**SELEÇÃO DE ESTIRPES FRACAS DO *PASSION FRUIT*
WOODINESS VIRUS E TENTATIVAS DE PREMUNIZAÇÃO PARA
O CONTROLE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO
MARACUJAZEIRO**

QUELMO SILVA DE NOVAES

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho – 2002

**SELEÇÃO DE ESTIRPES FRACAS DO *PASSION FRUIT*
WOODINESS VIRUS E TENTATIVAS DE PREMUNIZAÇÃO PARA
O CONTROLE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO
MARACUJAZEIRO**

QUELMO SILVA DE NOVAES
Engenheiro Agrônomo

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

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Novaes, Quelmo Silva de

Seleção de estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus* e tentativas de premunização para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro / Quelmo Silva de Novaes. - Piracicaba, 2002.

74 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Doença de planta 2. Endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro 3. Maracujá 4. Virose vegetal 5. Vírus de planta I. Título

CDD 634.425

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A meus pais, Heleno e Carmosina,
meus irmãos, Juca e Núbia,
pelo apoio e compreensão,
com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela constante presença em nossas vidas;

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende, pela orientação desta tese; pelo incentivo, confiança, paciência e amizade e pela grande contribuição na minha vida profissional;

Ao técnico José Edivaldo Buriolla, pelo auxílio prestado no Laboratório de Virologia Vegetal e nos trabalhos de casa de vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP;

Ao Sr. Pedro C. Arthuso, pelo auxílio nos trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação e em campo no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP;

Ao Prof. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela concessão de uso do Laboratório de Genética Molecular do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, para os trabalhos de sequenciamento e a Daniela Truffi e Giovana Camarotte pela grande ajuda prestada na realização destes trabalhos;

À Associação dos Fruticultores de Vera Cruz (AFRUEC) pelo fornecimento das sementes de maracujazeiro utilizadas neste trabalho;

Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade surgida durante a elaboração deste trabalho;

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, por todo o apoio durante a realização deste estudo e em especial aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal, Danilo Pedrazzoli, Davi Pacheco, José Giampan, Juliana Freitas-Astua, Louise Mota, Luiz Rabelo, Marília Della Vecchia, Paulo Oliveira, Ricardo Gioria e Zayame Pinto;

Aos amigos Guilherme, Heloisa, Renato, Célia e Marcel por todo apoio e conselhos dados durante a minha permanência em Piracicaba e que se fizeram presentes em todos os momentos, não só de alegrias mas também de dificuldades;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos durante o curso de Doutorado;

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

Finalmente, agradeço à minha família e a Luciana Castro, por todo o carinho, incentivo e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Plantas-teste	10
3.2 Estirpe do vírus	10
3.3 Métodos de inoculação	10
3.3.1 Mecânica.....	10
3.3.2 Com afídeos	11
3.4 Superinoculação com estirpe severa do PWV	11
3.5 Escala de notas de sintomas	12
3.6 DAS-ELISA indireto	12
3.7 Procura de estirpes fracas do PWV	13
3.7.1 A partir de plantas de elite em campo.....	13
3.7.2 A partir de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico.....	14
3.7.3 A partir de lesões locais	15
3.8 Indexação das plantas e seleção de estirpes fracas	16
3.9 Teste do efeito protetor das estirpes fracas do PWV em casa de vegetação	16
3.9.1 Em maracujazeiro.....	16
3.9.2 Em crotalária	17

3.10 Teste do efeito protetor das estirpes fracas do PWV em campo	18
3.10.1 Em maracujazeiro	18
3.10.2 Em crotalária	20
3.11 Quantificação do PWV em diferentes folhas das plantas	21
3.11.1 Em maracujazeiro	21
3.11.2 Em crotalária	22
3.12 Caracterização molecular do gene da capa protéica das estirpes fracas e severa do PWV	23
3.12.1 Extração de RNA total	23
3.12.2 Síntese de DNA complementar por RT-PCR	24
3.12.3 Ligação dos fragmentos do produto da RT-PCR ao plasmídeo vetor.....	25
3.12.4 Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i> para transformação.....	25
3.12.5 Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo vetor recombinante	26
3.12.6 Extração de DNA plasmidial.....	28
3.12.7 Sequenciamento	29
3.12.8 Análise do sequenciamento	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Estirpes fracas do PWV	31
4.1.1 Selecionadas a partir de plantas de elite em campo	31
4.1.2 Selecionadas a partir de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico.....	31
4.1.3 A partir de lesões locais	34
4.2 Efeito protetor das estirpes fracas do PWV em casa de vegetação	35
4.2.1 Em maracujazeiro	35
4.2.2 Em crotalária	37
4.3 Efeito protetor das estirpes fracas do PWV em campo.....	39
4.3.1 Em maracujazeiro	39
4.3.2 Em crotalária	43

4.4 Concentração das estirpes fracas do PWV em folhas de maracujazeiro.....	46
4.5 Concentração das estirpes fracas do PWV em folhas de crotalária	49
4.6 Seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos do gene da capa protéica das estirpes fracas e severa do PWV	52
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

SELEÇÃO DE ESTIRPES FRACAS DO *PASSION FRUIT* WOODINESS VIRUS E TENTATIVAS DE PREMUNIZAÇÃO PARA O CONTROLE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO MARACUJAZEIRO

Autor: QUELMO SILVA DE NOVAES

Orientador: Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo selecionar estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus* (PWV) e avaliar o seu efeito protetor para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Foram selecionadas seis estirpes fracas do PWV. Três a partir de plantas de elite, encontradas em pomares severamente afetados pelo vírus (F-101, F-102 e F-103) e três a partir de bolhas formadas em folhas de maracujazeiro com mosaico (F-99, F-144 e F-145). O efeito protetor das estirpes fracas foi avaliado em maracujazeiros, em casa de vegetação e em campo. Em casa de vegetação foi observada uma proteção parcial das estirpes F-101, F-102 e F-144, contra a estirpe severa PWV-SP. Em campo, num primeiro experimento, as seis estirpes fracas selecionadas foram avaliadas e aproximadamente 4 meses após o desafio com a estirpe PWV-SP, todas as plantas apresentaram sintomas severos da doença. Diante da proteção parcial em casa de vegetação e da ausência total de

proteção no experimento de campo, duas hipóteses foram apresentadas para explicar a intensificação de sintomas em maracujazeiros premunizados e desafiados com a estirpe severa do vírus: a) a ocorrência de baixa concentração e/ou distribuição irregular das estirpes fracas nos tecidos das plantas premunizadas permite a infecção e estabelecimento da estirpe severa posteriormente inoculada e b) as estirpes fracas selecionadas são de uma espécie diferente de Potyvirus, serologicamente relacionada com o PWV, mas que não oferecem proteção contra a estirpe severa deste último. A primeira hipótese foi estudada repetindo-se o experimento com maracujazeiros premunizados com as estirpes F-101 e F-144, separadamente, e cultivados em campo sob condições de telado. Antes do desafio, foram feitos estudos quantitativos das estirpes F-101 e F-144, em diferentes folhas das plantas, através do DAS-ELISA indireto. Foi observada uma grande variação na concentração das estirpes fracas nos tecidos de diferentes folhas da mesma planta. Em 68,3 %, de 300 discos foliares, as estirpes fracas não foram detectadas pelos critérios adotados nessa investigação. Mais uma vez todas as plantas premunizadas e desafiadas apresentaram sintomas severos da doença, quatro meses após o desafio. A segunda hipótese foi estudada através de testes de proteção em plantas de crotalária premunizadas com as estirpes F-101 e F-144 e da análise da seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica das estirpes F-101, F-103 e PWV-SP. Nos testes de proteção, todas as plantas premunizadas com as estirpes fracas ficaram protegidas contra a infecção e/ou manifestação dos sintomas causados pela estirpe severa PWV-SP. Estudos quantitativos das estirpes fracas nessa hospedeira revelaram uma maior uniformidade na concentração do vírus nos tecidos foliares. A análise da seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a capa protéica, apontaram identidade de 99,7 % entre as estirpes fracas e de 97,5 % destas com a estirpe severa, mostrando tratarem-se de estirpes do mesmo vírus. Esses resultados mostram que a premunização não parece ser uma alternativa adequada para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro,

devido à falha na proteção. Essa quebra de proteção parece estar relacionada com a baixa concentração e/ou distribuição irregular das estirpes fracas nas folhas do maracujazeiro, que propiciam a existência de sítios de infecção para a estirpe severa posteriormente inoculada.

SEARCH FOR MILD STRAINS OF *PASSION FRUIT WOODINESS VIRUS* (PWV) AND ATTEMPT TO CONTROL THE PASSION FRUIT WOODINESS BY PREIMMUNIZATION

Author: QUELMO SILVA DE NOVAES

Adviser: Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

SUMMARY

The main purpose of this work was to select mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) and to evaluate their protective effect in passion flower (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) challenged with a severe strain of the virus. Three mild strains were selected from outstanding plants found in orchards severely affected by the virus (F-101, F-102 and F-103) and three others were obtained from blisters formed in passion flower leaves with mosaic (F-99, F-144 and F-145). The protective effect of the mild strains was evaluated in passion flower under greenhouse and field conditions. Plants preimmunized with mild strains F-101, F-102 and F-144, under greenhouse conditions, showed partial protection after challenge inoculation with the severe strain PWV-SP. Total absence of protection was observed in passion flower preimmunized with all six mild strains and challenged with PWV-SP in the first field experiment. Due to these results, two hypotheses were raised to explain the intensification of symptoms in passion flower preimmunized with mild strains and challenged with the severe strain of the virus: a) the occurrence of low concentration and/or

irregular distribution of the mild strains in the tissues of the preimmunized plants allow the infection and establishment of the later inoculated severe strain and b) the selected mild strains belong to a different species of Potyvirus, serologically related to PWV, but that do not offer protection against the severe strain of PWV. The first hypothesis was studied in a field experiment with passion flower preimmunized with mild strains F-101 and F-144, separately, and cultivated under screenhouse. Before the challenge inoculation, leaf samples were taken from five leaves of all protected plants and the concentration of the mild strains was estimated by indirect DAS-ELISA. A group of plants was challenged in three expanded leaves of the vine and another group was challenged with viruliferous aphids placed on the tip of the vine. All preimmunized plants showed severe symptoms of the disease, four months after the challenge inoculation. A great variation was observed in the concentration of the mild strains in the tissues of different leaves of the same plant. The ELISA test was not able to detect the mild strains in extracts of 205 out of 300 leaf disks. The second hypothesis was tested with crotalaria plants (*Crotalaria juncea* L.) preimmunized with mild strains F-101 and F-144 and analysis of the nucleotide sequence of the coat protein gene of the F-101, F-103 and PWV-SP strains. All preimmunized crotalaria plants were protected against the infection and/or manifestation of the symptoms caused by the severe strain PWV-SP. Quantitative studies of the mild strains in crotalaria revealed a larger uniformity in the concentration of the virus in the leaves. The analysis of the nucleotide sequence of the coat protein gene pointed out identity of 99.7% among the mild strains. The severe strain shared 97.5 % identity with both mild strains, showing that they are all strains of the same virus. These results showed that preimmunization does not seem to be an appropriate alternative for the control of the passion fruit woodiness disease in passion flower due to the breakdown in protection. Failure in protection seems to be related to the low concentration and/or irregular distribution of the mild strains in the leaves of the passion flower, which allow the occurrence of infection sites available for superinfection with the severe strain.

1 INTRODUÇÃO

A área cultivada com frutíferas vem crescendo de forma constante e eficiente no Brasil, gerando empregos e aumentando a rentabilidade do setor agrícola. Dentre as frutíferas, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) vem sendo cultivado em larga escala no País, que é o maior produtor mundial, com uma área estimada em 35.637 hectares no ano de 1999 (FNP, 2002). As regiões Nordeste e Sudeste são as maiores produtoras, com áreas estimadas em aproximadamente 18.000 e 9.000 ha, respectivamente. Todo o maracujá produzido no Brasil tem sido destinado à produção de suco e à comercialização de frutas frescas.

Os problemas mais comuns que afetam a cultura do maracujazeiro são as pragas e as doenças, entre as quais estão as viroses. Dentre as viroses e anomalias correlatas constatadas em diversas zonas produtoras de maracujá do país, destaca-se aquela causada pelo vírus do endurecimento dos frutos (*Passion fruit woodiness virus* - PWV) (Kitajima et al., 1986). O PWV foi constatado pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá amarelo e *P. alata* Ait, no Estado da Bahia, no final da década de 70 (Chagas et al., 1981 e Yamashiro & Chagas, 1979). Posteriormente, foi relatado nos Estados de Pernambuco (Loreto & Vital, 1983), de Sergipe, do Ceará (Kitajima et al., 1986), de São Paulo (Chagas et al., 1992), de Minas Gerais (São José et al., 1994), do Pará (Trindade et al., 1999) e também no Distrito Federal (Inoue et al., 1995).

Desde a constatação do PWV no Brasil, não são conhecidos trabalhos consistentes de pesquisa que visam o desenvolvimento de medidas

permanentes para o controle do endurecimento dos frutos. Diversas sugestões já foram apontadas, com base em trabalhos realizados em outros países, porém não tem sido aplicadas na prática (Chagas et al., 1992; Kitajima et al., 1986; Novaes & Rezende, 1999 e Rezende, 1994). Entre essas sugestões encontra-se a seleção de plantas resistentes e/ou tolerantes, premunização com estirpes fracas do vírus e práticas culturais que possam minimizar a incidência e a disseminação da doença. Entre as práticas culturais, Gioria et al. (2000) preconizaram a erradicação sistemática de maracujazeiros infectados pelo PWV, durante os 6 a 8 primeiros meses após o transplante, em plantios adensados, parcialmente isolados, como possível forma de reduzir os danos quantitativos e qualitativos causados pela doença. Essa recomendação está baseada em estudos desses autores que mostraram que plantas infectadas tardiamente apresentaram maior índice de área foliar e conseqüentemente maior produção de frutos comerciais.

