

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**REAÇÃO DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora* spp.) À VIROSE DO  
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS**

**ZANON SANTANA GONÇALVES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**ABRIL – 2016**

**REAÇÃO DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora* spp.) À VIROSE DO  
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS**

**ZANON SANTANA GONÇALVES**

Biólogo

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – 2014

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientador: Dr. EDER JORGE DE OLIVEIRA**

**Coorientadores: Dr. ONILDO NUNES DE JESUS**

**Dr. CARLOS BERNARD M. CERQUEIRA-SILVA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, 2016

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Zanon Santana.

Reação de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) à virose do endurecimento dos frutos / Zanon Santana Gonçalves. – Cruz das Almas, BA, 2016.  
96 f. il.; 30 cm.

Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira.

Coorientador: Dr. Onildo Nunes de Jesus.

Coorientador: Dr. Carlos Bernard M. Cerqueira-Silva

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) -  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

1. Maracujá. 2. Doença de planta. 3. Melhoramento vegetal. I. Oliveira, Eder Jorge de. II. Jesus, Onildo Nunes de. III. Cerqueira-Silva, Carlos Bernard M. IV. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia V. Título.

CDD: 634.425 (21.ed.)

**COMISSÃO ORGANIZADORA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ZANON SANTANA GONÇALVES**

---

**Dr. Eder Jorge de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)**

---

**Dr. Rafael Parreira Diniz  
PNPD – Embrapa Mandioca e Fruticultura**

---

**Dr<sup>a</sup>. Simone Alves Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em ....., conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em .....

À minha mãe, **Eunilia Santana** por todo amor incondicional dedicado, pela educação concedida, as incansáveis e constantes orações. Por apoiar todas as minhas escolhas e pelos exemplos, que foram fundamentais para minha formação moral. Obrigado por sustentar tudo que venho construindo em minha vida, te amo.

**DEDICO**

Ao meu irmão **Zalmar Santana**, pelo exemplo, por todas as palavras de carinho e os conselhos, que foram essenciais para que eu pudesse 'driblar' as 'atribulações' que esta fase nos impõe, mas sobretudo, pela paciência.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente à **DEUS**, pelo Dom da vida, por guiar meus passos e por permitir que eu galgasse mais uma etapa profissional e pessoal com muita sabedoria;

Ao programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (**RGV**) e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (**UFRB**), pela chance de realizar o mestrado;

Ao Centro de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura (**EMBRAPA/CNPMPF**), pela parceria e por toda infraestrutura concedida para elaboração desta pesquisa;

As agências de fomento à pesquisa pelos recursos financeiros que permitiram a realização deste trabalho, destacando a **FAPESB** (Projeto Rede *Passiflora*, Edital Nº 12/2012, Pedido Nº 4264/2012) e a **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos;

Ao orientador, Dr. **Eder Jorge** e aos coorientadores, Dr. **Onildo Nunes** e Dr. **Carlos Bernard**, pelos exemplos de pesquisadores, cada um com seus 'dogmas', mas que com muita sabedoria e experiência profissional foram essências para o 'desfecho' desta pesquisa. Grato pelo apoio, confiança, paciência, exigências e pelos conhecimentos partilhados.

Aos meus pais, **Eunília Santana** e **Zenildo Gonçalves**, pela educação, apoio, por acreditar na minha capacidade e por tudo que sei e sou;

À minha namorada **Denise Ribeiro**, provou que a distância não constitui uma 'barreira' e sempre me agraciou com sua agradável e adorável companhia, pelos cuidados, por acalmar meus momentos de angústia e estresse, mas, principalmente, por sempre acreditar e apoiar meus planos e projetos, o qual incluo nosso relacionamento;

À analista do Lab. de Biologia Molecular Avançada, **Andresa Priscila**, pela inestimável amizade, e por toda logística, principalmente as cotações de kits e reagentes;

Ao analista do Lab. de Virologia, **Emanuel Abreu**, pela valiosa contribuição e dicas nas extrações de RNA, e consequente detecção molecular do patógeno;

Aos técnicos do Lab. de Biologia Molecular, **Raimundo Pereira**, mas principalmente a **Vandeson Sousa** ‘vandete’, sobretudo, pelo exemplo de ser humano e por todo companheirismo e suporte técnico prestado durante execução deste trabalho;

À **equipe ‘LBM’**, pela calorosa recepção quando iniciei as atividades no estágio supervisionado. Por toda ajuda nas extrações de DNA, pelo relacionamento amigável, por propiciarem um bom ambiente de trabalho e pela geração de conhecimentos, que foram, sem sombra de dúvidas, essências para as discussões dos capítulos dessa dissertação;

Aos **funcionários** da EMBRAPA e da URFB pela gentileza;

Aos **professores** da Pós-graduação, por todo conhecimento transmitido durante as disciplinas ofertadas;

À ‘equipe maracujá’ por todo o apoio e serviços prestados, especialmente a Sidnara pelo pronto atendimento nas tarefas em que era solicitada;

As ‘novas amigas’ construídas durante o mestrado, principalmente ao amigo **Lucas Kennedy**, pela valiosa amizade e participação efetiva durante a execução e elaboração deste trabalho, destacando principalmente as avaliações de sintomatologia foliar;

Aos amigos da Pós-graduação, sendo necessário destacar pessoas como **Alice, Ariana, Alírio, Camila e Leticia**, por compartilharem todos os momentos durante esta etapa;

Ao Pós doutorando **Rafael Diniz**, o ‘mineiro’, pela oportunidade das discussões associadas ao melhoramento genético de plantas, auxílio nas análises estatísticas e interpretação dos dados;

À doutoranda **Cátia Dias**, pelas preciosas dicas, constante ajuda ao longo deste ‘processo’, que na maioria das vezes, deixava de lado suas próprias atividades para atender-me.

Aos amigos **Paulo Henrique** ‘paulete’, e **Rogério Mercês** ‘rogerete’, pelos conhecimentos compartilhados e pela preciosa amizade;

À Dr. **Marciene** e as Pós-doutorandas, **Kátia** e **Karla** ‘as Pestanas’, pelas preciosas dicas nas etapas de obtenção de marcadores MSAP, para análises epigenéticas inicialmente proposto neste estudo;

Aos Pós-doutorandos **Taliane Leila** e **Hilo Sousa** por todo auxílio nos estudos anatômicos dos tecidos foliares infectados com CABMV;

Ao grupo '**Chora Rita**', por tornar a minha 'estadia' em Cruz das Almas mais agradável;

À minha querida turma de bacharelado em biologia pelas vibrações positivas. Em especial, aos amigos (as) **Iasminy Silva** e **João Guilherme**, exemplos de dedicação e empenho. Grato por todo incentivo e a constante torcida;

Aos amigos de 'longas datas', **Ivanderson**, **Thiago**, **Jeovani** e **Fernando**, que mesmo de longe, sempre torceram e acreditaram no meu sucesso;

À banca pelas relevantes contribuições;

Este é o '**Capítulo 3**', sendo, portanto, mais que uma obrigação expressar toda minha gratidão e sinceros votos de que as pessoas envolvidas na 'construção' deste trabalho, tenham muito sucesso pessoal e profissional.

“Seja paciente e resistente”

*Perfer et obdura, dolor hic tibi proderit olim*

Ovídio

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Resumo	
Abstract	
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
ASPECTOS METODOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO ( <i>Passiflora</i> spp.) À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS.....	32
<b>CAPÍTULO 2</b>	
FONTES DE RESISTÊNCIA À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS EM <i>Passiflora</i> spp.....	54
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>84</b>

## REAÇÃO DE MARACUJAZEIROS (*Passiflora* spp.) À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

Autor: ZANON SANTANA GONÇALVES

Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

Coorientadores: Dr. Onildo Nunes de Jesus

Dr. Carlos Bernard M. Cerqueira-Silva

**Resumo:** A virose do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) é um dos principais fatores que limitam a manutenção e expansão do cultivo do maracujazeiro. Estudos sobre a evolução temporal dos sintomas e a identificação de fontes de resistência são etapas importantes para melhor compreensão deste patossistema para o desenvolvimento de estratégias de controle. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o progresso dos sintomas causados pelo CABMV e identificar fontes de resistência em diferentes espécies de maracujazeiros. Avaliou-se a reação ao CABMV em 80 genótipos pertencentes a 12 espécies de *Passiflora* spp. As plantas foram inoculadas artificialmente e 20 dias após inoculação (DAI) foram realizadas avaliações da severidade com uso de uma escala de notas variando de 1 (resistente) a 4 (altamente suscetível) que posteriormente foi convertida em índice de doença (ID). A análise de variância foi realizada com os valores médios do índice de doença e para agrupamento das médias foi utilizado o teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). As análises revelaram existência de variabilidade genética para resistência ao CABMV nos genótipos avaliados. A severidade média da doença atingiu máximo aos 62 DAI, embora não tenha sido observada diferença no índice de doença (ID) dos genótipos a partir dos 55 DAI. Aos 55 DAI foi observado que as espécies *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. gibertii*, foram resistentes ao CABMV com índice de doença variando de 0,00 a 2,86%, enquanto que espécies comerciais como *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* foram suscetíveis com ID de 37,65 e 59,43%. As espécies resistentes podem ser utilizadas como parentais em cruzamentos interespecíficos visando à transferência da resistência ao CABMV para espécies comerciais como *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*.

**Palavras-chave:** Passicultura, germoplasma, resistência, *Potyvirus*, CABMV.

## **PASSIONFRUIT (*Passiflora* spp.) REACTION TO PASSIONFRUIT WOODINESS DISEASE**

Author: ZANON SANTANA GONÇALVES

Advisor: Dr. Eder Jorge de Oliveira

Coadvisors: Dr. Onildo Nunes de Jesus

Dr. Carlos Bernard M. Cerqueira-Silva

**Abstract:** The passionfruit woodiness disease, caused by *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) are one of the main limiting factors to passionfruit crop expansion and maintenance. Studies related to the symptoms, temporal evolution, and identifying the source of resistance are fundamental steps to better understand this pathosystem and to develop control strategies. The purpose of this research was to evaluate the progress of symptoms caused by CABMV and identify resistance sources in different passionfruit species. We evaluated the reaction to CABMV 80 genotypes belonging to 12 *Passiflora* species. Plants were mechanically inoculated and the symptoms evaluated weekly 20 days after the inoculation (DAI). Severity was estimated by a grade scale varying from 1 (resistant) to 4 (highly susceptible) that was subsequently converted to a disease index (DI). The analysis of variance was performed with the DI mean values and the mean values cluster was conducted with the Scott Knott-test ( $p \leq 0.05$ ). The analyses showed genetic variability to resistance to CABMV on the samples assessed. The medium severity reached the maximum 62 days after the inoculation (DAI), although no difference has been observed in the genotypes from the disease index (DI) starting from 55 DAI. From the DI mean values at 55 DAI it was observed that *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea* and *P. gibertii* were resistant to CABMV with the DI ranging from 0.00 to 2.86%, while the commercial species such as *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. alata* were susceptible with DI in 37.65 and 59.43%. The resistant species may be used in crossbreeding in order to transfer the resistance to CABMV to commercial species such as *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. alata*.

**Keywords:** Passionfruit crop, germoplasm, resistance, *Potyvirus*, CABMV

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Centro de diversidade do gênero *Passiflora***

A família *Passifloraceae* Juss., cujas espécies são conhecidas comumente como maracujazeiros, possui estimativas de número de espécies que varia entre 520 e 700 distribuídas em 18 a 23 gêneros (FEUILLET, 2004; MACDOUGAL; FEUILLET, 2004), não havendo, portanto, consenso entre os taxonomistas a respeito do número de espécies e gêneros desta família (BERNACCI et al., 2005). Diante dessa diversidade de gêneros, o *Passiflora* merece destaque por congregar o maior número de espécies (cerca de 576), com ampla distribuição nos trópicos da América (OCAMPO et al., 2016). O Brasil com aproximadamente 150 espécies de *Passiflora*, em conjunto com a Colômbia que possui ao menos 171 espécies identificadas são os principais centros de diversidade genética do gênero (OCAMPO, 2010; BERNACCI et al., 2013). A importância desses países como centros de diversidade é também destacada pelo número de espécies endêmicas, aproximadamente 89 do Brasil, além do fato de novas espécies serem descobertas constantemente (OCAMPO, 2010; CERVI et al., 2011; BERNACCI et al., 2013). Apesar do grande número de espécies e do potencial uso como recurso genético, poucas são efetivamente cultivadas para fins comerciais (VIEIRA; CARNEIRO, 2004; MELETTI et al., 2005).

### **1.2 Importância do maracujazeiro**

As espécies do gênero *Passiflora* possuem diversos usos e aplicações, sendo, portanto, utilizadas em vários segmentos, com registro de mais de 400 híbridos existentes no mundo com fins ornamentais em diferentes ambientes (ABREU et al., 2009; CONCEIÇÃO et al., 2011; SOARES et al., 2015), uso medicinal (MELO et al., 2012; SIEBRA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2016), bem como uso direto e indireto na alimentação humana, seja na forma de

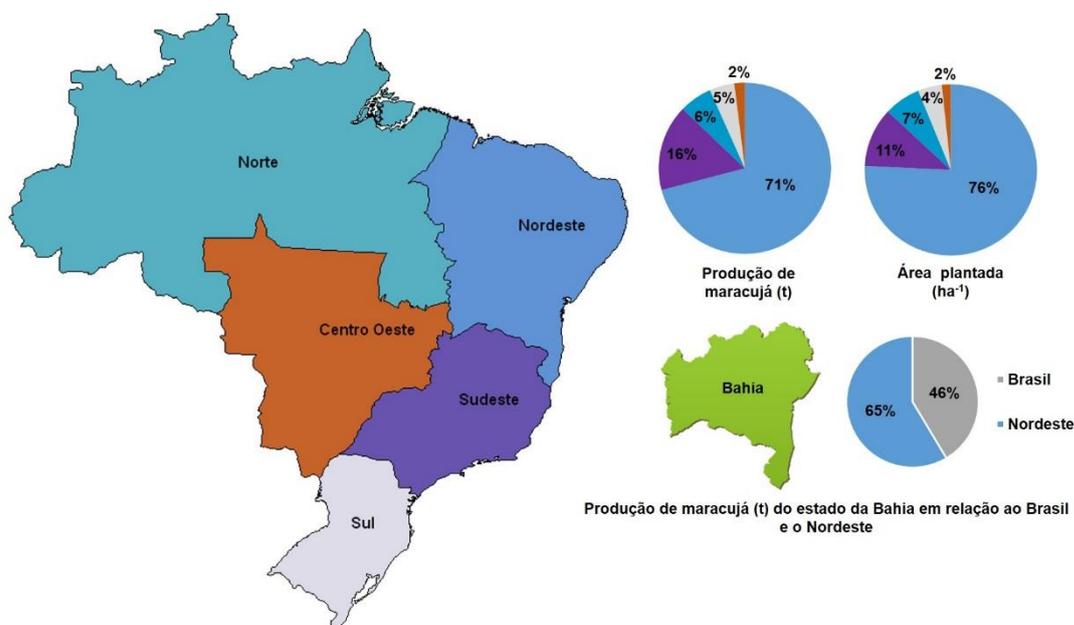
sucos, doces, sorvetes, refrescos, licores ou no consumo *in natura* dos frutos (ISHIMOTO et al., 2007).

Dentre as espécies mais cultivadas para a alimentação humana, destacam-se as que produzem frutos comestíveis, a exemplo do *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg (maracujá 'amarelo' ou 'azedo'), *P. edulis* f. *edulis* Sims. (maracujá 'roxo') e o *P. alata* Curtis (maracujá 'doce'), que atualmente possuem maior interesse econômico (BERNACCI et al., 2008; FALEIRO et al., 2011). Outras espécies também produtoras de frutos comestíveis, tais como *P. cincinnata* Mast, *P. nitida* Kunth, *P. quadrangularis* L., *P. setacea* DC., *P. ligularis* Juss., *P. maliformes* L., apesar de representarem uma pequena fração da produção nacional, são de comercialização restrita a determinadas regiões (MELETTI et al., 2005; CARDOSO-SILVA et al., 2007; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010; CERQUEIRA-SILVA et al., 2009; 2012c). Além disso, muitas espécies silvestres de *Passiflora* por possuírem genes de resistência a fatores abióticos e bióticos (PAULA et al., 2010; AGUIAR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013) são extensivamente utilizadas em programas de melhoramento genético.

### **1.3 Aspectos econômicos da cultura do maracujazeiro**

O Brasil insere-se no cenário internacional como o maior produtor e consumidor de maracujá, com uma produção em 2014 de 823,3 mil toneladas, plantados em aproximadamente 57,2 mil hectares (IBGE, 2015).

Embora o cultivo do maracujazeiro seja explorado em todas as cinco macro regiões do país, o Nordeste é a região com maior produção, respondendo por aproximadamente 71% da produção nacional (IBGE, 2015; Figura 1). Dentre os estados produtores, a Bahia responde por 65% de toda área plantada no Nordeste e 46% da produção brasileira (IBGE, 2015; Figura 1).



**Figura 1.** Representação da produção de maracujazeiros no Brasil, áreas de cultivo, macro regiões produtoras de frutos de maracujá e produção da Bahia em relação ao Brasil e Nordeste. Mapa gerado com a ferramenta GISMAPS VIEWER (<http://www.gismaps.com.br/>). Obtenção dos dados: <http://www.ibge.gov.br>.

Apesar da importância para a economia nacional e da franca expansão das áreas destinadas a passicultura, a produtividade nacional ainda é baixa (14 t ha<sup>-1</sup>), embora o potencial da cultura possa chegar a 50 t ha<sup>-1</sup> (BORGES et al., 2005; NEVES et al., 2013; EMBRAPA, 2013; IBGE, 2015). O aumento da produção da passicultura, no Brasil, está ligado à ampliação da área de cultivo, bem como, com o uso de espécies melhoradas geneticamente que atendam às necessidades do mercado consumidor (MELETTI et al., 2000; SILVA et al., 2009).

O maracujá 'amarelo' ou 'azedo' (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), é a espécie mais cultivada e comercializada mundialmente (OLIVEIRA et al., 2008), e quando em conjunto com a variedade de frutos 'roxos' (*P. edulis* Sims), ocupa mais de 90% do território mundial destinado ao cultivo de maracujazeiros (BORGES et al., 2005). No Brasil, o maracujazeiro 'amarelo', também é a espécie mais representativa, chegando a ocupar 95% da área cultivada (MELETTI; MAIA, 1999). Neste contexto, merece destaque o fato de diferentes grupos de pesquisa no Brasil serem pioneiros na caracterização

morfo-agronômica (FREITAS et al., 2011; CASTRO et al., 2012; PAIVA et al., 2014) e da reação de doenças associadas ao cultivo dos maracujazeiros (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; FISCHER et al., 2010; SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2015), bem como na caracterização de diversidade genética de espécies comerciais (PEREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2014; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014a) e silvestres (PAULA et al., 2010; BELLON et al., 2014; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012a). Os estudos destes grupos de pesquisa são importantes para adotar estratégias que potencializem os ganhos genéticos e para quantificar a variabilidade existente para as características de interesse, a exemplo dos ganhos de quantidade e qualidade de produção, bem como a busca por resistência a doenças (CERQUEIRA-SILVA et al., 2009; REIS et al., 2012; MACIEL et al., 2009).

#### **1.4 Entraves associados à expansão da passicultura**

Em conjunto com a expansão das fronteiras agrícolas destinadas ao cultivo dos maracujazeiros, tem sido observado o surgimento de um grande número de fitopatógenos, a exemplo de fungos (*Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*) (SOUZA et al., 2014; FLORES; BRUCKNER, 2014; PREISIGKE et al., 2015), bactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*) (VIANA et al., 2014a), nematoides (*Meloidogyne* spp.) (FISCHER et al., 2010), fitoplasmas (LUIZ et al., 2008) e vírus (*Passion fruit woodiness virus* - PWV e *Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) (NASCIMENTO et al., 2006; MELO et al., 2015; GARCÊZ et al., 2015). Isoladamente ou em conjunto, esses patógenos depreciam a quantidade e a qualidade dos frutos produzidos, reduzindo o seu valor comercial, produtividade e a longevidade da cultura (FALEIRO et al., 2008). Deste modo, os aspectos fitossanitários mostram-se fatores limitantes para a expansão e até mesmo para a manutenção da passicultura.

