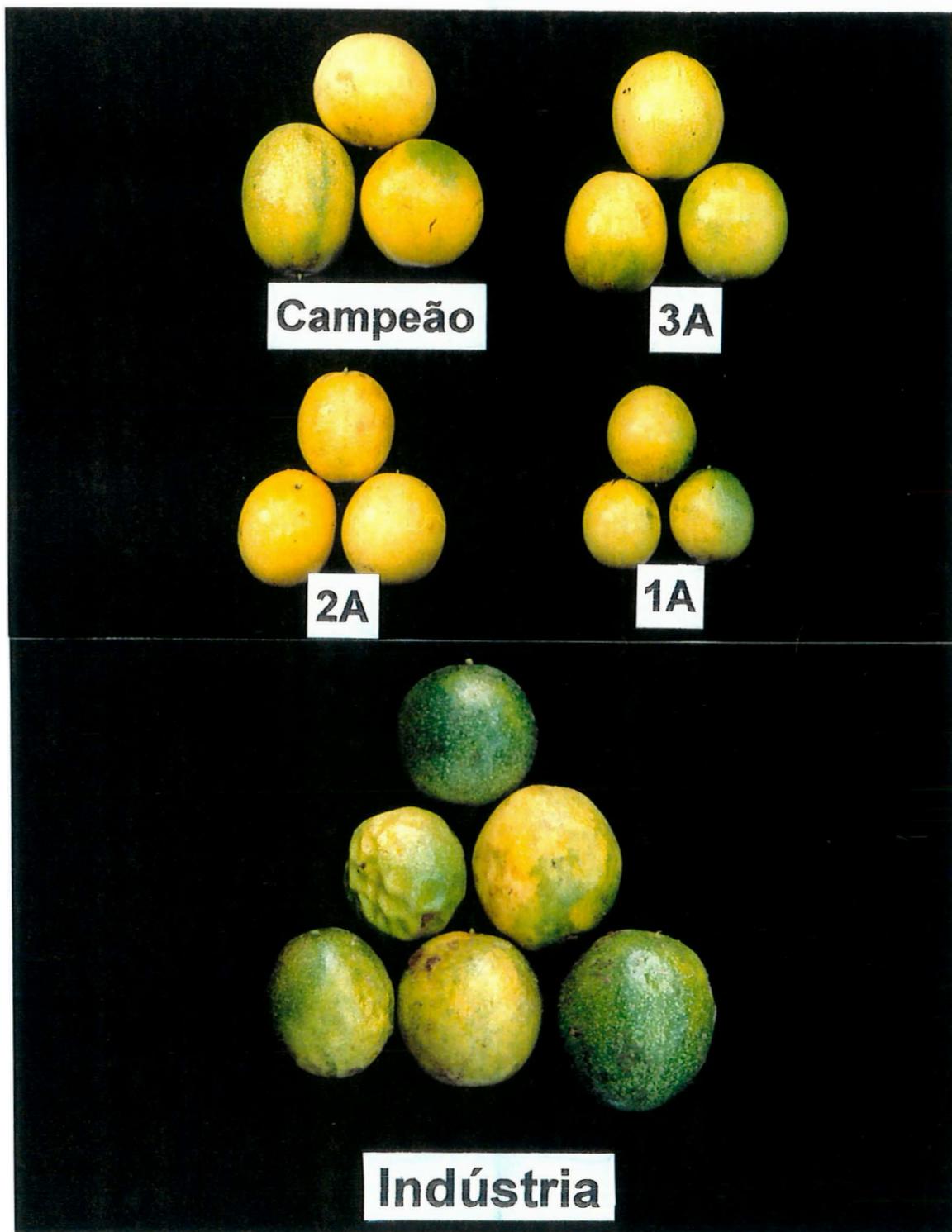


Figura 4. Classificação de frutos de maracujazeiro baseada no critério da Associação de Fruticultores de Vera Cruz (AFRUVEC).

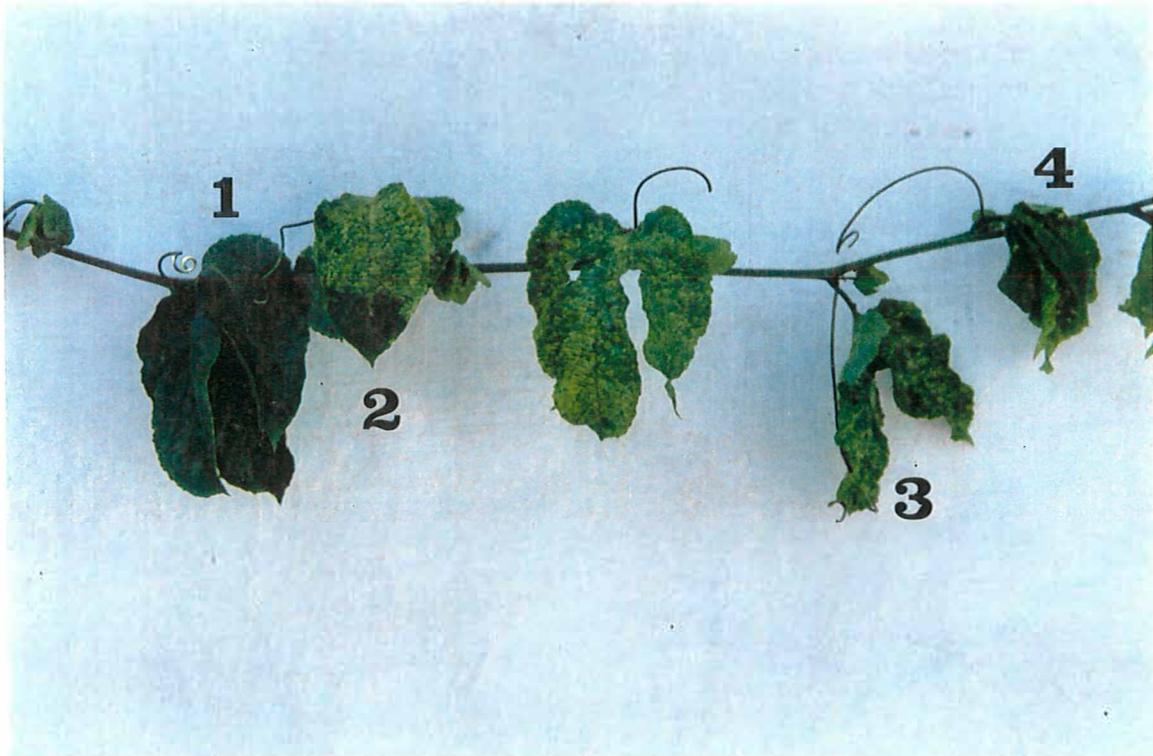


Figura 5. Regiões de um ramo de maracujazeiro infectado com o CMV no campo: região assintomática na parte mais velha do ramo (1); região contendo a primeira folha sintomática (2); região contendo a última folha sintomática (3) e ponta assintomática do ramo (4).

Assim, uma amostra denominada F1 foi retirada de uma folha localizada na região assintomática na parte mais velha do ramo e uma amostra R1 foi retirada de um trecho do ramo localizado na mesma região de inserção da folha. Uma amostra F2 foi retirada da primeira folha sintomática e uma R2 de um trecho do ramo associado a esta folha e assim sucessivamente. Baseando-se nesta identificação obtiveram-se 8 tipos de amostras denominadas F1, R1, F2, R2, F3, R3, F4 e R4. Cada amostra foi subdividida em 2 a 3 subamostras, que foram utilizadas para os testes biológicos e serológicos de PTA-ELISA ou “Western-blot”.

Além disso, 10 folhas de ramos com sintomas causados pelo CMV foram escolhidas para a análise da presença do vírus em áreas sintomáticas e assintomáticas dentro da folha.

3.8.1 Teste biológico

O teste biológico para avaliar a infectividade do CMV presente nas diferentes amostras foi feito por meio da transmissão mecânica para plantas-teste de fumo (*N. tabacum* cv. Turkish) e abobrinha de moita (*C. pepo* cv. Caserta). O inóculo foi preparado a partir das subamostras, macerando-se 0,5 g de tecido em 1 ml de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0.

Plantas de fumo com 4 folhas completamente expandidas foram inoculadas com inóculo proveniente das regiões F1, F2, F3 e F4 de 10 ramos separadamente. Estas plantas foram avaliadas visualmente após 10 - 12 dias e, posteriormente, serologicamente por PTA-ELISA utilizando-se antissoro específico contra o CMV.

Plantas de abobrinha de moita ‘Caserta’ em estágio cotiledonar foram inoculadas com extratos provenientes das regiões F1, R1, F2, R2, F3, R3, F4 e R4, de 5 ramos, separadamente. Cinco dias após a inoculação foram contadas as lesões locais formadas nas folhas cotiledonares inoculadas. Avaliação visual dos sintomas sistêmicos foi feita aos 15 dias após a inoculação. Em seguida

amostras de cada planta foram testadas por PTA-ELISA utilizando-se antissoro específico contra o CMV.

