Ana Carolina Christino de Negreiros Alves
Engenheiro Agrônomo

Passion flower little leaf mosaic begomovirus: reação de espécies de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B

Orientador:
Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia**

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Alves, Ana Carolina Christino de Negreiros

Passion flower little leaf mosaic begomovirus: reação de espécies de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B / Ana Carolina Christino de Negreiros Alves. - - Piracicaba, 2008.

48 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Insetos vetores 2. Maracujá 3. Mosaico (Doença de planta) 4. Mosca-branca 5. Vírus c
plantas I. Título

CDD 634.425
A474p

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

*Aos meus pais, Mara e Acácio, a minha avó Nena (in memoriam) e ao meu irmãozinho
Marcus Vinicius,
Dedico.*

*As minhas tias Jenny e Ângela,
Ofereço*

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu anjo da guarda (que por sinal tem sempre muito trabalho...) e a todos aqueles que me auxiliaram durante todo este tempo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pela formação profissional e momentos preciosos da minha vida.

Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, especialmente ao setor de Fitopatologia pela estrutura e assistência oferecidas desde a iniciação científica.

Ao Professor Jorge Rezende pela orientação, amizade, estímulo e principalmente compreensão durante todos estes anos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela oportunidade e apoio financeiro.

Aos companheiros de laboratório: José S. Giampam (Minuto), Scheila Maciel, Marília D. Vecchia, Estela Bonilha (Sorvete), Débora M. S. Freitas (Lis), Daniel Nakano (Teμ-Ki) Adriana G. Moreira, Joice K. Banin, Evelyn (Peluquera), Ana C. Firmino, Adriana S. Jadão, Rogério (PaH) e Bruna (KY) pelos tantos bons momentos juntos e por tudo o que me ensinaram. A alguns também pelas briguinhas, intriguinhas e fofuquinhas que também de certa forma contribuíram para o meu crescimento.

Aos técnicos do laboratório, José Edvaldo Buriolla, e do campo experimental, Pedro C. Arthuso, pela cooperação.

Aos meus amigos Ely O. Garcia (Akola), Bárbara Eckstein, Julio C. Barbosa, M^a Cristina Rapussi (Xiquitita), Paula Porreli (Da-terra), Mariana Monteiro (Ti²-K), Fernanda Bueno (Go²gril), Luis Fernando N. Silva (Cão) e Leandro Camilli (Enéas) pelo auxílio nos momentos difíceis, companheirismo e carinho.

A todos os colegas do curso de pós graduação, pela amizade, companheirismo e empréstimo de canecas no restaurante (Ruccas).

Finalmente agradeço aos meus cãezinhos e a minha família pela compreensão, amor e estímulo para continuar caminhando.

SUMÁRIO

2.4.1 Origem e manutenção do vírus.....	18
2.4.7 Avaliação da reação de espécies de Passiflora ao PLLMV.....	22

RESUMO

Passion flower little leaf mosaic begomovirus: reação de espécies de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B

O Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV) foi encontrado causando danos severos em plantios de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em dois municípios do Estado da Bahia no ano de 2001. Nesses locais foi constatada que a incidência deste begomovirus estava relacionada à colonização das plantas por *Bemisia tabaci*, cujo biótipo não foi identificado. Até o momento este vírus não parece constituir grave ameaça a cultura do maracujazeiro, o que aparentemente está relacionado ao fato de *P. edulis* f. *flavicarpa* não ser preferida para a alimentação desse alelyrodídeo. Assim, os objetivos deste trabalho foram: a) selecionar espécies silvestres de *Passiflora* resistentes a este begomovirus que possam ser úteis em futuro programa de melhoramento genético; b) identificar possíveis hospedeiros alternativos do patógeno entre algumas espécies da vegetação espontânea e cultivadas e c) avaliar se adultos de *B. tabaci* biótipo B presentes no Estado de São Paulo são capazes de transmitir esse vírus. A reação de espécies silvestres de *Passiflora* foi avaliada por enxertia em maracujazeiro amarelo infectado que serviu como de fonte de inóculo. As avaliações foram feitas por meio da expressão de sintomas, análise de PCR e teste de recuperação do vírus para maracujazeiro amarelo. As espécies *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. morifolia*, *P. serrato-digitata*, *P. suberosa* e *P. foetida* foram suscetíveis ao PLLMV, enquanto *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. mucronata* e *P. giberti* se mostraram resistentes a este vírus. No estudo de hospedeiros alternativos, primeiramente o PLLMV foi inoculado mecanicamente nas seguintes espécies vegetais: *Capsicum annuum*, *Chenopodium quinoa*, *Solanum lycopersicon*, *S. tuberosum*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana benthamiana* e *Sida* sp.. Somente *N. benthamiana* foi infectada sistemicamente. Posteriormente foram feitas tentativas de transmissão desse begomovirus por meio de enxertia, usando-se como fonte de inóculo (porta-enxerto), plantas infectadas de *N. benthamiana*. Foram avaliadas as seguintes espécies vegetais: *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicon*, *S. tuberosum*, *N. benthamiana*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. glutinosa* e *Sida rhombifolia*. O vírus foi transmitido somente para plantas de *S. pimpinellifolium*. As sucessivas transmissões mecânicas do PLLMV em *N. benthamiana* permitiram a seleção de uma estirpe fraca e protetora deste begomovirus. *B. tabaci* biótipo B não foi capaz de transmitir o PLLMV.

Palavras-chave: Maracujazeiro; Geminivirus; Resistência; Proteção cruzada

ABSTRACT

Passion flower little leaf mosaic begomovirus: reaction of species of *Passiflora*, partial host range, selection of mild strain and transmission by *Bemisia tabaci* B biotype

The Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV) was found causing severe damage in passion flower (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) orchards in two counties of Bahia state, in 2001. The high incidence of this begomovirus was related to the colonization of plants by *Bemisia tabaci*, whose biotype was not identified. To date this virus doesn't seem to be a serious threat to the passion flower cultivation, which apparently is related to the fact that *P. edulis* f. *flavicarpa* is not a preferred species for whitefly feeding. The aim of this work were: a) to select wild species of *Passifloraceae* resistant to PLLMV, that may be useful in future breeding program; b) to identify some possible alternative hosts of the pathogen among some weed and cultivated species and c) to evaluate whether adults of *B. tabaci* biotype B are capable of transmitting this virus. The reaction of wild species of *Passifloraceae* was evaluated by grafting on infected yellow passion fruit that served as a source of inoculum. The evaluation of these plants were done by means of symptoms, PCR test and biological recovery of the virus to yellow passion fruit. The species *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. morifolia*, *P. serrato-digitata*, *P. suberosa* and *P. foetida* were susceptible to PLLMV, while *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. mucronata* and *P. giberti* were resistant to this virus. In the study of alternative hosts, at first, PLLMV was mechanically inoculated in the following species: *Capsicum annuum*, *Chenopodium quinoa*, *Solanum lycopersicon*, *S. tuberosum*, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana benthamiana* and *Sida* sp. Only *N. benthamiana* was systematically infected. Subsequently, graft transmission of PLLMV was carried out using infected *N. benthamiana* as source of inoculum (root stock). The following species were evaluated: *Solanum pimpinellifolium*, *S. lycopersicon*, *S. tuberosum*, *N. benthamiana*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. glutinosa* and *Sida rhombifolia*. The virus was transmitted only to *S. pimpinellifolium*. Successive mechanical transmissions of PLLMV in *N. benthamiana* led to the selection of a mild and protective strain of this begomovirus. *B. tabaci* biotype B was not able to transmit the PLLMV.

Keywords: Passion flower; Geminivirus; Resistance; Cross protection

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, possuindo uma área estimada em 35.000 ha e uma produção total de 330.000 t de frutos (FNP, 2007). As espécies de *Passiflora* mais plantadas no país são *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, conhecida como maracujá amarelo ou azedo e *P. alata*, o maracujá doce. Em menor escala, com importância bastante regionalizada e comercialização restrita, são cultivados o maracujá-roxo (*P. edulis* f. *edulis*), o maracujá-melão (*P. quadrangularis*), o maracujá-tubarão (*P. cincinnata*) e o maracujá-suspiro (*P. nitida*).