Dentre os fitopatógenos, as viroses, sobretudo a virose do endurecimento dos frutos se destaca pela severidade que causam a cultura, gerando grandes problemas econômicos e sociais (NASCIMENTO et al., 2004; 2006), além de não existir métodos químicos para o controle desta doença. Esta enfermidade é considerada uma das principais dificuldades para a ampliação

da passicultura. Portanto, ações no sentido de mitigar esse patossistema, devem ser priorizadas (KAREEM; TAIWO, 2007; SAMPAIO et al., 2008).

### **1.5 Virose do endurecimento dos frutos em maracujazeiros (origem e ocorrência)**

A virose do endurecimento dos frutos é citada como uma das doenças mais significativas que acomete os maracujazeiros, possuindo diferentes agentes causais em áreas de cultivo no mundo (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014b).

Os primeiros relatos do endurecimento dos frutos em maracujazeiros foram descritos na Austrália por Cobbem 1901. A princípio, a doença do endurecimento dos frutos, foi creditada ao agente etiológico *Passion fruit woodiness virus* - PWV (TAYLOR; GREBER, 1973; KITAJIMA et al., 1986), infectando plantas comerciais de maracujazeiros 'amarelo' e 'doce'. Basicamente, os testes para a detecção deste patógeno eram fundamentados em ensaios biológicos (avaliações sintomatológicas) e sorológicos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) (NOVAES; RESENDE, 1999). Até 2004 ainda acreditava-se que o PWV era considerado o único vírus capaz de induzir a doença. Entretanto, sua ocorrência, comprovadamente está restrita ao território australiano (WYLIE; JONES, 2011; COUTTS et al., 2011; FUKUMOTO et al., 2013), o que indica a possibilidade de outros vírus estarem associados a este patossistema.

Outros vírus, que também provocam a doença, já foram relatados na África do Sul (*South African Passiflora virus* – SAPV) (BRAND et al. 1993), mais tarde diagnosticado como sendo uma estirpe do *Cowpea aphid borne mosaic virus* – CABMV (MCKERN et al., 1994; HUGUENOT et al., 1996; SITHOLE-NIANG et al., 1996), Japão (*East Asian Passiflora virus* – EAPV) (IWAI et al., 2006; FUKUMOTO et al., 2012; MISHRA et al., 2015), e mais recentemente em Uganda (*Ugandan Passiflora virus* – UPV) (OCHWO-SSEMAKULA et al., 2012) indicando que ao menos quatro espécies estão associadas a doença.

O uso de ferramentas moleculares baseada em sequenciamento de genes e análise filogenéticas tem indicado maior similaridade genômica dos isolados brasileiros com o CABMV (NASCIMENTO et al., 2004; 2006; BARROS

et al., 2011; NICOLINI et al., 2012; MELO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

No Brasil, especificamente na cidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil, a doença do endurecimento dos frutos foi registrada no final da década de 1970 (YAMASHIRO; CHAGAS, 1979) quando ainda era descrita como o PWV. Rapidamente a doença propagou-se pelo território nacional, sendo observada em plantações nos estados de Pernambuco (LORETO; VITAL, 1983), Sergipe e Ceará (KITAJIMA et al., 1986), São Paulo (CHAGAS et al., 1992), Minas Gerais (SÃO JOSÉ et al., 1994), Distrito Federal (INOUE et al., 1995; NASCIMENTO et al., 2006), Pará (TRINDADE et al., 1999), Santa Catarina (COLARICCIO et al., 2008), Bahia (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; MELO et al., 2015), Paraíba (NASCIMENTO et al., 2004) e Mato Grosso do Sul (STANGARLIN et al., 2011). Atualmente o CABMV possui ocorrência generalizada em território nacional, sendo registrado em todas as áreas de produção do maracujazeiro, e em muitos casos, com incidência de 100% nos pomares (RESENDE, 2006).

### **1.6 CABMV - *Cowpea aphid borne mosaic virus* (características, infecção e sintomatologia)**

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus* da família *potyviridae* e possui partículas virais alongadas e flexuosas com tamanho aproximado de 670-900 nm de comprimento e 11-16 nm de diâmetro. O genoma é constituído por uma única molécula de RNA fita simples (ssRNA), sentido positivo, com cerca de 10.000 nucleotídeos (KING et al., 2012). O RNA possui uma única fase abertura de leitura (*Open Reading Frame*, ORF), envolto por um capsídeo proteico (CP) cuja tradução gera uma poliproteína com tamanho de 340-350 KDa que sofre proteólise e gera de 8 a 10 produtos finais (P1, Hc-Pro, P3, CI, NIa [VPg-Pro] e NIb, 6K1, 6K2 e CP) (MLOTSHWA et al., 2002a).

O efeito destas proteínas no citoplasma das células infectadas produz inclusões cilíndricas (CI – *Cylindrical Inclusion*), conhecidas também como ‘cata-vento’ (KING et al., 2012). Entretanto, é a proteína multifuncional HC-Pro (*Helper Component Protease*) que coordena as principais funções relacionadas à: (i) atividade de protease que cliva poliproteína viral, (ii) ao movimento do vírus na planta (célula a célula via plasmodesmas e à longa distância via

floema), (iii) replicação viral, (iv) virulência do patógeno, (v) acúmulo do vírus na planta, (vi) sinergismo viral, (vii) e, por vezes, atua como proteína repressora/supressora do silenciamento gênico (MLOTSHWA et al., 2002b; LLAVE et al., 2002; KASSCHAU et al., 2003; SCHOTT et al., 2012; NAM et al., 2013).

Naturalmente, a transmissão dos *Potyvirus* se dá por intermédio de afídeos em uma relação vírus-vetor não circulativa e não persistente, e artificialmente através de tratos culturais efetuados de maneira incorreta, levando os pomares de maracujazeiros a se tornarem verdadeiros depósitos deste vírus (FISCHER; RESENDE, 2008; GIBBS; OHSHIMA, 2010; SILVA et al., 2012a). Entretanto, destaca-se que a transmissão também pode se dar pela inoculação via extrato foliar tamponado ou a partir de preparações virais purificadas e concentradas (LANGHAM, 2008).

Os sintomas observados em plantas de maracujazeiros infectados com o CABMV caracterizam-se por mosaicos (leve ou intenso), por vezes acompanhados de bolhosidade, rugosidade e deformação foliar (NOVAES; RESENDE, 2003; FISCHER; RESENDE, 2008), redução no tamanho da planta, frutos deformados e tamanho reduzido, pericarpo com uma espessura irregular, endurecido e redução na cavidade da polpa, além da diminuição da produção de frutos (GIORIA et al., 2000).

Além dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.) o CABMV infecta espécies filogeneticamente distantes, a exemplo de diversas leguminosas como feijão-caupi, feijão-de-praia (*Canavalia rosea*), amendoim (*Arachis hypogea*) e gergelim (KITAJIMA et al., 2008; BARROS et al., 2011; NICOLINI et al., 2012; GONZÁLEZ-SEGNANA et al., 2013), fato este que dificulta o controle e erradicação da virose em campos de produção.

### **1.7 Melhoramento genético do maracujazeiro: Híbridações interespecíficas visando resistência ao CABMV**

O melhoramento genético do maracujazeiro, no Brasil, é praticado a menos de 20 anos, e as ações eram voltadas para a obtenção de variedades com maior produtividade e qualidade dos frutos (MELLETTI et al., 2005; MELLETTI, 2011; FALEIRO et al., 2011). Neste sentido, para que o Brasil se

mantenha como maior produtor mundial e os problemas associados aos aspectos fitossanitários da cultura sejam contornados, o desenvolvimento de novas variedades com resistência comprovada a fitopatógenos por meio de hibridações interespecíficas deve ser priorizado (FREITAS et al., 2015; OCAMPO et al., 2016).

As hibridações interespecíficas são frequentemente utilizadas no programa de melhoramento genético de maracujazeiro (FONSECA et al., 2009) visando a transferência de alelos de resistência a fatores bióticos e abióticos encontrados nas espécies silvestres (OLIVEIRA et al., 2013) e incorporados à espécie suscetível. A resistência genética em espécies silvestres é relatada por diversos autores, a exemplo da *Passiflora cincinnata*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; PAULA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; FREITAS et al., 2015), o que motiva os pesquisadores para dar início e/ou continuidade aos programas de melhoramento que visam ampliar a base genética das espécies comerciais e a obtenção de variedades resistentes. Na literatura, registra-se o crescente volume de trabalhos que utilizam espécies silvestres em hibridações interespecíficas (AMORIM et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012; OCAMPO et al., 2016), e na maioria dos casos, as hibridações entre *P. edulis* x *P. setacea*, visando resistência, tem sido preferencialmente utilizada (JUNQUEIRA et al., 2005; FREITAS et al., 2015; SANTOS et al., 2015).

Embora exista possibilidade efetiva do uso de espécies silvestres como fontes de resistência, algumas hibridações interespecíficas não são bem sucedidas em função de problemas de incompatibilidades genética entre as espécies envolvidas (PEREIRA et al., 2005; BUGALLO et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2011; SOARES et al., 2015), a exemplo de ausência de germinação do grão de pólen, retardo ou inibição do tubo polínico, diferença no número de cromossomos ( $2n= 12; 18; 20; 22; 24; 36, 72$  e  $84$ ) e também ao fato de pertencerem a diferentes gêneros de *Passiflora*.

Na ocorrência de insucesso nas hibridações, ferramentas biotecnológicas, a exemplo da cultura de tecidos, hibridações por fusão de protoplastos e transformação genética, tem-se tornado alternativas viáveis (LIMA et al., 2000; MELETTI et al., 2005; CORREA et al., 2015).

Hibridações interespecíficas entre genótipos de *P. edulis* x *P. setacea*, vêm sendo conduzidas em unidades de pesquisa no Brasil para alcançar resistência ao CABMV (FREITAS et al., 2015; SANTOS et al., 2015), e os resultados têm-se mostrado promissores para elaboração de estratégias de controle da doença.

O programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura vêm conduzindo ações de pesquisas por meio de hibridações interespecíficas entre as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* ( $2n= 18$ ) x *P. cincinnata* ( $2n= 18$ ), seguida de vários ciclos de retrocruzamentos [*P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. cincinnata*) x *P. edulis*] para obtenção de populações segregantes com resistência ao CABMV e a rusticidade do *P.cincinnata*.

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido direcionados na busca de de resistência de *P. edulis* ao CABMV, e os resultados obtidos tem revelado variação no nível de severidade (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; PINTO et al., 2008; VIANA et al., 2014b), provavelmente em função da alta variabilidade constatada nessa espécie (BELLON et al., 2014). Embora, exista a variabilidade genética para resistência em genótipos de *P. edulis*, ainda não foram relatados níveis satisfatórios para controle do CABMV (JUNQUEIRA et al., 2005).

#### **1.8. Procedimentos para identificação de fontes de resistência ao CABMV**

Em programas de melhoramento do maracujazeiro, o *screening* de plantas visando à identificação de genótipos com resistência ao CABMV vem sendo realizado (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2015). Para essa finalidade são utilizados diferentes procedimentos metodológicos para efetiva seleção de genótipos resistentes. As metodologias utilizadas nessa etapa geralmente variam em função do patossistema.

Para o CABMV são usadas as avaliações fitopatológicas, a exemplo de chaves descritivas (escala de notas) (NOVAES; RESENDE, 2003; LEÃO et al., 2006; PINTO et al., 2008; VIANA et al., 2014b) e índices fitopatométricos de doença (ID) (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; 2012b), para eficiente quantificação dos sintomas produzidos e avaliação da sua severidade. Nos

trabalhos desenvolvidos por Novaes; Resende, (2003), Leão et al. (2006), Pinto et al. (2008) e Viana et al. (2014b), os autores verificaram a reação ao vírus do endurecimento dos frutos com uso de escala de notas e inoculações artificiais. Oliveira et al. (2013), Santos et al. (2015) e Freitas et al. (2015), fizeram uso de escala de notas em condições de campo, porém, para analisar a severidade da doença, esses autores, não transformaram as notas atribuídas em índice de doença. Sabe-se que o uso isolado da nota média a partir da escala de notas, principalmente quando a variação é pequena (1 a 4), tem como desvantagem a dificuldade de transformação dos dados para uma distribuição normal dos dados.

Outros autores, além de utilizarem escala de notas, transformam as notas atribuídas em um índice de doença para quantificar a severidade da doença. Cerqueira-Silva et al. (2008) observaram que o uso do índice de doença global foliar (IDGF) foi eficiente em avaliar a reação de maracujazeiros 'amarelo' ao CABMV em condições de campo. Com este índice, os autores também concluíram que a gravidade da doença se correlaciona negativamente e significativamente com a produção de frutos. Cerqueira-Silva et al. (2012b) avaliaram a reação do CABMV em maracujazeiros 'amarelo' em condições de campo, com uso de diferentes índices, sendo eles: (i) índice de intensidade de infecção, (ii) índice global de doença foliar, e, (iii) incidência global e índice de gravidade. O uso desses índices são importantes para caracterizar o germoplasma selvagem usando isolados de menor gravidade ou para avaliar o nível de resistência de variedades cultivadas utilizando isolados mais graves. O uso do índice de doença transforma a nota da escala em percentagem, contribuindo para a normalidade dos dados para a análise de variância.

Verifica-se ainda o uso da área abaixo da curva de progresso da doença (VIANA et al., 2014b; FREITAS et al., 2015; SANTOS et al., 2015) para estudos da proporção da doença ao longo do tempo. Entretanto, essa metodologia fornece uma só estimativa a partir de diversas épocas de avaliação, sendo, portanto, uma estratégia interessante, mas que não permite a definição da melhor época de avaliação da doença (HIKISHIMA et al., 2010). Nota-se ainda, que para avaliar a reação dos maracujazeiros, são utilizadas diferentes classificações fenotípicas. Para este patossistema, tem sido reportado a classificação dos genótipos em 'resistentes', 'moderadamente resistentes',

‘suscetíveis’, ‘extremamente suscetíveis’ ou ‘altamente suscetíveis’ (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; PINTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; VIANA et al., 2014b). Também tem sido proposta a classificação de genótipos em relação à severidade de doenças em ‘altamente resistentes’, ‘resistentes’, ‘moderadamente resistentes’, ‘moderado’, ‘moderadamente suscetíveis’ e ‘suscetíveis’ (PATAKY; CARSON, 2008). Com estes relatos, verifica-se que os programas de melhoramento genético utilizam diferentes abordagens de classificação, e em consequência, a reação de genótipos é apresentada com uma variedade de formas (PATAKY; CARSON, 2008; MARTINS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Os trabalhos que avaliaram a reação do CABMV em maracujazeiros, tem sido realizado em período variando de 30 a 60 dias após inoculação. Porém, são escassos na literatura, estudos que proponham estabelecer melhores tempos para avaliar a reação do CABMV. Desta forma, a identificação de resistência em germoplasma e/ou de populações segregantes e até mesmo em parentais silvestres de maracujazeiros poderá ser realizada de forma rápida, eficiente e confiável.

### **1.9. Ações visando o controle e a resistência do maracujazeiro ao CABMV**

Até o presente momento não existem métodos curativos para os pomares infectados com o CABMV (JUNQUEIRA et al., 2005; 2006). Medidas para redução das perdas de produtividade em maracujazeiro infectados com o CABMV envolvem a renovação anual das plantas, a utilização de mudas saudáveis produzidas em telado antiofídico, o aumento na densidade dos plantios que devem priorizar locais longe dos focos da doença, a eliminação de plantas infectadas antes de um novo plantio e cuidados nas práticas culturais para prevenir a transmissão mecânica do vírus (RESENDE, 2006; FISCHER; RESENDE, 2008; SAMPAIO et al., 2008; MELLETTI et al., 2010). Para Sampaio et al. (2008) e Cerqueira-Silva et al. (2008), devido a inexistência variedades resistentes e impossibilidade de efetivo combate do agente etiológico, a melhor estratégia ainda se baseia no convívio com a doença.

Nesta perspectiva, para evitar a ação ou ao menos minorar as perdas causadas pelo CABMV, uma alternativa atraente é o uso de variedades com

maior nível de resistência (LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2012b; SANTOS et al., 2015). Todavia, até o presente momento, não existem variedades comerciais que efetivamente agreguem características agronômicas de produção e sejam resistentes a essa enfermidade (JUNQUEIRA et al., 2005; 2008, FALEIRO et al., 2011). Como verificado por diferentes autores, é observada o limitado número de cultivares disponível no mercado (FALEIRO et al., 2011), e a pouca resistência a fitopatógenos (FISCHER et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2013; BATISTTI et al., 2013), além disso, verifica-se que a variabilidade genética em genótipos comerciais de *P. edulis* é 'estreita', o que dificulta a obtenção de cultivares resistentes (ORTIZ et al., 2012; CERQUEIRA-SILVA et al., 2010b). Observa-se ainda que são poucas as fontes de resistência já identificadas, que genericamente são encontradas em espécies silvestres de *Passiflora* (MACIEL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; BELLON et al., 2014), e que certamente demandará muito tempo para transferência desta característica para variedades comerciais (SANTOS et al., 2012; 2015). Além disso, verifica-se que o número de acessos contidos em coleções de germoplasma ainda é bastante reduzido. Estima-se que cerca de 700 acessos (referentes a 67 espécies), são mantidos em bancos de germoplasma no Brasil, representando menos de 15% da diversidade de espécies de *Passiflora* spp.

Neste sentido, é necessário o incremento no número de acessos armazenados nos BAGs, bem como prioridade na sua caracterização, principalmente, no que diz respeito à reação a doenças. Deste modo, a caracterização de acessos de maracujazeiros do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura deverá contribuir para a identificação de fontes de resistência.

São descritos inúmeros trabalhos que visam à identificação de acessos e híbridos de maracujazeiros com diferentes níveis de resistência à virose do endurecimento dos frutos (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2013; VIANA et al., 2014b; SANTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2015). Contudo, em sua maioria esses trabalhos são dedicados a estudos regionais, com poucos dados epidemiológicos e/ou encontram-se em etapas iniciais de avaliação, como discutido por Fischer; Resende (2008). Ganhos genéticos e herdabilidade associada à resistência ao CABMV, também tem sido reportado na literatura (SANTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2015).

Outra estratégia que vem sendo estudada é a transformação genética como forma de se obter resistência ao CABMV por meio do silenciamento gênico. Estudos iniciais com esta abordagem foram realizados por Alfenas et al. (2005), Trevisan et al. (2007) e mais recente por Monteiro-Hara et al. (2011) e Correa et al. (2015) em espécies comerciais de maracujazeiros. Todavia, apesar dos esforços, as plantas de maracujazeiros transformados com essa metodologia não foram eficientes no silenciamento para todos os isolados de CABMV.

Tendo em vista a importância econômica da cultura, torna-se premente a avaliação de acessos de maracujazeiros contidos em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), quanto à severidade da virose do endurecimento dos frutos, com intuito de identificar genótipos resistentes ao CABMV para direcionar cruzamentos interespecíficos para geração de populações segregantes, sendo esta, uma etapa crucial em programas de melhoramento (em especial, o pré-melhoramento) genético de *Passiflora* spp.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P.P.; SOUZA, M.M.; SANTOS, E.A.; PIRES, M.V.; PIRES, M.M.; ALMEIDA, A.A.F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, p. 307-315, 2009.

AGUIAR, A.V.M.D.; SILVA, R.M.D.; CARDOSO, E.D.A.; MARACAJÁ, P.B., PIRES, H.G. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como porta-enxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 6, p. 17-22, 2011.

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

AMORIM, J.D.S.; SOUZA, M.M.; JOSÉ, A.; VIANA, C.; FREITAS, J.C.O. Self-cross and interspecific pollinations in *Passiflora capsularis* and *P. rubra*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, p. 537-544, 2011.

BARROS, D.R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA Jr., J.E.A.; ANTUNES, T.F.S.; ZERBINI, F.M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1085-1091, 2011.

BATISTTI, M.; KRAUSE, W.; BARÉA, M.; ARAUJO, D.V.; PALÚ, E.G. Resistência à verrugose de cultivares de maracujazeiro amarelo sob diferentes métodos de inoculação. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 2710-2720, 2013.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FUHRMANN, E. Variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro, obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais

com base em marcadores RAPD. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 1692-1697, 2014.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. **Passifloraceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>, 2013.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. **Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). Maracujá: germoplasma e melhoramentogenético. Embrapa Cerrados: Planaltina, Brasil, p. 559-586, 2005.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.D.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 566-576, 2008.