3.8.2 “Western-blot”

Subamostras dos mesmos ramos testados nos testes biológicos, foram utilizadas em análises de “Western-blot”, conforme descrito em 3.4.3.

3.9 Transmissão do CMV para mudas de maracujazeiro

Para os teste de transmissão do CMV utilizaram-se 10 plantas de maracujazeiro em estágio cotiledonar. Inóculo do vírus extraído de maracujazeiro sintomático foi inoculado mecanicamente nos cotilédones das plantas-teste. Estas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação para posteriores análises.

Dez dias após a inoculação foi efetuada uma análise visual seguida de retirada de amostras da região cotiledonar das 10 plantas, com subsequente extração de proteínas totais para posterior análise por “Western-blot”. Decorrido 30 dias da primeira avaliação efetuou-se nova análise visual de sintomas, seguida de desenvasamento das plantas e retirada de amostras de raízes e folhas da região apical de cada uma. Destas amostras também forma extraídas proteínas totais e, juntamente com as amostras cotiledonares, efetuou-se um “Western-blot”.

3.10 Análise estatística dos dados obtidos

Os dados obtidos na avaliação do efeito do PWV no desenvolvimento do maracujazeiro em casa-de-vegetação e na avaliação de danos causados às plantas em telado foram analisados utilizando o programa Statistical Analysis System V. 6.08 (SAS Institute, 1993) sendo a significância obtida avaliada

aplicando-se o teste de Tukey 5% (Gomes, 1990). Utilizou-se regressão não linear com o modelo monomolecular ($y = b_1 - (1 - b_2) * \exp(-b_3 * X)$, onde y = índice de área foliar (IAF), x = tempo expresso em dias e b_1 , b_2 e b_3 = parâmetros do modelo) para se avaliar o desenvolvimento das plantas baseado no IAF, nos diferentes tratamento (Bergamin Filho, 1995). Foi utilizada regressão linear para estabelecimento de correlação entre IAF e produção por planta.

4 RESULTADOS

4.1 Incidência de viroses

Foram visitadas 45 pomares, constituídos por aproximadamente 75.000 plantas, abrangendo 9 municípios. Foram avaliadas visualmente 991 plantas, coletando-se 310 amostras para análise laboratorial. Os pomares amostrados possuíam plantas com idade entre 9 a 18 meses (Tabela 1).

Com base nas avaliações visuais foram encontradas somente plantas exibindo sintomas semelhantes aos descritos para o PWV, o CMV e o Rhabdovirus causador do clareamento de nervuras (Tabela 1). Raros foram os casos de sintomas de pinta verde, observados somente em frutos já colhidos. As amostras com sintomas característicos do PWV e do CMV coletadas foram analisadas por PTA-LISA e confirmaram a presença desses vírus. A incidência média, baseada nas amostras analisadas serologicamente e na sintomatologia visualizada em campo, foi estimada para o PWV em 71,8%, variando de 10% a 100% e para o CMV em 40,7%, variando de 0% a 87%. Das amostras exibindo sintomas de clareamento de nervuras 10 foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão, através de cortes ultra finos de tecidos. Em todas elas foram observadas a presença de partículas semelhantes àquelas descritas para Rhabdovirus (Figura 6). Devido a correlação, entre sintomas de clareamento das nervuras e a presença de partículas do tipo Rhabdovirus nessas amostras, estimou-se que a incidência média desse vírus, com base nos sintomas, foi da ordem de 5,8%, variando de 0,0% a 11,1%.

Tabela 1. Incidência do “*Passion fruit woodiness virus*” (PWV), do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) e do vírus do clareamento das nervuras (Rhabdovirus) em amostras coletadas em 45 pomares de maracujazeiro localizados em 9 municípios na Alta Paulista, SP.

Município	Propriedade	Idade do pomar (meses)	Nº de plantas inspeccionadas	Incidência (%)	
				PWV	CMV
Duartina	Antônio Morais	10	20	60,0	85,0
Fernão	Figueira Branca	8	20	10,0	0,0
	Haragushi	10	20	65,0	0,0
	Kikushi	10	22	59,1	36,3
	Mariângela	9	26	35,0	57,7
	N. S. Aparecida	9	15	66,7	0,0
	N. S. Aparecida 2	10	20	85,0	65,0
	Sto Antônio	10	23	100,0	82,6
	Sta Terezinha	19	21	100,0	85,7
Garça	Sta Rita 3	12	30	96,7	73,4
	São Francisco	9	34	82,4	35,3
	São João	18	10	80,0	10,0
	Souza	12	15	66,7	93,4

^{xx} Avaliação feita com base em sintomas e PTA-ELISA; ^{xxx} Avaliação estimada com base em sintomas e exames de alguns cortes ultra finos em microscópio eletrônico de transmissão.

Tabela 1 (continuação). Incidência do “*Passion fruit woodiness virus*” (PWV), do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) e do vírus do clareamento das nervuras (Rhabdovirus) em amostras coletadas em 45 pomares de maracujazeiro localizados em 9 municípios na Alta Paulista, SP.

Município	Propriedade	Idade do pomar (meses)	Nº de plantas inspecionadas	Incidência (%)		
				PWV	CMV	Rhabdovirus
Lácio	São João	9	30	70,0	6,7	0,0
Lucianópolis	Boa Esperança	9	21	38,1	0,0	0,0
	Boa Esper. 2	9	27	59,3	3,7	3,7
	N. S. Aparecida	12	36	50,0	50,0	6,7
	N. S. Aparecida 2	14	35	23,0	11,4	0,0
	Pau d’alho	16	20	80,0	70,0	20,0
	Vizotto	9	22	72,7	0,0	0,0
	Yamagutti	12	30	86,7	30,0	0,0
Lupércio	Ianamura	17	29	68,9	13,8	0,0
	Murakami	17	26	84,0	11,5	0,0
Marília	Cavalca	11	22	72,7	18,2	0,0
Oriente	Padovani	9	20	55,0	20,0	0,0
Vera Cruz	Aconcheço	17	20	95,0	10,0	0,0

Avaliação feita com base em sintomas e PTA-ELISA; Avaliação estimada com base em sintomas e exames de alguns cortes ultra finos em microscópio eletrônico de transmissão.

Tabela 1 (continuação). Incidência do “*Passion fruit woodiness virus*” (PWV), do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) e do vírus do clareamento das nervuras (Rhabdovirus) em amostras coletadas em 45 pomares de maracujazeiro localizados em 9 municípios na Alta Paulista, SP.

Município	Propriedade	Idade do pomar (meses)	Nº de plantas inspecionadas	Incidência (%)		
				PWV*	CMV*	Rhabdovirus**
Vera Cruz	Bela Cintra	9	23	33,4	50,0	8,7
	Cabeceirinha	12	22	90,9	45,4	36,4
	Hilário Tozoni	14	21	100,0	14,3	9,5
	José Eurides	9	30	100,0	73,4	3,4
	José Máximo	10	30	76,7	50,0	10,0
	Ouro Verde	14	32	96,8	78,1	6,3
	Ouro Verde 2	15	39	87,2	87,2	34,4
	Paulista	9	20	60,0	5,0	0,0
	Sta Helena	19	5	80,0	40,0	0,0
	Sta Maria	15	16	56,3	62,5	0,0
	Sto Antônio	14	12	33,4	83,4	0,0
	São Bento	9	9	33,4	66,7	0,0
	São Francisco	16	15	73,4	53,4	0,0

* Avaliação feita com base em sintomas e PTA-ELISA; ** Avaliação estimada com base em sintomas e exames de alguns cortes ultra finos em microscópio eletrônico de transmissão.

Tabela 1 (continuação). Incidência do “*Passion fruit woodiness virus*” (PWV), do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) e do vírus do clareamento das nervuras (Rhabdovirus) em amostras coletadas em 45 pomares de maracujazeiro localizados em 9 municípios na Alta Paulista, SP.

Município	Propriedade	Idade do pomar (meses)	Nº de plantas inspecionadas	Incidência (%)		
				PWV	CMV	Rhabdovirus
Vera Cruz	São João	9	19	100,0	31,5	50,0
	São João do Paraíso	14	11	54,4	45,5	0,0
	São Joaquim	9	23	91,4	17,4	0,0
	São Jorge	16	10	60,0	90,0	0,0
	São Roque	12	20	65,0	50,0	20,0
	Sérgio Peloso	15	20	70,0	20,0	0,0
Média				71,8	40,7	5,8

“ Avaliação feita com base em sintomas e PTA-ELISA; “ Avaliação estimada com base em sintomas e exames de alguns cortes ultra finos em microscópio eletrônico de transmissão.