O presente trabalho teve por objetivo selecionar estirpes fracas do PWV que possam ser usadas no controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro por meio da premunização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro encontrado no Brasil apresenta características semelhantes à daquele descrito na Austrália, onde foi primeiramente relatado (McKnight, 1953). O PWV, como é conhecido internacionalmente, é uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, cujas partículas medem 670 - 750 nm de comprimento por 12 – 15 nm de diâmetro. Apresenta RNA de fita simples, positiva, e produz no citoplasma das células infectadas inclusões lamelares típicas dos *Potyvirus*, na configuração de cata-vento (Van Regenmortel et al., 2000 e Taylor & Greber, 1973).

Estudos recentes, com base em análises comparativas da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína da capa protéica, apontaram homologia de aproximadamente 70 % de alguns isolados do PWV do Brasil com o PWV da Austrália. Por outro lado, comparando-se os isolados brasileiros do PWV com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e o *South African passiflora virus*, encontrou-se homologia de 85 % no mesmo gene (Santana et al., 1999). Considerando-se que valores de homologia desse gene iguais ou superiores a 85 % agrupam os isolados em uma mesma espécie de *Potyvirus* (Van Regenmortel et al., 2000), é provável que estudos adicionais poderão originar futuras alterações taxonômicas no PWV causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil.

A transmissão natural do PWV em campo se dá por meio de afídeos, principalmente pelas espécies *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover (Chagas et al., 1981), sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente

(Taylor & Greber, 1973). Até o momento não se têm relatos de transmissão por sementes em espécies de maracujazeiro, mas o PWV foi transmitido por sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Preto 153 (Costa, 1985). Experimentalmente a transmissão mecânica do PWV é relativamente fácil, sendo transmitido para várias espécies de maracujazeiro, com exceção de *P. suberosa*, que parece ser imune (Costa, 1994). Além do maracujazeiro, o PWV é capaz de infectar sistemicamente *P. vulgaris* (cvs. Preto G-2 e Black Turtle 2), *Canavalia ensiformis* D. C., *C. brasiliensis* Marth., *Crotalaria juncea* L., *Cassia occidentalis* (L.) Link, *Arachis hypogaea* L., *Centrosema pubescens* Benth., entre outras espécies de leguminosas. Em *P. vulgaris* (cvs. Jalo e Manteiga) e outras espécies, como *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn e *C. quinoa* Willd., esse vírus causa apenas lesões locais nas folhas inoculadas.

Maracujazeiros infectados com o PWV apresentam sintomas generalizados de mosaico foliar, com intensidade variável, podendo vir acompanhado de manchas anelares, bolhas, rugosidade e deformações do limbo foliar. As plantas afetadas podem apresentar ainda o crescimento retardado, bem como encurtamento dos entrenós. Os frutos podem ficar deformados e menores do que os produzidos por planta sadia, o pericarpo fica com espessura irregular e consistência endurecida, havendo redução na cavidade da polpa (Pio-Ribeiro & Mariano, 1997 e Rezende, 1994).

O PWV é o vírus de maior incidência em maracujazeiros no Brasil. Em pomares nos estados de São Paulo e do Ceará foram constatadas incidências da ordem de 71,8 e 73,1 %, respectivamente (Gioria et al., 2000 e Lima et al., 1996). Os prejuízos ocasionados por esse vírus na cultura do maracujazeiro são considerados graves na Austrália e em Pernambuco, onde atribuiu-se a ele queda de produtividade, produção de frutas sem valor comercial e redução na vida econômica do pomar (Costa et al., 1995; Pares et al., 1985 e Peasley & Fitzell, 1981). Em São Paulo, estudos quantitativos sobre o efeito do PWV no desenvolvimento e na produção do maracujazeiro foram realizados por Gioria et

al. (2000). Plantas inoculadas com 4 estirpes do PWV, oriundas de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Ceará, em condições de casa de vegetação (ESALQ/USP, Piracicaba), mostraram redução na área foliar da ordem de 30 a 45 %, quando comparadas com plantas sadias da mesma idade. Quanto ao efeito do vírus na produção das plantas, constatou-se que plantas inoculadas com um isolado de Vera Cruz, aos 2, 4, 6 e 8 meses após o transplante, em condições de telado em campo (Vera Cruz, SP), tiveram produções médias de 2,4; 3,4; 6,9 e 12,9 kg, respectivamente, na colheita durante 5 meses. Verificou-se também que a produção estava diretamente correlacionada com o índice de área foliar (LAI), cujos valores foram da ordem de 4,4; 3,8; 5,6 e 10,0 para as plantas infectadas aos 2, 4, 6 e 8 meses após o transplante, respectivamente.

Na Austrália, o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro tem sido alcançado principalmente através da utilização de híbridos de maracujá roxo e amarelo, tolerantes à doença (Inch, 1978 e Taylor & Greber, 1973). Em alguns casos, o controle é obtido através da utilização dos híbridos tolerantes premunizados com estirpes fracas do PWV (Pares et al., 1985 e Peasley & Fitzell, 1981), cujas pesquisas iniciais foram feitas por Simmonds (1959). Este autor constatou que plantas premunizadas separadamente com 2 estirpes fracas selecionadas em campo, denominadas 10 e 15, produziram 95 e 81 % de frutos não endurecidos e 4 e 19 % de frutos endurecidos, respectivamente, enquanto que plantas infectadas pela estirpe severa, denominada 16, produziram 32 % de frutos não endurecidos e 68 % de frutos endurecidos. Em Taiwan, o controle tem sido feito com a erradicação anual dos plantios afetados e replantio com mudas livres do vírus (Chang et al., 1992).

A premunização das plantas com estirpes fracas de vírus, que não afetam significativamente o desenvolvimento e a produção e protegem as plantas contra a infecção e/ou manifestação das estirpes severas do vírus, é

uma alternativa ecologicamente segura para o controle de fitoviroses. Além do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, na Austrália, outros exemplos positivos de premunização são encontrados para o controle do “Swollen shoot” do cacaueiro (*Cocoa swollen shoot virus*), na África (Posnette & Todd, 1955), do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus*), na Holanda e na Inglaterra (Rast, 1975 e Fletcher, 1978), do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus-type P*), em Taiwan (Yeh et al., 1988), do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus*), na França, Taiwan, Inglaterra, Hawaii e Israel (Cho et al., 1992; Lecoq et al., 1991; Yarden et al., 2000; Wang et al., 1991 e Walkey et al., 1992), do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*) em pimentão, na China (Tien et al., 1987) e em tomates, nos Estados Unidos e Itália (Gallitelli et al., 1991 e Montasser et al., 1991), entre outros. Deve-se mencionar que o uso da premunização foi descontinuado para o controle do mosaico do tomateiro, devido à falta de proteção contra algumas estirpes severas e ao desenvolvimento de variedades resistentes (Fulton, 1986) e para o controle do mosaico do mamoeiro em Taiwan, por causa de problemas de quebra de proteção e reversão da estirpe fraca para formas severas do vírus (Fuchs et al., 1997). Para o “swollen shoot” do cacaueiro, o programa de premunização também não teve continuidade, por trata-se de uma doença causada por um vírus transmitido por cochonilhas, não transmitido mecanicamente, dificultando assim a premunização massal de mudas. Além disso, as estirpes fracas estudadas não oferecem proteção completa contra a estirpe severa predominante (Hughes & Ollennu, 1994 e Ollennu & Owusu, 1989).

No Brasil, a premunização tem sido utilizada com sucesso, há mais de 3 décadas, para o controle da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) (Müller & Costa, 1977 e Müller & Carvalho, 2001). Müller & Costa (1968) selecionaram 45 estirpes fracas do CTV, a partir de plantas de elite em campo, ou seja, plantas que não apresentavam sintomas severos da doença, em

pomares severamente afetados pelo CTV no Estado de São Paulo. Destas, duas foram consideradas satisfatórias para o controle da tristeza em laranja 'Pêra', duas para limão 'Galego' e uma para pomelo. Desde então, estas estirpes fracas vêm sendo utilizadas no controle da tristeza dos citros. A pouca procura por pomelos, por não ser variedade de interesse, e por limão 'Galego', devido a substituição deste por limão Tahiti, praticamente acabou com o programa de premunização nessas duas culturas. Um clone de 'Pêra' premunizado destacou-se entre os melhores da variedade, conferindo proteção mesmo depois de sucessivas propagações clonais. Até o presente momento, acredita-se que existem mais de 80 milhões de laranjeiras 'Pêra' premunizadas com estirpes fracas do CTV no Brasil (Müller & Carvalho, 2001). A estabilidade destas estirpes e o alto nível de proteção oferecido contra a maioria das estirpes comuns, têm sido responsáveis pelo sucesso da premunização no controle da tristeza dos citros no País.

A premunização com estirpes fracas também tem sido utilizada em pequena escala para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type W – PRSV-W) em algumas cucurbitáceas. Rezende et al. (1994) selecionaram 18 estirpes fracas deste vírus, a partir de bolhas que aparecem nas folhas de plantas de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) com mosaico. Duas destas estirpes fracas, denominadas PRSV-W-1 e PRSV-W-2, apresentaram alto grau de proteção em abobrinha-de-moita 'Caserta', contra a infecção com estirpes severas do vírus, em condições de campo (Rezende et al., 1994 e Rezende, 1996). Resultados de dois experimentos independentes indicaram ganhos de 633 e 344 %, respectivamente, na produção de frutos comerciais das plantas premunizadas, quando comparada com a produção das plantas infectadas com estirpes severas do vírus (Rezende & Pacheco, 1998).

Em abóbora (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir. cv. Menina Brasileira), que é considerada tolerante ao mosaico causado pelo PRSV-W, plantas

premunizadas com as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2, separadamente, apresentaram ganhos de 24 e 43 %, respectivamente, na produção de frutos comerciais, em relação às plantas infectadas naturalmente com a estirpe severa do PRSV-W (Rezende et al., 1999).

Em dois experimentos independentes com abóbora híbrida do tipo Tetsukabuto (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam x *C. moschata* 'Takayama'), Dias & Rezende (2000) demonstraram haver ganhos quantitativos e qualitativos na produção, utilizando as estirpes fracas PRSV-W-1 e PRSV-W-2 para o controle do mosaico. No primeiro experimento, as plantas premunizadas produziram aproximadamente 3,1 vezes mais frutos (peso) do que as infectadas com as estirpes severas do vírus. Qualitativamente, 83,7 % dos frutos colhidos das plantas protegidas foram classificados como comerciais, enquanto que as infectadas naturalmente com as estirpes severas do vírus produziram apenas 25 % de frutos dessa categoria. No segundo experimento, a produção das plantas premunizadas foi, aproximadamente, 2,3 vezes maior do que a daquelas infectadas com as estirpes severas do PRSV-W. Além disso, 97,1 % dos frutos colhidos das plantas protegidas foram comerciais, em contraste com 2,1 % dos frutos dessa classe colhidos de plantas infectadas naturalmente com as estirpes comuns do vírus.

A premunização ainda não tem sido satisfatória para o controle do mosaico causado pelo PRSV-W em melancia. Dificuldades na infecção das plantas com a estirpe fraca, quando inoculada mecanicamente, e danos de 40 % na produção das plantas premunizadas em relação às plantas sadias, têm sido observados (Dias & Rezende, 2001).

Mais recentemente, uma estirpe fraca do vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV) foi selecionada por Rabelo (2002), em abobrinha-de-moita diretamente inoculada com uma suspensão parcialmente purificada do ZYMV, exposta à luz ultravioleta, durante

30 minutos. Esta estirpe mostrou-se altamente estável, com base na sintomatologia, durante 15 meses, após 12 transferências sucessivas em plantas de abobrinha-de-moita. Testes de proteção realizados em casa de vegetação mostraram que plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas com essa estirpe, denominada ZYMV-M, e desafiadas com estirpes severas do ZYMV, não apresentaram sintomas severos da doença, confirmando assim o seu efeito protetor. Em um experimento em campo, as plantas de abobrinha-de-moita 'Caserta' premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M, ou duplamente premunizadas com as estirpes ZYMV-M e PRSV-W-1, também ficaram protegidas contra a infecção com as respectivas estirpes severas desses vírus e tiveram ganhos significativos na produção de frutos comerciais. Foram observadas produções médias de 1,85 e 1,7 kg de frutos comerciais por planta, nas plantas premunizadas apenas com a estirpe ZYMV-M e duplamente premunizadas, respectivamente. Os ganhos de produções dessas plantas, em relação às plantas inoculadas com uma mistura das estirpes severas desses vírus, foram de 101 e 85 %, respectivamente.

Esses fatos mostram que a premunização é uma alternativa viável para o controle de algumas doenças causadas por vírus no Brasil e poderia ser útil para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, visto que esta doença preenche os pré-requisitos apresentados por Posnette & Todd (1955) para a aplicação dessa tecnologia no controle de fitoviroses.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas-teste

Esse estudo foi realizado utilizando-se maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*), feijoeiro (*P. vulgaris*) cvs. Jalo e Black Turtle 2 e crotalária (*C. juncea*). Estas plantas foram obtidas através de semeadura em vasos de alumínio, de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, cheios com uma mistura de três partes de terra e uma de esterco de curral curtido. As plantas-teste foram mantidas em casa de vegetação no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP.

3.2 Estirpe do vírus

Foi utilizada uma estirpe severa do PWV, obtida de maracujazeiros em Vera Cruz (SP) (PWV-SP), a qual foi mantida em plantas da mesma espécie em casa de vegetação. Com a finalidade de manter fonte de inóculo de boa qualidade, essa estirpe foi freqüentemente transmitida mecanicamente para maracujazeiros novos.