BORGES, R.S.; SCARANARI, C.; NICOLI, A.M.; COELHO, R.R. **Novas variedades: validação e transferência de tecnologia**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados: Planaltina, Brasil, p. 618-640, 2005.

BRAND, R.J.; BURGER, J.T.; RYBICKI, E.P. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of a new Potyvirus infection South African *Passiflora*. **Archives of Virology**, v. 128, p. 29-41, 1993.

BUGALLO, V.; CARDONE, S.; JULIA, M.; GABRIELA, P. Breeding advances in *Passiflora* spp. (Passionflower) native to Argentina. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, v. 5, p. 23-34, 2011.

CARDOSO-SILVA, C.B.; MELO, J.R.F.; PEREIRA, A.S.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; OLIVEIRA, A.C. Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos. **Magistra**, v. 19, p. 352-358, 2007.

CASTRO, J.A.; NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 145, p. 17-22, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CARDOSO-SILVA, C.B.; NONATO, J.V.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Genetic dissimilarity of 'yellow' and 'sleep' passion fruit accessions based on the fruits physical-chemical characteristics. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 210-218, 2009.

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

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MELO, J.R.F.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 489-495, 2012b.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MOREIRA, C.N.; FIGUEIRA, A.R.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1209-1216, 2008.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.; SOUZA, A.M.; MORI, G.M.; OLIVEIRA, E.J.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 99, p. 170-172, 2012c.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; JESUS, O.N.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. New microsatellite markers for wild and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross-amplification. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, p. 1-6, 2014a.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊA, R.X. Short communication genetic variation in a wild population of the sleep passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 731-738, 2012a.

CERVI, A.C.; AZEVEDO, M.A.M; BERNACCI, L.C. **Lista de espécies da flora do Brasil.** Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>>. Accessed on February 23rd, 2011.

CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA, C.T.; Jr., LOPES, L.C.; GALLETI, S.R. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro (VEFM) no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, p. 187-190, 1992.

COBBEM, N.A. Woodiness of passionfruit. **Agricultural Gazette of New South Wales**, v. 12, p. 407-418, 1901.

COLARICCIO, A.; PERUCH, L.A.M.; GALLETI, S.R.; LOMBARDI, R.; CHAGAS, C.M. O endurecimento dos frutos do maracujazeiro associado a severas perdas no litoral norte de Santa Catarina. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, **Anais...** Belo Horizonte, MG, v. 33, p. 300, 2008.

CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; SANTOS, S.F.; FREITAS, J.C.O. Hybridization among wild passionflower species. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, p. 237-240, 2011.

CORREA, M.F.; PINTO, A.P.C.; REZENDE, J.A.M.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of sweet passion fruit (*Passiflora alata*) and

reactions of the transgenic plants to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 813-821, 2015.

COUTTS, B.A.; KEHOE, M.A.; WEBSTER, C.G.; WYLIE, S.J.; JONES, R.A. Indigenous and introduced potyviruses of legumes and *Passiflora* spp. from Australia: biological properties and comparison of coat protein nucleotide sequences. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1757-1774, 2011.

EMBRAPA. **Tabela de produção de maracujá**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013. Disponível em: [https://www.embrapa.br/documents/1355135/1529009/Maracuja\\_Brasil\\_2013.pdf/f5d12c66-0a38-4ee2-9777-58d7efec84b3](https://www.embrapa.br/documents/1355135/1529009/Maracuja_Brasil_2013.pdf/f5d12c66-0a38-4ee2-9777-58d7efec84b3). Acessado em março de 2015.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético assistidos por marcadores moleculares: resultados da pesquisa 2005-2008. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Cerrados, v. 1, p. 7, 2008.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. **Pré-melhoramento do maracujá**. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. (Eds). Pré-melhoramento de plantas. Estado da arte e experiências de sucesso. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, p. 549-570, 2011.

FEUILLET, C. **Passifloraceae (passion flower family)**. In: Flowering Plants of the Neotropics. Princeton University Press: Oxford, MS, USA, p. 286-287. 2004.

FIGUEIREDO, D.; COLOMEU, T. C.; SCHUMACHER, N. S. G.; STIVANIN-SILVA, L. G.; CAZARIN, C. B. B.; MELETTI, L. M. M.; FERNANDES, L. G. R.; PRADO, M. A.; ZOLLNER, R. L. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). **International Immuno pharmacology**, v. 35, p. 127-136, 2016.

FISCHER, I.H.; BUENO, C.J.; GARCIA, M.J.M; ALMEIDA, A.M. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 223-227, 2010.

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

FLORES, P.S.; BRUCKNER, C.H. Raios gama na sobrevivência de plantas de maracujazeiro amarelo inoculadas com *Fusarium oxysporum* f sp. *passiflorae*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 639-644, 2014.

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SILVA, M.S.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; VAZ, C.F. Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 145-153, 2009.

FREITAS, J.C.O; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, F.H.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M.M.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 291-297, 2015.

FREITAS, J.P.X.; OLIVEIRA, E.J.; CRUZ NETO, A.J.; SANTOS, L.R. Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1013-1020, 2011.

FUKUMOTO, T.; NAKAMURA, M.; RIKITAKE, M.; IWAI, H. Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. **Virus Genes**, v. 44, p. 141-148, 2012.

FUKUMOTO, T.; NAKAMURA, M.; WYLIE, S.J.; CHIAKI, Y.; IWAI, H. Complete nucleotide sequence of a new isolate of passion fruit woodiness virus from Western Australia. **Archives of Virology**, v. 158, p. 1821-1824, 2013.

GARCÊZ, R. M.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; MELETTI, L. M. M.; AZEVEDO FILHO, J. A.; SILVA, L. A.; COLARICCIO, A. Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread *Cowpea aphid borne mosaic virus* in a subtropical region of Brazil. **Springer Plus**, v. 4, p. 1-12, 2015.

GIBBS, A.J.; OHSHIMA, K. Potyviruses and the digital revolution. **Annual Review Phytopathology**, v. 48, p. 205-223, 2010.

GIORIA, R.; BOSQUÊ, G.G.; REZENDE, J.A.M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista – SP e danos causados pelo *Passion Fruit Woodiness Virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 182-189, 2000.

GONZÁLEZ-SEGNANA, L.R.; ESQUIVEL FARIÑA, A.; GONZÁLEZ, D.D.; MELLO, A.P.O.; REZENDE, J.A.; KITAJIMA, E.W. Alternative hosts of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) in sesame (*Sesamum indicum*) crops grown in Paraguay. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 539-542, 2013.

HIKISHIMA, M.; CANTERI, M.G.; GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; SILVA, A.J. Quantificação de danos e relações entre severidade, medidas de refletância e produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 96-103, 2010.

HUGUENOT, C.; FURNEAUX, M.T.; CLARE, J.A.; HAMILTON, R.I. Improved diagnosis of *Cowpea aphid borne mosaic virus* in Africa: significance for cowpea seed-indexing, breeding programs and potyvirus taxonomy. **Archives of Virology**, v. 141, p. 137-145, 1996.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Banco de dados agregados**. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2015. Disponível em. <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em Jan de 2016.

INOUE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of *Passionfruit woodiness virus* isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 479-485, 1995.

ISHIMOTO, F.Y.; HARADA, A.I.; BRANCO, I.G.; CONCEIÇÃO, W.D.S.; COUTINHO, M.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) para produção de biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 279-292, 2007.

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

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. **Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados: Planaltina, Brasil, p. 81-107, 2005.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; RAMOS, J.D.; BRAGA, M.F.; SOUZA, L.S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 19-196, 2008.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. **Uso de Espécies Silvestres de Passifloras no Pré-melhoramento do Maracujazeiro**. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, A.M.A.J.F.; FALEIRO, F.G. (Eds). Curso internacional de pré-melhoramento de plantas. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 133-137, 2006.

KAREEM, K.T.; TAIWO, M.A. Interactions of viruses in cowpea: effects on growth and yield parameters. **Virology Journal**, v. 4, p. 1-7, 2007.

KASSCHAU, K.D.; XIE, Z.; ALLEN, E.; LLAVE, C.; CHAPMAN, E.J.; KRIZAN, K.A.; CARRINGTON, J.C. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. **Developmental Cell**, v. 4, p. 205-217, 2003.

KING, A.M.K.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. **Academic Press**, v. 9, p. 1327, 2012.

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

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. 405-432, 1986.

LANGHAM, M.A.C. **Mechanical Inoculation of Plant Viruses**. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A. S. (Eds). Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises, Boca Raton, USA, v. 45, p. 35-43, 2008.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 87-92, 2006.

LIMA, D.M., GOLOMBIESKI, E.R., AYUB, R.A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 30, p. 359-363, 2000.

LIMA, J.A.A.; SILVA, A.K.F.S; ARAGÃO, M.L.; FERREIRA, N.R.A; TEÓFILO, E.M. Simple and multiple resistances to viruses in cowpea genotypes, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1432-1438, 2011.

LLAVE, C.; MARTINEZ, B.; DIAZ-RUIZ, J.R.; LOPEZ-ABELLA, D. Amino acid substitutions within the Cys-rich domain of the tobacco etch potyvirus HC-Pro result in loss of transmissibility by aphids. **Archives of Virology**, v.147, p. 2365-2375, 2002.

LORETO, T.J.G.; VITAL, A. **Viroses e Micoplasmoses do Maracujá em Pernambuco**. Recife: Informe SERDV, 1983.

LUIZ, F.C.; RIBEIRO, E.G.S.; IVAN, P.B. Evidencia molecular da ocorrência de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro em cinco estados brasileiros. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 233-325, 2008.

MACDOUGAL, J.M.; FEUILLET, C. **Systematics**. In: ULMER, T.; MAC DOUGAL, J.M. (Eds). *Passiflora: Passionflowers of the World*. Portland, OR, USA, p. 27-31, 2004.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. *Screening of Passiflora species for reaction to Cowpea aphid borne mosaic virus reveals an immune wild species*. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 414-418, 2009.

MARTINS, I.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; MELLO, S.C.M.D. Reação de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 639-643, 2008.

MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D. D.; WARD, C.W. *Cowpea aphid borne mosaic virus – Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus*. **Archives of Virology**, v. 136, p. 207-217, 1994.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. **Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). *Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético*. Embrapa Cerrados: Planaltina, Brasil, p. 55-78, 2005.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá**: produção e comercialização. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 62, (Boletim Técnico, 181), 1999.

MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: Obtenção do 'Composto IAC-27'. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 491-498, 2000.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, p. 83-91, 2011.

MELLO, J.R.F.; FIGUEIRA, A.R.; MOREIRA, C.N.; OLIVEIRA, A.C. Recent characterization of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 735-744, 2015.

MELO, A.F.; MURICY, J.M.T.C.; SANTOS, R.F. Desenvolvimento de um gel gengival a partir do extrato bruto seco de *Passiflora edulis* Sims. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, p. 1-15, 2012.

MISHRA, R.; VERMA, R.K.; GAUR, R.K. Analysis of genome comparison of two Indian isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus* from India. **Virus Genes**, v. 51, p. 306-309, 2015.

MLOTSHWA, S.; VERVER, J.; SITHOLE-NIANG, I.; GOPINATH, K.; CARETTE, J.; VAN KAMMEN, A. B.; WELLINK, J. Subcellular location of the helper component-proteinase of *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Virus Genes**, v. 25, p. 207-216, 2002b.

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

MONTEIRO-HARA, A.C.B.A.; JADÃO, A.S.; MENDES, B.M.J.; REZENDE, J.A.M.; TREVISAN, F.; MELLO, A.P.O.A.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; PIEDADE, S.M.S. Genetic transformation of passionflower and evaluation of R1 and R2 generations for resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 95, p. 1021-1025, 2011.

NAM, M.; LEE, J.H.; CHOI, H.S.; LIM, H.S.; MOON, J.S.; LEE, S.H. Complete genome sequence of keunjong mosaic virus, a potyvirus from *Cynanchum wilfordii*. **Archives of Virology**, v. 158, p. 1817-1820, 2013.

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

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

NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Avaliação agronômica de parentais e híbridos de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 191-198, 2013.

NICOLINI, C.; FILHO, F.A.C.R.; RESENDE, R.O.; ANDRADE, G.P.; KITAJIMA, E.W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 82-87, 2012.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao *Passionfruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 76-79, 1999.

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

OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. **Euphytica**, v. 209, p. 395-408, 2016.

OCAMPO, J.; D'EECKENBRUGGE, J.C.; JARVIS, A. Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the coffee growing zone. **Diversity**, v. 2, p. 1158-1180, 2010.

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

OLIVEIRA, E.J.; SANTOS, V.S.; LIMA, D.S.; MACHADO, M.D.; LUCENA, R.S.; MOTA, T.B.N.; CASTELLEN, M.S. Seleção em progênies de maracujazeiro-amarelo com base em índices multivariados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1543-1549, 2008.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.X.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; MORAIS, O.M.; DOURADO, F.W.N. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 584-590, 2010.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 485-492, 2013.

ORTIZ, D.C.; BOHÓRQUEZ, A.; DUQUE, M.C.; TOHME, J.; CUÉLLAR, D.; VÁSQUEZ, T.M. Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 1089-1099, 2012.

PAIVA, C.L.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, R.N.O.; OLIVEIRA, E.J. Genetic diversity of the genus *Passiflora* using the Ward-MLM strategy. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 381-390, 2014.

PATAKY, J.K.; CARSON, M.L. **Host Resistance**. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A. S. (Eds). Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises, Boca Raton, USA, v. 45, p. 387-404, 2008.

PAULA, M.D.S.; FONSECA, M.D.N.; BOITEUX, L.S.; PEIXOTO, J.R. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 222-229, 2010.

PEREIRA, T.N.A., NICOLI, R.G., MADUREIRA, H.C., JÚNIOR, P.C.D., GABURRO, N.O.P., COUTINHO, K. **Caracterização morfológica e reprodutiva de espécies silvestres do gênero *Passiflora***. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q.; SOUSA, E.S. (Eds). IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 29-34, 2005.

PEREIRA, G.S.; NUNES, E.S.; LAPERUTA, L.D.C.; BRAGA, M.F.; PENHA, H.A.; DINIZ, A.L.; VIEIRA, M.L.C. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. **Annals of Applied Biology**, v. 162, p. 347-361, 2013.

PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.D.O.; MATTOS, J.K.D.A.; MELO, B.D. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo

ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v. 24, p. 19-26, 2008.

PREISIGKE, S.C; NEVES, L.G.; ARAÚJO, K.L.; BARBOSA, N.R.; SERAFIM, M.E.; KRAUSE, W. Multivariate analysis for the detection of *Passiflora* species resistant to collar rot. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 1700-1707, 2015.

REIS, R.V.; VIANA, A.P.; OLIVEIRA E.J.; SILVA, M.G.M. Phenotypic and molecular selection of passion fruit s progenies in the second cycle of recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 17-24, 2012.

RESENDE, J.A.M. **Práticas culturais para prevenção e convivência com as viroses do maracujazeiro**. In: SAMPAIO, A.C.; FUMIS, T.F.; ROSSI, A.D.; ALMEIDA, A.M.; GARCIA, M.J.M. (Eds). Manejo no controle do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) do Maracujazeiro. Jaboticabal: Gráfica Multipress, p. 1-76, 2006.

RODRIGUES, L.K.; SILVA, L.A.; GARCÊZ, R.M.; CHAVES, A.L.; DUARTE, L. M.; GIAMPANI, J.S.; EIRAS, M. Phylogeny and recombination analysis of Brazilian yellow passion fruit isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus*: origin and relationship with hosts. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, p. 31-41, 2015.

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

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P.P.; ARAÚJO, I.S.; VIANA, A.P.; ALMEIDA, A.A.F.; FREITAS, J.C.O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, p. 389-399, 2012.

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; FREITAS, J.C.O.; SILVA, F.H.L.; RODRIGUES, R.; EIRAS, M. Resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 85-98, 2015.

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, **Anais...** Salvador, BA, v. 13, p. 797, 1994.

SCHOTT, G.; MARI-ORDONEZ, A.; HIMBER, C.; ALIOUA, A.; VOINNET, O.; DUNOYER, P. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. **The EMBO Journal**, v. 31, p. 2553-2565, 2012.

SIEBRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.R.; MARTINS, A.O.B.P.B.; SIEBRA, D.C.; ALBUQUERQUE, R.S.; LEMOS, I.C.S.; DELMONDES, G.A.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; FELIPE, C.F.B.; KERNTOPF, M.R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, *in press*, 2016.

SILVA, A.S.; OLIVEIRA, E.J.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F.F.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, S.A.S.; FREITAS, J.P.X. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxisporum* s. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 236-242, 2013.

SILVA, L.A.S.; GARCÊZ, R.M, CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M. Transmissão experimental revela novos potenciais reservatórios do *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 168-169, 2012a.

SILVA, M.A.A.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A.F.; CORRÊA, R.X.; ARAÚJO, I.S.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S. Analysis of transferability of microsatellite *primers* (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 5908-5918, 2014.

SILVA, M.G.M.; VIANA, A.P.; AMARAL, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; REIS, R.V. Biometria aplicada ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 493-499, 2012b.

SILVA, M.G.M.; VIANA, A.P.; GONÇALVES, G.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, M.G. Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 170-176, 2009.

SITHOLE-NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'-terminal region of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). **Archives of Virology**, v. 141, p. 935-943, 1996.

SOARES, T.L.; JESUS, O.N.; SOUZA, E.H.; OLIVEIRA, E.J. Reproductive biology and pollen–pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 339-349, 2015.

SOUSA, M.A.F.; PIRES, M.D.C.; PEIXOTO, J.R.; FALEIRO, F.G.; BASSAY BLUM, L.E. Reaction of passion fruit progenies to the antracnosis under green house conditions. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 563-570, 2014.

STANGARLIN, O.S.; MELLO, A.P.O.A.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, C.R.Y.I.; OLIVEIRA, I. Ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Mato Grosso do Sul. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, **Anais...** Botucatu, SP, v. 37, 2011.

TAYLOR, R.H., GREBER, R.S. **Passion fruit woodiness virus**. Fainhani Royal: Commom wealth Mycological Institute. 1973.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M. Resistance to passion fruit woodiness virus in transgenic plants of the yellow passion fruit expressing the viral coat protein gene. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 495-499, 2007.

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

VIANA, C.A.S.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BLUM, L.E.B. Genótipos de maracujazeiro-azedo com resistência à bacteriose. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 591-598, 2014a.

VIANA, C.A.S.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BLUM, L.E.B. Resistência parcial de genótipos de maracujá-azedo à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v. 30, p. 338-345, 2014b.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.C. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Eds). **Biotechnology of Fruit and nut Crops**. Oxford: CABI, p. 436-453, 2004.

WYLIE, S.J.; JONES, M.G. The complete genome sequence of a passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 479-482, 2011.

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, **Anais...** Pelotas, RS, v. 5, p. 915-917, 1979.

## **CAPÍTULO 1**

### **ASPECTOS METODOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora* spp.) À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Artigo a ser traduzido e submetido para o comitê editorial do periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

## ASPECTOS METODOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora* spp.) À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o progresso dos sintomas causados pelo *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) em diferentes espécies de *Passiflora*, para identificação de fontes de resistência. O estudo foi realizado em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial (80 genótipos x 7 avaliações) considerando cada planta inoculada como uma repetição. Foram avaliados 80 genótipos pertencentes a 12 espécies de *Passiflora*. As inoculações foram realizadas duas vezes em intervalos de quatro dias, utilizando folhas sintomáticas maceradas em solução tampão com abrasivo. A severidade do CABMV foi quantificada por meio do índice de doença (ID). As avaliações foram realizadas 20, 27, 34, 41, 48, 55 e 62 dias após a inoculação (DAI). As médias do ID foram utilizadas para verificar a evolução da doença em cada período de avaliação. O período mínimo para estabilização do progresso do CABMV foi utilizado para agrupar os genótipos pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), bem como para classificar os genótipos em resistente (R), moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS), suscetível (S), e altamente suscetível (AS). A severidade média da doença aumentou gradativamente nos intervalos de 20 a 55 dias após inoculação (DAI) e atingiu seu máximo aos 62 DAI. Cerca de 20, 24, 36, 10 e 11% do germoplasma avaliado foram classificados como R, MR, MS, S e AS respectivamente. O progresso temporal da doença foi bastante variável entre e dentro destes grupos, muito embora não tenha sido observada diferença no ID dos genótipos a partir de 55 DAI, indicando a estabilização dos sintomas a partir deste período, independentemente do nível de resistência do genótipo. Os resultados indicaram diferenças importantes nos genótipos de maracujazeiro que podem ser utilizados para introdução de resistência genética nas espécies comerciais, bem como para orientar a seleção de fontes de resistência em bancos de germoplasma.