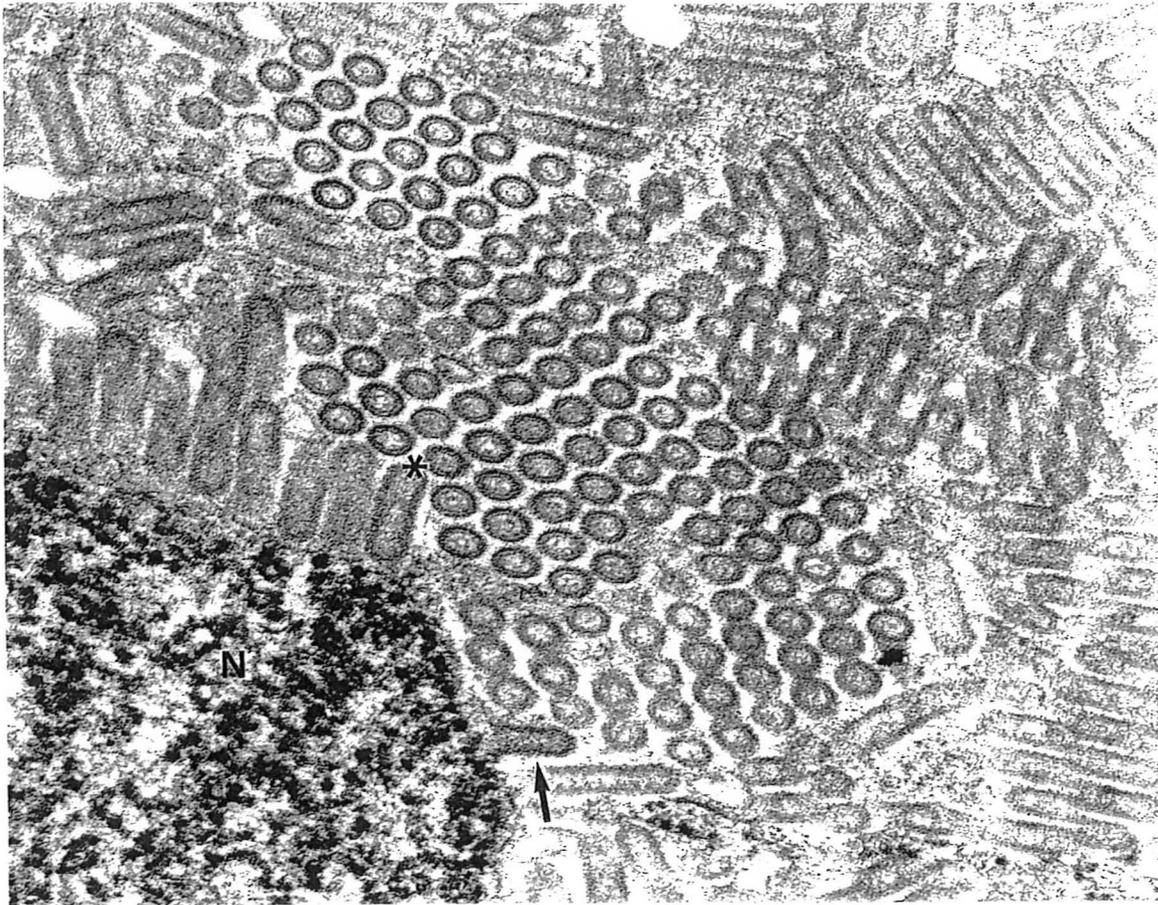


Figura 6. Micrografia eletrônica de secção de folha de maracujazeiro com sintomas de clareamento de nervuras mostrando grupos de partículas do tipo Rhabdovirus (*) na cavidade perinuclear de uma célula do parênquima do mesófilo. A seta mostra uma partícula em processo de morfogênese (brotação). N-núcleo (X 91.800) (Foto E.W. Kitajima).

Do total de amostras em que foi verificada a presença do PWV, 53,2% corresponderam a infecções simples, enquanto 46,8% a infecções duplas com o CMV. Nenhuma das amostras com sintomas característico do vírus do clareamento de nervuras apresentou reação com antissoros contra o PWV ou CMV, tratando-se portanto de infecções simples. Este fato pode tratar-se de mera casualidade.

Foi observado que populações baixas de trapoeraba (0 a 30%) nas entrelinhas de plantio estavam relacionadas à incidências de CMV, em maracujazeiros, da ordem de 10%. Quando a população de trapoeraba cobria 30% a 60% das entrelinhas, a incidência média do CMV atingia 35%, enquanto que para populações acima de 60% a incidência média do vírus foi de 67% (Tabela 2).

4.2 Efeito do PWV no desenvolvimento do maracujazeiro em casa-de-vegetação

Os dados referentes as avaliações de área foliar de 3 experimentos independentes (outubro/novembro de 1998; janeiro/fevereiro de 1999 e julho/agosto de 1999) encontram-se na figura 7. De modo geral pode-se verificar que as plantas infectadas com os diferentes isolados do PWV apresentaram redução de área foliar da ordem de 30% a 45%, quando comparadas às testemunhas sadias. Na maioria dos casos essas diferenças foram estatisticamente significativas. Apesar da área foliar das plantas infectadas com os 4 isolados ter apresentado pequenas variações, estas não foram estatisticamente significativas. Os resultados das avaliações de peso úmido e seco do sistema radicular e da parte aérea foram paralelos aos obtidos para as medidas de área foliar, com reduções da ordem de 30 a 50% nas plantas infectadas com os diferentes isolados do PWV, quando comparadas à testemunha. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as plantas infectadas com os

Tabela 2. Incidência do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) em maracujazeiros em função da população de trapoeraba (*Comellina sp*) infectada entre as linhas de plantio.

População de trapoeraba *	Nº de propriedades	Média de incidência de CMV em maracujazeiros (%)
Baixa	19	10,2
Média	4	35,4
Alta	22	66,7

Baixa = 0 a 30% de entrelinhas com trapoeraba; Média = 30% a 60%; Alta = 60 a 100%.

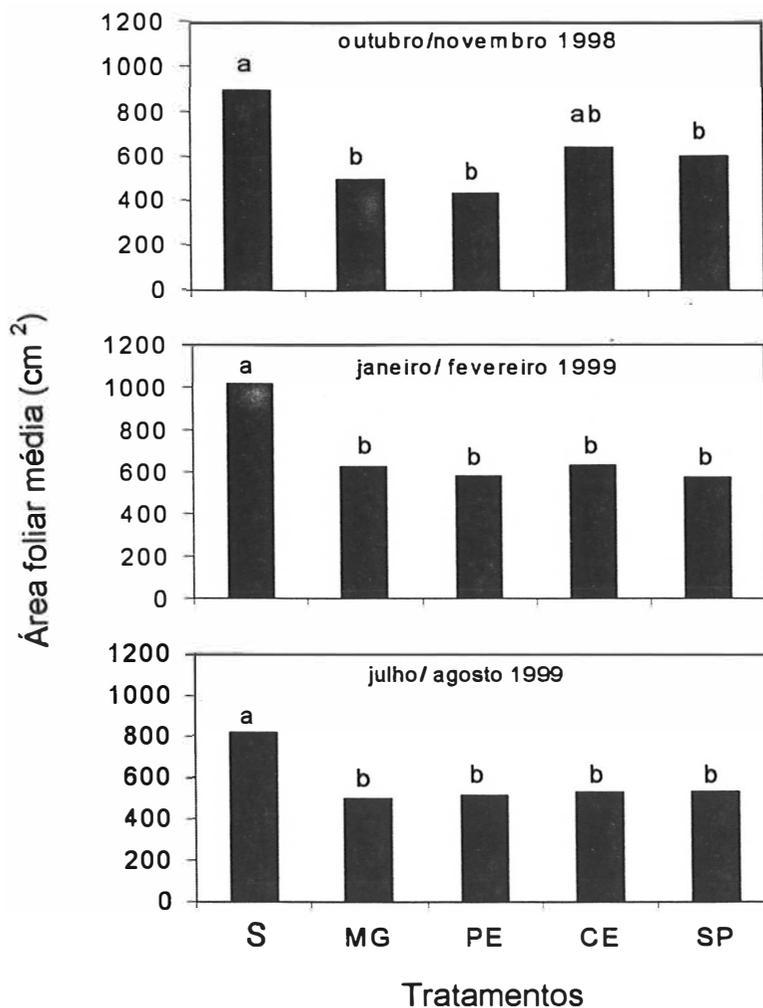


Figura 7. Área foliar média de plantas saudas (S) e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP) em casa-de-vegetação. Barras com letras distintas, dentro de cada experimento (outubro/novembro de 1998, janeiro/fevereiro de 1999 e julho/agosto de 1999), diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

4 isolados do PWV (Tabelas 3 e 4).

Verificou-se ainda, que o número de folhas das plantas infectadas e das testemunhas foi praticamente o mesmo no final dos experimentos, estando na faixa de 11 a 15 folhas por planta. As plantas inoculadas com os isolados do PWV apresentaram, em média, de 50 a 55% de folhas sintomáticas nas três repetições do experimento, não havendo diferenças estatísticas entre os isolados.