A cultura tem grandes perdas quantitativas e qualitativas de produção devido a doenças fúngicas, bacterianas e de natureza viral. No Brasil foram descritas várias espécies de vírus causando doenças em passifloras. O *Cucumber mosaic virus* (CMV) causa mosaico foliar e manchas amarelas que podem coalescer. Frutos deformados e endurecidos em decorrência da infecção com o CMV já foram observados na Austrália (TAYLOR; KIMBLE, 1964). Este vírus, no entanto, tem movimentação sistêmica limitada em plantas, tornando-o um patógeno de pouca importância no maracujazeiro no Brasil (GIORIA et al., 2002). O agente causal da pinta verde do maracujazeiro, Passion fruit green spot virus (PGSV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, já causou danos significativos na produção de maracujazeiro em São Paulo (KITAJIMA et al., 1997). O monitoramento e posterior controle do ácaro vetor têm permitido o combate à doença, uma vez que o vírus fica localizado nos pontos de alimentação do ácaro. Há outros vírus de ocorrência esporádica e menor importância para a cultura do maracujazeiro já descritos no Brasil. O Purple grandilla mosaic virus (PGMV), que foi encontrado apenas em *P. edulis* no Brasil. O Passion fruit yellow mosaic virus (PaYMV), um Tymovirus que foi descrito apenas na Colômbia e no Brasil, não sendo detectado em pomares brasileiros atualmente, isto talvez devido ao possível vetor, *Diabrotica speciosa*, ser encontrado apenas ocasionalmente na cultura. Um possível membro da família rhabdovirus denominado Passion fruit vein clearing virus (FISCHER; REZENDE, 2008).

O endurecimento dos frutos, causado pelo potyvirus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é a mais importante doença da cultura. Anteriormente essa virose foi atribuída ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV). No entanto, estudos de filogenia de isolados encontrados causando endurecimento dos frutos em diversas regiões de cultivo de maracujazeiro demonstraram que no Brasil a doença é causada por um isolado do CABMV (NASCIMENTO et

al., 2006). Este vírus encontra-se distribuído por todas as áreas produtoras de maracujá no território nacional e causa prejuízos significativos na produção quantitativa e qualitativa do maracujazeiro, além de reduzir a vida útil do pomar. O controle da virose é difícil, uma vez que as espécies comerciais de maracujazeiro são suscetíveis ao CABMV, o vírus pode ser transmitido durante os tratos culturais e de modo não persistente por diversos pulgões, o que torna o controle químico dos insetos ineficiente (KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; GIORIA et al., 2000; REZENDE; KITAJIMA, 2003; FISCHER; REZENDE, 2008).

Alguns anos atrás foi constatada a presença de uma possível nova espécie da Família *Geminiviridae*, Gênero *Begomovirus*, denominada Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV), em infecção mista com o CABMV, causando grandes prejuízos em plantios de maracujazeiro no Estado da Bahia (NOVAES et al., 2002, 2003). Esse vírus foi posteriormente constatado em plantas isoladas nos Estado do Rio de Janeiro (MOREIRA et al., 2006), Minas Gerais e Pará (MOREIRA; REZENDE, dados não publicados). Mais recentemente, um begomovirus, que pode ser a mesma espécie, foi detectado por PCR em maracujazeiro no Estado de Alagoas (LIMA et al., 2005). Até o momento, no entanto, essa begomovirose não parece constituir grave ameaça para a cultura do maracujazeiro, especialmente pelo fato de esta espécie vegetal não ser preferida para alimentação de *Bemisia tabaci* biótipo B, inseto vetor de begomovirus.

Apesar da pouca importância dessa virose no momento, estudos devem ser desenvolvidos para elucidar as características biológicas e epidemiológicas da doença. Esse conhecimento poderá ser útil para elaboração de estratégias de controle, caso ocorram aumentos na incidência da doença no futuro. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram: a) selecionar espécies de *Passiflora* resistentes a este begomovirus que possam ser úteis em futuro programa de melhoramento genético; b) identificar possíveis hospedeiros alternativos do PLLMV entre espécies cultivadas e da vegetação espontânea e c) verificar se adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B são capazes de transmitir o PLLMV.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Sobre o maracujazeiro

O termo maracujazeiro é a denominação genérica de cerca de quinhentas espécies de *Passiflora*, a maioria nativa da América Tropical (SALOMÃO; ANDRADE, 1987; VANDERPLANK, 1996). As *Passifloraceae* americanas estão distribuídas em quatro gêneros (*Dilkea*, *Tetrastylus*, *Mitostemma* e *Passiflora*) sendo o gênero *Passiflora* de longe o mais importante, com 519 espécies reconhecidas (ESCOBAR, 1988). O número de espécies nativas encontradas no Brasil está em torno de 150, sendo a região Centro-Norte a maior em distribuição. O gênero *Passiflora* guarda uma grande diversidade genética, podendo encontrar espécies com diferenças morfológicas, de resistência às doenças, florescimento, entre outras. Estima-se que há de 50 a 60 espécies de *Passiflora* com fruta comestível dentro do gênero (BRUCKNER; OTONI, 1999). Além do uso alimentício, as passifloras também podem ser exploradas para ornamentação e fins medicinais. O uso de passifloras em ornamentação é muito restrito no Brasil, no entanto vem crescendo em países do Hemisfério Norte, onde são cultivadas espécies como *P. murucuja*, *P. caerulea* e *P. incarnata*. O uso medicinal de espécies de *Passiflora* faz parte da cultura de povos americanos, europeus e asiáticos, sendo recomendadas flores, folhas, frutos ou mesmo raízes para tratamento de diversas enfermidades desde verminoses a tumores gástricos. O uso medicinal se popularizou, no entanto, pelos efeitos benéficos ao sistema nervoso, em tratamentos de insônia, histeria e depressão, atribuídos em especial às espécies *P. alata* e *P. foetida*. Algumas espécies de maracujá também são apontadas como alimento funcional, como por exemplo, *P. edulis* no tratamento de obesidade e diabetes (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; PEIXOTO, 2005).

O maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) é uma planta alógama, com número de cromossomos $2n = 18$, que apresenta auto-incompatibilidade sem diferenciação morfológica na flor (homomórfica) e determinada pelo pólen (esporofítica). O agente polinizador é exclusivamente a mamangava (*Xylocopa* sp) isto porque insetos menores podem coletar néctar sem realizar a polinização. Não há envolvimento do vento na polinização devido ao pólen ser pesado e pegajoso, dependendo a cultura do inseto ou polinizações artificiais. Estas últimas são viáveis devido a eficiência na polinização ser proporcional a produtividade final da cultura. O florescimento é afetado por condições de temperatura, precipitação e principalmente pelo fotoperíodo, sendo que a quantidade de dias longos acaba por determinar o período de safra de

uma região. A cultura e propagada no país principalmente por sementes, da mesma forma que em outros países produtores como o Havaí, Equador, Quênia, entre outros, havendo poucas exceções onde são utilizados híbridos enxertados (SOUZA; MELETTI, 1997; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). O maracujá azedo representa cerca de 97% da área plantada de passifloras no Brasil. O Estado da Bahia é o maior produtor nacional, com cerca de 114 mil toneladas de fruto produzidas em 2004, seguido pelo Estado do Espírito Santo (aproximadamente 81 mil toneladas de fruto ao ano) e demais estados com produção muito inferior. Esta produção é quase que totalmente absorvida pelo mercado interno, havendo pouca exportação do fruto. A cultura pode ser plantada em ampla faixa de latitude (40° N a 35° S) estando presente em todo o país, exceto nos estados do Rio Grande do Sul e Roraima devido a condições ambientais não favoráveis (SOUZA; MELETTI, 1997; FNP, 2007).