**Palavras-chave:** Passicultura, curva de progresso, dinâmica temporal, CABMV.

## METHODOLOGICAL ASPECTS TO ASSESS THE PASSIONFRUIT RESISTANCE (*PASSIFLORA* SPP.) TO PASSIONFRUIT WOODINESS DISEASE

**Abstract:** The goal of this work was to assess the symptoms progress caused by *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) in different *Passiflora* species, in order to identify resistance sources. The study was conducted in randomized complete block with a factorial treatment (80 genotypes x 7 ratings) considering each inoculated plant as a repetition. Were evaluated eighty passionfruit genotypes from 12 *Passiflora* species. The inoculations were conducted twice with intervals of 4 days using symptomatic leaves macerated in abrasive buffered solution. A grade scale was used for phenotyping and to create a disease index (DI) in order to quantify the disease severity. The evaluations were performed 20, 27, 34, 41, 48, 55 e 62 days after the inoculation (DAI). The DI means were used to verify the disease progress in each evaluation periods. The minimum period to CABMV progress stabilization was considered to cluster the genotypes by the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ), as well as classifying the genotypes in resistant (R), moderately resistant (MR), moderately susceptible (MS), susceptible (S) and highly susceptible (HS). The mean severity gradually increased in the intervals of 20 and 55 DAI and reach the maximum at 62 DAI. About 20, 24, 36, 10 and 11% of the germplasm assessed were classified as R, MR, MS, S and HS, respectively. The disease temporal progress was quite variable into these groups although it was observed no difference in the genotypes DIs from 55 DAI, indicating a symptom stabilization from this period, regardless the genotype resistance level. The results suggest remarkable differences in the passionfruit genotypes that may be used as a vehicle of resistance to commercial species, as well as conduct the resistance source selection in germplasm bank.

**Keywords:** Passionfruit crop, progress curve, temporal dynamics, CABMV.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujá é acometida por uma série de doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides, fitoplasmas e vírus (NASCIMENTO et al., 2006; SOUSA et al., 2014; VIANA et al., 2014a, b). As doenças virais são citadas como as mais importantes por causarem grandes prejuízos aos agricultores em termos de redução da produtividade e longevidade da cultura, bem como depreciação da qualidade dos frutos produzidos, reduzindo o seu valor comercial (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; 2012).

Dentre os diversos vírus que atacam a cultura, destaca-se o CABMV (*Cowpea aphid borne mosaic virus*), que causa o endurecimento dos frutos e possui ocorrência generalizada no território brasileiro (BARROS et al., 2011; NICOLINI et al., 2012; FREITAS et al., 2015; MELO et al., 2015). As lavouras podem se tornar improdutivas dependendo da idade em que as plantas são infectadas e da velocidade de disseminação da doença (KAREEN; TAIWO, 2007; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008). As estratégias adotadas para prevenção e controle da doença não têm contribuído para mitigação do problema (FISCHER; RESENDE, 2008; SAMPAIO et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). O difícil controle do CABMV tem resultado em elevada incidência da doença nos principais polos produtivos do Brasil, limitando a expansão da passicultura (OLIVEIRA et al., 2013; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; 2014).

O uso de variedades resistentes pode ser uma alternativa viável (SANTOS et al., 2015), pois permite reduzir o uso de defensivos agrícolas utilizados no controle dos insetos vetores, evitando danos à saúde dos trabalhadores e ao meio ambiente. Apesar de desejável, não existem cultivares disponíveis no mercado que atendam a diversidade de ambientes de cultivo no território brasileiro e que sejam resistentes ao CABMV.

A primeira etapa para o desenvolvimento de variedades com resistência ao CABMV é a identificação de genótipos promissores para uso como fonte de resistência. Alguns autores têm reportado que a resistência ao CABMV é do tipo poligênica, ao avaliarem populações segregantes de maracujazeiro em condições de campo (FREITAS et al., 2015; SANTOS et al., 2015). Em *P.*

*edulis* f. *flavicarpa* existem informações contraditórias em relação à caracterização da resistência ao CABMV pois, alguns autores têm classificado como resistente a altamente suscetível (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008). Além disso, não há uma padronização nas avaliações da reação ao CABMV, pois alguns estudos têm abordado a utilização de escalas de notas para avaliar severidade da doença (NOVAES; RESENDE, 2003; FREITAS et al., 2015; SANTOS et al., 2015), enquanto outros têm adotado índices fitopatométricos de doença (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; 2012). Também é observado que não há uma definição do melhor momento para se avaliar a reação do CABMV, sendo que essa época tem variado de 30 dias até 60 dias após a inoculação (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; FREITAS et al., 2015; VIANA et al., 2014b).

A identificação de fontes de resistência ao CABMV em acessos de germoplasma e híbridos por meio de inoculações artificiais em condições controladas constitui-se em uma ferramenta importante para a rápida fenotipagem. Diferentemente de outras viroses, a transmissão do CABMV pode ser facilmente realizada de forma mecânica, fato esse que facilita a avaliação do germoplasma de maracujazeiro.

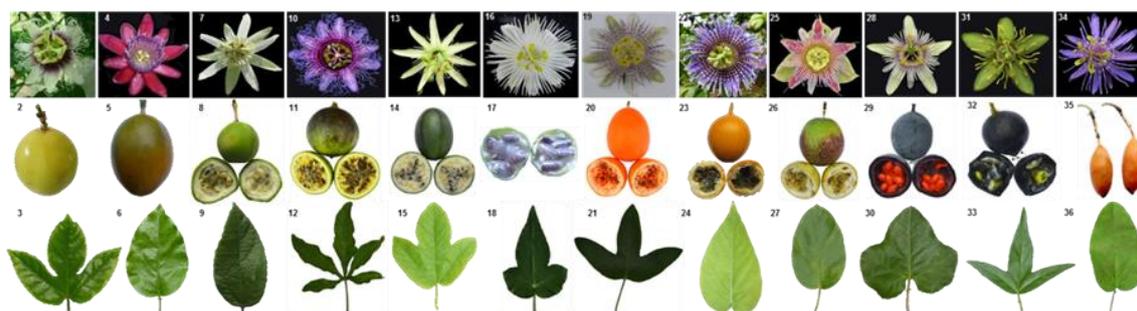
Metodologias que promovam a identificação do nível de resistência de forma rápida e eficiente são imprescindíveis para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Adicionalmente aos aspectos metodológicos de seleção, a análise temporal dos sintomas causados pelo CABMV pode revelar eventos epidemiológicos importantes, tais como o tempo necessário para início da doença, variação na sua intensidade e período de máxima severidade após inoculação. Apesar disso, até o presente, não foram encontrados trabalhos que relatam a dinâmica temporal do CABMV em diferentes espécies de *Passiflora*. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o progresso dos sintomas causados pelo CABMV em diferentes espécies de *Passiflora*, para definição de estratégias mais precisas na busca por fontes de resistência ao CABMV.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local e Material Vegetal

A pesquisa foi desenvolvida na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'39" S, 39°06'23" O, 226 m).

Foram avaliados 80 genótipos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), pertencentes a 12 espécies, sendo 61 de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., um de *P. alata* Curtis, um de *P. malacophylla* Mast., quatro de *P. cincinnata* Mast., um de *P. setacea* DC., um de *P. foetida* L., um de *P. gibertii* N.E Brown., um de *P. ligularis* Juss., um de *P. maliformes* L., dois de *P. morifolia* Mast., cinco de *P. suberosa* L., e um de *P. subrotunda* Mast. (Figura 1; Tabela 1). Os genótipos foram selecionados com base na disponibilidade de sementes para cada espécie do banco de germoplasma.



**Figura 1.** Diversidade de formas e cores de flores, frutos e folhas das 12 espécies de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) utilizadas para caracterização da reação ao vírus do endurecimento dos frutos (CABMV). 1-3) *Passiflora edulis* Sims; 4-6) *P. alata*; 7-9) *P. malacophylla*; 10-12) *P. cincinnata*; 13-15) *P. setacea*; 16-18) *P. foetida*; 19-21) *P. gibertii*; 22-24) *P. ligularis*; 25-27) *P. maliformes*; 28-30) *P. morifolia*; 31-33) *P. suberosa*; e, 34-36) *P. subrotunda*, respectivamente. Créditos: Soares, T.L e Jesus, O.N.

**Tabela 1.** Relação de genótipos silvestres, comerciais e híbridos de maracujazeiros (*Passiflora* spp.), utilizados para avaliação da severidade do *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV).

Nº	Genótipo*	Espécie	Origem	Nº	Genótipo*	Espécie	Origem
1	H09-14	<i>P. e. fla</i>	BA	41	BGP189 x BGP345	<i>P. e. fla</i>	BA
2	HFOP-09	<i>P. e. fla</i>	BA	42	BGP424	<i>P. e. fla</i>	BA
3	H09-02	<i>P. e. fla</i>	BA	43	BGP425	<i>P. e. fla</i>	BA
4	BRS Gigante Amarelo	<i>P. e. fla</i>	BA	44	BGP325	<i>P. e. fla</i>	SP
5	BRS Rubi do Cerrado	<i>P. e. fla</i>	BA	45	BGP334	<i>P. e. fla</i>	BA
6	HFOP-08	<i>P. e. fla</i>	BA	46	BGP188	<i>P. e. fla</i>	SP
7	BGP396	<i>P. e. fla</i>	BA	47	BGP400	<i>P. e. fla</i>	BA
8	BRS Sol do Cerrado	<i>P. e. fla</i>	BA	48	BGP177	<i>P. e. fla</i>	BA
9	FB300	<i>P. e. fla</i>	BA	49	BGP189	<i>P. e. fla</i>	SP
10	BGP393	<i>P. alata</i>	CE	50	BGP327	<i>P. e. fla</i>	SP
11	BGP415	<i>P. mor</i>	SP	51	BGP190	<i>P. e. fla</i>	SP
12	BGP107	<i>P. mor</i>	SP	52	BGP330	<i>P. e. fla</i>	BA
13	BGP379	<i>P. mali</i>	BA	53	BGP223	<i>P. e. fla</i>	BA
14	BGP134	<i>P. sube</i>	BA	54	BGP205	<i>P. e. fla</i>	SP
15	BGP143	<i>P. sube</i>	SP	55	BGP328	<i>P. e. fla</i>	DF
16	BGP014	<i>P. sube</i>	SP	56	BGP185	<i>P. e. fla</i>	SP
17	BGP112	<i>P. sube</i>	-	57	BGP418	<i>P. e. fla</i>	BA
18	BGP152	<i>P. sube</i>	SP	58	BGP238	<i>P. set</i>	BA
19	BGP160	<i>P. ligu</i>	BA	50	BGP413	<i>P. cin</i>	SP
20	BGP395	<i>P. foe</i>	MT	60	BGP077	<i>P. cin</i>	BA
21	BGP394	<i>P. subr</i>	BA	61	BGP414	<i>P. gib</i>	SP
22	H09-10	<i>P. e. fla</i>	BA	62	BGP031	<i>P. e. fla</i>	BA
23	H09-07	<i>P. e. fla</i>	BA	63	BGP032	<i>P. e. fla</i>	PR
24	H09-30	<i>P. e. fla</i>	BA	64	BGP037	<i>P. e. fla</i>	PA
25	HFOP-05	<i>P. e. fla</i>	BA	65	BGP051	<i>P. e. fla</i>	MG
26	RC2-45-P14x224	H. inter	BA	66	BGP123	<i>P. e. fla</i>	SP
27	RC2-57-P8x224	H. inter	BA	67	BGP224	<i>P. e. fla</i>	BA
28	RC2-44-P8x222	H. inter	BA	68	BGP227	<i>P. e. fla</i>	SP
29	RC2-45-P18PA	H. inter	BA	69	BGP345	<i>P. e. fla</i>	BA
30	RC2-45-P8x222	H. inter	BA	70	BGP222	<i>P. e. fla</i>	BA
31	RC2-44-P3x224	H. inter	BA	71	BGP005	<i>P. e. fla</i>	SP
32	RC2-45-P10x223	H. inter	BA	72	BGP064	<i>P. e. fla</i>	BA
33	RC2-45-P14x223	H. inter	BA	73	BGP324	<i>P. e. fla</i>	DF
34	RC2-44-P8x185	H. inter	BA	74	BGP351	<i>P. e. fla</i>	BA
35	BGP165	<i>P. e. fla</i>	BA	75	BGP341	<i>P. e. fla</i>	BA
36	BGP170PA	<i>P. mala</i>	-	76	BGP210	<i>P. e. fla</i>	MG
37	BGP128	<i>P. e. fla</i>	SP	77	BGP221	<i>P. e. fla</i>	BA
38	Seleção-2	<i>P. e. fla</i>	BA	78	BGP061	<i>P. e. fla</i>	SP
39	BGP428	<i>P. e. fla</i>	BA	79	BGP200	<i>P. cin</i>	SP
40	Seleção-1	<i>P. e. fla</i>	BA	80	BGP268	<i>P. cin</i>	BA

\*Registro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. *P. e. fla* = *Passiflora edulis flavicarpa*; *P. alata* = *P. alata*; *P. mor* = *P. morifolia*; *P. mali* = *P. maliformes*; *P. sube* = *P. suberosa*; *P. ligu* = *P. ligularis*; *P. foe* = *P. foetida*; *P. subr* = *P. subrotunda*; H. inter = Híbrido interespecífico; *P. mala* = *P. malacophylla*; *P. set* = *P. setacea*; *P. cin* = *P. cincinnata*; *P. gib* = *P. gibertii*. BA = Bahia; CE = Ceará; SP = São Paulo; MT = Mato Grosso; DF = Distrito Federal; PR = Paraná; PA = Pará; MG = Minas Gerais.

Aproximadamente 20 sementes de cada genótipo foram previamente embebidas em 20 mL de água durante 60 minutos. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em vasos plásticos de polietileno de 1L contendo uma mistura com fibra de coco (120 L), Vivatto® (40 L) (3:2) e acrescido de 40 g de osmocote a cada 10 L de substrato. Após a germinação das sementes, foram selecionadas as 10 melhores plantas de cada genótipo para compor o ensaio. A casa de vegetação foi mantida em condições de temperatura controladas em torno de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa (UR) de 45% durante todo o ensaio.

## **2.2 Ensaio biológico e amostragem**

O ensaio biológico foi estabelecido em casa de vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para cada acesso foram obtidas dez plantas, das quais oito foram inoculadas mecanicamente com um isolado agressivo do CABMV e as outras duas inoculada somente com tampão de inoculação (controle negativo). A inoculação das plantas com o CABMV foi realizada quando as plantas apresentavam de sete a nove folhas definidas, aproximadamente 100 dias após o plantio.

## **2.3 Inoculações artificiais**

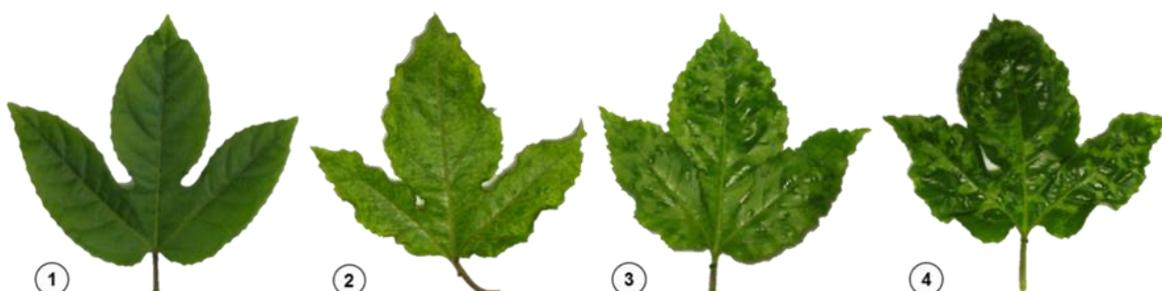
A inoculação foi realizada mecanicamente a partir de extrato de folhas infectadas com CABMV, cujas folhas de plantas infectadas foram coletadas na área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para as inoculações, preparou-se o extrato em um almofariz à partir de amostras foliares com sintomas característicos da doença, macerando-se a proporção de 1 g de tecido para 10 mL de uma solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfato de sódio 0,1M, com pH 7,0), e em seguida adicionada uma pequena quantidade de celite (1 g) utilizado como abrasivo para causar ferimentos na superfície foliar (LEÃO et al., 2006; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008). As partículas virais foram inoculadas nas plantas friccionando a parte adaxial da folha com o dedo umedecido no extrato uma única vez, a fim de padronizar a pressão de inóculo. Nas plantas controles utilizou-se apenas tampão sem vírus e celite. As inoculações foram realizadas duas vezes em intervalo de quatro dias, sendo inoculadas duas folhas por planta em cada inoculação, utilizando

sempre as folhas basais (com exceção dos cotilédones). Após 10 minutos da realização das inoculações, as folhas inoculadas foram lavadas para retirar o excesso do celite.

#### 2.4 Fenotipagem das plantas inoculadas

A caracterização da reação dos genótipos de maracujazeiros à infecção causada pelo CABMV foi realizada a partir dos sintomas visuais da doença. Previamente todas as folhas foram enumeradas e as avaliações foram realizadas a partir da oitava folha totalmente desenvolvida. A primeira avaliação foi realizada aos 20 dias após a primeira inoculação (DAI), e as demais em intervalos de sete dias, encerrando-se na sétima avaliação, aos 62 DAI.

Para as avaliações dos sintomas da doença, utilizou-se escala diagramática de notas com variação de 1 a 4, sendo: 1 = ausência de sintomas de mosaico, 2 = mosaico leve, sem distorção foliar, 3 = mosaico grave, sem distorção foliar e 4 = mosaico grave, bolhas e distorção foliar, proposta por Novaes e Rezende (2003) (Figura 2). Esta escala consiste em avaliar a ausência ou presença de diferentes níveis de sintomas foliares da doença. A identidade do isolado utilizado nas inoculações como *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) foi previamente confirmado por RT-PCR utilizando pares de *primers* específicos da região de inserção cilíndrica do vírus de 700 pb (HA et al., 2008).



**Figura 2.** Escala de notas para avaliação da severidade do vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) em folhas de maracujá 'amarelo' (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Créditos: Lima, L.K.S e Jesus, O.N.

## 2.5 Severidade da doença

A severidade da doença foi quantificada com uso do Índice de Doença (ID) proposto por MCKINNEY (1923). Este índice foi calculado com base na ponderação da escala de notas de infecção, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$ID (\%) = \frac{\sum(GS \times L)}{(TNL \times HGS)} \times 100$$

Em que:

GS = grau da escala determinada para cada folha;

L = número de folhas que mostram cada grau da infecção (nota);

TNL = número total de folhas avaliadas, e;

HGS = grau máximo de infecção (nota).

## 2.6 Análise estatística

A análise de variância foi realizada considerando o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (80 genótipos x 7 períodos de avaliação). Cada planta inoculada foi considerada como uma repetição (total de oito plantas). As médias do índice de doença (ID) para cada período de avaliação, independente do genótipo foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), não sendo utilizados na análise os valores do ID das plantas assintomáticas. As médias do ID também foram plotadas em uma curva logarítmica para determinar a evolução da doença.