3.3 Métodos de inoculação

3.3.1 Mecânica

A inoculação mecânica do PWV foi realizada com extrato de folhas de plantas sistemicamente infectadas, preparado em tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, na diluição de 1:20 (peso:volume). As folhas das

plantas-teste foram previamente polvilhadas com Carbureto de silício, grau 320 e o inóculo foi aplicado por meio de fricção das folhas com o indicador umedecido com o extrato vegetal obtido. Após a inoculação, as folhas foram lavadas para retirar o excesso de inóculo e de abrasivo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação dos sintomas.

3.3.2 Com afídeos

A transmissão por afídeos foi feita utilizando-se a espécie *Myzus persicae* Sulz., obtida de colônias livres de vírus, em plantas de rabanete selvagem (*Raphanus raphanistrum* L.). Com o auxílio de um pincel fino, Os afídeos foram removidos das folhas de rabanete, acondicionados em recipiente plástico e mantidos em jejum por uma hora. Em seguida, foram transferidos para maracujazeiros sistemicamente infectados com o PWV para a aquisição do vírus (30 minutos). Depois desse tempo, grupos de dez afídeos foram transferidos para o ponteiro de cada planta-teste, para efetuarem a transmissão do vírus. Os afídeos foram transferidos um a um, com o auxílio do pincel fino. Para confiná-los nas folhas do ponteiro, foi passada uma pasta adesiva (“steaker”) na haste, logo abaixo das folhas contendo os afídeos. Depois de 24 horas as plantas foram pulverizadas com deltametrina (0,2 mL/litro de água) para eliminar os afídeos.

3.4 Superinoculação com estirpe severa do PWV

A superinoculação ou inoculação de desafio é o processo de inoculação realizado em plantas já infectadas por uma estirpe do vírus, geralmente uma estirpe fraca.

A superinoculação com a estirpe severa do PWV foi feita através de inoculações mecânicas ou por afídeos virulíferos, conforme descritas anteriormente.

3.5 Escala de notas de sintomas

Todas as plantas-teste inoculadas foram periodicamente avaliadas quanto à manifestação de sintomas. Para isso, foram utilizadas escalas de notas de 0 a 3, para os sintomas apresentados em cada planta-teste. Para maracujazeiro a escala utilizada foi a seguinte: 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para feijoeiro 'Black Turtle 2' a escala foi: 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas, deformações foliares e necrose sistêmica seguida de morte da planta. No caso das plantas de crotalária, utilizou-se a seguinte escala de notas: 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve, 2 = mosaico amarelo severo e 3 = mosaico amarelo severo e lesões necróticas nas folhas e na haste.

3.6 DAS-ELISA indireto

O teste de DAS-ELISA indireto, que utiliza anticorpos produzidos em duas espécies de animais, foi realizado de acordo com o método descrito por Van Regenmortel & Dubs (1993) e adaptado para o PWV por Novaes & Rezende (1999). Foram utilizados antissoros policlonais produzidos em galinha e coelho e que se encontravam disponíveis no Laboratório de Virologia, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP (Novaes, 1998). A purificação das imunoglobulinas G e Y (IgG e IgY), a partir dos antissoros policlonais obtidos de coelho e de galinha, respectivamente, foi feita de acordo com os procedimentos descritos por Novaes (1998). O DAS-ELISA indireto foi realizado da seguinte maneira: inicialmente foram adicionados 100 µL de suspensão de IgG de coelho, diluída em tampão carbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6), numa concentração de 10,0 µg mL⁻¹, em cada pocinho da placa de ELISA. A placa foi incubada por 1,5 h a 37 °C e depois lavada 3 vezes consecutivas com PBS-Tween

(0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl , 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl , pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20 L^{-1}). A seguir, foram adicionados 100 μL dos extratos das amostras das plantas a serem analisadas, nos respectivos pocinhos. Os extratos das amostras foram obtidos em PBS-Tween, na diluição de 1:50. Como controle negativo foi utilizado o extrato de planta sadia na mesma diluição. Depois de um período de incubação de 1,5 h, a 37 °C, a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-Tween e colocados 100 μL da IgY de galinha por pocinho, na concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluída em PBS-Tween com 1% BSA (Bovine serum albumin). A placa foi incubada por mais 1,5 h, a 37 °C. Em seguida, foi lavada 3 vezes como anteriormente e colocados 100 μL de IgG de cabra contra IgY de galinha, conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-9171), diluída 1:10.000 em PBS-Tween contendo 2 % de polyvinylpyrrolidone. A placa foi novamente incubada por 1,5 h, a 37 °C. Depois de lavada como anteriormente, foram colocados 100 μL de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA N-9389), diluído em tampão dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg mL^{-1}) e a placa foi incubada à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática (60 a 120 minutos). A absorbância de cada um dos pocinhos foi medida no leitor de ELISA, da marca Metertech Σ 960, utilizando-se filtro de 405 nm. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância excedia em 3 vezes o valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

3.7 Procura de estirpes fracas do PWV

3.7.1 A partir de plantas de elite em campo

A seleção de estirpes fracas a partir de plantas de elite em campo, ou seja, de plantas assintomáticas ou que não apresentam sintomas severos, em pomares severamente afetados pela doença, já foi utilizada com bastante sucesso por Simmonds (1959), na seleção de estirpes fracas do PWV, na

Austrália e por Müller & Costa (1968), na seleção de estirpes fracas do *Citrus tristeza virus* (CTV), no Brasil.

Cinco pomares de maracujazeiros severamente afetados pelo PWV, na região de Vera Cruz, SP, foram inspecionados e as plantas que apresentavam sintomas fracos da doença, bom desenvolvimento vegetativo e boa produção de frutos, foram selecionadas. Ramos apicais dessas plantas foram coletados e enxertados em maracujazeiros sadios, os quais foram mantidos em casa de vegetação para posteriores avaliações dos sintomas.

3.7.2 A partir de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico

Em folhas de maracujazeiros sistemicamente infectados pelo PWV é comum o aparecimento de bolhas, que são elevações verde-escuro distintas da região ao redor, que se apresenta de coloração verde-amarelada. Essas bolhas são semelhantes às causadas por outros Potyvirus em outras espécies vegetais (Rezende et al., 1982 e Rezende et al., 1994).

A procura de estirpes fracas do PWV, a partir de bolhas das folhas de maracujazeiros com mosaico, foi feita seguindo-se a metodologia empregada com sucesso por Rezende et al. (1982) e Rezende et al. (1994) para os vírus do mosaico do mamoeiro estirpes mamoeiro e melancia (*Papaya ringspot virus* – types P and W), respectivamente. Discos foliares de 2 - 4 mm de diâmetro foram retirados da região central das bolhas com o auxílio de um vazador. Esses discos foram colocados individualmente na superfície áspera de etiquetas plásticas, utilizadas para identificação de vasos, em presença de uma gota de tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, e macerados com outra etiqueta para a extração do inóculo viral. Cada extrato foi inoculado individualmente nas duas primeiras folhas de um maracujazeiro ou cotilédones de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2. A inoculação foi feita esfregando-se levemente a etiqueta contendo o inóculo na superfície das folhas

previamente polvilhadas com carbureto de silício. Após a inoculação, as plantas foram lavadas para retirar o excesso de inóculo e abrasivo e mantidas em casa de vegetação para posteriores avaliações.

O feijoeiro 'Black Turtle 2' foi escolhido por exibir sintomas severos da doença, do tipo necrose sistêmica, que resulta em morte das plantas. Assim sendo, as plantas que não apresentassem sintomas severos, poderiam ser portadoras de uma possível estirpe fraca. Estas foram transferidas mecanicamente para plantas-teste de maracujazeiro para posteriores avaliações dos sintomas.

3.7.3 A partir de lesões locais

A utilização de lesões locais como forma de segregação de estirpes do complexo normal de um vírus é fato amplamente conhecido e empregado em trabalhos com vírus de plantas (Hull, 2001). Folhas de plantas de *P. vulgaris* cv. Jalo, inoculadas mecanicamente com estirpes do PWV, geralmente exibem sintomas de lesões locais cloróticas 5 a 7 dias após a inoculação, em condições de casa de vegetação. Essas lesões locais foram individualmente retiradas das folhas com o auxílio de vazadores com diâmetro de 2 – 4 mm. Inóculos de cada lesão foram extraídos seguindo-se o mesmo procedimento descrito para a obtenção de inóculos de discos foliares de bolhas. Cada inóculo foi individualmente inoculado em uma planta de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2 no estágio cotiledonar. As plantas foram lavadas, mantidas em casa de vegetação e posteriormente avaliadas. As prováveis estirpes fracas selecionadas nessa cultivar foram transferidas mecanicamente para plantas-teste de maracujazeiro para posteriores avaliações dos sintomas.

3.8 Indexação das plantas e seleção de estirpes fracas

Os maracujazeiros e feijoeiros inoculados foram avaliados com base na manifestação e intensidade dos sintomas, utilizando-se as respectivas escalas de notas descritas no item 3.5. A confirmação da infecção das plantas com o PWV foi feita através do teste serológico de DAS-ELISA indireto. Uma planta foi considerada portadora de uma estirpe fraca do PWV quando apresentou reação positiva no teste serológico e recebeu nota 0 ou 1 de sintomas durante o período de observações. Além disso, o desenvolvimento das plantas foi comparado com o de plantas mantidas sadias.

3.9 Teste do efeito protetor das estirpes fracas do PWV em casa de vegetação

3.9.1 Em maracujazeiro

O valor protetor das estirpes fracas obtidas foi inicialmente avaliado em maracujazeiros em casa de vegetação. Cada estirpe fraca foi inoculada em 18 maracujazeiros sadios, cultivados em vaso. A confirmação da infecção das plantas foi realizada 15 dias depois da inoculação, através do DAS-ELISA indireto e, no mesmo dia, 16 plantas premunizadas foram superinoculadas (desafiadas) com a estirpe severa PWV-SP. A superinoculação foi feita mecanicamente em duas folhas expandidas do ponteiro. Por ocasião do desafio, plantas sadias da mesma idade também foram inoculadas com a estirpe PWV-SP. Os tratamentos comparados nesse teste foram os seguintes: a) plantas premunizadas com as estirpes fracas e não desafiadas; b) plantas premunizadas com as estirpes fracas e superinoculadas com a estirpe severa; c) plantas inicialmente sadias, da mesma idade, inoculadas com a estirpe severa por ocasião da superinoculação e d) plantas sadias.

Todas as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação, onde foram feitas leituras periódicas de sintomas de acordo com a escala descrita anteriormente.

3.9.2 Em crotalária

Para os testes de proteção em crotalária, em casa de vegetação, foram realizados dois experimentos independentes. No primeiro, uma estirpe fraca do PWV foi inoculada mecanicamente em 10 plantas de crotalária no estágio cotiledonar. Quinze dias após a inoculação, foi feita a confirmação da infecção destas plantas através do DAS-ELISA indireto e oito delas foram superinoculadas (desafiadas) com a estirpe PWV-SP. Em quatro destas plantas, a superinoculação foi feita mecanicamente, em duas folhas expandidas do ponteiro. Nas outras quatro plantas, a superinoculação foi feita em duas folhas da parte mediana do ramo. Por ocasião do desafio, duas plantas saudáveis, da mesma idade, também foram inoculadas com a estirpe PWV-SP. Duas plantas premunizadas não foram desafiadas, enquanto duas outras foram mantidas saudáveis.

No segundo experimento, foram utilizadas duas estirpes fracas do PWV. Cada estirpe fraca foi inoculada em 10 plantas de crotalária no estágio cotiledonar. A confirmação da infecção das plantas inoculadas foi realizada 20 dias depois da inoculação, através do DAS-ELISA indireto. Dez dias depois, cinco plantas premunizadas com cada estirpe foram superinoculadas (desafiadas) com a estirpe PWV-SP. A superinoculação foi feita mecanicamente, em duas folhas expandidas do ponteiro. Por ocasião do desafio, cinco plantas da mesma idade também foram inoculadas com a estirpe PWV-SP. Duas plantas premunizadas não foram desafiadas, enquanto duas outras foram mantidas saudáveis.

Todas as plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação, onde foram feitas leituras periódicas de sintomas de acordo com a escala descrita anteriormente.

3.10 Teste do efeito protetor das estirpes fracas do PWV em campo

3.10.1 Em maracujazeiro

Dois experimentos independentes foram conduzidos no campo experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, para testar o efeito protetor das estirpes fracas do PWV em maracujazeiros. No primeiro, as mudas de maracujazeiros foram preparadas em casa de vegetação e no dia 20 de outubro de 2000, quando apresentavam de 4 a 6 folhas, foram transplantadas para o campo, em covas contendo 10 litros de esterco de curral curtido e 200 g do formulado N-P-K (4-14-8), obedecendo a um espaçamento de 2,0 m entre linhas e 5,0 m entre plantas. A premunização das plantas foi realizada no dia 20 de novembro de 2000, inoculando-se mecanicamente as duas folhas expandidas abaixo do ponteiro. A confirmação da infecção destas plantas foi feita 20 dias depois, através do DAS-ELISA indireto. O desafio também foi feito mecanicamente, inoculando-se as duas folhas expandidas abaixo do ponteiro, no dia 20 de dezembro de 2000. Para fins de avaliações foram comparados os seguintes tratamentos: a) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, e desafiadas com a estirpe PWV-SP, 30 dias após a premunização; b) plantas inoculadas com a estirpe PWV-SP no dia do desafio; c) plantas premunizadas com duas estirpes fracas, separadamente, não desafiadas e d) plantas sadias. Cada tratamento continha cinco plantas distribuídas ao acaso no campo experimental. As plantas foram avaliadas quanto à severidade de sintomas, durante quatro meses após o desafio, utilizando-se a escala de notas de sintomas descrita anteriormente.