A cultura do maracujá azedo adquiriu expressão econômica na década de 80, inicialmente pelo incentivo da agroindústria, que estimulou o mercado do produto processado na forma de suco e, em seguida, pela crescente demanda no segmento *in natura*. A fruta, que era pouco comum nos mercados de atacado e varejo do país, passou a ter seu espaço garantido. Os primeiros cultivares de maracujazeiro tornaram-se disponíveis somente a partir de 1999, com algumas seleções regionais como a Maguary (mais cultivada em Minas Gerais), Sul-Brasil, Golden Star (Rio de Janeiro e Espírito Santo) e as cultivares desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo da Campinas: IAC Monte-Alegre, IAC – Jóia e IAC- Maravilha, antigas IAC 273, 277 e 275 respectivamente, mais utilizadas no Estado de São Paulo. Estas representam um avanço considerável em produtividade e qualidade de frutos para consumo *in natura* e industrial, porém deixam a desejar quanto à resistência as moléstias. A partir de 2000 o melhoramento genético se desenvolveu para atender aos novos padrões da indústria e consumo e também intensificar a busca por resistência varietal as principais doenças limitantes da cultura, a fusariose (*Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*), a bacteriose ou morte precoce (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) e ao vírus causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (CABMV) (MELETTI, 2001; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

A busca por resistência genética às doenças do maracujazeiro na verdade teve início a mais de duas décadas, observando um grande potencial no uso de espécies silvestres nos programas de melhoramento, com uso de cruzamentos artificiais. Como exemplos podem ser citadas as espécies *P. giberti* e *P. maliformis*, que possuem resistência à bacteriose. *P. nitida* e *P.*

mucronata são pouco afetadas pela infecção de *Nectria haematococca*, agente causal de cancos e desintegração de tecidos corticais do colo e das raízes das plantas, com conseqüente morte dessas. *P. suberosa* é resistente ao vírus do mosaico do maracujá roxo (PGMV). *P. alata*, *P. giberti* e *P. caerulea* são resistentes a fusariose. *P. macrocarpa*, *P. caerulea* e *P. cincinnata* apresentam resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita*. *P. serrato-digitata* e *P. amethystina* são resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose nos frutos e ramos. *P. suberosa* revelou-se imune ao CABMV (BRAGA; JUNQUEIRA, 2000; RONCATTO et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2005; FISCHER et al., 2005; MACIEL et al., 2009).

2.2 Sobre o Passion flower little leaf mosaic virus

O Passion flower little leaf mosaic virus é um membro tentativo da família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. Os geminivirus são caracterizados por apresentarem partículas icosaédricas geminadas, fato que deu origem ao nome da família. O ácido nucléico é constituído de DNA circular de fita simples, havendo um componente genômico nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus* e dois componentes, chamados A e B, no gênero *Begomovirus*. A maioria dos begomovirus possuem DNA-A e DNA-B, havendo poucas exceções como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) e o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), que possuem apenas o DNA-A. O componente A contém genes necessários para a replicação viral e encapsidação e o B contém genes ligados a movimentação sistêmica, hospedeiros e desenvolvimento de sintomas. Ambos os componentes possuem uma região de cerca de 200 nucleotídeos chamada região comum (RC) que apresenta alta homologia (cerca de 90%). Nesta região comum está inserida uma sequência de nove nucleotídeos, o domínio funcional da origem de replicação, que será clivado no início da replicação viral, processo que ocorre pelo mecanismo de círculo rolante. Os begomovirus também podem ser distinguidos dos demais gêneros dentro da família *Geminiviridae* por serem transmitidos por aleyrodídeos, alguns também por transmissão mecânica, à espécies de dicotiledôneas como feijoeiro, soja, tomateiro, entre outras. *Curtovirus* e *Topocuvirus* são transmitidos à espécies dicotiledôneas por cigarrinhas das famílias *Cicadellidae* e *Membracidae*, respectivamente. Os *Mastrevirus* também são transmitidos por cigarrinhas

(Homoptera: Cicadellidae) para monocotiledôneas, havendo algumas espécies que infectam dicotiledôneas (FAUQUET et al., 2005; FARIA; ZERBINI, 2000).

O PLLMV foi constado inicialmente em plantios de maracujazeiro nos municípios de Nossa Senhora do Livramento e Bom Jesus da Lapa, no Estado da Bahia, no ano de 2001. No primeiro município, onde foram inspecionados dois pomares, num total de aproximadamente 10.000 plantas, todas estavam infectadas com esse vírus e o CABMV (NOVAES et al., 2002; 2003). Constatou-se também que a alta incidência desse begomovirus em maracujazeiros estava associada com a colonização das plantas pelo aleyrodídeo *Bemisia tabaci*, conhecido vulgarmente como “mosca-branca”. Naquela ocasião não houve identificação do biótipo do inseto. Todas as plantas apresentavam sintomas de mosaico amarelo, intensa redução e encarquilhamento do limbo foliar e redução no desenvolvimento vegetativo.

Adultos de *B. tabaci* coletados nas plantas infectadas em campo e transferidos para plantas sadias de maracujazeiro comprovaram a transmissão do PLLMV e permitiram o seu isolamento da infecção mista com o CABMV. Plantas de maracujazeiro infectadas apenas com esse begomovirus exibem mosaico amarelo, um pouco menos intenso do que o observado em campo, acompanhado de severa redução no tamanho das folhas novas (Figura 1). O desenvolvimento das plantas também é afetado em relação ao daquelas sadias.

Figura 1 - Planta de maracujazeiro-amarelo infectada pelo PLLMV

DNA total, extraído de plantas sintomáticas do Estado da Bahia, submetido a uma reação de PCR, usando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) universais para os componentes A (WYATT; BROWN, 1996) e B (ROJAS et al., 1993) dos begomovirus bipartidos, permitiu a

amplificação de fragmentos com cerca de 550 e 500 pb, respectivamente. A sequência de nucleotídeos do fragmento do DNA A, que corresponde à região central do gene da proteína capsidial, mostrou maiores identidades com as das putativas espécies *Sida mottle virus* (89,2%) e *Sida yellow mosaic virus* (88,3%), isoladas de *Sida rhombifolia* em Viçosa, Minas Gerais (NOVAES et al., 2003). Análise filogenética permitiu enquadrar o PLLMV no grupo de begomovirus do Novo Mundo, juntamente com outras espécies desse gênero encontradas no Brasil, sugerindo ser aqui o seu provável centro de origem. Em Andradina (AL) também foi detectado um begomovirus infectando maracujazeiro (LIMA et al., 2005), porém não há sequência de nucleotídeos disponível para comparação com o isolado encontrado no estado da Bahia. Uma outra espécie de begomovirus, tentativamente denominada *Passiflora leaf mottle virus*, foi encontrada infectando maracujazeiros em Porto Rico (BROWN; BIRD; FLETCHER, 1993). O vírus foi posteriormente identificado como sendo *Jathropha mosaic virus* (JMV). Esse vírus foi transmitido experimentalmente pela *B. tabaci* biótipo B de plantas infectadas de *Jatropha gossypiflora* e *J. multifida* para essas duas espécies e para *P. foetida* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (BROWN; BIRD, 1996; BROWN, 2001).

A sequência completa de nucleotídeos do DNA-A do isolado do PLLMV encontrado no Rio de Janeiro foi recentemente obtida e revelou identidades de 89,8 e 91,1% com dois isolados do *Sida mottle virus*, indicando tratar-se de possível estirpe desse vírus com base nos recentes critérios de classificação de variantes, estirpes e espécies de begomovirus (MOREIRA et al, dados não publicados; FAUQUET et al., 2008).

Embora até o momento o PLLMV tenha sido constatado em plantios comerciais no Estado da Bahia e em algumas plantas isoladas em pomares nos Estados do Rio de Janeiro, de Minas Gerais e do Pará ele representa uma ameaça potencial para o cultivo dessa frutífera, caso o biótipo de *B. tabaci* encontrado colonizando *Passiflora* sp na Bahia torne-se comum nas regiões produtoras de maracujá do país.

2.3 *Bemisia tabaci* biótipo B

Bemisia tabaci é uma espécie da ordem *Hemiptera*, subordem *Sternorhyncha*, família *Aleyrodidae*. São insetos pequenos (cerca de 1 mm de comprimento) e recobertos por uma pulverulência branca, o que levou a denominação popular “mosca-branca”. O aparelho digestivo destes insetos tem forma de câmara-filtro, ou seja, uma câmara onde o excesso de líquido sugado passa diretamente para o final do tubo digestivo, sendo eliminado pelo ânus em forma de gotículas (“honeydew”), o que permite a sucção contínua de seiva pelo inseto, uma vez que este se alimenta de um suco concentrado e de fácil absorção. O ciclo de vida do inseto é de aproximadamente 15 dias, sendo que a fêmea vive aproximadamente 18 dias. O inseto sofre quatro ecdises até atingir a forma adulta, sendo que as ninfas, assim como os ovos, ficam aderidas na face inferior das folhas e tem pouca mobilidade. A última forma jovem, denominada ninfa IV é imóvel e não se alimenta, sendo por isso erroneamente chamada de “pupa”. A reprodução é sexuada, podendo, no entanto, haver partenogênese. O centro de origem desta espécie é possivelmente a Índia e regiões próximas (NAKANO et al., 2002; GULLAN; CRASTON, 2005).