4.3 Danos causados pelo PWV em telado

Observou-se que a estabilização do índice de área foliar (IAF) para as plantas inoculadas aos 2, 4 e 6 meses após o transplante ocorreu praticamente na mesma época, próxima dos 12 meses após o transplante, com índices da ordem de 4,4; 3,8 e 5,6, respectivamente. Nessa mesma época também foi observada uma tendência de estabilização do IAF ao redor de 10,0 para as plantas infectadas naturalmente entre 7 e 8 meses após o transplante (Figura 8). Na tabela 5 são apresentados os parâmetros b_1 , b_2 e b_3 e coeficiente de determinação R^2 , das regressões não lineares utilizando o modelo monomolecular para os 4 tratamentos, ajustados aos dados de evolução do IAF. Todas as regressões foram realizadas com os valores de todas as repetições dos tratamentos e não apenas com a média dos tratamentos.

Os resultados de produção, avaliada com base no número e peso total de frutos por planta, durante 5 meses de colheita, estão apresentados na figura 9. A redução na produção chega a 80,0%, quando se compara o número e o peso total de frutos colhidos das plantas inoculadas aos 2 meses, com os daquelas infectadas entre 7 e 8 meses após o transplante. As plantas infectadas aos 4 e 6 meses após o transplante tiveram redução no número e peso total dos frutos de aproximadamente 74% e 44%, respectivamente, quando comparadas com aquelas naturalmente infectadas entre 7 e 8 meses.

Tabela 3. Peso fresco da parte aérea, do sistema radicular e total, de plantas de maracujazeiro sadias e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP) em 3 experimentos distintos realizados em casa-de-vegetação.

Partes da planta	Peso fresco (g)				
	Sadia	MG	PE	CE	SP
Experimento I					
Parte aérea	28,6 a*	15,6 b	14,6 b	21,6 ab	20,3 b
Raiz	6,2 a	3,2 b	2,3 b	3,9 ab	3,0 b
Total	34,8 a	18,8 b	16,9 b	25,5 ab	23,3 b
Experimento II					
Parte aérea	31,3 a	20,7 b	18,6 b	18,6 b	20,2 b
Raiz	6,8 a	4,5 b	4,3 b	4,6 b	4,7 b
Total	39,1 a	25,2 b	22,9 b	23,2 b	24,9 b
Experimento III					
Parte aérea	28,3 a	16,7 b	18,7 b	19,2 b	19,3 b
Raiz	5,7 a	2,6 b	2,6 b	2,3 b	2,4 b
Total	34,0 a	19,3 b	21,3 b	21,5 b	21,7 b

* Linhas com letras distintas, dentro de cada experimento (I, II, III), diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Peso seco da parte aérea, do sistema radicular e total, de plantas maracujazeiro sadias e infectadas com os isolados do PWV de Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e São Paulo (SP) em 3 experimentos distintos realizados em casa-de-vegetação.

Partes da planta	Peso seco (g)				
	Sadia	MG	PE	CE	SP
Experimento I					
Parte aérea	5,2 a*	2,4 b	2,2 b	3,6 ab	3,3 b
Raiz	0,9 a	0,4 b	0,4 b	0,5 b	0,6 b
Total	6,14 a	2,8 b	2,6 b	4,1 ab	3,9 b
Experimento II					
Parte aérea	5,2 a	3,6 b	3,2 b	3,1 b	3,3 b
Raiz	1,5 a	0,6 b	0,4 b	0,6 b	0,7 b
Total	6,7 a	4,2 b	3,6 b	3,7 b	4,0 b
Experimento III					
Parte aérea	4,3 a	2,9 b	3,0 b	3,1 b	3,2 b
Raiz	1,4 a	0,4 b	0,5 b	0,4 b	0,5 b
Total	5,7 a	3,3 b	3,5 b	3,5 b	3,7 b

* Linhas com letras distintas, dentro de cada experimento (I, II, III), diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

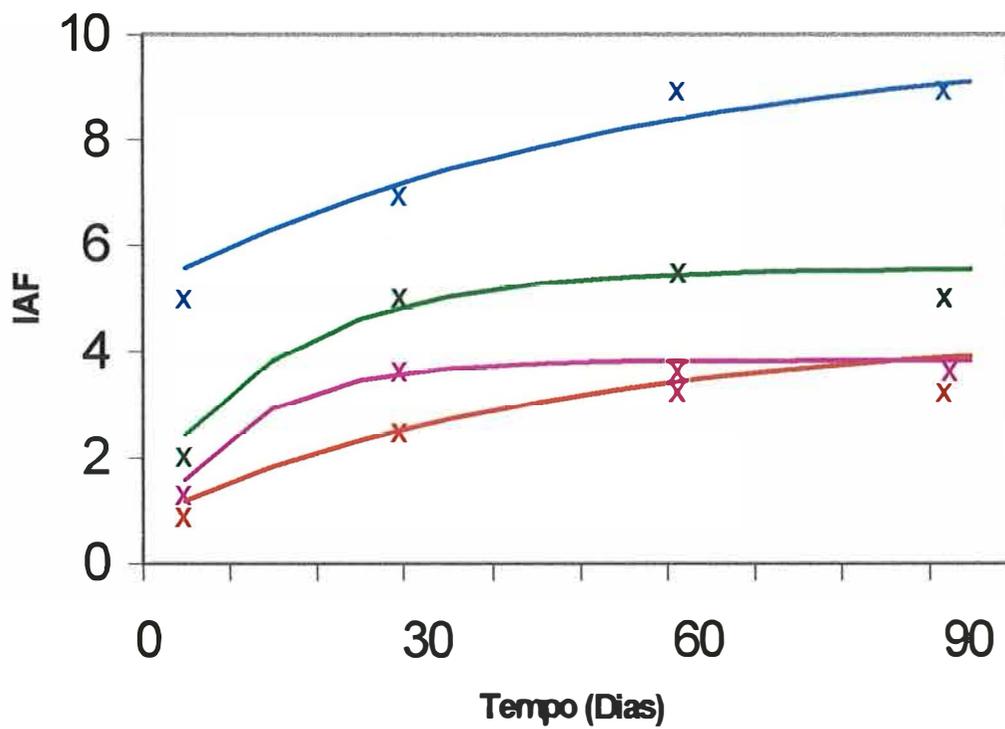


Figura 8. Evolução do índice de área foliar (LAI)* em função do tempo a partir do 9º mês após o transplante, para as plantas inoculadas, mecanicamente com o PWV, aos 2 (—), 4 (—) e 6 (—) meses e aquelas infectadas naturalmente entre 7 e 8 (—) meses após o transplante em telados.

x = valores médios estimados em cada avaliação.

Linhas representam a evolução do LAI utilizando-se o modelo de ajuste monomolecular.

Tabela 5. Parâmetros (b1, b2, b3) e coeficiente de determinação (R^2) da função monomolecular, ajustada aos dados de evolução do índice de área foliar em função do tempo, para os 4 tratamentos: inoculação de plantas de maracujazeiro com o PWV aos 2, 4 e 6 meses e infecção natural entre 7 e 8 meses após o transplante em telado.

Época de infecção (meses)	B1	B2	b3	R²
2	4,38	-2,17	0,022	0,84
4	3,85	-1,25	0,091	0,59
6	5,58	-2,14	0,059	0,70
7 e 8	10,00	-3,40	0,018	0,51

Todas as regressões apresentaram-se significativas a 5% de probabilidade

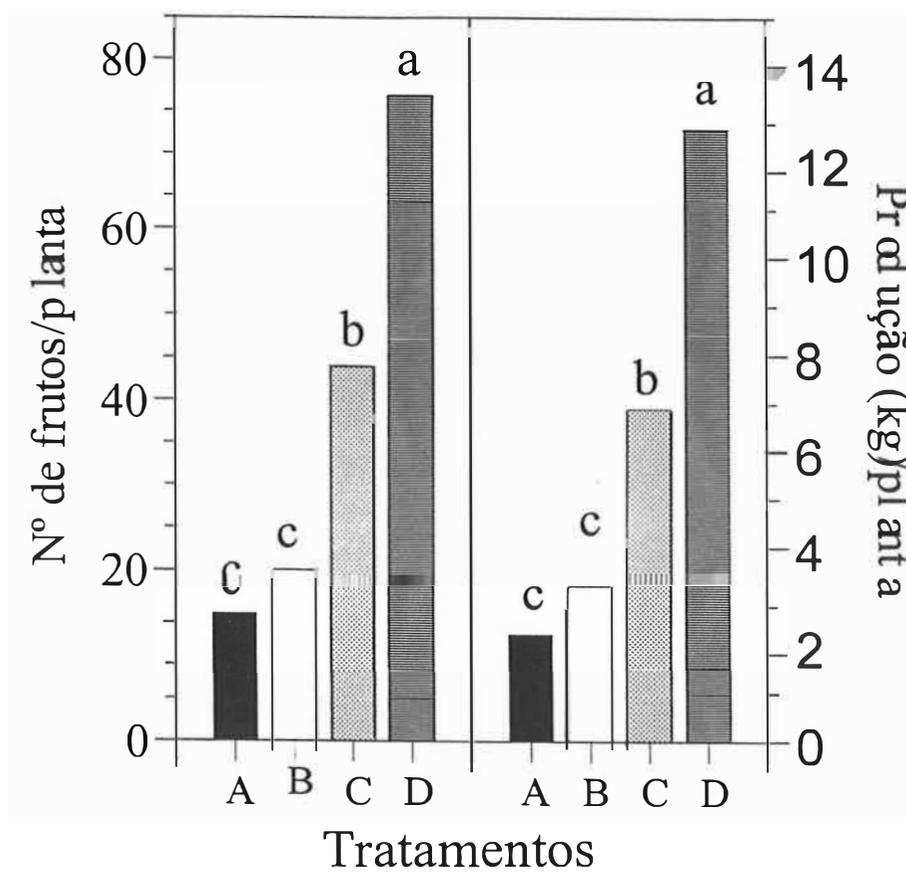


Figura 9. Número de frutos e produção média por planta de maracujazeiro após inoculação mecânica com o PWV aos 2 (A), 4 (B) e 6 (C) meses e infecção natural entre 7 e 8 meses (D) após o transplante em telado. Barras com letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