No segundo experimento, também foram utilizadas mudas de maracujazeiros preparadas em casa de vegetação e no dia 18 de julho de 2001, quando apresentavam 4 a 6 folhas, foram transplantadas para o campo, obedecendo-se os mesmos critérios adotados no primeiro experimento, exceto que a área experimental foi protegida com sombrite 50 % (Figura 1), para minimizar a entrada de afídeos e a conseqüente transmissão natural do PWV por esses insetos. A premunização das plantas foi realizada no dia 02 de agosto de 2001, inoculando-se mecanicamente as duas folhas expandidas abaixo do ponteiro. A confirmação da infecção destas plantas foi feita 50 dias depois através do DAS-ELISA indireto. Para fins de avaliações, foram comparados os seguintes tratamentos: a) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, e desafiadas mecanicamente com a estirpe PWV-SP, na sexta e sétima folha abaixo do ponteiro; b) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, e desafiadas com 10 afídeos virulíferos colocados no ponteiro das plantas; c) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, não desafiadas e d) plantas sadias. Os tratamentos a e b continham quatro plantas; o c e d, duas e cinco plantas, respectivamente, todas distribuídas ao acaso no campo experimental. Foram feitos dois desafios através de inoculação mecânica e dois com afídeos virulíferos. O primeiro, 50 dias após a premunização (21/09/2001) e o segundo, 110 dias após a premunização (21/11/2001). Para verificar a infectividade do inóculo da transmissão mecânica e a eficiência dos afídeos na transmissão, plantas sadias de maracujazeiros, cultivadas em vasos, foram inoculadas mecanicamente ou por afídeos virulíferos, no mesmo dia do desafio. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação do aparecimento dos sintomas. As plantas-teste em campo foram avaliadas quanto à severidade de sintomas, durante quatro meses após o primeiro desafio, utilizando-se a escala de notas de sintomas descrita anteriormente.

Figura 1 – Teste de proteção de maracujazeiros plantados sob telado de sombrite 50 %.

3.10.2 Em crotalária

Plantas de crotalária foram obtidas em vasos em casa de vegetação e premunizadas nas folhas cotiledonares com as estirpes fracas, separadamente. Cada estirpe fraca foi inoculada em 10 plantas. A confirmação da infecção das plantas inoculadas foi realizada 20 dias depois, através do DAS-ELISA indireto. Na mesma data, essas plantas foram transplantadas para o campo, obedecendo a um espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,5 m entre plantas. Cinco plantas premunizadas com cada uma das estirpes foram superinoculadas (desafiadas) com a estirpe PWV-SP. A superinoculação foi feita mecanicamente em duas folhas expandidas do ponteiro. Por ocasião do desafio, cinco plantas da mesma idade também foram inoculadas com a estirpe PWV-SP. Os tratamentos comparados nesse experimento foram os seguintes: a) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, e não desafiadas; b) plantas premunizadas com as estirpes fracas, separadamente, e

superinoculadas com a estirpe PWV-SP; c) plantas inicialmente sadias, da mesma idade e inoculadas com a estirpe severa, por ocasião da superinoculação e d) plantas não inoculadas.

3.11 Quantificação do PWV em diferentes folhas das plantas

3.11.1 Em maracujazeiro

A concentração relativa de duas estirpes fracas do PWV, em diferentes folhas das plantas, foi estimada com base nos valores de absorbância do DAS-ELISA indireto, uma vez que estes, em determinadas diluições dos extratos, são diretamente proporcionais à quantidade de vírus presente na amostra (Novaes & Rezende, 1999). Este teste foi realizado em todos os maracujazeiros premunizados no segundo teste de proteção em campo e as amostras foram retiradas antes do desafio. Primeiramente, foram escolhidas as cinco folhas expandidas próximas do ponteiro das plantas. De cada folha foram coletados três discos, de 1 cm de diâmetro, conforme ilustrado parcialmente na Figura 2. Os discos foliares coletados de cada planta foram macerados separadamente em tampão PBS com Tween, na diluição de 1:50 e avaliados conjuntamente através do DAS-ELISA indireto. Todas as amostras foram testadas em pocinhos duplicados, bem como os controles negativos (extrato de folhas de planta sadia) e positivos (extrato de folhas de maracujazeiro infectado com a estirpe severa PWV-SP, mantidas em casa de vegetação). Os valores médios de absorbância obtidos a 405 nm, iguais ou superiores a 3 vezes a média da absorbância da amostra sadia, foram considerados positivos e utilizados para comparar a concentração relativa das estirpes fracas nos tecidos foliares.

Figura 2 – Disposição dos pontos de coleta dos discos de três folhas de maracujazeiro para quantificação das estirpes fracas do PWV.

3.11.2 Em crotalária

A estimativa da concentração relativa de duas estirpes fracas do PWV, em diferentes folhas das plantas de crotalária, também foi realizada através do DAS-ELISA indireto. Este teste foi realizado em 16 plantas utilizadas no segundo teste de proteção em casa de vegetação, onde oito estavam premunizadas com a estirpe F-101 e oito com a estirpe F-144. Foram escolhidas cinco folhas expandidas próximas do ponteiro das plantas e coletado apenas um disco de 1cm de diâmetro, no centro de cada folha, devido ao tamanho reduzido desta. Os discos foliares foram macerados separadamente em tampão PBS com Tween, na diluição de 1:50 e avaliados conjuntamente

através do DAS-ELISA indireto, contendo controles negativos (extrato de folhas de crotalária sadia) e positivos (extrato de folhas de maracujazeiro infectado com a estirpe severa PWV-SP, mantidas em casa de vegetação) em cada placa. Todas as amostras foram testadas em pocinhos duplicados e os valores médios de absorbância a 405 nm, obtidos para cada amostra, foram utilizados de forma comparativa, para a avaliação da concentração das estirpes fracas do vírus nos tecidos foliares, seguindo o mesmo critério descrito anteriormente.

3.12 Caracterização molecular do gene da capa protéica das estirpes fracas e severa do PWV

3.12.1 Extração de RNA total

Para a caracterização molecular do gene da capa protéica foram utilizadas duas estirpes fracas e a estirpe severa PWV-SP. A extração de RNA total foi realizada de acordo a metodologia descrita por Gibbs & Mackenzie (1997). Cem miligramas de tecido foliar, coletados de maracujazeiros infectados com as estirpes fracas e severa do PWV, separadamente, foram macerados em nitrogênio líquido e colocados em microtubo de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 600 µL de CTAB [2 % CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio); 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 % mercaptoethanol]. Essa mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 55 °C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi centrifugada a 14.000 g, por 10 minutos. A fase aquosa foi retirada e transferida para um tubo limpo. O RNA foi precipitado adicionando-se 60 µL de acetato de sódio 7,5 M e 600 µL de isopropanol. A suspensão foi armazenada por aproximadamente 2 horas a -20 °C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 14.000 g por 5 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70 %, seco ao ar e dissolvido em 30 µL de água Milli Q, tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

3.12.2 Síntese de DNA complementar por RT-PCR

A primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas infectadas com as estirpes fracas e severa do PWV, separadamente. Dois microlitros e meio de suspensão de RNA total foram misturados a 10 µL do primer 1 [5'–GATTTAGGTGACACTATAG (T)₁₇(A/G/C)–3'] (Gibbs & Mackenzie, 1997), que se anela na cauda poli-A, presente no terminal 3' do RNA de todas as espécies de Potyvirus (Figura 3). O primer 1 foi diluído em água destilada previamente tratada com DEPC, na concentração de 40 pmoles. Essa solução foi aquecida a 65 °C por 5 minutos e posteriormente mantida no gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão 5 X da enzima transcriptase reversa (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT (ditiotretol) 0,1 M, 1 µL de mistura de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) 10 mM, 200 unidades da enzima Superscrit Transcriptase Reversa (Invitrogen), 20 unidades de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), misturados num volume final de 20 µL. Essa solução foi incubada por 60 minutos, a 42 °C e posteriormente aquecida a 70 °C por 5 minutos para a degradação da enzima.

O cDNA foi em seguida usado em uma reação em cadeia da polimerase ("polymerase chain reaction" – PCR). Para isso, 3 µL do produto da reação com a enzima transcriptase reversa foram misturados com 2,5 µL de tampão 10 X de PCR (Tris-SO₄ 600 mM, pH 8,9, sulfato de amônio 180 mM), 0,9 µL de MgSO₄ 50 mM, 20 pmoles do primer 1, 20 pmoles do primer 2 [5'–TAATACGACTCACTATAGGGIAA(C/T)AA(C/T)AG(C/T)GGICA(A/G)CC–3'] (Gibbs & Mackenzie, 1997), que se anela em uma região conservada do gene da inclusão nuclear proteína b ("Nuclear Inclusion protein b", NIb) de espécies do gênero *Potyvirus* (Figura 3), 0,5 µL de mistura de dNTP's 10 mM, 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega), completando o volume para 25 µL com água Milli Q. O regime do termociclador (MJ Research PTC 200) foi de 94 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 6 minutos, divididos em

1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 52 °C e 3 minutos a 72 °C, finalizando com 72 °C por 10 minutos. O produto da RT-PCR foi visualizado em gel de agarose a 1 %, contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo.

Figura 3 – Representação esquemática do genoma de um Potyvirus e localização da região de anelamento dos primers 1 e 2. Nib, inclusão nuclear proteína b; CP, capa protéica; NT, região não traduzida; (A)_n, cauda poli-A.

3.12.3 Ligação dos fragmentos do produto da RT-PCR ao plasmídeo vetor

O cDNA produzido na RT-PCR foi ligado ao plasmídeo vetor pGem® pelo uso do kit pGem® T Easy Vector Systems (Promega). Para a reação de ligação foram utilizados 3 µL do produto da RT-PCR, 5 µL do tampão 2 X de ligação rápida (Tris-HCl 60 mM, pH7,8; MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, 10 % PEG), 1 µL do vetor pGem®-T, 1 µL da enzima T₄ DNA ligase. Esses reagentes foram delicadamente misturados e incubados a 4 °C, pelo tempo mínimo de 12 horas. A mistura foi armazenada a -20 °C.

3.12.4 Preparo de células competentes de *Escherichia coli* para transformação

Células competentes foram preparadas a partir de uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem DH5α. Estas foram inicialmente inoculadas em

15 mL de meio SOB (2,0 g triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 0,05 g de NaCl, 1,0 mL de KCl 250 mM, pH 7,0, em volume final de 100 mL de solução) contendo 10 mM de magnésio e incubadas a 37 °C por 16 horas, sob constante rotação a 220 rpm. Um mililitro desse pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio SOB e este enriquecido com 1 mL de MgSO₄ 1 M e 1 mL de MgCl₂ 1 M. Essa cultura foi incubada nas mesmas condições de temperatura e rotação até atingir valor de absorbância entre 0,45 - 0,55, no comprimento de onda de 550 nm, em espectrofotômetro.

Essa cultura foi transferida para dois tubos de 50 mL e deixada no gelo por 10 minutos. Posteriormente, foi centrifugada a 3.500 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi dissolvido em 15 mL de tampão RF1 [KC₂H₃O₂ 30 mM, RbCl 100 mM, MnCl 50 mM, CaCl 10 mM, Glicerol 15% (p/v), pH 5,8] e deixado no gelo por 30 minutos. Logo em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 3.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 8 mL de RF2 [MOPS 10 mM, RbCl 100 mM, CaCl 75 mM, Glicerol 15% (p/v), pH 6,8] e deixado no gelo por 30 minutos. Decorrido esse tempo, alíquotas de 200 µL foram distribuídas em tubos de 1,5 mL previamente resfriados. Esses tubos foram transferidos para um recipiente contendo nitrogênio líquido e em seguida, estocados a -70 °C até o momento de uso.

3.12.5 Transformação de *E. coli* com o plasmídeo vetor recombinante

A transformação de células competentes de *E. coli*, da linhagem DH5α, utilizando os plasmídeos vetores contendo o cDNA de cada estirpe, separadamente, foi realizada de acordo com protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Duzentos microlitros de células competentes foram misturados com um volume variável de 2 a 5 µL do plasmídeo vetor em tubos de 1,5 mL. Essa mistura permaneceu no gelo por 30 minutos e em seguida foi colocada em um banho-maria a 42 °C, por 90 segundos. Após o choque térmico, os tubos foram

novamente transferidos para o gelo. Em ambiente asséptico, cada tubo recebeu 800 μL de meio SOC (2,0 g triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 0,05 g de NaCl, 0,5 mL de MgCl_2 2M, 2,0 mL de glicose 1 M, em volume final de 100 mL de solução). A mistura permaneceu a 37 °C, por 1 hora, sob agitação de 220 rpm. Em seguida, foi centrifugada por 1 minuto, a 13.000 g, para concentração das células. Cerca de 400 μL do sobrenadante resultante foram descartados e as células homogeneizadas no volume restante com auxílio de pipeta. Aproximadamente 100 μL dessa suspensão foram distribuídos em placas de Petri descartáveis, contendo meio LB (2,0 g triptona, 1,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de NaCl, 3,5 g de bacto agar, pH 7,0, em volume final de 200 mL) acrescido de ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, IPTG 200 mg mL^{-1} e X-Gal 50 mg mL^{-1} , para a avaliação da atividade de β -galactosidase nos transformantes e seleção destes. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 12 - 14 horas.

As colônias que conservaram a atividade de β -galactosidase, de cor azul, foram consideradas portadoras do plasmídeo vetor sem o inserto do cDNA, enquanto que as que perderam a atividade e que permaneceram claras, foram selecionadas como clones portadores de plasmídeo recombinante. Estas colônias foram inoculadas em 3 mL de meio TB (2,4 g triptona, 4,8 g de extrato de levedura, 800 μL de glicerol), acrescido de ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4 mL de tampão fosfato (1,15 g de KH_2PO_4 , 6,27 g de K_2HPO_4 , em volume final de 10 mL) e incubadas por 12 – 14 horas sob rotação de 220 rpm, a 37 °C.