A partir da década de 80 foram observados nos EUA aleyrodídeos com comportamento alimentar diverso e mais amplo do que as antigas populações de *B. tabaci* (predominantemente biótipo A), causando prejuízos em feijoeiro, algodoeiro, tomateiro e outras culturas. Estudos baseados na morfologia da última ninfa (IV) e moleculares demonstraram se tratar de biótipos dentro da espécie *B. tabaci*, ao invés de diferentes espécies, sendo que estes biótipos diferem entre si também quanto aos hospedeiros preferenciais (espécies e mesmo variedades de plantas), capacidade de transmissão de vírus e até mesmo incompatibilidade de cruzamentos, ou seja, infertilidade (BROWN; BIRD, 1992; MARKHAM et al., 1996; PERRING, 2001).

Entre os mais de vinte biótipos identificados, os biótipos B e Q são os que causam maiores danos as culturas pela alimentação direta no floema, transmissão de vírus e excreção de “honeydew”, que atua como substrato para crescimento fúngico na superfície das folhas (fumagina), o que reduz a capacidade fotossintética da planta. O biótipo Q foi relatado na década de 90 no sul da Europa, e posteriormente no Japão, Espanha, China, USA e áreas próximas ao mediterrâneo. O biótipo B atualmente está disperso em todos os continentes, especialmente no Brasil. Este biótipo se destaca pelo alto potencial biológico (300 ovos/fêmea) em comparação as antigas populações de *B. tabaci* biótipo A (próximas a 100 ovos /fêmea), apresenta resistência a alguns inseticidas, ampla adaptação a novos hospedeiros e transmissão de vírus dos gêneros

Crinivirus (Closteriviridae), *Carlavirus* (Potyviridae) e em maior número *Begomovirus* (Geminiviridae), o que o torna o biótipo mais importante em todo o mundo. O aumento de populações de *B. tabaci* biótipo B, a adaptação a outros hospedeiros ou introdução em alguns locais estão diretamente relacionados com as freqüentes ocorrências de epidemias de geminivirus, sejam estes já conhecidos em outros hospedeiros ou mesmo a emergência de novas espécies de vírus (BROWN; BIRD, 1992; MARKHAM et al., 1996; JONES, 2003; DE BARRO; TRUEMAN; FROHLICH, 2005).

Os Begomovirus constituem o grupo mais numeroso de vírus transmitidos por *B. tabaci* e causam sérios danos em diversas culturas como soja, feijoeiro, algodoeiro, mandioca, fumo, crucíferas, cucurbitáceas e solanáceas (JONES, 2003). Estes vírus são transmitidos de forma persistente, circulativa e geralmente não propagativa pelo vetor. As ninfas podem adquirir o vírus durante a alimentação e este pode permanecer no inseto após as ecdises até o estágio adulto, sendo as fêmeas consideradas mais eficientes em transmitir vírus do que os machos. Há alguns casos excepcionais. O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) pode ser transmitido entre aleyrodídeos durante a cópula e se replicar no vetor. Também há relato de transmissão transovariana envolvendo o *Tomato yellow leaf curl Sardina virus* (TYLCSV), e a presença do vírus no vetor afetar sua fecundidade ou longevidade. A grande variabilidade genética dentro do gênero *Begomovirus* poderia ser a causa dos diversos tipos de relações com o vetor que são encontrados. Pelo fato da transmissão ser do tipo circulativa no vetor há um período de latência para a transmissão de begomovirus pelo inseto (HUNTER et al., 1998; HARRIS; SMITH; DUFFUS, 2001; HOGENHOUT et al., 2008).

Os vírus são adquiridos durante a alimentação do inseto no floema da planta infectada, passando pelo estomodéu. Assim como o alimento, os vírus são concentrados na câmara filtro, de onde possivelmente passam para a hemolinfa do inseto, e assim circulam pelo corpo deste. As partículas atravessam a membrana da glândula salivar, e após passarem por pequenos dutos nesta estrutura, são liberados com a secreção salivar na próxima alimentação do aleyrodídeo. As proteínas da capa protéica são fundamentais para que ocorra a transmissão e são o mais importante fator de especificidade entre o vírus e seu vetor, talvez por isto tenham menor variabilidade de sequência do que outras proteínas virais. A transmissão também pode estar associada à presença de uma proteína produzida por uma bactéria endossimbionte do aleyrodídeo, semelhante a proteína GroEL produzida por *Buchnera* sp., um endossimbionte de afídeos que

auxilia na transmissão de vírus transmitidos por estes insetos. Esta proteína se complexa as partículas virais, protegendo-as da rápida proteólise que ocorreria no interior do inseto, caso este complexo não fosse formado (MORIN et al., 2000; HOUGENHOUT et al., 2008). A não transmissão de um begomovirus por aleyrodídeos é determinada pela capacidade do vírus em se ligar a possíveis receptores no inseto e assim cruzar a barreira da câmara-filtro (ou região anterior do mesenterom) e atingir a hemolinfa do inseto. A aquisição e retenção de vírus no aleyrodídeo aparentemente não são processos específicos para cada isolado ou espécie de vírus, uma vez que podem ocorrer mesmo que o inseto não seja capaz de transmitir o begomovirus, como *Trialeurodes vaporariorum*, por exemplo. Há relatos na literatura de vírus e recombinantes artificiais que não são transmitidos por aleyrodídeos, no entanto estes são retidos no inseto por alguns dias, o que indica que as partículas são estáveis no proctodeu, mesmo não havendo neste estágio reação com a proteína GroEL (WU et al., 1996; HÖFER et al., 1997; ROSELL et al., 1999; MORIN et al., 2000).

O período necessário para aquisição, latência e inoculação de begomovirus varia entre as espécies, o que pode ser uma adaptação dos isolados para a transmissão por diferentes biótipos ou mesmo devido as condições experimentais (PICCÓ; DIEZ; NUEZ, 1996). Brown e Bird (1992) citam que para eficiente transmissão de geminivirus é necessário um período de acesso a aquisição (PAA) de 2 a 24 horas, um período de acesso a inoculação (PAI) de 2 a 3 dias, podendo haver um período de latência de 4 a 10 horas. Cohen et al. (1983) observaram 100% de plantas infectadas pelo *Squash leaf curl virus* (SqLCV) quando os insetos foram deixados durante 6 horas para aquisição do vírus, sendo o período mínimo necessário para aquisição de 30 minutos. Santos, Ávila e Resende (2003) observaram um período de aquisição mínimo para transmissão do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) próximo a 5 minutos e o período de acesso a transmissão de 15 minutos, sendo que o aumento destes períodos em casa de vegetação aumentou a eficiência de transmissão do vírus. Firmino (2007) observou um período de aquisição mínimo de 30 minutos, um período de acesso a inoculação mínimo de 10 minutos e um período de latência de 16 horas para o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), sendo que o inseto foi capaz de transmitir o vírus até 20 dias após a aquisição. Mansour e Al-Musa (1992) obtiveram um período mínimo de aquisição e inoculação de 30 minutos para o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), havendo um período de latência de 20 horas. Estes valores são relativos a um isolado obtido da

Jordânia, que segundo os autores, diferem dos resultados obtidos para outros isolados do mesmo begomovírus, como os isolados obtidos na Arábia Saudita, Israel e Tunísia.

Apesar de a *B. tabaci* biótipo B ser um inseto polífago, dificilmente é encontrada em cultivos comerciais de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). No entanto, Nunes et al. (no prelo) observaram recentemente a colonização em casa-de-vegetação de *B. tabaci* biótipo B em espécies de *Passiflora*. Estes autores constataram que houve maior preferência para colonização e ovoposição em *P. amethystina*, seguida em menor quantidade de ninfas e ovos por folhas as espécies *P. morifolia*, *P. cincinnata*, *P. caerulea* e *P. foetida*, havendo pouquíssima ou ausência de colonização em *P. coriacea*, *P. suberosa*, *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*.

2.4 Materiais e métodos

2.4.1 Origem e manutenção do vírus

O isolado do PLLMV oriundo de São Fidelis (RJ) foi mantido em plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) em casa de vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Com a finalidade de manter fonte de inóculo de boa qualidade, o isolado foi freqüentemente transmitido por enxertia para novas plantas de maracujazeiro.

2.4.2 Colônia de *B. tabaci* biótipo B

Colônias do alelodídeo *B. tabaci* biótipo B livres de vírus, iniciadas com adultos coletados em São Paulo pelo Dr. André L. Lourenção (IAC), foram mantidas sobre plantas sadias de couve (*Brassica oleraceae*), em gaiolas a prova de insetos, no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Os insetos foram identificados pelas Dras Geni L. Villas Boas e Maria Esther de Noronha Fonseca (Embrapa Hortaliças) como *Bemisia tabaci* biótipo B. A confirmação de que o biótipo B de *B. tabaci* não foi substituído por algum outro biótipo durante o experimento foi feita através

de freqüente observação da indução de prateamento de folhas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* cv Caserta), quando os insetos ficam confinados nestas plantas (SSERUWAGI et al, 2005).