Com base na análise dos dados sobre o progresso dos sintomas do CABMV, estabeleceu-se o tempo mínimo de estabilização da doença nas espécies de *Passiflora* avaliadas. Este tempo mínimo foi utilizado para agrupar os genótipos pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) e com base neste agrupamento os genótipos foram classificados em resistentes - R (ID variando de 0,00 a 8,61%), moderadamente resistente - MR (ID variando de 17,34 a 27,19%), moderadamente suscetível - MS (ID variando de 29,06 a 43,77%), suscetível - S (ID variando de 45,58 a 62,70%) e altamente suscetível - AS (ID variando de 69,51 a 90,50%), respectivamente. Com base nesta classificação e ou agrupamento de média foram elaboradas curvas de regressão com o modelo logarítmico e estimados os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), bem como a equação ajustada para cada grupo de resistência. Todas as análises

foram realizadas com o uso do pacote “agricolae”, implementado no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2006).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância considerando os efeitos de blocos, genótipos, dias após inoculação artificial (DAI) e a interação genótipos vs. DAI estão apresentadas na Tabela 2. À exceção da interação genótipos vs. DAI, todos os outros fatores foram significativos. As diferenças significativas entre as médias do ID nos diferentes genótipos de *Passiflora* em diferentes dias de avaliação após a inoculação do CABMV (Tabela 2) demonstram a existência de variabilidade genética para resistência a uma das principais viroses do maracujazeiro, bem como a importância da evolução temporal desta doença no período de avaliação (Figura 3). Outros autores também verificaram a existência de variabilidade genética para reação ao CABMV em condições de campo (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

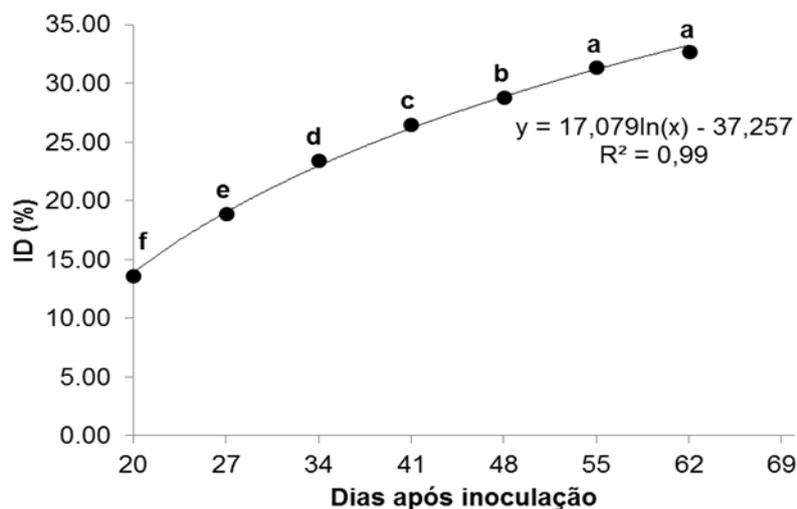
**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para índice de doença (ID%) dos genótipos de maracujazeiro avaliados em diferentes dias após inoculação artificial (DAI) com *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio	Teste F
Blocos	7	809,14	8,55**
Genótipos	79	12939,51	136,70**
DAI	6	26254,67	277,36**
Genótipos x DAI	474	96,43	1,02 <sup>ns</sup>
Erro	3290	94,66	
CV (%)	38,8		

\*\* altamente significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ). <sup>ns</sup> não significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).

A evolução da severidade média da doença ajustou-se à regressão logarítmica ( $R^2 = 99\%$ ), sendo observado aumento gradativo na severidade do CABMV nos intervalos de 20 a 55 DAI, com máximo aos 62 DAI (Figura 3). O progresso relativamente lento da virose do maracujazeiro no período inicial de

avaliação pode estar relacionado à baixa concentração do vírus na planta, bem como pelo tempo necessário para expressão visual dos sintomas (Figura 3).



**Figura 3.** Regressão logarítmica obtida por meio das médias do Índice de Doença (ID) em plantas de maracujazeiros infectadas com o *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) em diferentes dias após inoculação (DAI). Médias seguidas pela mesma letra em cada DAI pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Com o desenvolvimento das plantas após a inoculação do CABMV, a intensa taxa de reprodução celular pode ter contribuído para o aumento na replicação viral, bem como para a translocação do vírus na planta por meio dos tecidos vasculares, fazendo com que a doença se torne sistêmica (BOON et al., 2010). Isto acontece porque os vírus não possuem um sistema de replicação autônoma, sendo, portanto, necessária que a replicação ocorra em células hospedeiras (CHRISTENSEN et al., 2009; NETHERTON; WILEMAN, 2011).

De acordo com Dolnik et al. (2015) quando ocorre a infecção inicial do patógeno no hospedeiro, não há manifestação visual dos primeiros passos para estabelecimento viral, da doença, visto que todo o processo está ocorrendo em nível celular. Estes autores afirmaram ainda que o momento inicial da infecção não pode ser inferido a partir da visualização dos sintomas, sendo que sua expressão está relacionada com os mecanismos de

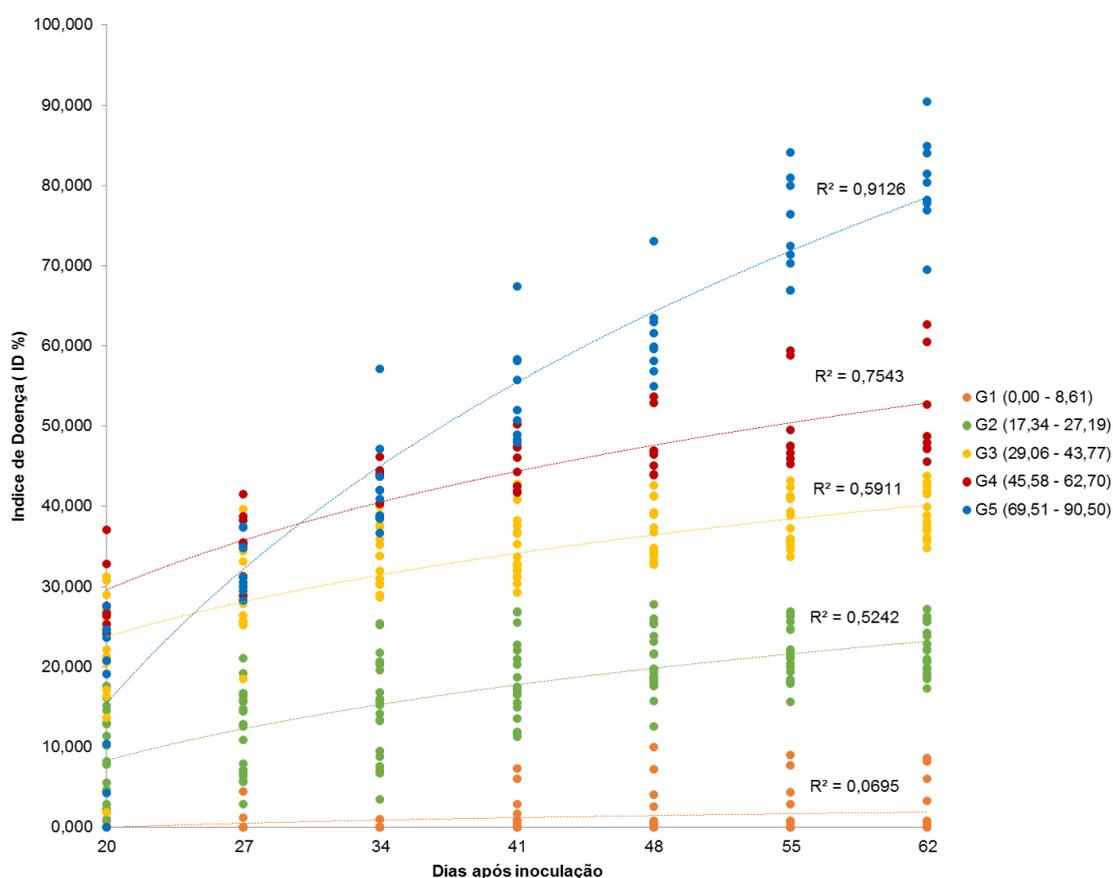
desenvolvimento inerentes do órgão afetado, tendo pouca relação com o momento de infecção. O período de incubação do CABMV não é conhecido com exatidão uma vez que, a expressão dos sintomas é dependente de variáveis como idade e genótipo, fatores nutricionais, bem como a interação do vírus com outros agentes. Contudo, é importante considerar que o progresso da doença representado na Figura 3, refere-se à média de todos os genótipos de *Passiflora* avaliados, porém o nível de reação ao CABMV é genótipo-dependente, ou seja, dependendo do genótipo ou espécie de maracujazeiro estudada, os sintomas da doença são variáveis, em função dos mecanismos de resistência existente em cada genótipo.

Os resultados indicaram uma estabilização dos sintomas do CABMV nas folhas a partir dos 55 DAI, indicando que a expressão da reação dos genótipos de maracujazeiro em termos de resistência/suscetibilidade pode ser determinada até este período. Por outro lado, Viana et al. (2014b) avaliaram em condições de casa de vegetação, a resistência ao CABMV em genótipos de maracujazeiro 'azedo' até os 60 DAI e verificaram severidade máxima aos 30 DAI. Possivelmente a severidade máxima observada aos 30 DAI deve-se ao uso de espécies mais suscetíveis ao CABMV, resultando, portanto, em sintomas severos de forma mais precoce.

Os estudos de avaliação do maracujazeiro 'azedo' quanto à reação ao CABMV em condições em campo indicaram que a expressão dos sintomas é bastante influenciada pelo ambiente (SANTOS et al., 2015). Estes autores ainda inferiram que o *screening* em campo deve ser realizado em diversos ambientes, tanto favoráveis quanto desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, no intuito de verificar a estabilidade da reação dos genótipos de maracujazeiro. Por outro lado, em comparação com a seleção de genótipos resistentes em condições de campo, a inoculação artificial sob condições controladas apresenta a grande vantagem de permitir a seleção de genótipos em curto espaço de tempo, possibilitando o *screening* de um maior número de acessos ao longo do ano. Também tem como vantagens a menor influência do ambiente na expressão dos sintomas da virose. Entretanto, uma desvantagem da inoculação artificial é a possibilidade de quebra das barreiras físicas existente nas folhas que poderiam evitar a entrada do vírus nas células vegetais. Por outro lado, a inoculação artificial também pode levar a ativação

de respostas do tecido lesionado de modo a evitar a entrada do vírus na planta (GILROY et al., 2007; FERNANDES et al., 2014).

Especificamente em relação à resistência dos genótipos de *Passiflora*, os valores médios do ID foram agrupados em cinco classes, em função da severidade da virose nas folhas (Figura 4; Tabela 3). Os grupos resistentes foi constituídos por 15 genótipos (BGP014, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170PA, BGP077, BGP200, BGP238, BGP268, BGP413, BGP414, BGP188, H0930 e Seleção2) pertencente às espécies *P. suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea*, *P. gibertii* e *P. edulis* f. *flavicarpa*.



**Figura 4.** Regressão logarítmica do Índice de Doença (ID%) em cinco grupos de maracujazeiro infectados com o *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) classificados quanto ao nível de resistência com base no teste de médias Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ). G1 = Resistente; G2 = Moderadamente Resistente; G3 = Moderadamente Suscetível; G4 = Suscetível e G5 = Altamente Suscetível. Os valores entre parênteses representam a amplitude do Índice de Doença (ID%) dos genótipos que compõe cada grupo.

Observou-se diferenças importantes na curva de progresso do CABMV nos diferentes agrupamentos (Figura 4), sendo que a evolução da severidade da doença foi mais rápida em genótipos altamente suscetíveis - AS (G5) em comparação com genótipos pertencentes aos demais grupos. Aos 20 dias, o progresso da virose foi praticamente nulo nos grupos resistente - R (G1) em comparação aos grupos considerados moderadamente resistente - MR (G2) e moderadamente suscetível - MS (G3).

Um fato interessante ocorreu no G5, cujo ID médio foi menor que os grupos suscetíveis (G4) e moderadamente suscetíveis (G3) nas avaliações realizadas aos 20 e 28 DAI (Figura 4; Tabela 3), embora o G5 tenha sido classificado como altamente suscetível. Este resultado pode estar associado a algum mecanismo inicial de resistência à multiplicação do CABMV em alguns genótipos pertencentes ao (G5), ou mesmo a efeitos aleatórios no processo de inoculação do vírus.

No G1 não houve progresso acentuado da virose até os 27 DAI, embora alguns genótipos de *P. cincinnata* (BGP200 e BGP268) e *P. edulis* (BGP188, H0930 e Seleção2) tenham apresentado algumas folhas com sintomas leves do CABMV, o que contribuiu para um baixo progresso médio da virose neste grupo (Figura 4). A amplitude da reação do CABMV nesse grupo foi de 0,00 a 8,61%, evidenciando uma baixa severidade da doença conferindo ao grupo a denominação de 'resistentes'. O ID dos genótipos do G2 variou de 17,34% aos 20 DAI para 27,19% aos 55 DAI sendo, portanto classificado como 'moderadamente resistente'. Por outro lado, nos grupos G3 e G4 foram observadas as maiores severidades iniciais, com ID variando de 29,06% aos 20 DAI a 43,77% aos 55 DAI e de 45,58% aos 20 DAI a 62,70% aos 55 DAI, sendo assim classificados como 'moderadamente suscetível' e 'suscetível', respectivamente (Figura 4).

Os sintomas do CABMV evoluíram de maneira bastante progressiva no G5, com valores de ID variando de 69,51 a 90,50% aos 55 DAI (Figura 4), sendo, portanto representado por genótipos com elevada suscetibilidade ao CABMV, e assim classificados como 'altamente suscetíveis'. A elevada severidade do CABMV no G5 (90,50%) pode ser explicada pelo fato deste grupo ser composto essencialmente por cultivares e híbridos de maracujazeiro

azedo (BRS Sol do Cerrado, FB300, BRS Rubi do Cerrado, BRS Gigante Amarelo, BGP160, HFOP-08, H0914 e HFOP-09).

A diferença na severidade do CABMV nos grupos pode ser diretamente visualizada com base nas médias do índice de doença de cada grupo em função do período de avaliação (Tabela 3). A média do ID aos 20 DAI nos grupos MS e AS não diferiram, indicando que a reação ao CABMV é praticamente a mesma nesse período. A partir dos 27 DAI a reação do grupo AS diferiu de forma significativa do grupo MS. Por outro lado, a maior severidade inicial ocorreu no grupo S. Porém, aos 27 e 34 DAI não houve diferença na reação ao CABMV para os grupos S e AS, e somente a partir dos 41 DAI é que foi observada maior severidade do CABMV no grupo AS (Tabela 3).

**Tabela 3.** Índice de doença médio do *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) em função dos dias de avaliação após a inoculação e dos grupos de resistência: R – resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível e AS – altamente suscetível.

Dias após inoculação	Classes/Grupo				
	R	MR	MS	S	AS
20	0,17aA*	8,01aB	19,10aC	28,09aD	17,23aC
27	0,37aA	12,03bB	24,22bC	35,61bD	32,66bD
34	0,54aA	15,47cB	29,12bC	43,11cD	42,63cD
41	1,29aA	18,32dB	30,99bC	45,18cD	54,19dE
48	1,68aA	20,51dB	32,76dC	47,49dD	61,16eE
55	1,69aA	21,63dB	34,28dC	50,09dD	74,37fE
62	1,83aA	22,18dB	35,27dC	51,57dD	80,40fE

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A análise da reação da doença dentro de cada grupo formado demonstrou que a reação da doença no grupo R (G1), pode ser determinada até 27 DAI, visto que após esse tempo, a doença não evolui de forma significativa. Para o grupo MR, a reação do CABMV pode ser realizada até 41 DAI, pois após este período, a doença evolui de forma lenta, de acordo com o

progresso dos sintomas do CABMV no G2 (Figura 4). Por outro lado, a reação e seleção dos genótipos que compõem os grupos MS e S podem ser inferidas até aos 48 DAI, considerando que após este período não houve diferença significativa na severidade da doença aos 55 e 62 DAI. Considerando a reação no grupo AS, a severidade do CABMV evoluiu até os 55 DAI, conforme observado na análise geral de todos os genótipos (Tabela 3), o que evidencia que quando não se conhece previamente a reação do genótipo a ser analisado, é prudente estender a avaliação até aquele período, ou considerar uma severidade mínima para classificação dos genótipos como suscetíveis ao CABMV.

Os resultados apresentados na Tabela 3 evidenciam o comportamento médio do CABMV entre e dentro dos grupos, sendo possível determinar em qual período a doença é mais severa nos grupos de resistência. Do ponto de vista prático, essas informações são úteis para o programa de melhoramento do maracujazeiro, pois subseqüentes fenotipagens e seleções de genótipos do banco de germoplasma podem ser melhor orientadas em função destas informações. Porém, para adotar as propostas de avaliação estabelecidas neste capítulo, deve-se levar em consideração o objetivo do programa de melhoramento genético, do conhecimento de cada genótipo que compõe o banco de germoplasma, assim como das condições experimentais. Todavia, para o uso do programa de melhoramento do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, os resultados obtidos podem auxiliar na tomada de decisão quanto ao tempo necessário para avaliar a reação ao CABMV em diferentes espécies de maracujazeiros, assim como utilizar classes para agrupar genótipos quanto ao nível de resistência ou suscetibilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

- a) A severidade média dos sintomas causados pelo CABMV nos grupos R, MR, MS e S, podem ser mensuradas de forma eficiente até aos 27, 41 e 48 dias após inoculação dos genótipos, respectivamente;
- b) A evolução da severidade do CABMV é dependente do nível de resistência genética de cada genótipo, porém, independente do agrupamento, a avaliação da reação ao CABMV em genótipos de maracujazeiro pode ser discriminada de forma eficiente aos 55 dias após a inoculação das plantas.
- c) As cinco classes fenotípicas estabelecidas para classificar a reação das diferentes espécies de maracujazeiro, representaram de forma bastante efetiva o progresso temporal do CABMV.

## REFERÊNCIAS

BARROS, D.R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA Jr., J.E.A.; ANTUNES, T.F.S.; ZERBINI, F.M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1085-1091, 2011.

BOON, J.A.; DIAZ, A.; AHLQUIST, P. Cytoplasmic viral replication complexes. **Cell Host & Microbe**, v. 8, p. 77-85, 2010.

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

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MELO, J.R.F.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 489-495, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MOREIRA, C.N.; FIGUEIRA, A.R.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1209-1216, 2008.

CHRISTENSEN, N.M.; FAULKNER, C.; OPARKA, K. Evidence for unidirectional flow through plasmodesmata. **Plant Physiology**, v. 150, p. 96-104, 2009.

DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2006.

DOLNIK, O.; STEVERMANN, L.; KOLESNIKOVA, L.; BECKER, S. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. **European Journal of Cell Biology**, v. 94, p. 323-331, 2015.

FERNANDES, L.H.M.; OLIVEIRA SILVEIRA, H.R.; SOUZA, K.R.D.; RESENDE, M.L.V.; ALVES, J.D. Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. **American Journal of Plant Science**, v. 5, p. 3710-3716, 2014.

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

FREITAS, J.C.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, F.H.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, R.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 291-297, 2015.

GILROY, E.M.; HEIN, I.; VAN DER HOORN, R.; BOEVINK, P.C.; VENTER, E.; MCLELLAN, H.; LÓPEZ, E.C. Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. **The Plant Journal**, v. 52, p. 1-13, 2007.

HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.A.; HARDING, R.M.; VU, M.; DALE, J.L. Design and application of two novel degenerate *primer* pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 25-36, 2008.

KAREEM, K.T.; TAIWO, M.A. Interactions of viruses in cowpea: effects on growth and yield parameters. **Virology Journal**, v. 4, p. 1-7, 2007.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 87-92, 2006.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v. 26, p. 195-218, 1923.

MELLO, J.R.F.; FIGUEIRA, A.R.; MOREIRA, C.N.; OLIVEIRA, A.C. Recent characterization of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 735-744, 2015.

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

NETHERTON, C.L.; WILEMAN, T. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. **Current opinion in virology**, v. 1, p. 381-387, 2011.

NICOLINI, C.; FILHO, F.A.C.R.; RESENDE, R.O.; ANDRADE, G.P.; KITAJIMA, E.W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. **Journal Phytopathol**, v. 160, p. 82-87, 2012.

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

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 485-492, 2013.

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

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; FREITAS, J.C.O.; SILVA, F.H.L.; RODRIGUES, R.; EIRAS, M. Resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 85-98, 2015.

SOUSA, M.A.F.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; FALEIRO, F.G.; BLUM, L.E.B. Reação de progênies de maracujazeiro azedo à antracnose em condições de casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 30, p.563-570, 2014.

VIANA, C.A.S.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BLUM, L.E.B. Genótipos de maracujazeiro-azedo com resistência à bacteriose. **Bioscience Journal**, v. 30, p.591-598, 2014a.

VIANA, C.A.S.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BLUM, L.E.B. Resistência parcial de genótipos de maracujá-azedo à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v. 30, p. 338-345, 2014b.