As porcentagens de distribuição dos frutos colhidos de acordo com o critério de classificação da AFRUVEC encontram-se na tabela 6. As plantas infectadas aos 2 e 4 meses após o transplante produziram 45% e 66%, respectivamente, de frutos comercializáveis *in natura* (1A, 2A e 3A). Nenhum fruto campeão (CP) foi colhido dessas plantas. Por outro lado, as plantas infectadas aos 6 meses produziram aproximadamente 80% de frutos viáveis para o comércio *in natura* (1A, 2A, 3A e CP) e 20% endurecidos ou para indústria. Quando as plantas foram naturalmente infectadas entre o 7º e 8º mês após o transplante, a produção de frutos nas categorias 1A, 2A, 3A e CP representou 87%, contra 13% destinados à indústria. Não foram colhidos frutos endurecidos dessas plantas.

Na figura 10 é apresentada a regressão linear entre o peso total de frutos e o IAF de cada planta, independentemente da época de inoculação. Nota-se uma alta correlação entre os dois parâmetros avaliados com R^2 igual a 0,92.

4.4 Transmissão e distribuição do CMV em áreas sintomáticas e assintomáticas

Testes de transmissão do CMV foram efetuados em plantas de maracujazeiro em estágio cotiledonar. Dez plantas de maracujazeiro inoculadas mecanicamente foram avaliadas após 10 dias, constatando-se sintomas de mosaico amarelo apenas nas folhas cotiledonares inoculadas. Análise de “Western-blot” comprovaram a presença do CMV nestas amostras (Figura 11a). Após 40 dias da inoculação, em amostras retiradas de folhas assintomáticas do ponteiro e do sistema radicular, das mesmas plantas, não foi detectada a presença do CMV pelo mesmo teste serológico (Figuras 11b e 11c).

Os estudos sobre a distribuição do CMV em ramos de plantas infectadas em campo foram iniciados com testes de indexação biológica. Extratos de subamostras de folhas assintomáticas (F1 e F4) e sintomáticas (F2 e F3), de 10

Tabela 6. Porcentagem média de frutos 1A, 2A, 3A, Campeão (CP), endurecido (END) e indústria (IND) produzidos por planta de maracujazeiro após inoculação mecânica com o PWV aos 2, 4 e 6 meses e infecção natural entre 7 e 8 meses após o transplante em telado.

Época de infecção (meses)	Frutos produzidos em cada classe (%)					
	1A	2A	3A	CP	END	IND
2	18,9 a	17,2 a	9,0 a	0,0 a	38,7 a	16,2 a
4	27,1 b	29,0 b	10,2 b	0,0 a	17,4 b	16,3 a
6	19,0 a	40,0 c	17,0 c	3,2 b	6,3 c	14,4 ab
7 e 8	20,8 ab	39,2 c	18,5 c	8,5 c	0,0 d	13,0 b

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

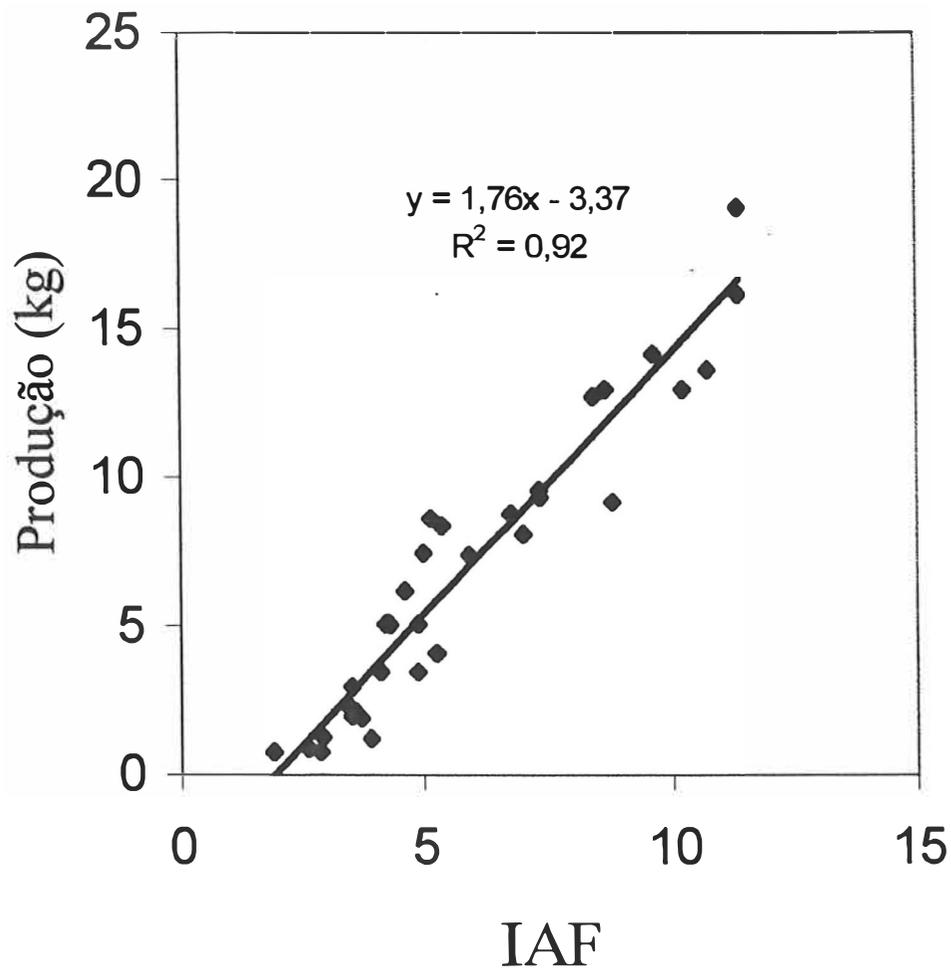


Figura 10. Índice de área foliar (IAF) e produção correspondente das plantas de maracujazeiro submetidas a inoculação mecânica e naturalmente infectadas com o PWV sob telado (pontos) e relação entre as variáveis (linha) estabelecida após regressão linear entre produção (variável dependente - y) e índice de área foliar (variável independente - x). R^2 representa o coeficiente de determinação da regressão linear.

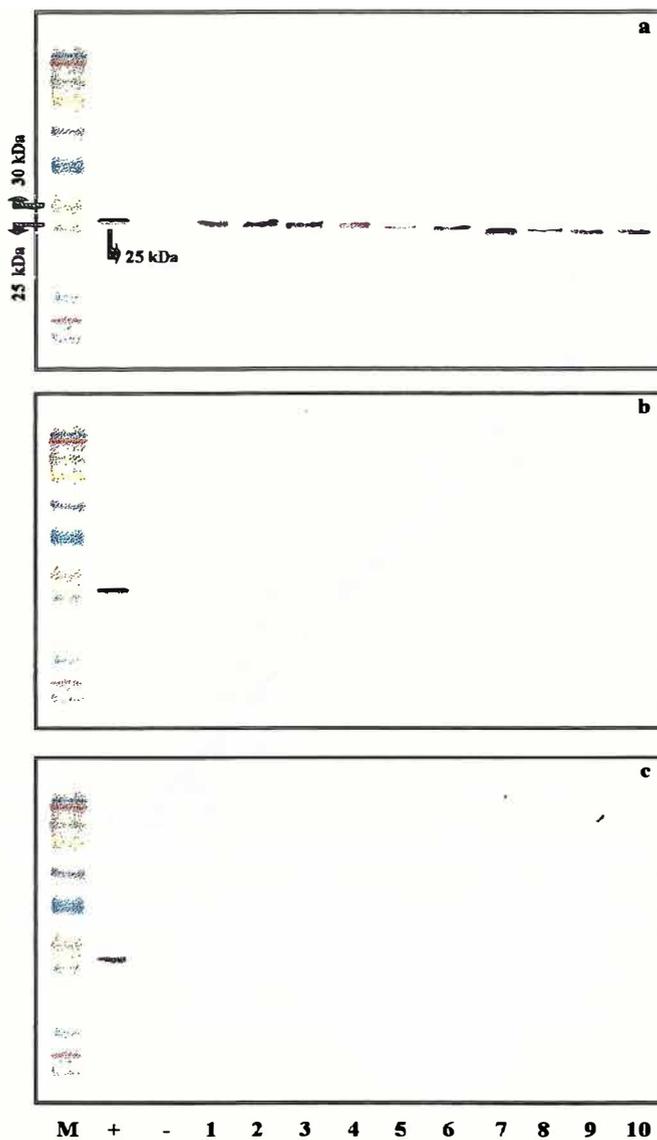


Figura 11. Testes de “Western-blot” de amostras de folhas cotiledonares (a); folhas do ponteiro (b) e sistema radicular de 10 plantas de maracujazeiro inoculadas na fase cotiledonar com o CMV. (M) marcador de peso molecular; (+) controle positivo; (-) controle negativo e (1 a 10) plantas de maracujazeiro inoculadas com o CMV.