2.4.3 Transmissão mecânica do PLLMV

O inóculo viral foi obtido a partir de folhas de maracujazeiro ou *Nicotiana benthamiana* infectadas com o PLLMV, macerando-as em almofariz de porcelana, em presença de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0 acrescido de sulfito de sódio 0,02 M. As inoculações foram feitas nas folhas das plantas-teste polvilhadas com abrasivo Carbureto de silício (carburundum), friccionando-as com o indicador umedecido na solução de inóculo. Em seguida as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e de inóculo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para observações de sintomas e posteriormente análises para confirmação de infecção com o begomovirus.

2.4.4 Transmissão do PLLMV por enxertia

Plantas de maracujazeiro amarelo foram obtidas a partir da semeadura em vasos de alumínio, contendo uma mistura de terra mais matéria orgânica. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação. Quando atingiram uma altura de aproximadamente 20 cm foram decapitadas e na região central da haste foi aberta uma fenda longitudinal, de aproximadamente 2 cm de comprimento, com uma gilete. Na fenda dessa planta, considerada o porta-enxerto, foi inserido um pedaço de haste obtido de planta de maracujazeiro infectada com o PLLMV. Para isso, na base dessa haste foram feitos dois cortes em bisel, formando uma cunha, de aproximadamente 1,5 cm. As partes foram mantidas juntas por meio de presilhas plásticas apropriadas para essa prática horticultural. Após o pegamento do enxerto as presilhas foram retiradas e as plantas sintomáticas foram usadas posteriormente como fontes de inóculo ou como porta enxertos para outros testes que serão descritos adiante.

2.4.5 Transmissão do PLLMV por *B. tabaci* biótipo B

Adultos de *B. tabaci* livres de vírus foram coletados com sugadores (figura 2A) e colocados para se alimentar sobre plantas-teste sistemicamente infectadas com o PLLMV. Os insetos foram confinados em folhas das plantas no interior de pequenas gaiolas confeccionadas com tecido a prova de insetos (figura 2B). O período de alimentação para a aquisição do vírus foi de aproximadamente 12 h. Após a aquisição os aleyrodídeos foram retirados destas plantas e colocados sobre plantas saudáveis das espécies a serem testadas. Foram confinados um número mínimo de dez insetos por planta. O período de alimentação para transmissão também foi de 12 h. Em seguida as plantas foram pulverizadas com inseticida para eliminar os insetos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação.

Figura 2 - Transmissão por aleyrodídeos. (A) sugador utilizado na coleta dos aleyrodídeos e (B) insetos confinados em gaiola de tecido para se alimentarem em planta de tomateiro

Como controle da eficiência da *B. tabaci* biótipo B na transmissão de begomovirus foi usado um isolado do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) mantido em tomateiro (*Solanum lycopersicum* = *Lycopersicon esculentum*). A transmissão foi feita de tomateiro para tomateiro usando o mesmo procedimento descrito acima.

2.4.6 Detecção do PLLMV por PCR

Para averiguar a aquisição do vírus pela *Bemisia tabaci* biótipo B foi feita extração total de DNA dos aleyrodídeos após o período de aquisição do vírus segundo Metha et al. (1994), com algumas modificações. Um número mínimo de dez insetos foi coletado e congelado em 200 µl de tampão TE (Tris-EDTA 0,1M, 1% SDS, pH 9,0). Os insetos foram macerados no mesmo tampão. Em seguida adicionou-se proteinase K (50 µg/ml) e incubou-se a 65°C durante 30 min. Após foram adicionados 3,5 µl de acetato de potássio 8 M e incubou-se em gelo por 30 minutos. Em seguida foi feita uma centrifugação a 8.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a este adicionados 200 µl de clorofórmio: fenol (1:1) e a mistura foi novamente centrifugada a 8.000g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada, e a esta foram adicionados 500 µl de etanol absoluto e a mistura foi acondicionada em freezer (-20°C) durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µl de etanol 70 %. O precipitado foi dissolvido em 25 µl de água deionizada. Como controle foram usados aleyrodídeos que se alimentaram em plantas de tomateiro sadias e infectadas com o ToYVSV.

Para a extração do DNA total das plantas inoculadas foi usado o protocolo desenvolvido por Zhang et al. (1998) com algumas alterações. Amostras de folhas das plantas-teste, do controle positivo (planta infectada com o PLLMV) e do controle negativo (planta sadia) foram maceradas em nitrogênio líquido adicionando-se 800 µl de tampão CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, pH 8,0 e 0,2% de mercaptoethanol) aquecido a 65°C. As amostras foram agitadas em vortex e mantidas em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, agitando-as a cada dez minutos. A seguir, foi adicionado um volume de CIA 24:1 (clorofórmio: álcool isoamilico), agitado em vortex e centrifugado por dez minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado um volume de isopropanol e 0,25 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5. A seguir as amostras foram colocadas em freezer por no mínimo uma hora e em seguida centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado por duas vezes com 500 µl de etanol 70%, centrifugando por um minuto a 8.000 g após cada lavagem. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 20 µl de água deionizada (Milli Q).

Para a reação de PCR foram utilizados dois µl de DNA total extraído para a amplificação como descrito por Wyatt e Brown (1996). Foram usados separadamente oligonucleotídeos que

amplificam parte do DNA-A que contém o gene da proteína capsidial (AV494 /Ac1048) e do DNA-B (PCRc1/PBL1v 2040). Em termociclador, as amostras foram aquecidas a 94°C por 2 minutos e após passaram por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C, sendo completado por 10 min. a 72°C. O produto desta reação foi identificado juntamente com marcador de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) em gel de agarose 1%, corado com Syber safe (1:10000, Invitrogen).

2.4.7 Avaliação da reação de espécies de *Passiflora* ao PLLMV

Diferentes espécies de *Passiflora* (Tabela 1) obtidas de coleções mantidas por instituições de pesquisas e ensino do país foram estudadas quanto à infecção com o PLLMV.

Tabela 1 - Espécies silvestres de <i>Passiflora</i> e fontes de origem	
Espécies de <i>Passifloraceae</i>	Procedência
<i>P. nitida</i>	IAC – Campinas
<i>P. suberosa</i>	IAC – Campinas
<i>P. quadrangularis</i>	IAC – Campinas
<i>P. serrato-digitata</i>	IAC – Campinas
<i>P. caerulea</i>	IAC – Campinas
<i>P. cincinnata</i>	IAC – Campinas
<i>P. morifolia</i>	Unesp – Jaboticabal
<i>P. alata</i>	ESALQ – Depto de genética
<i>P. foetida</i>	ESALQ – Depto de genética
<i>P. giberti</i>	ESALQ – Depto de genética
<i>P. amethystina</i>	ESALQ – Depto de genética
<i>P. mucronata</i>	Produtor – RJ

As espécies silvestres de *Passiflora* foram enxertadas em plantas de maracujazeiro amarelo infectadas com o PLLMV conforme descrito anteriormente e após o pegamento dos enxertos e posterior desenvolvimento das copas enxertadas foi feita a avaliação da infecção. Foram utilizadas cinco estacas de cada espécie para enxertia em cinco porta-enxertos infectados com o begomovirus. A avaliação foi feita inicialmente com base na observação visual dos sintomas. A confirmação da infecção foi feita por meio do teste de PCR e recuperação do vírus das plantas

testadas para plantas sadias de maracujazeiro amarelo por meio de enxertia. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e feitas avaliações semanais quanto à presença de sintomas típicos do begomovirus nas novas brotações do porta-enxerto.

2.4.8 Avaliação da gama de hospedeiros do PLLMV

Espécies cultivadas, da vegetação espontânea e indicadoras de vírus foram cultivadas em vasos de alumínio, sob condições de casa de vegetação, para avaliação da suscetibilidade ao PLLMV. A suscetibilidade dessas plantas-teste foi avaliada por meio da transmissão mecânica convencional e, quando pertinente, por enxertia.