## **CAPÍTULO 2**

### **FONTES DE RESISTÊNCIA À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS EM *Passiflora* spp.<sup>2</sup>**

<sup>2</sup>Artigo a ser traduzido e submetido para o comitê editorial do periódico Scientia Agrícola

## FONTES DE RESISTÊNCIA À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS EM *Passiflora* spp.

**Resumo:** O *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), que causa o endurecimento dos frutos em maracujazeiro, é um dos principais entraves associado à expansão da passicultura e até o momento não existe variedades resistentes. Objetivou-se identificar fontes de resistência à virose do endurecimento dos frutos em *Passiflora* spp. Para isso, 80 genótipos de *Passiflora* pertencentes a 12 espécies, foram avaliados em delineamento em blocos casualizados com oito plantas inoculadas e duas plantas não inoculadas. A inoculação artificial com CABMV foi realizada duas vezes em intervalo de quatro dias. Aos 55 dias após as inoculações (DAI) foi realizada a avaliação dos sintomas mediante uso de uma escala diagramática de notas que variou de 1 (resistente) a 4 (altamente suscetível). A partir dessas notas foram estimados os valores do Índice de Doença (ID%). Visando a confirmação da infecção viral nos genótipos, foi realizado o RT-PCR com o uso de iniciadores específicos para o CABMV. A partir dos dados do ID (%) aos 55 DAI, foi realizada a análise estatística, sendo as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Também foi realizada a análise de agrupamento dos genótipos utilizando índice de Gower e método UPGMA. Foi confirmado a presença do vírus em todas as plantas sintomáticas, porém, não houve confirmação em plantas inoculadas e assintomáticas. Dos genótipos avaliados, 18,75% foram resistentes (ID de 0,00%), com destaque para BGP014, BGP077, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170PA, BGP238 e BGP413 pertencentes as espécies *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. gibertii*. Outros 36,25% foram moderadamente suscetíveis com ID variando de 29,64 a 43,77% e 11,25% foram altamente suscetíveis, com ID variando de 69,51 a 90,50%. Cerca de 70% dos genótipos de *P. edulis* e híbridos interespecíficos apresentaram algum grau de suscetibilidade ao CABMV. A variabilidade genética identificada para resistência ao CABMV abre novas perspectivas para indicação de cruzamentos visando incorporar resistência a virose no maracujazeiro.

**Palavras-chave:** *Screening*, resistência genética, variedade, CABMV.

## RESISTANCE SOURCES TO PASSIONFRUIT WOODINESS DISEASE IN *Passiflora* spp.

**Abstract:** The *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), which causes passionfruit woodiness disease is one of the main constraint to the expansion of passionfruit crops and so far there are no resistant varieties. The objective of this study was identifying resistance sources to passionfruit woodiness virus in *Passiflora* spp. Eighty passionfruit genotypes, from 12 species, were evaluated in a randomized block design with eight replications including two uninoculated controls. CABMV artificial inoculation was performed twice with intervals of 4 days. The symptoms evaluation was performed 55 days after inoculation (DAI) using a diagrammatic scale from 1 (resistant) to 4 (highly susceptible). From these data Disease Index (DI) values were estimated. In order to confirm viral infection in the genotypes, RT-PCR was performed using specific primers for CABMV. The DI (%) means from the 55 DAI were clustered by the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ). Cluster analysis of genotypes was also executed using the Gower index and UPGMA method. The presence of the virus was confirmed in all the symptomatic plants, however, there was no confirmation in uninoculated and asymptomatic plants. Of the assessed genotypes, 18.75% were resistant, specifically genotypes BGP014, BGP077, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170PA, and BGP238 BGP413 (*Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, and *P. setacea* *P. gibertii*) with 0.00% DI estimated. Of the other tested genotypes 36.25% were mildly susceptible with DI ranging from 29.64 to 43.77%. The remaining 11.25% were highly susceptible with DI ranging from 69.51 to 90.50%. Approximately 70% of *P. edulis* genotypes and interspecific hybrids showed some degree of susceptibility to CABMV. Genetic variability identified for resistance to CABMV opens new perspectives for crossing aiming to transfer virus resistance into passionfruit.

**Keywords:** *Screening*, genetic resistance, variety, CABMV.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário econômico internacional na produção de frutos de maracujazeiro, sobretudo, o maracujá 'amarelo' (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), tendo uma produção aproximada de 823 mil toneladas, produzidas em 57 mil hectares (IBGE, 2015). O Nordeste é a principal região produtora com aproximadamente 71% da produção nacional, sendo a Bahia responsável por 46% dessa produção (IBGE, 2015). No entanto, a produtividade média nacional é ainda considerada baixa (14 t ha<sup>-1</sup>). Vários fatores justificam a baixa produtividade da passicultura, com destaques aos entraves associados a aspectos fitossanitários da cultura, como a ocorrência de pragas e patógenos, a exemplo das doenças bacterianas, fúngicas e virais (FISCHER; RESENDE, 2008).

A virose do endurecimento dos frutos no Brasil tem sido associada a *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (BARROS et al., 2007; NICOLINI et al., 2012; MELO et al., 2015). Plantas de maracujá infectadas com o CABMV apresentam mosaico, evoluindo para manchas amareladas ao longo das nervuras e limbo foliar, bolhosidade e deformação foliar (NASCIMENTO et al., 2006; FISCHER; RESENDE, 2008). Os prejuízos causados pelo CABMV são considerados os mais graves para a cultura, chegando a infectar 100% dos pomares. Esta doença é considerada economicamente a mais importante para a cultura do maracujá, pois é registrada em vários polos de produção e causa depreciação da qualidade e rendimento dos frutos e até o momento não conta com estratégias efetivas de controle (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; 2012; FREITAS et al., 2015a). Uma alternativa para minimizar os danos causados pela doença seria o uso de variedades resistentes (SANTOS et al., 2015). Contudo, apesar dos esforços e dos programas de melhoramento genético do maracujazeiro, ainda não existem variedades comerciais com resistência ao CABMV (CORREA et al., 2015). Por outro lado, existem relatos de resistência em espécies silvestres (MACIEL et al., 2009; FREITAS et al., 2015a; SANTOS et al., 2015).

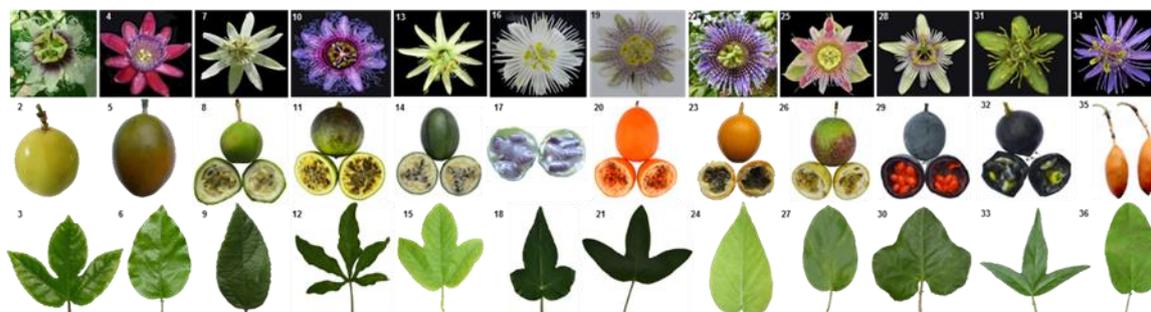
O Brasil é considerado um dos centros de diversidade do gênero *Passiflora*, no entanto, pouco se conhece sobre as reais potencialidades da

maioria das espécies armazenadas nos bancos de germoplasma. Atualmente o germoplasma de *Passiflora* tem sido explorado basicamente para estudos associados à caracterização morfo-agronômica (CASTRO et al., 2012; LAWINSCKY et al., 2014) e molecular, voltado a estudos da diversidade genética (RAMAIYA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; CERQUEIRA-SILVA et al., 2015). Especificamente para resistência as doenças os principais estudos indicam que as espécies silvestres são potencialmente úteis devido ao elevado grau de resistência (MACIEL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Deste modo, a busca por fontes de resistência no germoplasma silvestre é uma alternativa para programas de melhoramento genético que tem como objetivo desenvolver variedades comerciais com maior nível de resistência ao CABMV. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção de fontes de resistência ao vírus causador da virose do endurecimento dos frutos em genótipos de maracujazeiros em condições controladas de inoculação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Foram avaliados 80 genótipos de *Passiflora* pertencentes a 12 espécies, sendo 61 de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., um de *P. alata* Curtis., um de *P. malacophylla* Mast., quatro de *P. cincinnata* Mast., um de *P. setacea* DC., um de *P. foetida* L., um de *P. gibertii* N.E. Brown., um de *P. ligularis* Juss., um de *P. maliformes* L., dois de *P. morifolia* Mast., cinco de *P. suberosa* L., e um de *P. subrotunda* Mast., respectivamente (Figura 1; Tabela 1). Esses genótipos foram selecionados com base na disponibilidade de sementes do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura.



**Figura 1.** Diversidade de formas e cores de flores, frutos e folhas das 12 espécies de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) utilizadas para caracterização da reação ao vírus do endurecimento dos frutos. 1-3) *P. edulis* f. *flavicarpa*; 4-6) *P. alata*; 7-9) *P. malacophylla*; 10-12) *P. cincinnata*; 13-15) *P. setacea*; 16-18) *P. foetida*; 19-21) *P. gibertii*; 22-24) *P. ligularis*; 25-27) *P. maliformes*; 28-30) *P. morifolia*; 31-33) *P. suberosa*; e, 34-36) *P. subrotunda*, respectivamente. Créditos: Soares, T.L.; Jesus, O.N.

**Tabela 1.** Relação de genótipos silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) utilizados na avaliação da severidade do *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV).

Nº	Genótipo*	Espécie	Origem	Nº	Genótipo*	Espécie	Origem
1	H09-14	<i>P. e. fla</i>	BA	41	BGP189 x BGP345	<i>P. e. fla</i>	BA
2	HFOP-09	<i>P. e. fla</i>	BA	42	BGP424	<i>P. e. fla</i>	BA
3	H09-02	<i>P. e. fla</i>	BA	43	BGP425	<i>P. e. fla</i>	BA
4	BRS Gigante Amarelo	<i>P. e. fla</i>	BA	44	BGP325	<i>P. e. fla</i>	SP
5	BRS Rubi do Cerrado	<i>P. e. fla</i>	BA	45	BGP334	<i>P. e. fla</i>	BA
6	HFOP-08	<i>P. e. fla</i>	BA	46	BGP188	<i>P. e. fla</i>	SP
7	BGP396	<i>P. e. fla</i>	BA	47	BGP400	<i>P. e. fla</i>	BA
8	BRS Sol do Cerrado	<i>P. e. fla</i>	BA	48	BGP177	<i>P. e. fla</i>	BA
9	FB300	<i>P. e. fla</i>	BA	49	BGP189	<i>P. e. fla</i>	SP
10	BGP393	<i>P. alata</i>	CE	50	BGP327	<i>P. e. fla</i>	SP
11	BGP415	<i>P. mor</i>	SP	51	BGP190	<i>P. e. fla</i>	SP
12	BGP107	<i>P. mor</i>	SP	52	BGP330	<i>P. e. fla</i>	BA
13	BGP379	<i>P. mali</i>	BA	53	BGP223	<i>P. e. fla</i>	BA
14	BGP134	<i>P. sube</i>	BA	54	BGP205	<i>P. e. fla</i>	SP
15	BGP143	<i>P. sube</i>	SP	55	BGP328	<i>P. e. fla</i>	DF
16	BGP014	<i>P. sube</i>	SP	56	BGP185	<i>P. e. fla</i>	SP
17	BGP112	<i>P. sube</i>	-	57	BGP418	<i>P. e. fla</i>	BA
18	BGP152	<i>P. sube</i>	SP	58	BGP238	<i>P. set</i>	BA
19	BGP160	<i>P. ligu</i>	BA	50	BGP413	<i>P. cin</i>	SP
20	BGP395	<i>P. foe</i>	MT	60	BGP077	<i>P. cin</i>	BA
21	BGP394	<i>P. subr</i>	BA	61	BGP414	<i>P. gib</i>	SP
22	H09-10	<i>P. e. fla</i>	BA	62	BGP031	<i>P. e. fla</i>	BA
23	H09-07	<i>P. e. fla</i>	BA	63	BGP032	<i>P. e. fla</i>	PR
24	H09-30	<i>P. e. fla</i>	BA	64	BGP037	<i>P. e. fla</i>	PA
25	HFOP-05	<i>P. e. fla</i>	BA	65	BGP051	<i>P. e. fla</i>	MG
26	RC2-45-P14x224	H. inter	BA	66	BGP123	<i>P. e. fla</i>	SP
27	RC2-57-P8x224	H. inter	BA	67	BGP224	<i>P. e. fla</i>	BA
28	RC2-44-P8x222	H. inter	BA	68	BGP227	<i>P. e. fla</i>	SP
29	RC2-45-P18PA	H. inter	BA	69	BGP345	<i>P. e. fla</i>	BA
30	RC2-45-P8x222	H. inter	BA	70	BGP222	<i>P. e. fla</i>	BA
31	RC2-44-P3x224	H. inter	BA	71	BGP005	<i>P. e. fla</i>	SP
32	RC2-45-P10x223	H. inter	BA	72	BGP064	<i>P. e. fla</i>	BA
33	RC2-45-P14x223	H. inter	BA	73	BGP324	<i>P. e. fla</i>	DF
34	RC2-44-P8x185	H. inter	BA	74	BGP351	<i>P. e. fla</i>	BA
35	BGP165	<i>P. e. fla</i>	BA	75	BGP341	<i>P. e. fla</i>	BA
36	BGP170PA	<i>P. mala</i>	-	76	BGP210	<i>P. e. fla</i>	MG
37	BGP128	<i>P. e. fla</i>	SP	77	BGP221	<i>P. e. fla</i>	BA
38	Seleção-2	<i>P. e. fla</i>	BA	78	BGP061	<i>P. e. fla</i>	SP
39	BGP428	<i>P. e. fla</i>	BA	79	BGP200	<i>P. cin</i>	SP
40	Seleção-1	<i>P. e. fla</i>	BA	80	BGP268	<i>P. cin</i>	BA

\*Registro do Banco Ativo de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) no município de Cruz das Almas - Bahia. *P. e., fla* = *Passiflora edulis flavicarpa*; *P. alata* = *P. alata*; *P. mor* = *P. morifolia*; *P. mali* = *P. maliformes*; *P. sube* = *P. suberosa*; *P. ligu* = *P. ligularis*; *P. foe* = *P. foetida*; *P. subr* = *P. subrotunda*; H. inter = híbrido interespecífico; *P. mala* = *P. malacophylla*; *P. set* = *P. setacea*; *P. cin* = *P. cincinnata*; *P. gib* = *P. gibertii*. BA = Bahia; CE = Ceará; SP = São Paulo; MT = Mato Grosso; DF = Distrito Federal; PR = Paraná; PA = Pará; MG = Minas Gerais.

Aproximadamente 20 sementes de cada genótipo foram previamente embebidas em 20 mL de água durante 60 minutos. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em vasos plásticos de 1L contendo uma mistura com fibra de coco (120 L) e Vivatto® (40 L) (3:2) acrescido de 40 g de osmocote a cada 10 L de substrato. Foram selecionadas as 10 melhores plantas de cada espécie para compor o ensaio. A casa de vegetação foi mantida em temperatura controlada em torno de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e Umidade Relativa (UR) de 45% durante todo o ensaio.

## **2.2 Inoculações artificiais**

O isolado utilizado para as inoculações artificiais foi proveniente de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação com sintomas de CABMV. Estas plantas matrizes foram inoculadas à partir de folhas de maracujazeiros contaminadas com CABMV provenientes da área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para as inoculações, preparou-se um extrato em almofariz a partir de amostras foliares das plantas sintomáticas, macerando-se a proporção de 1,0 g de tecido para 10 mL de uma solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfato de sódio 0,1M, com pH 7,0) (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008). Em seguida foi adicionada uma pequena quantidade de celite (1 g) utilizado como abrasivo para causar ferimentos na superfície foliar. As partículas virais foram inoculadas nas plantas friccionando a superfície adaxial da folha com o dedo umedecido no extrato uma única vez, a fim de padronizar a pressão de inóculo. Nas plantas controles utilizou-se apenas o tampão e celite.

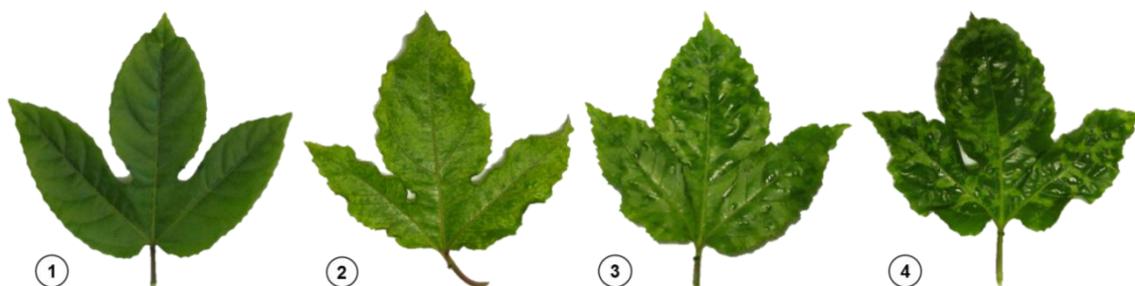
As inoculações foram realizadas duas vezes em intervalo de quatro dias, sendo inoculadas duas folhas por planta em cada inoculação, utilizando sempre as folhas basais (com exceção dos cotilédones). Após 10 minutos da realização das inoculações, as folhas inoculadas foram lavadas para retirar o excesso do celite.

## **2.3 Avaliações dos sintomas da doença**

A caracterização da reação dos genótipos de maracujazeiros à infecção causada pelo CABMV foi realizada a partir dos sintomas visuais da doença. Previamente todas as folhas foram enumeradas e as avaliações realizadas à

partir da oitava folha completamente desenvolvida. A primeira avaliação foi realizada 20 dias após a primeira inoculação, e as demais, em intervalos de sete dias, encerrando-se na até completar a sétima avaliação, aos 62 dias após inoculação (DAI).

As avaliações da severidade dos sintomas foram realizadas com uso da escala de notas proposta por Novaes; Rezende (2003), com modificações, que variam de 1 a 4, descrita a seguir: 1= ausência de sintomas de mosaico, 2= mosaico leve, sem distorção foliar, 3= mosaico grave, sem distorção foliar e 4= mosaico grave, bolhas e distorção foliar (Figura 2). A incidência da doença nos genótipos foi avaliada considerando o percentual de plantas que apresentaram sintomas típico da doença.



**Figura 2.** Escala de notas para avaliação da severidade do vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) em folhas de maracujá 'amarelo' (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Créditos: Lima, L.K.S e Jesus, O.N.

#### 2.4 Análises da severidade da doença

A severidade da doença foi quantificada com uso do Índice de Doença (ID%) proposto por MCKINNEY (1923), aplicando-se a seguinte fórmula:

$$ID (\%) = \frac{\sum(GS \times L)}{(TNL \times HGS)} \times 100$$

Considera-se na fórmula:

GS = grau da escala determinada para cada folha;

L = número de folhas que mostram cada grau da infecção (nota);

TNL = número total de folhas avaliadas, e;

HGS = grau máximo de infecção (nota)

## 2.5 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados, considerando cada uma das oito plantas inoculadas como uma repetição. Duas plantas de cada genótipo foram utilizadas como controle da inoculação. As plantas controles e as plantas assintomáticas não foram computadas nas análises estatísticas. Os dados foram submetidos à análise de variância. Para agrupamento dos genótipos foram utilizadas as estimativas do ID (%) aos 55 dias após a inoculação utilizando o teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R (R Development Core Team, 2006), pacote “agricolae”. Os genótipos foram classificados em resistente – R; moderadamente resistente – MR; moderadamente suscetível – MS; suscetível – S e altamente suscetível – AS, respectivamente.

## 2.6 Análise de agrupamento dos genótipos

A partir dos valores médios do índice de doença obtidos aos 55 DAI procedeu-se a análise de agrupamento dos genótipos com base no índice de Gower (GOWER, 1971) e método de agrupamento hierárquico *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Para obtenção da matriz de dissimilaridade foi utilizado o programa Genes (CRUZ, 2013) e a partir da matriz utilizou-se o programa MEGA7.0 (TAMURA et al., 2011) para obtenção do dendrograma.