ramos de maracujazeiro, foram inoculados em plantas teste de *N. tabacum* cv. Turkish. Todos os inóculos provenientes das subamostras de folhas sintomáticas (F2 e F3) ocasionaram mosaico em plantas de fumo, sendo a presença do CMV comprovada em todas elas por PTA-ELISA. Por outro lado, todos os inóculos provenientes das subamostras de folhas assintomáticas (F1 e F4) não causaram infecção visível em plantas-teste de fumo. Extratos dessas plantas não reagiram com antissoro contra o CMV em PTA-ELISA.

Uma outra subamostra das mesmas regiões dos 10 ramos de maracujazeiros foram submetidas ao teste de “Western-blot” com antissoro contra o CMV. A figura 12 ilustra o resultado obtido com as subamostras de um ramo, uma vez que foi igual para os 10 casos analisados. Observa-se que houve reação serológica apenas com extratos das subamostras de folhas sintomáticas. A reação positiva, visualizada através da banda de peso molecular próxima a 25 kDa corresponde ao peso molecular da proteína da capa protéica do CMV.

Um segundo teste de indexação biológica foi realizado com plantas-teste de abobrinha de moita ‘Caserta’, para detectar a presença do CMV em subamostras (F1, R1, F2, R2, F3, R3, F4 e R4), coletadas de 5 outros ramos infectados em campo. Os resultados desse teste encontram-se na tabela 7. Extratos provenientes de regiões sintomáticas (F2, F3, R2 e R3) causaram lesões locais em folhas cotiledonares de abobrinha de moita, com posterior infecção sistêmica. Nenhuma planta de abobrinha de moita inoculada com extratos das subamostras assintomáticas (F1, F4, R1 e R4) mostrou sintomas locais ou sistêmicos. O CMV foi detectado por PTA-ELISA apenas em plantas de abobrinha sintomáticas.

Outras subamostras desses 5 ramos foram submetidas a um teste de “Western-blot” com antissoro contra o CMV. As subamostras provenientes de folhas assintomáticas e respectivas porções dos ramos, não apresentaram reação positiva no teste. Todas as subamostras de folhas sintomáticas (F2 e F3) reagiram positivamente com antissoro contra o CMV. No entanto, das subamostras de porções dos ramos contendo folhas sintomáticas (R2 e R3),

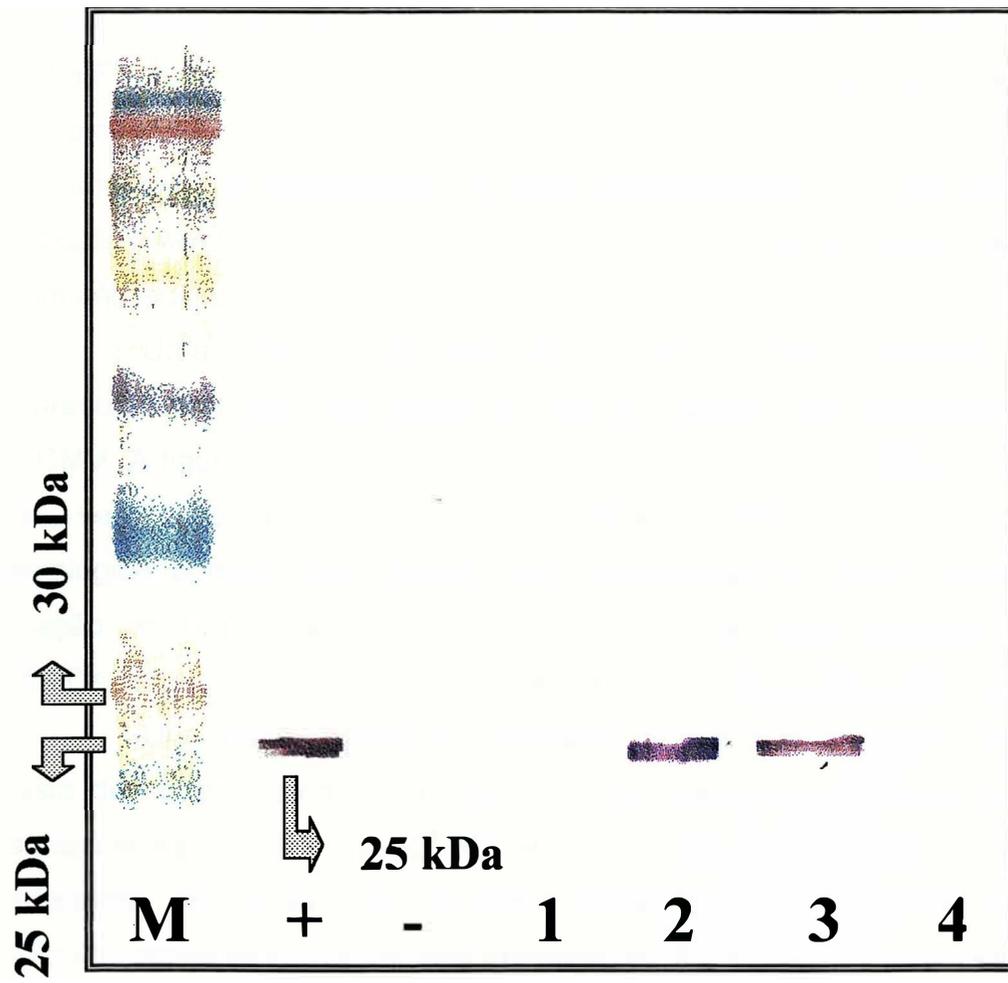


Figura 12. Teste de “Western-blot” de subamostras obtidas de ramos de maracujazeiro infectado com o CMV em campo. (M) marcador de peso molecular; (+) controle positivo; (-) controle negativo; (1, 2, 3 e 4) subamostras obtidas das regiões F1, F2, F3 e F4, respectivamente.

Tabela 7. Número médio de lesões locais em cotilédones de plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) inoculadas com extratos de subamostras de folhas (F1, F2, F3 e F4) e das porções correspondentes nos ramos (R1, R2, R3 e R4), obtidas de 5 ramos de maracujazeiros com sintoma de CMV coletados em campo.

Origem do inóculo	Nº médio de lesões locais em cotilédones de abobrinha de moita 'Caserta'				
	Ramo 1	Ramo 2	Ramo 3	Ramo 4	Ramo 5
F1	0	0	0	0	0
R1	0	0	0	0	0
F2	<u>77</u> *	<u>70</u>	<u>105</u>	<u>90</u>	<u>128</u>
R2	<u>27</u>	9	14	10	<u>30</u>
F3	<u>77</u>	<u>80</u>	<u>105</u>	<u>90</u>	<u>83</u>
R3	<u>30</u>	7	6	12	14
F4	0	0	0	0	0
R4	0	0	0	0	0

* As amostras cujos números de lesões locais em 'Caserta' estão sublinhados apresentaram reações positivas com antissoro contra o CMV em "Western-blot".

apenas 3 indicaram a presença do CMV por “Western-blot”. As demais tiveram reação negativa. As reações positivas, nestes casos, estavam relacionadas com as subamostras cujos extratos causaram maior número de lesões locais em ‘Caserta’ (Tabela 7).