Para a preservação de cada um dos clones obtidos, cerca de 100 μL de meio inoculado foram misturados com 100 μL de glicerol 50 %, sendo armazenados a -80 °C.

3.12.6 Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994). Colônias crescidas no meio TB foram centrifugadas em tubos de 1,5 mL, a 13.000 g, por 5 minutos, descartando o sobrenadante. O precipitado resultante foi dissolvido, sob agitação vigorosa, em 100 µL de solução I (50 mM de glicose, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris, pH 8,0) gelada e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução II (75 mL de água estéril, 20 mL de NaOH 1 M, 5 mL de SDS 20 %). Após misturar delicadamente, as células foram deixadas em gelo por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução III (24,6 g de acetato de sódio, pH 4,8, ajustado com ácido acético glacial, em volume final de 10 mL), a qual foi delicadamente misturada e centrifugada a 13.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foram adicionados 400 µL de clorofórmio saturado com acetato de sódio. Após agitação vigorosa a suspensão foi centrifugada a 13.000 g, por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e a este foram adicionados 400 µL de fenol equilibrado com Tris 10 mM, pH 8,0. Depois de agitada vigorosamente, a suspensão foi novamente centrifugada a 13.000 g, por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e acrescentado 1 mL de etanol absoluto, mantido a -20 °C. Os tubos foram invertidos delicadamente para misturar o conteúdo e deixados a -20 °C, por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado seco ao ar com o tubo invertido sobre a mesa. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água Milli Q e adicionado 1 mL de etanol absoluto, mantido a -20 °C. A suspensão foi incubada por 10 minutos, a -20 °C. Em seguida, foi centrifugada a 13.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi seco ao ar e dissolvido em um volume de 20 - 40 µL de água estéril.

O DNA plasmidial extraído foi tratado com 2,2 µL de RNase 1A (10mg/mL) (Pharmacia) e incubado por 2 horas a 37 °C. Em seguida foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1 %. Além do DNA plasmidial, o gel continha um padrão com concentração conhecida do pGem (Promega). Com base na espessura da banda apresentada pelo padrão foi estimada a concentração do DNA.

3.12.7 Sequenciamento

Para proceder ao seqüenciamento, o DNA plasmidial extraído de cada um dos clones foi amplificado utilizando-se o kit Dyenamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech), contendo os primers M13 (“forward” e “reverse”), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi feito no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, da ESALQ/USP. A reação de amplificação foi realizada com 400 - 500 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol de primer M13, 2,0 µL de Dyenamic, num volume final de 10 µL. O regime do termociclador foi de 30 ciclos de 1 minuto e 35 segundos, divididos em 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando com 5 minutos a 4 °C. Ao conteúdo dos tubos foi acrescentado 1 µL de solução de acetato de sódio/EDTA ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 1,5 M, pH 8,0, EDTA 250 mM) e 40 µL de etanol 95 %. A mistura foi colocada no escuro por 20 minutos e em seguida centrifugada a 13.000 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O precipitado foi dissolvido em 250 µL de etanol 70 %. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37 °C, por 5 minutos. Em seguida, foi dissolvido em 4 µL de tampão de carregamento (formamida) antes de ser levado ao aparelho para sequenciar.

O seqüenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ de acordo com os protocolos descritos nos kits utilizados no laboratório de Genética Molecular.

3.12.8 Análise do seqüenciamento

As seqüências de nucleotídeos obtidas para cada clone foram alinhadas pelo programa CLUSTAL L, de onde foi extraída a seqüência consenso final para cada estirpe. As seqüências consenso de nucleotídeos das estirpes fracas e severa foram alinhadas pelo programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e a seqüência de amino ácidos deduzidos da proteína do capsídeo foi realizada pelo programa 'Translate', disponível no endereço <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>. A comparação da identidade entre as estirpes, tanto de nucleotídeos como de amino ácidos, foi realizada pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. A localização do gene da capa protéica (CP), bem como da região não traduzida (NT), indicadas na Figura 3, foi feita alinhando-se as seqüências de nucleotídeos obtidas com a seqüência completa do genoma do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Mlotshwa et al., 2002), depositada no banco de dados do NCBI, acesso número AF348210.

4 RESULTADOS

4.1 Estirpes fracas do PWV

4.1.1 Selecionadas a partir de plantas de elite em campo

Foram realizadas inspeções em cinco pomares de maracujazeiros severamente afetados pelo PWV, na região de Vera Cruz, SP e cinco plantas que apresentavam sintomas fracos da doença, bom desenvolvimento vegetativo e boa produção de frutos, foram selecionadas. Maracujazeiros enxertados com ramos de três, das cinco plantas de elite selecionadas, apresentaram sintomas fracos da doença nas brotações novas. Os outros dois mostraram sintomas severos da doença e foram descartados. As três estirpes fracas selecionadas, denominadas F-101, F-102 e F-103, respectivamente, foram mantidas em casa de vegetação, para posteriores testes de proteção contra a estirpe severa.

4.1.2 Selecionadas a partir de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico

Foram inoculados individualmente extratos provenientes de 406 bolhas obtidas de folhas de maracujazeiro com mosaico causado pela estirpe PWV-SP. Desses, extratos de 180 bolhas foram inoculados em maracujazeiros, enquanto que os 226 restantes foram inoculados em plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Black Turtle 2. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Reação de maracujazeiros e de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2 inoculados com extrato de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico causado pelo *Passion fruit woodiness virus*.

Plantas-teste	Nº plantas inoculadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas*			
		0	1	2	3
Maracujazeiro**	180	127	4	0	49
<i>P. vulgaris</i> cv. Black Turtle 2***	226	67	3	0	156

* Escala de notas de sintomas utilizada para cada espécie, item 3.5.

** Avaliação realizada aos 30 dias após a inoculação

*** Avaliação realizada aos 15 dias após a inoculação

Todos os maracujazeiros foram indexados através do DAS-ELISA indireto. Todas as plantas que apresentaram sintomas deram reação positiva com o antissoro contra o PWV no teste serológico. Entre estas, quatro apresentaram mosaico leve, recebendo nota 1. Das 127 plantas sem sintomas, que receberam nota 0 na avaliação, quatro mostraram-se infectadas. As demais deram reação negativa nesse teste serológico.

A infecção das plantas de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2 também foi comprovada pelo DAS-ELISA indireto. Entre as 159 plantas sintomáticas e positivas no teste serológico, três apresentaram-se com sintomas fracos de mosaico (Figura 4). As 67 plantas que receberam nota 0 apresentaram reação negativa no teste de DAS-ELISA indireto.

Dessa forma, oito plantas portadoras de possíveis estirpes fracas foram selecionadas em maracujazeiro e três em feijoeiro. Extrato de folhas dessas plantas foram inoculados em maracujazeiros, separadamente, e três estirpes, das oito selecionadas em maracujazeiro, causaram apenas um leve mosaico, sem deformações foliares, acompanhado de bom desenvolvimento das plantas,

recebendo nota 1 de sintoma. Maracujazeiros da mesma idade, inoculados com a estirpe severa, mostraram mosaico acentuado e menor área foliar (Figura 5). Essas três estirpes selecionadas foram denominadas F-99, F-144 e F-145, respectivamente. As cinco estirpes restantes induziram sintomas severos em maracujazeiro, 15 dias após a inoculação, sendo então descartadas. As três estirpes que induziram sintomas fracos em feijoeiro causaram sintomas severos quando transferidas para maracujazeiro. Estas também foram descartadas.

Figura 4 - Plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Black Turtle 02 infectadas com o *Passion fruit woodiness virus*, apresentando mosaico fraco (esquerda) e hipersensibilidade (direita).

Figura 5 - Maracujazeiros infectados com estirpe severa do *Passion fruit woodiness virus* (esquerda), estirpe fraca (centro) e planta sadia (direita).

4.1.3 A partir de lesões locais

Folhas de plantas de *P. vulgaris* cv. Jalo inoculadas com a estirpe PWV-SP e mantidas em casa de vegetação, apresentaram lesões locais cloróticas 5 a 7 dias após a inoculação. Extratos de 68 lesões foram inoculados individualmente em plantas de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Reação de plantas de *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2 inoculadas com extratos de lesões locais produzidas pelo *Passion fruit woodiness virus* em folhas de *P. vulgaris* cv. Jalo, mantidas em casa de vegetação.

Planta-teste	Nº plantas inoculadas	Nº de plantas de acordo com a severidade dos sintomas*			
		0	1	2	3
<i>P. vulgaris</i> cv. Black Turtle 2**	68	22	4	0	42

* 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas, deformações foliares e necrose sistêmica seguida de morte da planta.

** Avaliação realizada aos 15 dias após a inoculação.

A infecção pelo PWV em todos os feijoeiros que apresentaram mosaico foi confirmada por DAS-ELISA indireto. As plantas assintomáticas apresentaram resultados negativos no teste serológico. As quatro plantas que receberam nota 1 de sintoma foram selecionadas e extratos delas foram inoculados individualmente em maracujazeiros. Todos os maracujazeiros inoculados com as quatro possíveis estirpes fracas do PWV apresentaram sintomas severos da doença, 15 dias após a inoculação, sendo então descartados.

4.2 Efeito protetor das estirpes fracas do PWV em casa de vegetação

4.2.1 Em maracujazeiro

No teste de proteção em casa de vegetação foi avaliado o efeito protetor de duas estirpes fracas obtidas a partir de plantas de elite em campo (F-101 e F-103) e de uma estirpe fraca obtida a partir de bolhas de folhas de

maracujazeiro com mosaico (F-144). Os resultados desse teste estão apresentados na Tabela 3. Quinze dias após o desafio, todas as plantas que estavam inicialmente sadias e foram inoculadas com a estirpe PWV-SP mostraram-se infectadas, apresentando mosaico severo e deformações foliares. Nesse mesmo período, 29 % das 48 plantas premunizadas com as três estirpes fracas e desafiadas com a estirpe PWV-SP, também já apresentavam sintomas severos da doença. Aos 45 dias após o desafio, aproximadamente 63 % dessas plantas exibiam sintomas severos da doença. No entanto, 25, 38 e 50 % das plantas premunizadas com as estirpes F-101, F-102 e F-144, respectivamente, e desafiadas com a estirpe PWV-SP permaneceram protegidas, pois receberam notas 0 e 1 de sintomas. As plantas premunizadas e não desafiadas, permaneceram sem sintomas ou com sintoma fraco da doença, durante o período de avaliação do experimento.

Tabela 3. Frequência de maracujazeiros em função da severidade de sintomas, em duas épocas de avaliação da proteção com estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus*, em casa de vegetação.

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas com nota máxima de sintoma*	
		15 dias após o desafio	45 dias após o desafio
Prem. F-101 + PWV-SP**	16	4	12
Prem. F-102 + PWV-SP	16	6	10
Prem. F-144 + PWV-SP	16	4	8
Prem. F-101	2	0	0
Prem. F-102	2	0	0
Prem. F-144	2	0	0
Sadias	6	0	0
Sadia inoculada c/ PWV-SP	6	6	6

* 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares.

** Premunizada com estirpe fraca e desafiada com a estirpe severa PWV-SP, 15 dias depois.

4.2.2 Em crotalaria

Os resultados de dois testes de proteção realizados com esta espécie, em casa de vegetação, estão apresentados na Tabela 4. No primeiro experimento foi avaliado o efeito protetor da estirpe fraca F-101, obtida de plantas de elite em campo. Durante dois meses de avaliações, as plantas premunizadas com a estirpe fraca F-101 e desafiadas com a estirpe PWV-SP apresentaram apenas sintomas fracos de mosaico. Sintomas semelhantes foram apresentados pelas plantas premunizadas e não desafiadas. As plantas sadias inoculadas com a estirpe PWV-SP apresentaram sintomas severos de mosaico amarelo e lesões necróticas nas folhas e na haste, vinte dias após a inoculação.

No segundo experimento, além da estirpe F-101, foi avaliado o efeito protetor da estirpe F-144, obtida de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico. Os resultados apresentados confirmaram o efeito protetor da estirpe F-101 e mostraram que as plantas premunizadas com a estirpe F-144 e desafiadas com a estirpe PWV-SP, também ficaram protegidas, uma vez que nenhuma delas apresentou sintomas severos durante dois meses de avaliações. As plantas premunizadas e não desafiadas também não apresentaram sintomas severos da doença. As plantas sadias, inoculadas com a estirpe PWV-SP na ocasião do desafio, apresentaram sintomas severos, semelhantes aos observados no primeiro experimento.

Tabela 4. Frequência de plantas de crotalária, em dois experimentos independentes, em função da severidade de sintomas, em duas épocas de avaliação da proteção com estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus*, em casa de vegetação.

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas com nota máxima de sintoma*	
		20 dias após o desafio	60 dias após o desafio
Experimento 1			
Prem. F-101 + PWV-SP**	8	0	0
Prem. F-101	2	0	0
Sadias	2	0	0
Sadia inoculada c/ PWV-SP	2	2	2
Experimento 2			
Prem. F-101 + PWV-SP	5	0	0
Prem. F-144 + PWV-SP	5	0	0
Prem. F-101	5	0	0
Prem. F-144	5	0	0
Sadias	5	0	0
Sadia inoculada c/ PWV-SP	5	0	5

* 0= sem sintomas, 1= mosaico leve, 2= mosaico amarelo severo e 3= mosaico amarelo severo e lesões necróticas nas folhas e na haste.