## 2.7 Detecção molecular do CABMV

### 2.7.1 Extração de RNA

Amostras de tecidos foliares do ápice de plantas sintomáticas, assintomáticas e controles negativos de todos os genótipos foram coletadas no final das avaliações e em seguida armazenadas em ultra *freezer*  $-80^{\circ}$  C. As extrações de RNA total foram realizadas em três conjuntos de amostras agrupadas (plantas sintomáticos, assintomáticos e controle negativo).

Os conjuntos de tecidos foliares foram maceradas com nitrogênio líquido e o RNA total extraído seguiu o protocolo estabelecido por Gambino et al. (2008). Os *pellets* contendo os RNAs totais foram eluídos em 40  $\mu$ L com água DEPC (Diethylpyrocarbonate). A integridade do RNA foi confirmada por meio

de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) não desnaturante. O tampão para eletroforese foi constituído por Tris Base (P.A), ácido acético glacial (P.A) e tampão EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético – 0,5 M, pH 8,0), corados com brometo de etídio ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e analisados sob incidência de luz UV em sistema fotodocumentador Kodak GeoLogic-220 pro (Carestream). As amostras foram armazenadas em ultra freezer  $-80^{\circ} \text{C}$  até a obtenção do cDNA.

### 2.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*). Inicialmente  $5,0 \mu\text{L}$  do RNA total foi pipetado em um mix contendo  $1,0 \mu\text{L}$  de iniciadores oligos (dT)<sub>18</sub> ( $10 \mu\text{M}$ ) e Random primer ( $10 \mu\text{M}$ ) e,  $1,0 \mu\text{L}$  de dNTPs ( $2,5 \text{ mM}$ ). A esta etapa, foi adicionado H<sub>2</sub>O ultra pura (milli-Q) para completar  $12 \mu\text{L}$ . Em seguida, as moléculas de RNA, tiveram suas estruturas secundárias rompidas por desnaturação inicial de  $65^{\circ} \text{C}/5 \text{ min}$  ( $4^{\circ} \text{C}/\infty$ ). Em seguida, foi adicionado  $1,0 \mu\text{L}$  da enzima “M-MLV reverse transcriptase” (Invitrogen [ $200 \text{U } \mu\text{L}^{-1}$ ]), em um mix contendo  $4,0 \mu\text{L}$  de Tampão RT (5X),  $2,0 \mu\text{L}$  de M-DTT e  $1,0 \mu\text{L}$  de RNase out. Deste mix, pipetou-se  $8,0 \mu\text{L}$  na etapa anterior, completando o volume final para  $20 \mu\text{L}$ . Esta reação atendeu as seguintes etapas: síntese a  $37^{\circ} \text{C}/50 \text{ min}$  e inativação da enzima a  $70^{\circ} \text{C}/15 \text{ min}$  ( $4^{\circ} \text{C}/\infty$ ). Após a síntese, os cDNAs foram quantificados em NanoDrop NanoVue plus™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare) e armazenados em ultra freezer  $-80^{\circ} \text{C}$  até a sua utilização na Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.

### 2.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação via PCR foram utilizados iniciadores específicos para o CABMV que amplificam porções genômicas da região de Inclusão Cilíndrica (CI), CIRev (5'-ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC-3') e CIFor (5'-GGIVVIGTIGGIWSGGIAARTCIAC-3'), gerando um fragmento de 700 pb (HA et al., 2008). As reações foram realizadas com Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen, EUA) contendo  $2,5 \mu\text{L}$  de tampão taq (10X),  $1,5 \mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> ( $50 \text{ mM}$ ),  $0,5 \mu\text{L}$  de dNTPs ( $2,5 \text{ mM}$  [dATP, dCTP, dTTP e dGTP]),  $0,5 \mu\text{L}$  dos iniciadores CIRev e CIFor ( $10 \mu\text{M}$ ),  $0,2 \mu\text{L}$  de Taq polimerase ( $5 \text{U}$

$\mu\text{L}^{-1}$ ), 5,0  $\mu\text{L}$  de cDNA como molde e  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pura para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) seguindo as seguintes variações de temperatura: aquecimento inicial a 94° C por 3 min, seguida de 38 ciclos de desnaturação (94°C/ 45s), anelamento de (54°C/ 45s) e extensão de (71°C/ 1min e 30s) seguido por uma extensão final de 72° C por 10 min.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v) não desnaturantes em tampão Tris-borato e tampão EDTA, (TBE 1X pH 8,0), corados com brometo de etídio e visualizados por luz UV em fotodocumentador Kodak GeoLogic-220 pro (Carestream) (SAMBROOK et al., 1989). O tamanho de cada fragmento foi determinado por meio do marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Reação de espécies de *Passiflora* ao CABMV

Com base nos resultados da severidade da virose associada ao do índice de doença (ID) houve grande variabilidade entre as espécies de *Passiflora* avaliadas com ID variando de 0,00 a 71,33% (Tabela 2). Cinco espécies de *Passiflora* com ID variando de 0,00 (*P. malacophylla*, *P. suberosa* e *P. setacea*) a 2,86 (*P. gibertii* e *P. cincinnata*) foram classificadas como resistentes. Embora essas espécies pertençam ao mesmo agrupamento, apenas *P. malacophylla*, *P. suberosa* e *P. setacea* apresentaram resistência completa, enquanto *P. gibertii* e *P. cincinnata* exibiram mosaico leve ao longo das avaliações (Tabela 2).

Com relação às demais espécies de *Passiflora* observou-se pelo índice de doença o enquadramento dessas em quatro níveis de severidade: moderadamente resistente (*P. morifolia* e *P. subrotunda*), moderadamente suscetível (*P. maliformes*, *P. edulis*, *P. foetida* e o híbrido interespecífico), suscetível (*P. alata*) e altamente suscetível (*P. ligularis*) (Tabela 2). De forma análoga, Oliveira et al. (2013), também observaram em *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* algum grau de suscetibilidade a virose do endurecimento dos frutos.

**Tabela 2.** Análise de severidade média da virose do endurecimento dos frutos em 12 espécies de maracujazeiro e um híbrido interespecífico.

<b>Espécies</b>	<b>ID (%)*</b>	<b>Reação<sup>#</sup></b>	<b>Ploidia</b>
<i>Passiflora malacophylla</i> Mast.	0,00a	R	2n = 18
<i>P. suberosa</i> L.	0,00a	R	2n = 12; 24; 36
<i>P. setacea</i> DC.	0,00a	R	2n = 18
<i>P. cincinnata</i> Mast.	2,62a	R	2n = 18
<i>P. gibertii</i> N.E. Brown	2,86a	R	2n = 18
<i>P. morifolia</i> Mast.	23,40b	MR	2n = 12
<i>P. subrotunda</i> Mast.	21,03b	MR	-
Híbrido interespecífico	33,71c	MS	2n = 36
<i>P. maliformes</i> L.	39,39c	MS	2n = 18
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.	37,65c	MS	2n = 18
<i>P. foetida</i> L.	29,54c	MS	2n = 18; 20; 22
<i>P. alata</i> Curtis	59,43d	S	2n = 18
<i>P. ligularis</i> Juss.	71,33d	AS	2n = 18

Médias agrupadas pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \*Índice de Doença; #R – resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram aos observados por outros autores que também verificaram imunidade ao CABMV nas espécies *P. suberosa* (MACIEL et al., 2009) e *P. setacea* (OLIVEIRA et al., 2013). Essas espécies, assim como a *P. malacophylla*, por apresentarem resistência ao CABMV tem potencial para serem utilizadas em programas de melhoramento genético.

As espécies classificadas como resistentes e moderadamente resistentes foram em sua maioria silvestres. Embora, as informações registradas na literatura sobre a resistência dessas espécies ao CABMV sejam poucos frequentes a maioria aborda a severidade da doença em função da sintomatologia do vírus (MACIEL et al., 2009; CAVICHIOLI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013) e raros são aqueles que quantificam a severidade pelo índice de doença (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012).

As espécies silvestres de *Passiflora* são fontes naturais de genes de resistência e por serem consideradas nativas apresentam estruturas pré-formadas e fitoconstituintes que estão associados a defesa vegetal (PATIL; PAIKRÃO, 2012). Sakalem et al. (2012), identificaram que a composição química de extratos hidroetanólicos da espécie silvestre *Passiflora bahiensis*, mostraram a presença de flavonas, um ácido derivado de feruloilquímicos e glicosídeos cianogênicos. Estes compostos estão associados à resistência contra patógenos e herbívoros, sendo considerado um importante mecanismo de resistência bioquímica pré-formada (SAKALEM et al., 2012; PATIL; PAIKRÃO, 2012). Diversos estudos realizados com espécies silvestres de *Passiflora* têm revelado variabilidade para resistência aos principais fitopatógenos que acometem a cultura do maracujazeiro (FLORES et al., 2012; SILVA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2015) tornando-as uma importante fonte de genes de resistência que podem ser transferidos para a espécie comercial, a exemplo da *P. edulis* f. *flavicarpa*. Desta forma, destaca-se a importância da identificação de fontes de resistência ao CABMV nessas espécies e em acessos conservados em bancos de germoplasma, para direcionar ações de melhoramento genético via hibridação interespecífica (SANTOS et al., 2014; 2015; FREITAS et al., 2015a; MELO et al., 2015).

A incidência da virose verificada nos 80 genótipos de *Passiflora* ssp. oscilou de 0,00 a 100%, sendo que nove genótipos apresentaram 0,0% de incidência, 66 genótipos com 100% de incidência e 14 genótipos apresentaram incidência menor que 100%, devido a presença de plantas assintomáticas dentro das repetições avaliadas (Tabela 3). Nos genótipos avaliados não há uma relação entre incidência e severidade, haja vista que as plantas podem ter 100% de incidência, mas apresentarem mosaico leve (nota 2) ao longo das observações. Apesar disso, os relatos de Cavichioli et al. (2011), afirmam que o desenvolvimento das plantas e o aumento na incidência da virose resultam em maior severidade nas plantas com o passar do tempo.

Considerando à reação dos genótipos de *Passiflora* spp. à severidade da virose estimada pelo índice de doença (ID%), observou-se que 34 genótipos apresentaram algum nível de resistência ao CABMV, sendo que desse total, 15 genótipos (18,75%) foram classificados como resistentes com ID variando de 0,00 a 8,61%, e 19 genótipos (23,75%) foram considerados moderadamente

resistentes, com ID entre 17,34 a 27,19%. Por outro lado, 48 indivíduos apresentaram certo grau de suscetibilidade ao CABMV, sendo 29 (36,25%) classificados como moderadamente suscetível, com ID variando de 29,06 a 43,77%, oito genótipos (10%) considerados suscetíveis (ID de 45,58 a 62,70%) e nove (11,25%) comportaram-se como altamente suscetíveis ao CABMV com ID oscilando de 69,51 a 90,50% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Severidade da virose do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV) em 80 genótipos de maracujazeiros.

Genótipo*	Espécie**	Inc (%)	Índice de doença (%) - 55 DAI***			Reação#
			Min.	Máx.	ID (%)	
BGP014	<i>Ps</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP077	<i>Pc</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP112	<i>Ps</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP134	<i>Ps</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP143	<i>Ps</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP152	<i>Ps</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP170PA	<i>Pb</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP188	<i>Pe</i>	17	0,00	3,70	0,56e	R
BGP200	<i>Pc</i>	12	0,00	6,45	0,78e	R
BGP238	<i>Pc</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP268	<i>Pc</i>	38	0,00	30,00	8,24e	R
BGP413	<i>Pc</i>	0	0,00	0,00	0,00e	R
BGP414	<i>Pg</i>	14	0,00	20,00	3,27e	R
H0930	<i>Pe</i>	80	0,00	7,69	6,03e	R
Seleção 2	<i>Pe</i>	100	2,78	16,67	8,61e	R
BGP032	<i>Pe</i>	100	16,67	37,04	22,84d	MR
BGP037	<i>Pe</i>	100	20,00	33,33	27,19d	MR
BGP051	<i>Pe</i>	100	4,17	22,22	17,34d	MR
BGP061	<i>Pe</i>	100	10,26	25,64	19,83d	MR
BGP107	<i>Pmf</i>	100	15,79	28,79	24,27d	MR
BGP123	<i>Pe</i>	100	12,28	33,33	20,70d	MR
BGP189xBGP345	<i>Pe</i>	100	4,17	33,33	19,72d	MR
BGP222	<i>Pe</i>	100	11,11	24,07	18,78d	MR
BGP224	<i>Pe</i>	100	10,14	33,33	20,94d	MR
BGP227	<i>Pc</i>	100	10,53	37,50	25,86d	MR
BGP324	<i>Pe</i>	100	17,46	31,67	22,01d	MR
BGP341	<i>Pe</i>	100	15,38	38,10	23,79d	MR
BGP345	<i>Pe</i>	100	20,00	46,67	26,28d	MR
BGP351	<i>Pe</i>	100	12,50	47,22	25,62d	MR
BGP394	<i>Pst</i>	100	3,27	35,35	22,11d	MR
BGP415	<i>Pmf</i>	100	15,08	29,89	26,01d	MR
BGP418	<i>Pe</i>	100	11,11	28,57	20,71d	MR
BGP428	<i>Pe</i>	100	2,56	30,56	19,16d	MR
BGP005	<i>Pe</i>	100	23,33	41,67	29,64c	MS
BGP031	<i>Pe</i>	100	18,52	47,22	29,91c	MS
BGP064	<i>Pe</i>	100	15,69	66,67	41,79c	MS
BGP128	<i>Pe</i>	100	17,78	46,03	30,07c	MS

Tabela 3. Cont....

Genótipo*	Espécie**	Inc (%)	Índice de doença (%) - 55 DAI***			Reação#
			Min.	Máx.	ID (%)	
BGP165	Pe	100	19,05	41,03	29,06c	MS
BGP177	Pe	100	22,22	36,11	30,39c	MS
BGP185	Pe	100	26,32	44,44	38,10c	MS
BGP189	Pe	100	20,83	56,41	42,98c	MS
BGP205	Pe	100	30,30	51,85	43,77c	MS
BGP210	Pe	100	20,00	47,62	31,64c	MS
BGP221	Pe	100	25,00	38,10	30,99c	MS
BGP325	Pe	100	28,21	63,33	42,53c	MS
BGP330	Pe	100	30,30	48,33	39,95c	MS
BGP334	Pe	100	20,37	54,55	35,70c	MS
BGP379	Pml	100	23,81	54,17	41,78c	MS
BGP395	Pf	100	24,24	36,36	30,55c	MS
BGP400	Pe	100	19,05	45,45	36,13c	MS
BGP424	Pe	100	25,64	45,83	37,50c	MS
BGP425	Pe	100	3,33	29,63	18,46c	MS
H0910	Pe	100	7,41	48,48	32,50c	MS
RC2-44-P3x224	Pe	100	16,67	43,59	36,02c	MS
RC2-44-P8x185	Pe	100	28,21	50,00	38,85c	MS
RC2-44-P8x222	Pe	100	12,82	38,46	31,31c	MS
RC2-45-P10x223	Pe	100	15,56	46,15	30,61c	MS
RC2-45-P14x223	Pe	100	30,30	43,59	34,81c	MS
RC2-45-P14x224	Pe	100	25,64	36,11	30,90c	MS
RC2-45-P18PA	Pe	100	23,33	53,33	37,18c	MS
RC2-45-P8x222	Pe	100	33,33	50,00	41,56c	MS
RC2-57-P8x224	Pe	100	26,39	45,45	36,98c	MS
Seleção 1	Pe	100	25,93	33,33	29,93c	MS
BGP190	Pe	100	29,41	56,14	45,58b	S
BGP223	Pe	100	23,33	70,83	52,69b	S
BGP327	Pe	100	35,29	71,43	47,94b	S
BGP328	Pe	100	33,33	66,67	48,75b	S
BGP393	Pa	100	40,00	73,33	62,70b	S
H0902	Pe	100	23,08	100,00	50,62b	S
H0907	Pe	100	30,95	63,33	47,16b	S
HFOP05	Pe	100	25,00	54,55	47,30b	S
BGP160	Pli	100	60,00	80,00	80,33a	AS
BGP396	Pe	100	44,93	91,67	76,93a	AS
BRS Gigante Amarelo	Pe	100	60,00	100,00	81,43a	AS
BRS Rubi do Cerrado	Pe	100	55,56	100,00	84,04a	AS
BRS Sol do Cerrado	Pe	100	52,38	100,00	90,50a	AS
FB300	Pe	100	61,90	100,00	84,94a	AS
H0914	Pe	100	57,14	88,89	77,78a	AS
HFOP08	Pe	100	42,86	85,71	78,22a	AS
HFOP09	Pe	100	39,39	100,00	69,51a	AS

\*Registro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. \*\*Pm - *Passiflora malacophylla*; Pe - *P. edulis*; Ps - *P. suberosa*; Pc - *P. cincinnata*; Pse - *P. setacea*; Pmf - *P. morifolia*; Pli - *P. ligularis*; Pml - *P. maliformes*; Pa - *P. alata*; Pst - *P. subrotunda*; Pf - *P. foetida*; Pg - *P. gibertii*. Inc (%) – Incidência; ID (%) – índice de doença. \*\*\*Dias após inoculados. #R – resistente; MR – moderadamente resistente; MS – moderadamente suscetível; S – suscetível; AS – altamente suscetível. Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

No caso específico dos genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, observou-se comportamento diferenciado dentro e entre, com grande amplitude na severidade da virose do endurecimento dos frutos, com variação de 0,56 a 90,50% (Tabela 3). Os genótipos BGP188, H09-30 e Seleção-2, apresentaram sintomas leves da doença ao longo das diferentes observações, com valores de severidade de 0,56, 6,03 e 8,61%, respectivamente (Tabela 3). Isto indica que a variabilidade genética de *P. edulis* f. *flavicarpa* pode ser explorada para seleção de fontes de resistência ao CABMV. Os resultados observados neste trabalho são corroborados por outros autores que também observaram ampla variação nos sintomas de CABMV na espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, classificando-a como moderadamente resistente a altamente suscetíveis (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; VIANA et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

As maiores estimativas de índice de doença foram observadas para os híbridos intraespecíficos de *P. edulis* f. *flavicarpa* como BRS Sol do Cerrado, FB300, BRS Rubi do Cerrado e BRS Gigante Amarelo, com 90,50%, 84,94, 84,04 e 81,43, respectivamente, sendo, portanto, classificados como altamente suscetíveis (Tabela 3).