Os testes de “Western-blot” realizados com amostras provenientes de áreas sintomáticas de 10 folhas de maracujazeiro foram positivos para o CMV. No caso das amostras oriundas de áreas assintomáticas, das mesmas folhas, detectou-se o CMV em apenas 3 amostras.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos corroboram as observações de diversos autores (McKnigh, 1953; Kitajima et al., 1986; Chagas, 1991; Rezende, 1994; lawai et al., 1996) de que o PWV é o vírus que predomina na cultura do maracujazeiro em várias partes do mundo. No caso de São Paulo é possível que a predominância do PWV na região da Alta Paulista também ocorra em outras áreas do estado onde o maracujazeiro é infectado por esse vírus. O CMV, segundo vírus em incidência nos plantios da Alta Paulista, aparentemente possui importância reduzida, conforme já apontado por outros investigadores (Colariccio, 1992; Rezende, 1994). Apesar de ser um vírus cosmopolita, infectar mais de 80 espécies vegetais, ser transmitido por diversas espécies de afídeos de forma não persistente (Palukaitis et al., 1992) e já ter sido relatado em maracujazeiro em diversas localidades, como Austrália (Magee, 1948), Califórnia (Teakle et al., 1963), Japão (Yonaha et al., 1979) e Brasil (Chagas et al., 1984; Colariccio et al., 1987), sua reduzida importância para essa frutífera pode estar associada com uma peculiaridade na infecção das plantas. Maracujazeiros infectados com o CMV mostram sintomas de mosaico amarelo intenso em algumas folhas, que reduz em intensidade em direção ao ponteiro dos ramos, com total remissão nas brotações novas. Esse fato já foi relatado por Taylor e Kimble (1964) na Austrália e por Colariccio et al. (1992) no Brasil, mas em nenhum caso foi estudada a presença do vírus nas áreas assintomáticas. Os estudos conduzidos neste trabalho mostraram que o CMV foi facilmente transmitido para plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* em estágio cotiledonar como já relatado por Colariccio et al. (1987). Mesmo assim os sintomas não persistiram e o vírus não foi detectado nas folhas

novas e nas raízes das plantas 40 dias após a inoculação (Figura 11). Esse fato, a princípio, evidencia certa diferença entre os isolados do CMV do Estado de São Paulo daqueles estudados por Barbosa et al. (1999) no Paraná, cujos sintomas persistiram por 60 dias nas plantas inoculadas.

Testes de indexação biológica de amostras de folhas sintomáticas e assintomáticas e das respectivas porções dos ramos onde as mesmas estavam inseridas, indicaram que o CMV parece estar restrito aos trechos sintomáticos. Somente extratos dessas áreas causaram sintomas nas plantas indicadoras inoculadas. Além disso, esses testes, quando realizados com plantas-teste de abobrinha de moita, mostraram que a concentração do CMV nas áreas sintomáticas não é homogênea. O número médio de lesões induzidas por extratos de amostras de folhas foi aproximadamente 5,7 vezes superior ao daquelas causadas por extratos de ramos das regiões correspondentes aos pontos de inserção das folhas. Os testes de “Western-blot” realizados com subamostras dessas mesmas regiões confirmaram a presença do CMV na maioria das áreas sintomáticas, através da detecção da proteína da capa protéica do vírus, com aproximadamente 25 kDa. Exceção para algumas subamostras de porções de ramos, cujos extratos induziram pequeno número de lesões (6 a 14) no teste biológico em abobrinha de moita, mas que não mostraram reação em “Western-blot” (Tabela 7).

Esse resultado mostra que, apesar da alta sensibilidade do teste serológico de “Western-blot”, ele não deve ser utilizado isoladamente nos estudos sobre a distribuição do CMV em ramos de maracujazeiro. Assim sendo, estudos complementares com base em testes de detecção do ácido nucléico viral (“Northern blot” e PCR) estão em andamento para melhor compreensão da distribuição do CMV em ramos de maracujazeiro.

O fato de o CMV apresentar distribuição aparentemente restrita aos trechos sintomáticos dos ramos, associado com a correlação encontrada entre a presença de trapoeraba infectada com este vírus, entre as linhas de plantio, e a incidência do mesmo em maracujazeiro na região da Alta Paulista (Tabela 2), são

sugestivos de que a retirada desta erva daninha dos maracujazais poderá auxiliar na diminuição da incidência deste vírus, pela proximidade dessas espécies em campo. É possível, no entanto, que outras plantas atuem como fonte de inóculo do CMV, visto que este possui uma vasta gama de hospedeiros, reduzindo assim o efeito da eliminação da trapoeraba.

Como os isolados do CMV provenientes de maracujazeiro foram capazes de invadir sistematicamente as plantas de *N. tabacum* cv. Turkish, *Commelina sp* e *C. pepo* cv. Caserta, pode-se supor que a distribuição aparentemente limitada do mesmo em *P. edulis* f. *flavicarpa* pode ser de natureza genética da planta. Assim sendo, trabalhos de melhoramento genético do maracujazeiro devem sempre considerar essa característica, pois, o aparecimento de populações capazes de permitir a completa invasão da planta pelo CMV poderão torná-lo importante patógeno para a cultura dessa frutífera.

Embora a incidência do vírus do clareamento de nervuras tenha sido feita quase que exclusivamente com base nos sintomas (Figura 1c), a alta associação entre estes e a presença de partículas do tipo Rhabdovirus nas amostras analisadas em microscopia eletrônica (Figura 6) permite sugerir que os sintomas de clareamento das nervuras parecem ser adequados para fins de diagnose. De acordo com a estimativa feita, a incidência desse vírus foi baixa na região da Alta Paulista (Tabela 1). Além disso, não foi observado efeito aparente da infecção por esse vírus no desenvolvimento das plantas. O possível Rhabdovirus causador da pinta verde, que foi recentemente responsável por danos de até 100% em áreas produtoras da região da Alta Paulista (Kitajima et al., 1997), atualmente parece encontra-se sob controle, pois raramente foram encontradas plantas sintomáticas. Isso comprova que a adoção de medidas de controle do ácaro *Brevipalpus phoenicis*, com possível restabelecimento do equilíbrio populacional, associada com o fato de a infecção com este provável Rhabdovirus ser restrita ao local de alimentação do vetor, parece ter contribuído para a redução desse problema na cultura do maracujazeiro naquela região.

Danos evidentes relacionados com a redução da área foliar foram observados em maracujzeiros infectados pelo PWV, tanto nos experimentos realizados em condições de casa-de-vegetação quanto em campo. Nos testes em casa-de-vegetação verificaram-se reduções da área foliar das plantas infectadas variando de 30 a 45% (Figura 7), o que deve afetar o desenvolvimento e a produção das plantas. As avaliações dos pesos úmido e seco da parte aérea e do sistema radicular das plantas infectadas (Tabela 3 e 4) mostraram que as reduções dos mesmos foram paralelas àquelas verificadas para a área foliar. Em função disso, sugere-se a adoção da medida da área foliar para estudos sobre o efeito do PWV em maracujazeiro.

O efeito do PWV no desenvolvimento das plantas sob condições de telado baseou-se no índice de área foliar (IAF) e o modelo monomolecular se mostrou adequado para o ajuste dos dados de evolução do IAF (Tabela 5). As avaliações do IAF mostraram que as infecções tardias com o PWV permitiram maior enfolhamento das plantas (Figura 8). Este por sua vez refletiu diretamente em maior produção de frutos (Figura 10). Assim sendo, pode-se atribuir ao vírus duas formas de danos associados a produção. O primeiro reduzindo a qualidade dos frutos, visto que quanto mais precocemente a planta é infectada com o vírus menor a porcentagem de frutos de valor comercial (1A, 2A, 3A e CP) e maior o número de frutos endurecido (END) e indústria (IND) (Tabela 6). O segundo, relativo a diminuição da área foliar que reflete diretamente no volume de produção, cuja correlação direta foi altamente significativa. Resultados semelhantes já foram relatados para doenças fúngicas da cultura do feijoeiro (Amorim et al., 1995; Bergamin Filho et al., 1997; Carneiro et al., 1997). Embora a severidade de mancha angular, antracnose e ferrugem não tenha apresentado relação com a produção da planta, a área foliar sempre foi positivamente a ela relacionada (Amorim et al., 1995; Bergamin Filho et al., 1997; Carneiro et al., 1997). Além das plantas que apresentam contínua produção de folhas (como o feijoeiro e o maracujazeiro), essa relação positiva tem sido também demonstrada para outras culturas (Waggoner &

Berger, 1987), pois a produção depende primariamente da capacidade fotossintética das plantas. Em experimentos realizados com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro, no entanto, o incremento da área foliar nem sempre ocasionou aumento na produção, pois as plantas infectadas no início do ciclo da cultura apresentaram numerosas pequenas folhas encarquilhadas que elevaram o IAF mas não contribuíram para a formação e o enchimento dos grãos (Bianchini, 1998).