Através da transmissão mecânica foram avaliadas as seguintes espécies vegetais: *Capsicum annuum* (pimentão), *Chenopodium quinoa* (erva-de-santa-maria), *Datura stramonium* (trombeteira), *Nicotiana benthamiana* (fumo), *Sida* sp.(guanxuma), *Solanum lycopersicon* cv. Santa Cruz (tomateiro), *Solanum tuberosum* (batateira), *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá azedo) e *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro).

As transmissões por enxertia foram realizadas enxertando sobre plantas de *N. benthamiana* infectada com o PLLMV hastes de espécies da família *Solanaceae*. Juntamente a estas, plantas sadias de *N. benthamiana* foram enxertadas como controle da inoculação. Desta forma foram avaliadas plantas de *C. annuum*, *N. glutinosa*, *S. lycopersicon* cv. Santa Cruz, *S. tuberosum*, *D. stramonium* e uma espécie silvestre de tomateiro, *S. pimpinellifolium*. Hastes de algumas plantas de *Sida rhombifolia* (guanxuma), família *Malvaceae*, foram enxertadas com hastes infectadas de *N. benthamiana*. A avaliação foi feita com base na manifestação de sintomas e confirmação por PCR.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Reação de espécies silvestres de *Passiflora* ao PLLMV

Foi avaliada a reação de onze espécies do gênero *Passiflora* com base na expressão de sintomas, após a enxertia em *P. edulis* f. *flavicarpa* sistemicamente infectada com o begomovirus (tabela 2).

Tabela 2 - Reação de espécies de *Passiflora* ao Passion flower little leaf mosaic virus, avaliadas por meio de enxertia em maracujazeiro amarelo infectado com o vírus

Espécies testadas	Nº de plantas com sintomas/ nº de plantas enxertadas	PCR	Recuperação biológica	% de infecção
<i>P. morifolia</i>	3/ 4	+	+	75
<i>P. alata</i>	3/ 5	+	+	60
<i>P. quadrangularis</i>	3/ 4	+	+	75
<i>P. suberosa</i>	3/ 5	+	+	60
<i>P. foetida</i>	4/ 5	+	+	75
<i>P. serrato-digitata</i>	1/ 4	+	+	25
<i>P. caerulea</i>	0/ 3	-	NR	0
<i>P. nitida</i>	0/ 3	-	NR	0
<i>P. giberti</i>	0/ 4	-	NR	0
<i>P. mucronata</i>	0/ 3	-	NR	0
<i>P. cincinnata</i>	0/ 9	-	NR	0
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	9/9	+	NR	100

NR = teste não realizado

As espécies *P. mucronata* (maracujá-pintado), *P. nitida* (maracujá-de-rato), *P. giberti* (maracujá-de-veado), *P. cincinnata* (maracujá-tubarão) e *P. caerulea* (maracujá-de-flor-azul) não exibiram sintomas mesmo após quatro meses da enxertia.

Passiflora alata (maracujá-doce) apresentou mosaico severo e encarquilhamento do limbo foliar assim como ocorre em maracujá-amarelo infectado pelo PLLMV (figura 3 A). As espécies *P. quadrangularis* (maracujá-melão), *P. serrato-digitata* (maracujá-de-cinco-pernas) e *P. morifolia* (Pachito-da-Bolívia) também exibiram mosaico acompanhado de deformação foliar (figuras 3 B, C e D respectivamente).

As plantas de *P. foetida* (maracujá-catinga) exibiram manchas cloróticas sem encarquilhamento do limbo foliar no início da infecção (figura 3 E). Algumas hastes após cerca de 4 meses da enxertia, passaram a apresentar folhas com anéis no limbo foliar como pode ser visto na figura 3 F.

P. suberosa (maracujazinho-cortiça-preto) apresentou sintomas de suave rugosidade em algumas folhas (figura 3G).

Figura 3 - Sintomas em plantas do gênero *Passiflora* infectadas com o PLLMV. (A) *P. alata*, (B) *P. quadrangularis*, (C) *P. serrato-digitata*, (D) *P. morifolia*, (E, F) *P. foetida* e (G) *P. suberosa*

Fragmentos de aproximadamente 590 pb correspondentes ao DNA – A foram amplificados por PCR a partir do DNA total extraído de folhas de maracujá azedo infectado (controle) e das espécies testadas que exibiram sintomas de infecção. Fragmento desse DNA não foi constatado nas espécies que não exibiram sintomas (figura 4).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Figura 4 - Detecção do DNA-A do PLLMV em espécies de *Passiflora*. (M) marcador 1kb, (1) *P. edulis* f. *flavicarpa* infectado com o PLLMV, (2) *P. edulis* f. *flavicarpa* sadia, (3) *P. alata*, (4) *P. morifolia*, (5) *P. cincinnata*, (6) *P. quadrangulares*, (7) *P. giberti*, (8) *P. foetida*, (9) *P. serrato-digitata*, (10) *P. mucronata*, (11) *P. nitida*, (12) *P. suberosa* e (13) *P. caerulea*

As espécies do gênero *Passiflora* têm grande variabilidade genética entre si e até mesmo dentro da espécie, como ocorre, por exemplo, com *P. suberosa* onde há plantas com diferentes números cromossômicos, denominados $2n = 12$, 24 e 36 (MELETTI; BRUCKNER, 2001). Isto associado ao fato das plantas avaliadas proverem de sementes de diversas plantas, de locais diferentes e por não terem passado por melhoramento genético, pode ter gerado variabilidade entre as plantas estudadas, resultando em reações diferentes quanto à suscetibilidade ao vírus, ou seja, mesmo nas espécies suscetíveis ao PLLMV não foi constatado 100% de infecção, o que normalmente é esperado no método de transmissão por enxertia. No caso de *P. edulis* f. *flavicarpa*, onde o vírus foi mantido por meio da transmissão por enxertia, sempre houve 100% de infecção.

Para evitar que esta variabilidade tenha ocultado a suscetibilidade em algumas das espécies testadas, foram reavaliadas quatro hastes de plantas obtidas de diferentes sementes de *P. nitida* e *P. giberti*. As duas espécies mais uma vez não foram infectadas pelo begomovírus. As demais espécies não puderam ser novamente avaliadas devido à falta de sementes viáveis.

Os resultados deste experimento confirmaram a alta suscetibilidade de *P. edulis flavicarpa* a esse begomovirus e revelaram que *P. alata*, a segunda espécie mais cultivada no país, também é suscetível a esse vírus.

P. suberosa, relatada como imune ao CABMV no Brasil (MACIEL et al, 2009) e resistente ao Passiflora virus Y na Austrália (PARRY; DAVIS; THOMAS, 2004), ao East Asian Passiflora virus no Japão (IWAI et al., 2006), ao fungo causador da fusariose (GARDNER, 1989) e a *Phytophthora parasitica* no Brasil (FISCHER, 2002), mostrou-se suscetível ao begomovirus.

As espécies *P. nitida* e *P. mucronata* além da resistência a este begomovirus também já foram relatadas como resistentes a *Nectaria haemacocca* (FISCHER, 2005). Outras espécies que se apresentaram resistentes ao PLLMV são também resistentes ou tolerantes a outras importantes doenças da cultura. A espécie *P. giberti*, tem resistência a fusariose e a bacteriose. *P. caerulea* é resistente a bacteriose, fusariose e antracnose. *P. cincinnata* é resistente a *Meloidogyne incognita* e apresenta tolerância a *Phytophthora* sp (BRAGA; JUNQUEIRA, 2000; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

2.5.2 Gama de hospedeiros

Na tabela 3 estão listadas as diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com o PLLMV e os resultados de infecções obtidas.

Tabela 3 - Reação de nove espécies vegetais inoculadas mecanicamente com o PLLMV

Espécies	Nº de plantas com sintomas/ nº de plantas inoculadas	PCR
<i>Capsicum annuum</i>	0/3	NR
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/3	NR
<i>Datura stramonium</i>	0/3	NR
<i>Nicotiana benthamiana</i>	4/4	+
<i>Sida sp</i>	0/3	NR
<i>Solanum lycopersicon</i>	0/4	-
<i>Solanum tuberosum</i>	0/2	NR
<i>Passiflora edulis</i> f	0/3	-
<i>flavicarpa</i>		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0/2	NR

NR= teste não realizado

As plantas de *N. benthamiana* foram as únicas que exibiram os sintomas de infecção viral caracterizado por mosaico, encarquilhamento e redução do limbo foliar (figura 5 A) e redução do ciclo vegetativo. Algumas das plantas teste inoculadas foram analisadas por PCR (Figura 5 B). Nenhuma das demais espécies testadas apresentou sintomas mesmo após a segunda inoculação, realizada dez dias após a primeira.