** Premunizada com estirpe fraca e desafiada com a estirpe severa PWV-SP, 15 dias depois.

4.3 Efeito protetor das estirpes fracas do PWV em campo

4.3.1 Em maracujazeiro

No primeiro teste em campo foi avaliado o efeito protetor das três estirpes fracas selecionadas a partir de plantas de elite em campo (F-101, F-102 e F-103) e das três estirpes fracas selecionadas a partir de bolhas das folhas com mosaico (F-99, F-144 e F-145).

Os resultados desse teste de proteção, avaliada com base na severidade dos sintomas nas plantas-teste, estão apresentados na Tabela 5. Todas as plantas sadias inoculadas com a estirpe PWV-SP, por ocasião da inoculação de desafio das plantas premunizadas, apresentaram sintomas severos da doença, 19 dias após a inoculação. Os frutos produzidos por estas plantas apresentaram-se totalmente deformados e com manchas corticosas de formato irregular que, em alguns casos, se estendiam por toda a sua superfície. Aproximadamente, 73 % das plantas premunizadas e desafiadas também receberam nota máxima de sintoma, 19 dias após o desafio (08/01/2001). O restante das plantas premunizadas e desafiadas apresentaram sintomas fracos da doença, recebendo nota 1 na primeira avaliação (08/01/2001) (Figura 6A). No entanto, a partir do primeiro mês após o desafio, os sintomas se intensificaram gradativamente e aos 64 dias após o desafio (22/02/2001), apenas duas plantas premunizadas e desafiadas (F-101 e F-144) apresentavam-se sem sintomas severos da doença. Ao final do experimento, aos 110 dias após o desafio (08/04/2001), todas as plantas premunizadas com as seis estirpes fracas e desafiadas com a estirpe severa receberam nota máxima de sintoma (Figura 6B). Os primeiros frutos produzidos pelas plantas premunizadas e desafiadas, que receberam nota 3 somente no final do experimento, não apresentaram sintomas da doença (Figura 6C). No entanto, os frutos produzidos após a quebra de proteção apresentaram-se deformados e endurecidos (Figura 6D). As plantas premunizadas e não desafiadas, bem como aquelas sadias expostas à infecção natural foram infectadas pela estirpe

severa, pois todas elas exibiram sintomas severos da doença, seis meses depois da implantação do experimento em campo.

Tabela 5. Frequência de maracujazeiros em função da severidade de sintomas, em três datas de avaliação da proteção com estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus*, em campo.

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº plantas com grau máximo de sintoma*		
		08/01/01	22/02/01	08/04/01
Prem. F-99 + PWV-SP**	5	5	5	5
Prem. F-101 + PWV-SP	5	2	4	5
Prem. F-102 + PWV-SP	5	4	5	5
Prem. F-103 + PWV-SP	5	5	5	5
Prem. F-144 + PWV-SP	5	3	4	5
Prem. F-145 + PWV-SP	5	3	5	5
Prem. F-101	5	0	0	5
Prem. F-103	5	0	4	5
Sadias não inoculadas	5	0	3	5
Sadias inoculadas c/ PWV-SP	5	5	5	5

* 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares.

** Premunizada com estirpe fraca e desafiada com a estirpe severa PWV-SP, 30 dias depois.

Figura 6 - Folha (A) e frutos (C) de planta premunizada com estirpe fraca F-101, antes da intensificação dos sintomas e folha (B) e frutos (D), da mesma planta, após o desafio com a estirpe PWV-SP e conseqüente intensificação dos sintomas.

Os resultados do segundo teste de proteção de maracujazeiros em campo, desta vez sob condições de telado de sombrite 50 %, para que fosse minimizada a transmissão natural do vírus por afídeos, estão apresentados na Tabela 6. Neste teste, devido à limitação da área, foram avaliadas apenas duas estirpes fracas, F-101 e F-144. Aos 30 dias após o primeiro desafio (21/10/2001), 0 e 25 % das plantas premunizadas com as estirpes fracas F-101 e F-144, respectivamente, e desafiadas mecanicamente com a estirpe PWV-SP, apresentavam sintomas de mosaico, deformações foliares e bolhas. Nessa mesma época, 50 % das plantas premunizadas e desafiadas com

afídeos virulíferos, apresentavam sintomas severos da doença, independente da estirpe fraca utilizada na premunização. Aos 60 dias após o primeiro desafio (21/11/2001), 75 % das plantas premunizadas com as duas estirpes fracas e desafiadas mecanicamente exibiam sintomas severos da doença. No entanto, para as plantas premunizadas e desafiadas com afídeos, o número daquelas com sintomas severos permaneceu igual ao da avaliação anterior (21/10/2001). As plantas premunizadas e não desafiadas continuavam com sintomas fracos nessa ocasião. As plantas sadias não inoculadas não apresentavam sintomas da doença nessa data.

Na avaliação de 21/12/2001, 30 dias após o segundo desafio, foi observado um aumento no número de plantas com sintomas severos. Ao final do segundo mês (21/01/2002), após o segundo desafio, todas as plantas premunizadas com as duas estirpes fracas e desafiadas com a estirpe severa, através de inoculação mecânica e com afídeos, receberam nota máxima de sintomas.

As plantas premunizadas e não desafiadas, bem como aquelas sadias, mesmo protegidas pelo telado, foram infectadas pela estirpe severa, pois todas elas exibiram sintomas severos da doença, seis meses depois da implantação do experimento em campo.

Todas as plantas inicialmente sadias, mantidas em casa de vegetação e inoculadas com a estirpe severa do PWV, mecanicamente ou por afídeos virulíferos, na ocasião de ambos os desafios das plantas em campo, apresentaram sintomas severos da doença, 15 e 30 dias após as inoculações, respectivamente. Este resultado comprova que o inóculo para a inoculação mecânica, bem como os afídeos virulíferos utilizados nos desafios, foram eficientes.

Tabela 6. Frequência de maracujazeiros em função da severidade de sintomas, em quatro datas de avaliação da proteção com estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus*, em campo sob telado.

Tratamento	Inoculação de desafio	Nº de plantas testadas	Nº de plantas com grau máximo de sintoma*			
			Após o 1º desafio		Após o 2º desafio	
			21/10/01	21/11/01	21/12/01	21/01/02
Prem. F-101 + PWV-SP**	Mecânica	4	0	3	4	4
Prem. F-144 + PWV-SP	Mecânica	4	1	3	3	4
Prem. F-101 + PWV-SP	Afídeos	4	2	2	2	4
Prem. F-144 + PWV-SP	Afídeos	4	2	2	3	4
Prem. F-101		2	0	0	1	2
Prem. F-144		2	0	0	1	2
Sadias		5	0	0	2	5

* 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve e sem deformações foliares, 2 = mosaico severo e sem deformações foliares e 3 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares.

** Premunizada com estirpe fraca e desafiada com a estirpe severa PWV-SP, 60 e 120 dias depois.

4.3.2 Em crotalária

Nesse experimento, utilizando plantas de crotalária em campo, foi avaliado o efeito protetor das estirpes fracas F-101 e F-144 e os resultados estão apresentados na Tabela 7 e ilustrados na Figura 7. Três, dentre as cinco plantas sadias inoculadas com a estirpe PWV-SP, apresentaram sintomas severos de mosaico amarelo (Figura 7B), lesões necróticas nas folhas (Figura 7E) e na haste (Figura 7F), trinta dias após a inoculação. As plantas premunizadas com as estirpes fracas F-101 e F-144, separadamente, e desafiadas com a estirpe PWV-SP apresentaram apenas sintomas fracos de mosaico (Figuras 7A e 7C), sem lesões necróticas na haste (Figura 7D),

durante dois meses de avaliações. Sintomas semelhantes foram apresentados pelas plantas premunizadas e não desafiadas com a estirpe PWV-SP. Nenhuma planta sadia apresentou sintomas da doença no período de avaliações desse experimento.

Tabela 7. Frequência de plantas de crotalária em função da severidade de sintomas, em duas épocas de avaliação da proteção com estirpes fracas do *Passion fruit woodiness virus*, em campo.

Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas com grau máximo de sintoma*	
		30 dias após o desafio	60 dias após o desafio
Prem. F-101 + PWV-SP**	5	0	0
Prem. F-144 + PWV-SP	5	0	0
Prem. F-101	5	0	0
Prem. F-144	5	0	0
Sacias	5	0	0
Sadia inoculada c/ PWV-SP	5	3	3

* 0 = sem sintomas, 1 = mosaico leve, 2 = mosaico amarelo severo e 3 = mosaico amarelo severo e lesões necróticas nas folhas e na haste.

** Premunizada com estirpe fraca e desafiada com a estirpe severa PWV-SP, 15 dias depois.

Figura 7 – Planta de crotalária premunizada com a estirpe fraca F-101 (A) e inoculada com a estirpe severa PWV-SP (B). Nos detalhes, (C) folha da planta premunizada, com sintoma fraco de mosaico; (D) haste da mesma planta, sem sintomas; (E) folha da planta infectada com a estirpe PWV-SP, com sintoma severo de mosaico amarelo e lesões necróticas e (F) haste da mesma planta, com lesões necróticas.

4.4 Concentração das estirpes fracas do PWV em folhas de maracujazeiro

Os resultados da estimativa da concentração relativa das estirpes fracas (F-101 e F-144) em maracujazeiros estão apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Em cada gráfico estão indicados os valores de absorbância dos extratos de cinco folhas de uma planta, numeradas de 1 a 5 a partir da porção mediana do ramo em direção ao ponteiro. Dentro de cada folha foram analisadas amostras de três posições diferentes (Figura 2). Os maiores valores de absorbância indicam uma maior concentração do vírus nos tecidos. Em todas as plantas inoculadas com as estirpes fracas, a concentração do vírus mostrou-se completamente irregular, entre e dentro das folhas. Em 108 e 97 discos foliares das plantas infectadas com as estirpes F-101 e F-144, respectivamente, não foi possível detectar a presença do vírus pelos critérios adotados no DAS-ELISA indireto. A estirpe fraca F-101 foi detectada em 42 discos foliares, porém com concentrações variadas, pois os valores de absorbância oscilaram de 0,35 (planta 4, folha 3) a 1,43 (planta 10, folha 2). O mesmo foi verificado em 53 discos foliares das plantas infectadas com a estirpe F-144, onde a absorbância variou de 0,34 (planta 8, folha 1) a 0,96 (planta 9, folha 2).

Figura 8 - Valores médios de absorbância de extratos de 5 folhas diferentes, em 3 pontos distintos de cada uma (conjunto de 3 barras iguais), coletadas de 10 maracujazeiros premunizados com a estirpe fraca F-101, em teste de DAS-ELISA indireto. (Linha contínua na horizontal indica o valor igual a 3 vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia = 0,33). PWV = maracujazeiro positivo.

Figura 9 - Valores médios de absorbância de extratos de 5 folhas diferentes, em 3 pontos distintos de cada uma (conjunto de 3 barras iguais), coletadas de 10 maracujazeiros premunizados com a estirpe fraca F-144, em teste de DAS-ELISA indireto. (Linha contínua na horizontal indica o valor igual a 3 vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia = 0,33). PWV = maracujazeiro positivo.

4.5 Concentração das estirpes fracas do PWV em folhas de crotalária

Os resultados da estimativa da concentração do PWV em diferentes folhas de plantas de crotalária inoculadas com as estirpes fracas F-101 e F-144, separadamente, estão apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Em cada gráfico estão apresentados os valores de absorbância dos extratos de cinco folhas de uma planta, numeradas de 1 a 5 a partir da porção mediana da planta em direção ao ponteiro. Os maiores valores de absorbância indicam uma maior concentração do vírus nos tecidos. Independente da estirpe inoculada, a concentração do vírus nos tecidos foliares dessa hospedeira mostrou-se mais uniforme na maioria das plantas testadas, independente da posição em que a folha ocupava no ramo. Em todas as folhas das plantas testadas foi possível detectar a presença do PWV por DAS-ELISA indireto, através dos critérios utilizados nesse trabalho. Os valores de absorbância para os extratos de discos foliares das plantas infectadas com a estirpe F-101 variaram de 0,41 (planta 8, folha 5) a 1,11 (planta 2, folha 1). No caso dos discos foliares das plantas infectadas com a estirpe F-144, os valores de absorbância ficaram entre 0,38 (planta 7, folha 4) e 0,87 (planta 1, folha 5).

Figura 10 - Valores médios de absorbância de extratos de 5 folhas diferentes, coletadas de 8 plantas de crotalária premunizadas com a estirpe fraca F-101, em teste de DAS-ELISA indireto. (Linha contínua na horizontal indica o valor igual a 3 vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia = 0,38). PWV = maracujazeiro positivo.

Figura 11 - Valores médios de absorbância de extratos de 5 folhas diferentes, coletadas de 8 plantas de crotalária premunizadas com a estirpe fraca F-144, em teste de DAS-ELISA indireto. (Linha contínua na horizontal indica o valor igual a 3 vezes a média da absorbância do extrato da planta sadia = 0,38). PWV = maracujazeiro positivo.

4.6 Seqüências de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos do gene da capa protéica das estirpes fracas e severa do PWV

Utilizando-se o RNA total extraído de plantas infectadas com as estirpes fracas F-101, F-103 e a estirpe severa PWV-SP, separadamente, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 1,7 kb, para as três estirpes, através da reação da RT-PCR (Figura 12). Estes fragmentos foram clonados e seqüenciados. Tanto para as estirpes F-101 e F-103 como para a estirpe PWV-SP, foi seqüenciado um fragmento de 1055 nucleotídeos. Quando essas seqüências foram alinhadas, separadamente, com a seqüência do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (AF348210), foi identificada uma seqüência de 825 nucleotídeos que representa o gene que codifica a proteína da capa protéica do vírus, e outra de 230 nucleotídeos, que representa a região não traduzida do terminal 3'.