No caso do PWV, a alta correlação entre o IAF e a produção é sugestiva de que a adoção de medidas culturais, que possam retardar a infecção das plantas de maracujazeiro nos 6 a 8 primeiros meses após o transplante, poderão reduzir os danos quantitativos e qualitativos da produção. Assim sendo, recomenda-se que seja estudada a viabilidade prática e econômica da retirada sistemática de plantas doentes durante os 6 a 8 primeiros meses da cultura, em plantios adensados, como forma de minimizar o problema, até que medidas duradouras de controle estejam disponíveis.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

1- O PWV é o vírus que predomina na cultura do maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, seguido pelo CMV e pelo Rhabdovirus causador do clareamento de nervuras;

2- O PWV reduz significativamente a área foliar e os pesos fresco e seco da parte aérea e do sistema radicular do maracujazeiro;

3- A produção do maracujazeiro está diretamente relacionada com o enfolhamento das plantas, sendo essas variáveis influenciadas pela época de infecção com o PWV. Quanto mais cedo a planta é infectada, maior a redução dessas variáveis;

4- O PWV causa danos quantitativos e qualitativos na produção do maracujazeiro, reduzindo número, peso e valor comercial dos frutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; GODOY, C.V.; IMAUTI, M.T.; NUNES, W.M.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Avaliação de danos na cultura do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.82-84, 1995.
- BARBOSA, C.J.; STENZEL, N.C.; JACOMINO, A.P. Identificação do vírus do mosaico do pepino ("cucumber mosaic virus"-CMV) em maracujazeiro amarelo no Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p. 193, 1999.
- BATISTA, F.A.S.; GOMES, R.C.; RAMOS, V.F. Ocorrência de uma anormalidade de possível causa virótica ou semelhante a vírus, provocando "enfesamento" do maracujazeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., Recife, 1981. **Anais**. Recife: SBF, 1981. p.1408-1413.
- BERGAMIM FILHO, A. Curvas de progresso de doença. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Agônômica Ceres, 1995. v. 1: Princípios e conceitos: p.602-626.
- BERGAMIN FILHO, A.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; GODOY, C.V.; AMORIM, L., BERGER, R.D.; HAU, B. Angular leaf spot of *Phaseolus* beans: relationships between disease, helathy leaf area, and yield. **Phytopathology**, v.87, p.506-515, 1997.

- BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A. Avaliação da incidência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá na Serra da Ibiapaba Ceará. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 25., Gramado, 1992. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.155, 1992.
- BIANCHINI, A. Mosaico dourado do feijoeiro: crescimento do hospedeiro, progresso da doença e produção. Piracicaba, 1998. 95p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BROWN, J.K. First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease**, v.77, n.12, p.1264, 1993. /Resumo/
- CARNEIRO, S.M.T.P.G.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de dano provocado pela mancha angular em feijoeiro: relação entre severidade, área foliar e componentes da produção. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.427-431, 1997.
- CHAGAS, C.M. Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) **A cultura do maracujazeiro no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.175-186.
- CHAGAS, C.M.; JOAZEIRO, P.P.; KUDAMATSU, M.; VEJA, J. Mosaico do maracujá roxo, uma nova virose no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.241-247, 1984a.

- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia, causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.259-268, 1981.
- CHAGAS, C.M.; COLARICCIO, A.; KUDAMATSU, M.; LIN, M.T.; BRIOSO, P.S.T.; KITAJIMA, E.W. Estirpe incomum do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 17., São Paulo, 1984. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 402, 1984b.
- CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA JR., C.T.; LOPES, L.C.; GALLETI, S.R.; PERRARI, J.T.; BELLUZ, B.M. Ocorrência do endurecimento do fruto do maracujazeiro (VEFM) no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.187-190, 1992.
- CHANG, C.A.; LIN, Y.D.; LIN, H.H. Utilization of virus-free passionfruit seedlings to control passionfruit virus diseases in Taiwan. **Proceeding of Disease and Pest Control Without Pesticides**, p. 359, 1992.
- CHASON, J.W.; BALDOCCHI, D.D.; HUSTON, M.A. Acomparison of direct and indirect methods for estimating forest canopy leaf area. **Agricultura and Forest Meteorology**, v.57, p.107-128, 1991.
- COLARICCIO, A.; GALETTI, S.R.; CHAGAS, C.M. Identificação de 2 isolados do vírus do mosaico do pepino (CMV) em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado de São Paulo, **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.178, 1992.

- COLARICCIO, A; CHAGAS, C.M.; MIZUKI, M.K.; VEGA, J.; CEREDA, E. Infecção natural do maracujá amarelo pelo vírus do mosaico do pepino no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.254-257, 1987.
- CONCI, V.L. Técnicas serológicas. In: DOCAMPO, D.M.; LENARDÓN, S.L. (Ed) **Métodos para detectar patógenos sistémicos**. Córdoba: IFFIVE-INTAJICA, 1999. cap.2, p.23-39.
- COSTA, A. F. Contribuição ao estudo da epidemiologia e controle do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 18., Fortaleza, 1985. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.310, 1985.
- COSTA, A.F.; BRÁS, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos de maracujazeiro (VEFM) por afídeos (Hemiptera-Aphididae). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.376, 1995.
- 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, p.951-955, 1986.
- CRESTANI, O.A.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; MARINHO, V.L.A.; PIMENTEL, J.P. Uma nova virose em maracujazeiro – mosaico amarelo – causada por um tymovirus. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 17., São Paulo, 1984. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 394, 1984.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 1998**: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 1998. 481p.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 1999**: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 1999. 521p.

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.; REZENDE, J. A. M. Reação de diferentes espécies, principalmente de 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.

GOMES, F.D. **Curso de estatística experimental**, 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

HOEHNE, F.C. **Frutas indígenas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1946. 96p.

IAWAI, H.; OHMORI, T.; KUROKAWA, Y.; MUTA, T.; ARAI, K. New record of passion fruit woodiness virus in Japan. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.62, p.415-465, 1996.

INOWE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of passion fruit woodiness virus isolates from Brasília and surrounding region, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.3, p.479-487, 1995.

KITAJIMA, E.W.; NOME, C.F. Microscopia electronica en virologia vegetal. In: DOCAMPO, D.M.; LENARDÓN, S.L. (Ed.) **Métodos para detectar patógenos sistémicos**. Córdoba: IFFIVE-INTA-JICA, 1999. cap.3, p.59-87.

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**, v.11, p.409-432, 1986.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JR., C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.555-559, 1997.

KOENIG, R.; FRIBOURG, C.E. Natural occurrence of tomato ringspot virus in *Passiflora edulis* from Peru. **Plant Disease**, v.70, n.3, p.244-245, 1986.

LORETO, T.J.G.; VITAL, A. **Viroses e micoplasmoses do maracujá em Pernambuco**. Informe SERDV, 1983. 23p.

MAGEE, C.J. The woodiness or mosaic disease of passion fruit. **Agriculture Gazette New South Wales**, v. 59, p. 199-202, 1948.

McKNIGHT, T. The woodiness virus of the passion vine (*Passiflora edulis* Sims.). **Queensland Journal of Agricultural Science**, v.10, p.4-35, 1953.

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

- PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. Cucumbeber mosaic virus. **Advances in Virus Research**, v.41, p.281-348, 1992.
- PARES, R.D.; MARTIN, A.B.; FITZELL, R.D. Virus-induced tip necrosis of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.) **Australian Plant Pathology**, v.14, p.76-78, 1985.
- PARES, R.D.; GUNN, L.V.; KESKULA, E.N.; MARTIN, A.B.; TEAKLE, D.S. Ocorrência de passiflora latent carlavirus on cultivated and wild *Passiflora* species in Australia. **Plant Disease**, v.81, n.4, p.348-350, 1997.
- PEASLEY, D.; FITZELL, R. D. Passionfruit industry benefits through scion wood scheme. **Agriculture Gazette New South Wales**, v. 92, p. 5-8, 1981.
- PIZA JR., C.T.; REZENDE, J.A.M. **Virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro**. Campinas: CATI, 1993. 10p. (CATI. Comunicado Técnico, 103)
- REZENDE, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 116-125.
- SALOMÃO, T.A.; ANDRADE, V.M.M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.20-39.
- SÃO JOSÉ, A.R.; REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.F. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Norte do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., Salvador, 1994. **Anais**. Salvador: SBF, 1994, p.797.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: release 6.08. ed. Cary, 1993.

SILVA, A.C.; SÃO JOSÉ, A.R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista, UESB, 1994. p. 1-5.

SIMMONDS, J.H. Mild strain protection as a mean of reducing losses from the Queensland woodiness virus in the passion vine. **Queensland Journal of Agricultural Science**, v.16, p.371-380, 1959.

TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. **Passion fruit woodiness virus**. Fainhani Royal: Commonwealth Mycological Institute, 1973. (Description of Plant Viruses, 122).

TAYLOR, R.H.; KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses which cause woodiness of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Australian Journal of Agricultural Science**, v.15, p.560-570, 1964.

TEAKLE, D.S.; GILL, C.C.; TAYLOR, R.H.; RAABE, R.D. Cucumber mosaic virus in *Passiflora* in California. **Plant Disease Reporter**, v.47, n.7, p.677-678, 1963.

TRINDADE, P.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.S.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência do "passionfruit woodiness virus" (PWV) em maracujazeiros no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p.196, 1999.

WAGGONER, P.E.; BERGER, R.D. Defoliation, disease, and growth. **Phytopathology**, v.77, p.393-398, 1987.

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979, **Anais**. Pelotas: SBF, 1979. p.915-917.

YONAHA, T.; TAMORI, M.; YAMANOHA, S.; NAKASONE, T. Studies on passion fruit virus diseases in *Passiflora edulis* and *Passiflora foetida* plants. **Science Bulletin of the College of Agriculture, University of Ryukyus**, v.29, p.29-38, 1979.