Figura 5 - Planta de *N. benthamiana* infectada pelo PLLMV (A) e detecção do DNA-A por PCR em algumas espécies inoculadas mecanicamente (B). (M) marcador molecular 1Kb, (1) *P. edulis* f. *flavicarpa* infectado com o PLLMV, (2) *P. edulis* f. *flavicarpa* sadio, (3) *N. benthamiana*, (4) *P. edulis* f. *flavicarpa*, e (5) *S. lycopersicon*

Após a transmissão mecânica do PLLMV para *N. benthamiana* foram feitas novas tentativas de identificação de espécies suscetíveis ao vírus entre algumas solanáceas por meio da enxertia de garfagem, usando plantas de *N. benthamiana* previamente infectadas pelo begomovirus. Plantas de *Sida rhombifolia*, família *Malvaceae*, também foram enxertadas para averiguar se esta espécie é suscetível ao begomovirus. Diferentemente das demais espécies avaliadas, hastes de *N. benthamiana* infectadas foram enxertadas em plantas de *S. rhombifolia* (porta-enxerto). Os resultados estão na tabela 4.

Tabela 4 - Reação de diferentes espécies ao PLLMV avaliadas por meio de enxertia em *N. benthamiana* infectada com o vírus

Espécies	Nº de plantas infectadas/ nº de plantas testadas	PCR
<i>Capsicum annuum</i>	0/4	-
<i>Datura stramonium</i>	0/3	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/5	+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0/2	-
<i>Sida rhombifolia</i>	0/3	-
<i>Solanum lycopersicon</i>	0/4	-
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	4/4	+
<i>Solanum tuberosum</i>	0/5	-

Plantas de pimentão, tomateiro, batateira, trombeteira e *N. glutinosa* não mostraram sintomas da infecção com o vírus. A ausência de infecção nessas plantas foi confirmada por PCR (Figura 6A).

Plantas de *S. pimpinellifolium* enxertadas apresentaram em algumas folhas sintoma de leve clareamento das nervuras (figura 6B). Todas as plantas de *N. benthamiana* usadas como controle também foram infectadas. A infecção pelo begomovirus nestas plantas foi confirmada através de PCR (Figura 6A).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 6 - (A) Detecção d DNA- A do PLLMV em algumas espécies enxertadas sobre *N. benthamiana* infectadas pelo PLLMV, sendo: (M) marcador 1 Kb plus (Invitrogen), (1) *N. benthamiana* infectada com o PLLMV, (2) *N. benthamiana* sadia, (3) *D. stramonium*, (4) *S. pimpinellifolium* (5) *S. lycopersicon*, (6) *S. tuberosum*, (7) *C. annuum*, (8) *N. glutinosa* e (9) *S. rhombifolia*. (B) Folha de *Solanum pimpinellifolium* exibindo leve clareamento de nervuras

Os resultados do teste de transmissão por enxertia corroboram aqueles obtidos por meio de inoculação mecânica, onde somente *N. benthamiana* foi suscetível à infecção com o PLLMV. Em conjunto esses resultados indicam que esse begomovirus parece ter uma gama restrita de hospedeiros.

2.5.3 Transmissão do PLLMV por *B. tabaci* biótipo B

As primeiras tentativas de transmissão desses begomovirus por *B. tabaci* biótipo B foram feitas a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas para plantas saudáveis dessa espécie. Em apenas dois desses testes, em quatro tentativas, os aleyrodídeos sobreviveram ao período de 12 h que permaneceram na planta para a aquisição do vírus, o que permitiu a posterior transferência dos insetos para algumas plantas saudáveis de *N. benthamiana*. No entanto, das cinco plantas de *N. benthamiana* avaliadas, nenhuma apresentou sintomas de infecção e o vírus não foi detectado por PCR (tabela 5).

Outra tentativa de transmissão foi feita usando como fonte de inóculo maracujazeiro infectado pelo PLLMV. Os insetos que se alimentaram em maracujazeiro para a aquisição do vírus foram transferidos para quatro plantas de *N. benthamiana*, uma de maracujazeiro e duas de *S. pimpinellifolium*.

Tabela 5- Tentativa de transmissão do PLLMV por *B. tabaci* biótipo B para espécies suscetíveis ao vírus

Fonte de inóculo	Nº de plantas sintomáticas/nº de plantas inoculadas			PCR
	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>N. benthamiana</i>	
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0/1	0/2	0/4	-
<i>N. benthamiana</i>	NR	NR	0/5	-

NR = teste não realizado.

Nenhuma das plantas testadas apresentou sintomas de infecção com o PLLMV. Análise de PCR não detectou a presença do vírus nessas plantas (tabela 5). Os dois tomateiros inoculados com o ToYVSV por *B. tabaci* biótipo B, usados como controle da eficácia do aleyrodídeo na transmissão por begomovirus, foram infectados. Assim como *N. benthamiana*, o maracujazeiro

também não é uma espécie vegetal preferida pelos aleyrodídeos para alimentação, o que fez com que poucos indivíduos sobrevivessem aos períodos de aquisição e transmissão.

Novas tentativas de transmissão desse begomovirus pela *B. tabaci* biótipo B foram realizadas utilizando como fonte de inóculo plantas de *S. pimpinellifolium*, espécie em que há colonização desse aleyrodídeo. Assim como nos testes anteriores, foram usados como controle insetos que adquiriram o ToYVSV de tomateiro infectado e posteriormente transferidos para plantas sadias de tomateiro.

Na tabela 6 estão os resultados de inoculações de dez plantas de *S. pimpinellifolium* e duas de *N. benthamiana* inoculadas com *B. tabaci* biótipo B que tiveram PAA e PAI de aproximadamente 12 h. Também estão apresentados os resultados de PCR para a detecção do DNA-A nas plantas inoculadas e em grupos de 10 aleyrodídeos após o PAA do vírus.

Tabela 6 - Análise de PCR em plantas de *S. pimpinellifolium* inoculadas com o PLLMV e em grupos de aleyrodídeos usados para inoculação dessas plantas

Experimento	Nº de plantas inoculadas (<i>S. pimpinellifolium</i>)	PCR	
		Plantas inoculadas	<i>B. tabaci</i>
I	1	-	-
II	4 e 2*	-	-
III	2	-	-
IV	3	-	-

* plantas de *N. benthamiana*

As plantas inoculadas não exibiram sintomas do begomovirus. Análise de PCR não detectou o vírus nos tecidos destas plantas ou mesmo nos aleyrodídeos. O controle, ToYVSV, causou os sintomas característicos nas plantas de tomateiro e foi detectado nos insetos após o mesmo período de aquisição, indicando que a *B. tabaci* biótipo B utilizada foi capaz de adquirir e transmitir esse begomovirus (figura 7). Estes resultados indicam que *B. tabaci* biótipo B não parece ser capaz de adquirir o vírus das plantas infectadas e transmiti-lo para plantas sadias das espécies inoculadas.

Figura 7 - Detecção do DNA-A do begomovirus em aleyrodídeos. Sendo (M) marcador 1 Kb e insetos que se alimentaram em plantas de: (1) tomateiro infectado com ToYVSV, (2) tomateiro sadio, (3) maracujazeiro infectado com PLLMV e (4) *S. pimpinellifolium* infectado com o PLLMV

O período de acesso a aquisição de 12 h utilizado nestes experimentos é compatível ao tempo necessário descrito para a aquisição de várias outras espécies de begomovirus por esse inseto. No entanto, existem descritos na literatura begomovirus cujos PAA e PAI são superiores a 12 h e períodos de latência de no mínimo 16 h. Também é comprovado que o aumento destes períodos aumenta a eficiência de transmissão de alguns begomovirus (BROW; BIRD, 1992; SANTOS; ÁVILA; RESENDE, 2003). Assim, para averiguar a possibilidade de o período de 12 h, estabelecido nos experimentos anteriores, não ter sido suficiente para a aquisição do PLLMV pelo aleyrodídeo ou para a superação do período de latência, foi realizado um novo experimento em que os insetos permaneceram vários dias alimentando-se em *S. pimpinellifolium* infectado com o PLLMV e periodicamente transferidos para plantas-teste sadias da mesma espécie. Os insetos foram confinados em plantas infectadas de *S. pimpinellifolium*, cuja comprovação da infecção foi feita por PCR. Após um PAA de 24 hs foram retirados alguns aleyrodídeos e colocados para se alimentar em plantas sadias de *S. pimpinellifolium*. Após um PAI de 48 h os insetos foram eliminados com inseticida e estas plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação de sintomas. Após um PAA de 8 dias, outros insetos foram coletados e novamente confinados em plantas sadias de *S. pimpinellifolium* por um PAI de 48 h. Nesta data foi feita análise de PCR de um grupo de insetos para a detecção do vírus. Novamente, após um PAA de 16 dias outros insetos foram transferidos para plantas de *S. pimpinellifolium*, sendo realizado

mais um teste de PCR para a detecção do vírus nestes aleyrodídeos. O mesmo procedimento foi repetido para PAA de 20, 26 e 40 dias, exceto a análise de PCR para a detecção do vírus nos insetos. Todas as plantas de *S. pimpinellifolium* testadas foram submetidas a teste de PCR. Os resultados se encontram na tabela 7.