Figura 12 - Fragmentos virais amplificados por RT-PCR, observados em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídeo. M, marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder); 1, amostra sadia; 2 e 3, fragmentos de aproximadamente 1.700 pares de bases das estirpes F-101 e PWV-SP, respectivamente.

As Figura 13 e 14 apresentam as sequências consenso de nucleotídeos do gene da capa protéica e da região não traduzida, respectivamente, das estirpes F-101, F-103 e PWV-SP, alinhadas pelo programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Quando comparadas entre si, as estirpes fracas F-101 e F-103 apresentaram identidade de 99,7 % no gene da capa protéica. Quando estas foram comparadas com a estirpe PWV-SP, a identidade foi de 97,5 %. A seqüências de nucleotídeos da região 3' não traduzida apresentou identidade de 100 % entre as estirpes fracas e de 95,5 % entre estas e a estirpe severa. As seqüências de amino ácidos deduzidos do gene da proteína da capa protéica de cada estirpe estão na Figura 15. A identidade entre as estirpes fracas foi de 99,6 %. Quando estas foram comparadas com a estirpe PWV-SP a identidade foi de 98 %.

Figura 13 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da capa protéica das estirpes fracas (F-101 e F-103) e severa (PWV-SP).

Figura 14 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região 3' não traduzida das estirpes fracas (F-101 e F-103) e severa (PWV-SP).

Figura 15 - Alinhamento das seqüências de amino ácidos deduzidos do gene da capa protéica das estirpes fracas (F-101 e F-103) e severa (PWV-SP).

5 DISCUSSÃO

A seleção de estirpes fracas de vírus para utilização no controle por premunização pode ser feita das seguintes maneiras: a) através da seleção de plantas de elite em plantios severamente atacados pela virose; b) a partir de áreas atípicas de folhas com mosaico; c) a partir do tratamento térmico de plantas infectadas; d) através de passagens do vírus por hospedeiros alternativos; e) por meio de vetores e f) com a utilização de agentes mutagênicos e g) construção de estirpes atenuadas através da técnica de DNA recombinante (Rezende & Müller, 1995).

Neste trabalho, a seleção de estirpes fracas do PWV foi realizada a partir de plantas de elite em campo, de bolhas de folhas de maracujazeiro com mosaico e de extratos de lesões locais causadas por esse vírus em *Phaseolus vulgaris* cv. Jalo. O sistema de cultivo de maracujazeiros em espaldeiras dificultou a seleção de plantas de elite em campo, pois eles se entrelaçam, impedindo assim, a visualização e a separação de plantas assintomáticas ou com sintomas fracos da doença. Mesmo assim, foi possível localizar cinco plantas que apresentavam sintomas fracos de mosaico, bom desenvolvimento e boa produção, em pomares severamente afetados pelo endurecimento dos frutos. A transferência dos isolados do vírus presentes nessas plantas, para maracujazeiros em casa de vegetação, permitiu a seleção de três estirpes fracas, denominadas F-101, F-102 e F-103. Segundo Müller & Costa (1987), a procura de plantas de elite em plantios severamente afetados pela doença deve ser priorizada em projetos de premunização, pois o efeito protetor da estirpe fraca já vem sendo testado naturalmente em campo. Na Austrália, a seleção de estirpes fracas do PWV foi realizada através da seleção de plantas de elite em

campo (Simmonds, 1959) e este parece ser, até o momento, o único caso de sucesso da premunização no controle do PWV, no mundo. Exemplo clássico de sucesso utilizando essa metodologia foi a seleção da estirpe fraca do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) no Brasil (Müller & Costa, 1968), a qual vem sendo utilizada no controle da tristeza dos citros a mais de três décadas (Müller & Carvalho, 2001). Outros exemplos de seleção de estirpes fracas a partir de plantas de elite em campo são encontrados para o *Cocoa swollen shoot virus*, na África (Posnette & Todd, 1955), para o *Papaya ringspot virus – type P* (PRSV-P), no Brasil (Rezende, 1985) e para o *Vanilla necrosis virus*, em Tonga (Liefting et al., 1992).

Os extratos de bolhas inoculados em maracujazeiros permitiram a seleção de 3 estirpes fracas do PWV (Tabela 1), as quais foram denominadas F-99, F-144 e F-145. A utilização de extratos de bolhas como forma de obtenção de estirpes fracas foi primeiramente relatada por Rezende et al. (1982) para o PRSV-P em mamoeiro. Naquele trabalho, os autores selecionaram três estirpes fracas do vírus, a partir de extratos de 76 bolhas inoculadas em mamoeiro. Anos mais tarde, Rezende et al. (1994) também tiveram sucesso na seleção de estirpes fracas do *Papaya ringspot virus – type W* (PRSV-W) a partir de bolhas de folhas de abobrinha-de-moita com mosaico. De 87 extratos de bolhas inoculadas, três originaram estirpes fracas estáveis e que protegeram plantas de abobrinha-de-moita contra a infecção pelo complexo normal do PRSV-W.

A passagem prévia dos isolados do PWV obtidos dos extratos de bolhas, para *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2, que é hipersensível ao vírus e que poderia portanto, permitir a seleção de estirpes fracas, não deu resultado satisfatório. Três estirpes aparentemente fracas foram inicialmente selecionadas nessa hospedeira, após a inoculação de extratos de 226 bolhas. No entanto, essas estirpes induziram sintomas severos da doença quando inoculadas em maracujazeiros.

A utilização de lesões locais induzidas por um determinado vírus em um hospedeiro alternativo é uma das maneiras mais antigas de se promover a segregação do complexo normal do vírus (Hull, 2001). No entanto, a seleção de estirpes fracas do PWV a partir de extratos de lesões locais, obtidas em *P. vulgaris* cv. Jalo e inoculados em *P. vulgaris* cv. Black Turtle 2, não apresentou resultados satisfatórios. Quatro isolados que causaram apenas mosaico leve nesta hospedeira (Tabela 2), induziram mosaico severo, bolhas e deformações foliares quando inoculados em maracujazeiro. Esses resultados sugerem que o feijoeiro ‘Black Turtle 2’ não parece adequado para a seleção de estirpes fracas do PWV. Resultados negativos de seleção de estirpes fracas a partir de lesões locais também foram obtidos por Rezende (1985), na tentativa de seleção de estirpes fracas do PRSV-P, através de lesões locais produzidas ocasionalmente por esse vírus em mamoeiro cv. Solo. Rabelo (2002) também não teve sucesso na seleção de estirpes fracas do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) a partir de lesões locais em folhas de *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*.

O efeito protetor das estirpes fracas do PWV foi avaliado em maracujazeiros em casa de vegetação e em campo. Em casa de vegetação, foi observada uma proteção parcial das estirpes F-101, F-102 e F-144, contra a estirpe PWV-SP. Após 45 dias do desafio, havia quebra de proteção em 75, 62,5 e 50 % das plantas premunizadas com cada uma dessas estirpes fracas, respectivamente (Tabela 3). Em campo, num primeiro experimento, foi avaliado o efeito protetor das seis estirpes fracas selecionadas. Dezenove dias após o desafio, 73 % das plantas premunizadas e desafiadas com a estirpe PWV-SP apresentavam sintomas severos da doença (Tabela 5). Ao final do experimento, aproximadamente quatro meses após o desafio, todas as plantas premunizadas e desafiadas mecanicamente estavam severamente afetadas pela doença. O mesmo foi constatado com as plantas premunizadas e não desafiadas, bem como aquelas sadias expostas à infecção natural. Nestes casos, a transmissão da estirpe severa do PWV foi feita naturalmente por meio de afídeos vetores.

Diante da proteção parcial, conferida pelas estirpes fracas F-101, F-102 e F-144, em testes realizados em casa de vegetação (Tabela 3), e da ausência total de proteção no experimento de campo, utilizando as seis estirpes fracas selecionadas (Tabela 5), duas hipóteses foram apresentadas para explicar a intensificação de sintomas em maracujazeiros premunizados e desafiados com a estirpe severa do vírus: a) a baixa concentração e/ou distribuição irregular das estirpes fracas nos tecidos foliares das plantas premunizadas, permite a infecção e estabelecimento da estirpe severa posteriormente inoculada e b) as estirpes fracas selecionadas são de uma espécie diferente de Potyvirus, serologicamente relacionada com o PWV, e não oferecem proteção contra a estirpe severa deste último.

A primeira hipótese foi investigada repetindo-se o teste de proteção de maracujazeiros premunizados com as estirpes fracas F-101 e F-144 e desafiados com a estirpe PWV-SP, inoculada mecanicamente e com afídeos virulíferos. A superinoculação mecânica das plantas premunizadas com cada estirpe fraca foi feita na sexta e sétima folhas abaixo do ponteiro de um grupo de quatro plantas. O desafio com afídeos foi realizado confinando-se os insetos no ponteiro de um outro grupo de quatro plantas. Antes dos desafios, foi estimada a concentração relativa das estirpes fracas, em cinco folhas de um ramo das plantas, através do DAS-ELISA indireto. Com o objetivo de eliminar ou minimizar a transmissão natural da estirpe severa do PWV entre as plantas do experimento, este foi conduzido em condições de telado de sombrite 50 %. Os resultados desse teste de proteção mostraram mais uma vez que as estirpes fracas não ofereceram proteção contra a estirpe PWV-SP. Aos 60 dias após o primeiro desafio, aproximadamente 62 % das plantas premunizadas e desafiadas já apresentavam sintomas severos da doença, independente do método de inoculação utilizado no desafio. Aos 60 dias após o segundo desafio, todas as plantas premunizadas e desafiadas apresentavam mosaico severo e deformações foliares (Tabela 6). Nesta mesma ocasião, as plantas premunizadas e não desafiadas, bem como as sadias não inoculadas, também

apresentaram sintomas severos da doença. A infecção dessas plantas pela estirpe severa deve ter ocorrido através da transmissão por afídeos, que foram capazes de entrar no telado. Fato semelhante também foi observado por Gioria (1999), em experimentos de avaliação de danos causados pelo PWV em maracujazeiros, na região de Vera Cruz (SP). Após seis meses da implantação do experimento, esse autor constatou que todas as plantas sadias, mantidas sob o telado, apresentavam os sintomas da doença. O autor atribuiu essa transmissão a pulgões alados que provavelmente entraram no telado.

Os resultados obtidos nos estudos quantitativos revelaram uma grande variação na concentração das estirpes fracas nos tecidos das diferentes folhas dos maracujazeiros premunizados (Figuras 8 e 9). Na maioria dos casos, foi observada uma baixa concentração do vírus nas folhas do ponteiro. A concentração irregular das estirpes fracas também foi observada dentro de uma mesma folha, na maioria das plantas testadas. Em 68,3 % das 300 amostras de discos foliares não foi possível detectar as estirpes fracas, de acordo com o critério utilizado na interpretação do DAS-ELISA indireto. Esses resultados permitem sugerir que a baixa concentração das estirpes fracas em diversas regiões dos tecidos foliares, originam áreas viáveis para a infecção com a estirpe severa do vírus, posteriormente inoculada. Esta, por ser mais competitiva do que as estirpes fracas presentes na planta, é capaz de mover sistemicamente e se expressar nas folhas dos ponteiros dos ramos.

Segundo Kunkel (1934) e Bawden & Kassanis (1945), um dos pré-requisitos para a proteção entre estirpes do mesmo vírus é a presença da primeira estirpe em todos os sítios de replicação do vírus na célula, que impede o estabelecimento de uma outra estirpe relacionada. A quebra de proteção relacionada à baixa concentração do vírus nos tecidos foi observada por Sherwood & Fulton (1982) em plantas de *Nicotiana sylvestris* Speg. infectadas por uma estirpe do *Tobacco mosaic virus* (TMV) que causa mosaico. Quando as plantas foram desafiadas com uma estirpe que causa lesões locais

necróticas, os sintomas da estirpe desafiante foram observados apenas em áreas verde-escuras das folhas, onde a concentração da estirpe protetora era muito baixa. Nas áreas verde-claras das mesmas folhas com mosaico, onde a concentração da primeira estirpe era alta, não houve quebra de proteção. Rezende & Sherwood (1991), trabalhando com *N. tabacum* L. cvs. Samsun e Xanthi, também mostraram que a falha na proteção entre estirpes do TMV estava associada à menor concentração desse vírus em áreas verde-escuras de folhas com mosaico. Quando as plantas infectadas com a estirpe TMV-P foram desafiadas com a estirpe TMV-C em áreas verde-escuras, 79 e 67 % das plantas de 'Samsun' e 'Xanthi', respectivamente, foram infectadas com a estirpe desafiante. Por outro lado, quando plantas dos cvs. Samsun e Xanthi foram desafiadas com a estirpe TMV-C, inoculada nas áreas verde-claras, a superinfecção ocorreu em apenas 9 e 11 % das plantas, respectivamente. A ausência de proteção entre estirpes do mesmo vírus, associadas à baixa concentração e/ou distribuição irregular do vírus na planta, também foi demonstrada por Fulton (1978), em estudos com estirpes do *Tobacco streak virus* (TSV).

A hipótese de as estirpes fracas serem de uma espécie de Potyvirus diferente do PWV foi investigada através de duas abordagens: a) testes de proteção em plantas de crotalária premunizadas com as estirpes F-101 e F-144, separadamente, e desafiadas com a estirpe PWV-SP, em casa de vegetação e em campo e b) análise da seqüência de nucleotídeos e de amino ácidos deduzidos do gene da capa protéica das estirpes F-101, F-103 e PWV-SP e da seqüência de nucleotídeos da região 3' não traduzida dessas mesmas estirpes. Nos testes de proteção, todas as plantas de crotalária premunizadas com as estirpes fracas ficaram protegidas contra a infecção e/ou manifestação dos sintomas causados pela estirpe severa PWV-SP (Tabelas 4 e 7 e Figura 7). Essa proteção pode estar associada à concentração mais uniforme que as estirpes F-101 e F-144 atingiram nos tecidos foliares dessa espécie vegetal (Figuras 10 e 11).