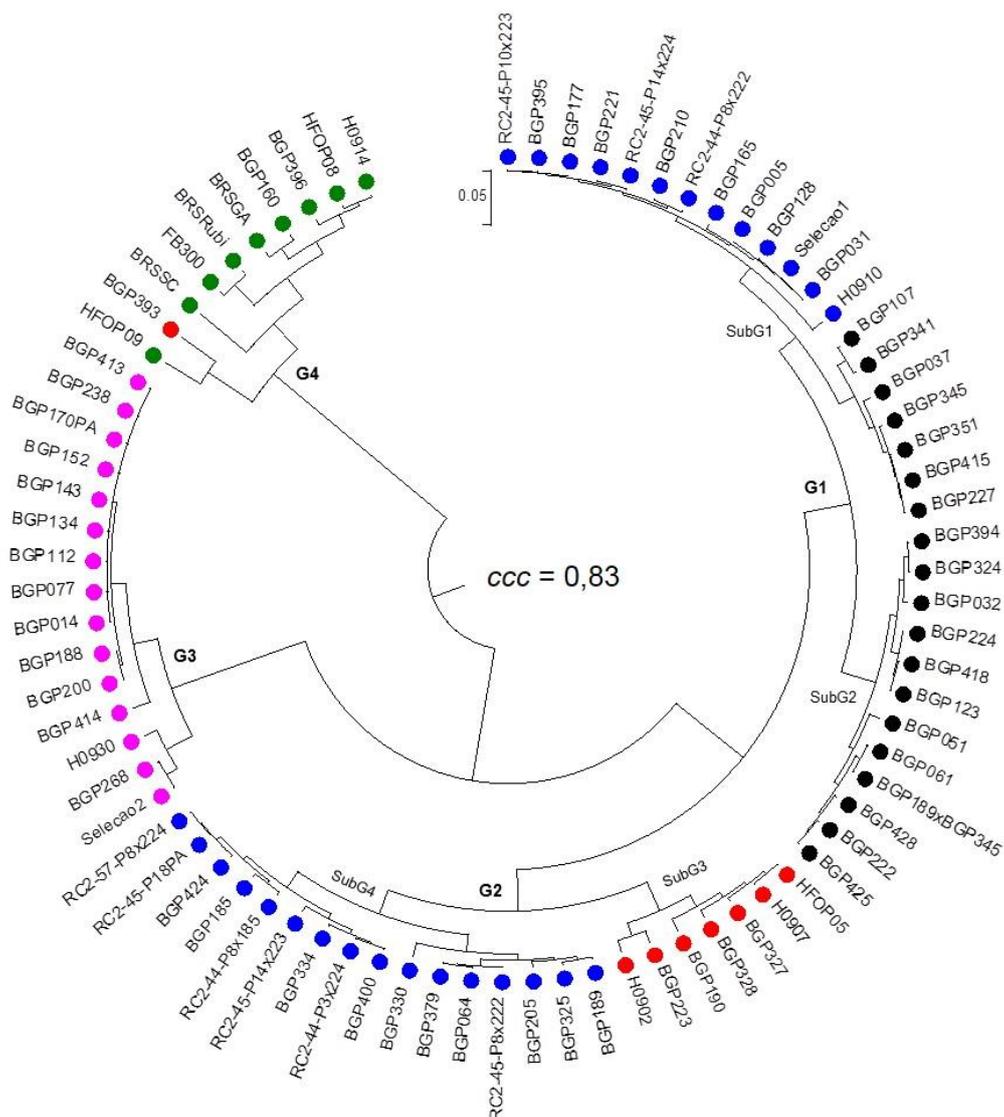
Considerando-se o fato que os cruzamentos intraespecíficos, em geral, são promovidos para ampliar a variabilidade genética para atributos agrônômicos e de resistência às doenças no maracujazeiro comercial, verificou-se que no presente estudo os híbridos comerciais avaliados não apresentaram resistência ao isolado CABMV da Bahia. Todavia, o genótipo BGP188 pertencente à espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* identificado como resistente à virose poderá ser incorporado aos programas de hibridação intraespecífica na tentativa de incluir alelos de resistência em híbridos comerciais.

Importante salientar que foram observadas plantas assintomáticas ao CABMV nas espécies *P. suberosa* (BGP014, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152), *P. cincinnata* (BGP077, BGP238 e BGP413) e *P. malacophylla* (BGP170PA) (Tabela 3). Oliveira et al. (2013), também identificaram genótipos de *P. cincinnata* (BGP275, BGP292 e BGP342) resistentes ao CABMV. Estes genótipos também poderão ser utilizados em blocos de cruzamentos com espécies comerciais de maracujazeiros (*P. edulis* f. *flavicarpa*) visando incorporar resistência.

No presente estudo, alguns híbridos interespecíficos da segunda geração de retrocruzamentos – RC2 [*P. edulis* (BGP330) x *P. cincinnata* (BGP077) x *P. edulis*] apesar de possuírem genitores contrastantes quanto à resistência, BGP330 com ID de 39,95% (suscetível) e BGP077 (resistente) com ID de 0,00%, foram consideradas moderadamente suscetíveis (ID variando de 30,61 a 41,56%). Fonseca et al. (2009) relataram a possibilidade de sucesso na transferência dos genes de resistência do genitor doador na geração F<sub>1</sub>, embora ocorra a perda da resistência ao longo dos retrocruzamentos, possivelmente associada à herança poligênica do caráter (FONSECA et al., 2009; FREITAS et al., 2015a). Desse modo, nem todos os alelos de resistência são incorporados nos indivíduos oriundos dos retrocruzamentos, pois na tentativa de recuperar o genoma do genitor recorrente (*P. edulis*), ao menos em parte, a resistência pode ser perdida, à medida que novos retrocruzamentos são realizados (JUNQUEIRA et al., 2005).

A análise de cluster apresentou coeficiente de correlação cofenética de 0,83, evidenciando ajuste adequado entre a representação gráfica das distâncias e a matriz original (Figura 3). Valor semelhante de 'ccc' foi também encontrado por (FREITAS et al., 2015b).

A análise de agrupamento subdividiu os 80 genótipos de *Passiflora* spp. em quatro grupos (Figura 3). O grupo 1 (representadas pelas cores azul e preto), é composto por 32 genótipos, os quais foram classificados como moderadamente suscetíveis (subgrupo 1, azul) e moderadamente resistentes (subgrupo 2, preto). O grupo 2 (vermelho e azul), representado por 23 genótipos, foram constituídos por genótipos suscetíveis (subgrupo 3, vermelho) e moderadamente suscetíveis (subgrupo 4, azul). Porém, o grupo moderadamente suscetível, representado por 29 genótipos pelo teste Scott-Knott, na análise de agrupamento indicado pelo dendograma revelou a divisão desta classe em dois subgrupos, sendo um próximo aos genótipos moderadamente resistentes (subgrupo 2, preto) e o outro aos genótipos suscetíveis (subgrupo 3, vermelho). O genótipo BGP393, classificado no teste de média como suscetível foi alocado nesta análise como altamente suscetível (grupo 4). No grupo três (rosa), foram alocados 15 genótipos classificados com resistentes, e por fim, o grupo quatro (verde) onde foram agrupados os 10 genótipos altamente suscetíveis.



**Figura 3.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento dos 80 genótipos de *Passiflora* spp. obtidos pelo índice de Gower e método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) com base nos valores médios do Índice de Doença (ID%) avaliado aos 55 DAI. As diferentes cores no dendrograma representam os diferentes grupos definidos pelo teste de média de Scott-Knott (Tabela 2): azul (subgrupo 1 e subgrupo 4, moderadamente suscetível), preto (subgrupo 2, moderadamente resistente), vermelho (subgrupo 3, suscetível), rosa (grupo 3, resistente) e verde (grupo 4, altamente suscetível).

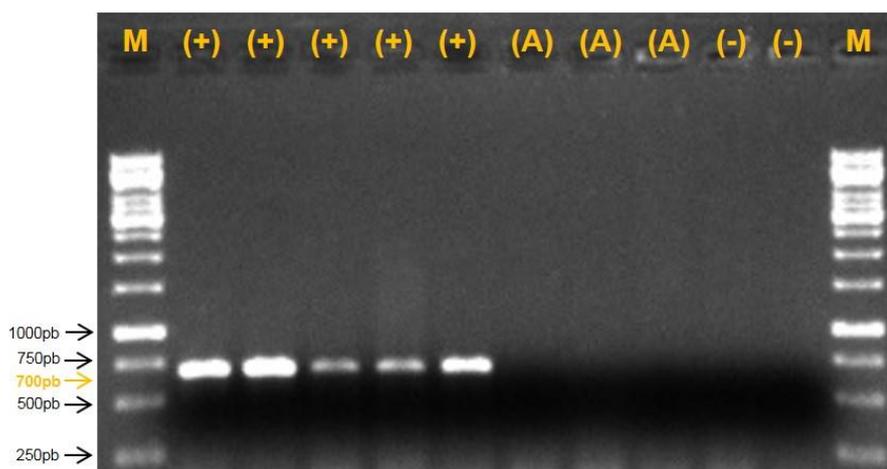
A variação observada nos genótipos de maracujazeiro quanto à severidade do CABMV pode estar associada à variabilidade genética do gênero *Passiflora*, considerando a presença de auto-incompatibilidade e polinização cruzada (PINTO et al., 2008). Destaca-se também, que as

inconsistências entre espécies do nível de resistência nos genótipos avaliados podem ser atribuídas a fatores como idade das plantas, agressividade do patógeno, mecanismos de resistência inerentes de cada genótipo ou até mesmo condições ambientais, que influenciam na expressão dos sintomas da doença (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2015).

### **3.1 Detecção molecular do CABMV nas plantas inoculadas**

O RT-PCR permitiu a amplificação de fragmentos genômicos correspondentes à região de inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) de aproximadamente 700 pb em todas as plantas sintomáticas, enquanto nas plantas controle (negativo) e assintomáticas não houve amplificação deste fragmento (Figura 4). O RT-PCR é comumente utilizado para detectar isolados de *Potyvirus* em maracujazeiro (BARROS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015). Vale destacar, que as plantas assintomáticas não foram consideradas nas análises de variância que pudessem associar a resistência genética dos genótipos ao teste de RT-PCR.

Apesar de não ter sido realizado o sequenciamento dos *amplicons*, a análise molecular com uso de iniciadores específicos para espécies de *Potyvirus*, indica tratar-se do CABMV. Estes resultados permitem confirmar que o isolado predominante nos campos de produção do município de Cruz das Almas, BA, Brasil, pertencem à espécie CABMV, o que cria subsídios necessários para a caracterização e ocorrência, e ao mesmo tempo confirmado pelos relatos de Nicolini et al. (2012), Rodrigues et al. (2015), Freitas et al. (2015a), Melo et al. (2015), que indicaram que no Brasil o endurecimento dos frutos do maracujazeiro está essencialmente associado ao CABMV.



**Figura 4.** Análise de RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) para detecção do fragmento genômico correspondente a região de inclusão cilíndrica (CI) do CABMV (*Cowpea aphid borne mosaic virus*) de aproximadamente 700 pb. (+) ‘pools’ de amostras foliares inoculadas sintomáticas, (A) ‘pools’ das plantas assintomáticas, e, (-) controles negativos. Agarose 1%. M= Marcador Molecular (DNA Ladder 1Kb – Fermentas).

A não amplificação do fragmento genômico do CABMV nas plantas inoculadas e assintomáticas podem ser um indicativo de resistência, baixa multiplicação do vírus nas plantas, impossibilitando sua detecção por RT-PCR, e/ou falhas na inoculação também pode ser levada em consideração, porém é importante destacar que as mudas foram inoculadas duas vezes (intervalo de quatro dias) e em duas folhas distintas, o que reduziu em muito o risco de escapes. Além desses fatores, a ação de microRNAs (miRNA) na promoção do silenciamento de RNA ou silenciamento gênico pós-transcricional também pode ser levado em consideração para explicar a ocorrência de plantas assintomáticas (MENG et al., 2011; FELIPPES et al., 2012; PANTALEO et al., 2016).

Freitas et al. (2015a) observaram plantas assintomáticas pelo teste PTA-ELISA, ao avaliarem populações segregantes de *Passiflora* em condições de campo a severidade do CABMV. De forma semelhante, Santos et al. (2015) e Oliveira et al. (2012), observaram diversas plantas assintomáticas de maracujazeiro quanto aos sintomas de viroses. Estes autores discutem que a presença ou ausência de sintomas nas plantas, podem estar associadas a fatores como baixa agressividade do isolado utilizado, sinergismo viral,

genótipos testados e condições ambientais. Estes autores, também relataram que estes fatores em conjunto com ação dos miRNAs, podem explicar a ocorrência de plantas assintomáticas.

Os miRNAs desempenham importantes funções antivirais, pois regulam ou degradam sequências específicas dos RNAs virais alvos, sendo considerado como uma resposta adaptativa que protege as plantas da invasão viral (DENG et al., 2013; SARKIES; MISKA, 2014; CRUZ et al., 2014; YIN et al., 2015). Mecanismos que levam ao silenciamento de RNA pela ação dos miRNAs ainda são relatados em outras culturas, porém novas pesquisas são requeridas para a averiguação de tais mecanismos e a resistência de plantas de maracujazeiros a viroses.

#### 4. CONCLUSÕES

- a) Houve ampla variação no nível de resistência dos genótipos, indicando a existência de variabilidade genética para a severidade do CABMV em condições controladas.
- b) Os genótipos BGP014, BGP077, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170PA, BGP238 e BGP413 pertencentes às espécies *P. suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. gibertii* apresentaram resistência ao (CABMV) podendo ser utilizadas como parentais em cruzamentos interespecíficos com as espécies comerciais *P. edulis* e *P. alata* consideradas suscetíveis ao CABMV.
- c) O genótipo BGP188 pertencente à espécie de *P. edulis*, identificado como resistente a virose tem potencial de uso em programas de hibridação interespecífica.

## REFERÊNCIAS

BARROS, D.R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA Jr, J.E.A.; ANTUNES, T.F.S.; ZERBINI, F.M. Comparative analysis of *the genomes of two isolates of Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV)* obtained from different hosts. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1085-1091, 2011.

BARROS, D.R.; BESERRA, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; PIORIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Complete genomic sequence of two isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV)* obtained from different hosts. **Virus Review & Research**, v. 12, p. 238-239, 2007.

CASTRO, J.A.; NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 145, p. 17-22, 2012.

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

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A. P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, v. 202, p. 345-359, 2015.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MELO, J.R.F.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. **European Journal Plant Pathology**, v. 134, p. 489-495, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MOREIRA, C.N.; FIGUEIRA, A.R.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. Detection of resistance gradient to the passion fruit

woodiness virus and selection of 'yellow' passion fruit plants in field conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1209-1216, 2008.

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

CRUZ, A.R.R.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-based enhanced resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid borne mosaic virus* in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, p. 831-837, 2014.

CRUZ, C.D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.

DENG, L.; PAN, Y.; CHEN, X.; CHEN, G.; HU, Z. Small RNAs were involved in homozygous state-associated silencing of a marker gene (Neomycin phosphotransferase II: nptII) in transgenic tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 68, p. 8-15, 2013.

DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2006.

FELIPPES, F.F.; WANG, J.W.; WEIGEL, D. MIGS: miRNA-induced gene silencing. **The Plant Journal**, v. 70, p. 541-547, 2012.

FISCHER, I.H.; RESENDE, J.A. M. Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, v. 2, p. 1-19, 2008.

FLORES, P.S.; OTONI, W.C.; DHINGRA, O.D.; DINIZ, S.P.S.S.; SANTOS, T.M.; BRUCKNER, C.H. Selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to fusarium vascular wilt. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 37-45, 2012.

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; SILVA, M.S.; VAZ, C.D.E.F. Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 145-153, 2009.

FREITAS, J.C.O.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; PAIVA, C.L.; SILVA, F.H.L.; AMARAL JR, A.T.; SOUZA, M.M.; DIAS, V.M. Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. **Euphytica**, v. 208, p. 493-507, 2015b.

FREITAS, J.C.O.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, F.H.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M.M.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV). **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 291-297, 2015a.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 520-524, 2008.

GOWER JC. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, p. 857-874, 1971.

HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.A.; HARDING, R.M.; VU, M.; DALE, J.L. Design and application of two novel degenerate *primer* pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 25-36, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Banco de dados agregados**. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2015. Disponível em. <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em Jan de 2016.

LAWINSCKY, P. R.; SOUZA, M. M.; BELO, G. O.; VIANA, A. J. C.; MELO, C. A. F.; OLIVEIRA, C. S. L. Morphological characterization and genetic diversity

in *Passiflora alata* Curtis and *P. cincinnata* Mast. (Passifloraceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, p. 261-272, 2014.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; RESENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 414-418, 2009.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v. 26, p. 195-218, 1923.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; AZEVEDO FILHO, J.D.; MARTINS, A.L.M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 275-278, 2003.

MELO, J.R.F.; FIGUEIRA, A.R.; MOREIRA, C.N.; OLIVEIRA, A.C. Recent characterization of *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 735-744, 2015.

MENG, Y.; SHAO, C.; WANG, H.; CHEN, M. The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. **Plant Physiology**, v. 157, p. 95, 2011.

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

NICOLINI, C.; RABELO FILHO, F.A.C; RESENDE, R.O.; ANDRADE, G.P; KITAJIMA, E.W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. Possible Host Adaptation as

an Evolution Factor of *Cowpea aphid borne mosaic virus* Deduced by Coat Protein Gene Analysis. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 82-87, 2012.

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

OLIVEIRA, C.R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NOGUEIRA, M.S.R.; BARROS, G.B.; EIRAS, M.; RIBEIRO, V.Q.; LOPES, A.C.A. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic vírus*. **Bragantia**, v. 71, p. 59-66, 2012.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.D.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Disease severity from passion fruit to identify sources of resistance in field conditions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 485-492, 2013.

PANTALEO, V.; VITALI, M.; BOCCACCI, P.; MIOZZI, L.; CUOZZO, D.; CHITARRA, W.; GAMBINO, G. Novel functional microRNAs from virus-free and infected *Vitis vinifera* plants under water stress. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-14, 2016.

PATIL, A.S.; PAIKRAO, H.M. Bioassay guided phytometabolites extraction for screening of potent antimicrobials in *Passiflora foetida* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 137-142, 2012.

PEREIRA, D.A., CORRÊA, R.X., OLIVEIRA, A.C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, 12-21, 2015.

PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.D.O.; MATTOS, J.K.D.A.; MELO, B.D. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo

ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v. 24, p. 19-26, 2008.

RAMAIYA, S.D.; BUJANG, J.S.; ZAKARIA, M. H. Genetic diversity in *Passiflora* species assessed by morphological and ITS sequence analysis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

RODRIGUES, L.K.; SILVA, L.A.; GARCÊZ, R.M.; CHAVES, A.L.; DUARTE, L.M.; GIAMPANI, J.S.; EIRAS, M. Phylogeny and recombination analysis of Brazilian yellow passion fruit isolates of *Cowpea aphid borne mosaic virus*: origin and relationship with hosts. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, p. 31-41, 2015.

SAKALEM, M.E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1219-1232, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning.2 ed. **Cold Spring Harbor Press**, New York, 1989.

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; FREITAS, J.C.O.; SOUZA, M.M.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, D.L.; TAVARES, R.F. Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 9828-9845, 2014.

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; OLIVEIRA FREITAS, J.C.; LIMA, F.H.; RODRIGUES, R.; EIRAS, M. Resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 85-98, 2015.

SARKIES, P.; MISKA, E. A. Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 525-535, 2014.

SILVA, A.D.S.; OLIVEIRA, E.J.D.; HADDAD, F.; LARANJEIRA, F.F.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, S.A.S.D.; FREITAS, J.P.X.D. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 236-242, 2013.

SOARES, T.L.; JESUS, O.N.; SOUZA, E.H.; OLIVEIRA, E.J. Reproductive biology and pollen–pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 339-349, 2015.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

VIANA, C.A.S.; PIRES, M.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BLUM, L.E.B. Resistência parcial de genótipos de maracujá-azedo à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v.30, p.338-345, 2014.

YIN, K.; TANG, Y.; ZHAO, J. Genome-Wide characterization of miRNAs involved in N gene-mediated immunity in response to *Tobacco Mosaic Virus* in *Nicotiana benthamiana*. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 11, p. 1-11, 2015.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância mundial da cultura do maracujazeiro e a inexistência de cultivares resistentes ao CABMV, os Capítulos 1 e 2 contribuirão de forma efetiva para elaboração de estratégias mais objetivas de avaliação de germoplasma (Capítulo 1), bem como para geração de novas cultivares que apresentem resistência ao CABMV (Capítulo 2).

Os resultados oriundos do Capítulo 1 podem auxiliar na tomada de decisões ao tempo necessário de avaliação em diferentes espécies de *Passiflora* e na identificação de pontos em que a doença é mais severa, o que indicaria a época ideal para seleção dos genótipos. Adicionalmente, os eventos epidemiológicos estabelecidos pela curva de progresso da doença, permitiu um melhor entendimento sobre a dinâmica temporal da doença após a inoculação dos genótipos. Para o programa de melhoramento genético de maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, estes resultados foram de suma importância para adotar medidas futuras de avaliação do germoplasma, visto que novas fenotipagens de acessos do Banco de germoplasma podem ser realizadas de forma efetiva seguindo os aspectos abordados neste Capítulo.

Especificamente no Capítulo 2, a variabilidade genética para as espécies avaliadas à severidade do CABMV pode ser explorada para indicação de cruzamentos para geração de populações segregantes para resistência a esta importante virose do maracujazeiro. Os genótipos BGP014, BGP077, BGP112, BGP134, BGP143, BGP152, BGP170PA, BGP238 e BGP413, pertencentes às espécies de *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. gibertii*, apresentaram resistência completa (ID = 0,00%), tendo, portanto, forte apelo para uso em programas de hibridação interespecífica. Por outro lado, o genótipo BGP188 pertencente à espécie de *P. edulis* f. *flavicarpa*, também foi considerado resistente, sendo assim uma fonte de genes para os programas de hibridação intraespecífica.

As ferramentas utilizadas para avaliação da reação dos maracujazeiros ao CABMV foram bastante acuradas para discriminar as diferentes reações dos genótipos avaliados, além de permitir uma rápida fenotipagem do germoplasma de *Passiflora* spp.