A proteção encontrada em crotalária foi o primeiro indicativo de que as estirpes fracas são da mesma espécie da estirpe severa do PWV. A confirmação desse fato veio da análise da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a capa protéica e da região 3' não traduzida. Estas apontaram identidade de 99,7 % no gene da capa protéica das estirpes fracas F-101 e F-103 e de 97,5 % quando estas foram comparadas com a estirpe severa PWV-SP. As sequências de nucleotídeos da região 3' não traduzida apresentaram identidade de 100 % entre as estirpes fracas e de 95,5 % entre estas e a estirpe severa.

A proteção encontrada em crotalária e a alta similaridade entre as sequências de nucleotídeos do gene da capa protéica e da região 3' não traduzida são alguns dos critérios utilizados para identificar espécies de Potyvirus (Van Regenmortel et al., 2000). No caso do genoma, são consideradas estirpes de uma mesma espécie de Potyvirus, aquelas que apresentam identidade de sequência de nucleotídeos do gene que codifica a capa protéica e da região 3' não traduzida, maior ou igual a 85 e 75 %, respectivamente (Van Regenmortel et al., 2000).

O fato de as duas estirpes apresentarem resultados opostos de proteção, quando estudadas em diferentes hospedeiras, não é um fato novo. Alguns estudos já demonstraram experimentalmente que a espécie vegetal também parece ter papel relevante na proteção. Rezende et al. (1992) mostraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. infectadas com a estirpe TMV-P, e desafiadas com a estirpe TMV-C, permitiram a multiplicação desta última nas folhas inoculadas, em níveis detectáveis pelo teste de ELISA, mas ela não moveu sistemicamente nas plantas. No entanto, quando as mesmas estirpes foram usadas em testes de proteção recíproca em *N. tabacum* cvs. Samsun e Xanthi, verificou-se que em todos os casos onde constatou-se a multiplicação da estirpe desafiante nas folhas inoculadas, esta foi encontrada dias mais tarde nas folhas do ponteiro das plantas. A interferência do hospedeiro no sucesso da

proteção entre estirpes do mesmo vírus também foi demonstrada por Singh & Singh (1995). Esses autores constataram que algumas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) inoculadas com a estirpe comum do *Potato virus Y* (PVY^o) não ficaram protegidas contra uma estirpe que causava necrose (PVY^N). No entanto, plantas de *Solanum brachycarpum* Correll inoculadas com a estirpe PVY^o e desafiadas com a estirpe PVY^N, não manifestaram os sintomas característicos da estirpe desafiante.

Apesar de a premunização não ter se mostrado eficiente para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, essa linha de abordagem do problema ainda não deve ser abandonada. As evidências obtidas nesse trabalho apontaram que a quebra de proteção parece estar associada com a concentração irregular das estirpes fracas nos tecidos foliares, que propiciam a existência de áreas que permitam a infecção com outras estirpes do vírus. Assim sendo, pode-se sugerir que a seleção de clones de maracujazeiro que permitam uma maior multiplicação das estirpes fracas, sem intensificação de sintomas, possa tornar viável a premunização para o controle da doença em campo. Pode-se pensar também na possibilidade de seleção de outras estirpes fracas que tenham maior poder invasivo, com conseqüente efeito protetor. Paralelamente, recomenda-se que novas linhas de trabalho para o desenvolvimento de métodos de controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro devem ser investigadas. Entre essas, encontram-se as práticas culturais que possam minimizar a incidência e a disseminação da doença, conforme sugerido por Gioria et al. (2000), a seleção de plantas tolerantes à doença e o desenvolvimento de plantas transgênicas que ofereçam resistência à infecção com as estirpes severas do PWV.

6 CONCLUSÕES

A premunização não é recomendável para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro porque as estirpes fracas do PWV não protegem contra a infecção com as estirpes severas do vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAWDEN, F.C.; KASSANIS, B.; The suppression of one plant virus by another. **Annals of Applied Biology**, v.32, p.52-57, 1945.

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

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

CHANG, C.A.; LIN, Y.D.; LIN, H.H. Utilization of virus-free passionfruit seedling control passionfruit virus disease in Taiwan. **Proceeding of disease and pest control without pesticide**. p.349-359, 1992.

CHO, J.J.; ULLMAN, D.E.; WHEATLEY, E.; HOLLY, J.; GONSALVES, D. Commercialization of ZYMV cross protection for zucchini production in Hawaii. **Phytopathology**, v.82, p.1073, 1992.

COSTA, A.F. Contribuição ao estudo da epidemiologia e controle do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.2, p.310, 1985.

- COSTA, A.F. Pesquisa e extensão com maracujá em Pernambuco. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p.138-143.
- COSTA, A.F.; BRÁS, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) por afídeos (Hemiptera-Aphididae). **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.376, 1995. (suplemento).
- DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida Tetsukabuto para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot vírus – type W*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.4, p. 390-398, 2000.
- DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Problemas na premunização de melancia para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot vírus – type W* (PRSV-W). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p. 651-654, 2001.
- FLETCHER, J.T. The use of avirulent strains to protect plants against the effects of virulent strains. **Annals of Applied Biology**, v.89, p.110-114, 1978.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2002**: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2002. 536p.
- FUCHS, M.; FERREIRA, S.; GONSALVES, D. Management of virus diseases by classical and engineered protection. **Molecular Plant Pathology On-Line**. [Http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs](http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs). (04/10/1997).
- FULTON, R.W. Superinfection by strains of Tobacco streak virus. **Virology**, v.85, p.1-8, 1978.
- FULTON, R.W. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p.67-81, 1986.

- GALLITELLI, D.; MARTELLI, G.; MONTASSER, M.S.; TOUSIGNANT, M.E.; KAPER, J.M. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in Southern Italy. **Plant Disease**. v. 75, p.93-95, 1991.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.63, p.9-16, 1997.
- GIORIA, R. Viroses do maracujazeiro: incidência na Alta Paulista-SP; danos causados pelo "Passion fruit woodiness vírus" (PWV) e sintomatologia do "Cucumber mosaic virus" (CMV). Piracicaba, 1999. 67p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 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, n.2, p.182-189, 2000.
- HOISINGTON, D.; KAIRHALLAH, M.; GONZALEZ-DE LEON, D. **Laboratory protocols**: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2. ed, Mexico: D. F. CIMMYT, 1994. 51p.
- HUGHES, J.d'A.; OLLENNU, L.A.A. Mild strain protection of cocoa in Ghana against cocoa swollen shoot virus – a review. **Plant Pathology**, v.43, p.442-457, 1994.
- HULL, R. **Plant virology**. London: Academic Press, 2001. 1056p.
- INCH, A.J. Passionfruit diseases. **Queensland Agricultural Journal**, p.479-484, sep./out. 1978.

- 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, n.3, p-479-487, 1995.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.409-432, 1986.
- KUNKEL, L.O. Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba mosaics. **Phytopathology**, v.24, p.437-466, 1934.
- LECOQ, H.; LEMAIRE, J.M.; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. **Plant Disease**. v. 75, p.208-211, 1991.
- LIEFTING, L.; PEARSON, M.; PONE, S. The isolation and evaluation of two naturally occurring mild strains of Vanilla necrosis potyvirus for control by cross-protection. **Journal of Phytopathology**, v.136, p.9-15, 1992.
- LIMA, J.A.A.; OLIVEIRA, V.B.; TORRES FILHO, J. Avaliação dos graus de incidência de vírus em pomares de maracujazeiro, na Serra da Ibiapaba, Ceará. **Caatinga**, v.9, p.61-66, 1996.
- LORETO, T.J.G.; VITAL, A. **Viroses e micoplasmoses do maracujá em Pernambuco**. Recife: Informe SERDV, 1983. 23p.
- McKNIGHT, T. The woodiness virus of the passion vine (*Passiflora edulis* Sims.). **Queensland Journal of Agricultural Science**, v.10, p.4-35, 1953.
- 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, 2002.

- MONTASSER, M.S.; TOUSIGNANT, M.E.; KAPER, J.M. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. **Plant Disease**, v. 75, p.86-92, 1991.
- MÜLLER , G.W.; COSTA, A.S. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGY, 4., Gainesville, 1968. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida, 1968. p.71-82.
- MÜLLER , G.W.; COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.3, p.868-872, 1977.
- MÜLLER , G.W.; COSTA, A.S. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. **Phytophylactica**, v.19, p.197-198, 1987.
- MÜLLER , G.W.; CARVALHO, S.A. Trinta e três anos de controle da tristeza dos citros por premunização no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.241-242, 2001. (suplemento).
- NOVAES, Q.S. Aplicação da técnica de DAS-ELISA indireto para diagnóstico e estudos quantitativos do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Piracicaba, 1998. 61p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 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.

- OLLENNU, L.A.A.; OWUSU, G.K. Isolation and study of mild strain of cocoa swollen shoot virus for possible cross protection. In: INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY WORKSHOP, 4., Montpellier, 1989. **Proceedings**. Montpellier : ISPP/SFP, 1989. p.119-122.
- PARES, R.D.; MARTIN, A.B.; FITZELL, R.D. Virus-induced tip necrosis of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.). **Australian Plant Pathology**, v.14, p.76-78, 1985.
- PEASLEY, D.; FITZELL, R.D. Passionfruit industry benefits through scion wood scheme. **Agriculture Gazette**, v.92, p.5-8, 1981.
- PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. Doenças das plantas cultivadas: p.525-534. v.2.
- POSNETTE, A.F.; TODD, J.Mc.A. Virus diseases of cacao in West Africa. IX. Strain variant and interference in virus 1A. **Annals of Applied Biology**, v.43, p.433-453, 1955.
- RABELO, L.C. Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot virus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita. Piracicaba, 2002. 55p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RAST, A.T.B. Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crop by resistance breeding and cross protection. **Agricultural Research Reports**, v. 834, p.76, 1975.

- REZENDE, J.A.M. Tentativas de premunização para o controle do mosaico do mamoeiro. Piracicaba, 1985. 64p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- REZENDE, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, UESB, 1994. p.116-125.
- REZENDE, J.A.M. Premunização de duas espécies e um híbrido de *Cucúrbita* para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia. Piracicaba, 1996. 88p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- REZENDE, J.A.M.; MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses por premunização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.3, p.185-226, 1995.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of papaya ringspot virus - type W in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, v.82, p.171-175, 1998.
- REZENDE, J.A.M.; SHERWOOD, J.L. Breakdown of cross protection between strains of tobacco mosaic virus due to susceptibility of dark green areas to superinfection. **Phytopathology**, v.81, n.12, p.1490-1496, 1991.
- REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S.; VEGA, J.. Obtenção de isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro a partir de “bolhas” das folhas com mosaico. **Fitopatologia Brasileira**, v.7, p.542, 1982.
- REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A.; IEMMA, A.F. Efeito da premunização da abóbora ‘Menina Brasileira’ com as estirpes fracas do vírus do mosaico do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1481-1489, 1999.

- REZENDE, J.A.M.; URBAN, L.; SHERWOOD, J.L.; MELCHER, U. Host effect on cross protection between two strains of tobacco mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v.136, p.147-153, 1992.
- REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; BORBA, L.S.; COSTA, A.S. Isolados fracos do potyvirus do mosaico da abobrinha presentes em bolhas atuam na premunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.55-61, 1994.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRISCH, E.F. **Molecular Cloning** : A laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 3v.
- SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.47, p.153, 1999.
- SÃO JOSÉ, A.R.; REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.F. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Norte do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., Salvador, 1994. **Anais**. Salvador: SBF, 1994. p. 797.
- SHERWOOD, J.L.; FULTON, R.W. The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. **Virology**, v.119, p.150-158, 1982.
- SIMMONDS, J.H. Mild strain protection as a means of reducing losses from the Queensland woodiness virus in the passion vine. **Queensland Journal of Agricultural Science**, v.16, p.371-380, 1959.
- SINGH, M.; SINGH, R.P. Host dependent cross-protection between PVY^N, PVY^O, and PVA in potato cultivars and *Solanum brachycarpum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.17, p.82-86, 1995.

- TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. **Passion fruit woodiness virus**. CMI/AAB, 1973. 4p. (Description of Plant Viruses, 122).
- TIEN, P.; ZHANG, X.; QIU, B.; WU, G. Satellite RNA for control of plant diseases caused by cucumber mosaic virus. **Annals of Applied Biology**, v. 111, p.143-152, 1987.
- TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.S.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência do “Passion fruit Woodiness virus” (PWV) em maracujazais no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.1, p.76-79, 1999.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; DUBS, M.C. Serological procedures. In: MATTHEWS, R.E.F. (Ed.) **Diagnosis of plant virus diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap.7, p. 159-214.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy**: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 1162p.
- WALKEY, D.G.A.; LECOQ, H.; COLLIER, R.; DOBSON, S. Studies on the control of zucchini yellow mosaic virus in courgettes by mild strain protection. **Plant Pathology**, v.41, p.762-771, 1992.
- WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by a mild strain of zucchini yellow mosaic virus in cucumber, melon and squash. **Plant Disease**, v.75, p. 203-207, 1991.

- YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5. Pelotas, 1979. **Anais**. Pelotas:SBF, 1979. p.915-917.
- YARDEN, G.; HEMO, R.; LIVNE, H.; MAOZ, E.; LEV, E.; LECOQ, H'; RACCAH, B. Cross protection of cucurbitaceae from zucchini yellow mosaic potyvirus. **Acta Horticulturae**, n.510, p.349-356, 2000.
- YEH, S.-D.; GONSALVES, D.; WANG, H.-L.; NAMBA, R.; CHIU, R.-J. Control of papaya ringspot virus by cross protection. **Plant Disease**. v.72, p.375-380, 1988.