Tabela 7 - Reação de plantas de *S. pimpinellifolium* inoculadas com o PLLMV por meio de *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de aquisição do vírus em *S. pimpinellifolium* infectado e análises de PCR das plantas e dos insetos

PAA (dias)	Nº de plantas com sintomas /Nº de plantas testadas	PCR	
		<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>B. tabaci</i>
1	0/2	-	NR
8	0/3	-	-
16	0/5	-	-
20	0/6	-	NR
26	0/4	-	NR
40	0/4	-	NR

NR = teste não realizado

Os resultados indicaram que mesmo após um PAA do vírus de 40 dias os aleyrodídeos não foram capazes de transmitir o PLLMV para plantas sadias de *S. pimpinellifolium*. É possível que alguns insetos usados após os três primeiros PAA já fossem progênies de primeira geração, pois o ciclo de vida do inseto é de aproximadamente 18 dias (NAKANO et al., 2002). Tentativas de detecção do DNA-A viral em grupos de aleyroidídeos após 8 e 16 dias de PAA também falharam. Mais uma vez os resultados mostram que a *B. tabaci* biótipo B não foi capaz de adquirir o PLLMV de *S. pimpinellifolium* infectado e transmiti-lo para plantas sadias da mesma espécie.

A ausência de transmissão de alguns begomovirus pelo aleyrodídeo *B. tabaci* biótipo B não é incomum como ilustram exemplos registrados na literatura (COSTA, 1955; BEDFORD et al., 1994; WU et al., 1996; LIU et al., 1997; HÖFER et al., 1997; MORIN et al., 2000) e pode estar associada com a espécie vegetal fonte de inóculo, prolongada propagação vegetativa da espécie hospedeira do vírus na ausência do vetor, sucessivas transmissões mecânicas do vírus (para os que são transmitidos dessa maneira) ou defeitos nos componentes genômicos. Os defeitos nos componentes genômicos podem ser de duas origens: a) já fazem parte do complexo viral e são segregados na espécie vegetal inoculada, por propagação vegetativa da fonte de inóculo ou sucessivas transferências mecânicas, ou b) são resultantes de mutações ou recombinações induzidas pelos mesmos procedimentos.

Costa (1955) verificou que adultos de *B. tabaci* (provavelmente biótipo A) adquiriram o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) em plantas infectadas de *Sida micrantha* e *S. rhombifolia* foram capazes de transmiti-lo para 6 espécies da família *Malvaceae*, 8 espécies da família *Leguminosae* e 2 espécies da família *Solanaceae*. Entre as malváceas, o vírus infectou o algodoeiro, onde já era reconhecido como o agente causal do mosaico comum normalmente encontrado em plantas em condições de campo em São Paulo. No entanto, todas as tentativas de transmissão desse vírus de algodoeiro para algodoeiro por meio da *B. tabaci* falharam, mesmo sendo confinados 100 a 200 insetos virulíferos por planta-teste.

Um isolado do AbMV frequentemente encontrado na ornamental *Abutilon hybridum* no Havaí também não foi transmitido pela *B. tabaci* biótipo B, embora o inseto tenha adquirido o vírus, conforme comprovado pela detecção do DNA-A por PCR, e retido-o por pelo menos 7 dias após a aquisição (WU et al., 1996). Segundo os autores, a exclusiva propagação vegetativa dessa ornamental pode ter eliminado a pressão de seleção para transmissão desse vírus pelo vetor. Análises comparativas de seqüências de aminoácidos da proteína capsidial do isolado do AbMV do Havaí com a de um isolado transmitido por *B. tabaci* biótipo B indicaram que diferenças em 5 aminoácidos podem estar envolvidas na transmissão de begomovirus. Anteriormente, Bedford et al. (1994) haviam demonstrado que um isolado do AbMV da Inglaterra também não foi transmitido por dezoito populações diferentes de *B. tabaci*, 7 sete delas do biótipo B. O envolvimento da proteína capsidial na transmissão de begomovirus por *B. tabaci* foi demonstrado por Höfer et al. (1997) quando restauraram a transmissão de um isolado do AbMV com a proteína capsidial do *Sida golden mosaic virus* (SiGMV-Co).

Liu et al. (1997) demonstraram experimentalmente que após 20 e 25 transferências sucessivas do isolado selvagem do *African cassava mosaic virus* da Nigéria (ACMV-NOg) por *N. benthamiana*, através de inoculações mecânicas, o vírus não foi mais transmitido por *B. tabaci*. Por outro lado, experimentos semelhantes realizados com um clone infeccioso do ACMV-NOg revelaram que o vírus foi transmitido pelo inseto mesmo após 40 passagens sucessivas pela mesma espécie vegetal. Procurando explicar esse caso, os autores sugeriram que isolados de campo do ACMV são constituídos por formas transmitidas e não transmitidas pelo inseto, as quais são perpetuadas por meio da propagação vegetativa da mandioca ou por trans-complementação. Alternativamente eles apontaram que a forma não transmitida pela *B. tabaci*

pode ser resultante de mutação que ocorre em região hiper-sensível do genoma logo após a passagem por hospedeiro alternativo como *N. benthamiana*.

No presente estudo, constatou-se que o isolado do PLLMV não foi transmitido por *B. tabaci* biótipo B e nem mesmo adquirido por esse inseto após alimentação por 40 dias em plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas. Pode-se supor que as passagens do vírus de maracujazeiro para *N. benthamiana* por meio da transmissão mecânica e posteriormente para *S. pimpinellifolium* por enxertia, podem ter provocado mutações e/ou segregações das formas que não são adquiridas e conseqüentemente transmitidas por esse inseto. Há ainda a possibilidade de que essa alteração e/ou segregação do complexo do PLLMV tenha ocorrido anteriormente, ainda em condições de campo, por ocasião da sua transmissão da espécie vegetal fonte do vírus para as plantas de maracujazeiro.

Finalmente, não se pode excluir o possível envolvimento de um biótipo diferente de *B. tabaci*, que tem preferência por maracujazeiro e é eficiente na transmissão desse begomovírus. Novaes et al. (2003) constataram que o isolado do PLLMV primeiramente encontrado na Bahia foi transmitido para plantas de maracujazeiro por meio de adultos de *B. tabaci* coletados em plantas infectadas em campo e que se encontravam colonizadas por esse aleyrodídeo. Posteriormente, tentativas de transmissão experimental desse begomovírus para outras plantas de maracujazeiro, através da *B. tabaci* biótipo B, proveniente de colônia mantida em soja (*Glycine max*), falharam. Também não foi observada colonização dessa espécie vegetal por *B. tabaci* biótipo B. Esse resultado corrobora com observações recentes de colonização natural de *B. tabaci* biótipo B em diferentes espécies de *Passiflora* em estufa, onde *P. edulis* f. *flavicarpa* foi uma das menos preferidas para ovoposição e colonização, entre 8 espécies avaliadas (NUNES et al., 2008). Há necessidade de mais investigações para avaliar a real importância da *B. tabaci* biótipo B na transmissão desse vírus.

2.5.4 Atenuação de sintomas induzidos pelo PLLMV em *N. benthamiana*

Para facilitar os testes de transmissão por enxertia e as primeiras tentativas de transmissão por *B. tabaci*, o PLLMV foi também mantido em plantas de *N. benthamiana*. Para tal o vírus foi freqüentemente transferido, por inoculação mecânica, de plantas infectadas para plantas saudáveis de *N. benthamiana*. No decorrer desses procedimentos constatou-se que após a terceira transferência

desse isolado viral, este passou a induzir sintomas atenuados, quase imperceptíveis em plantas de *N. benthamiana*. Em apenas algumas folhas havia mosqueado e ausência de deformação foliar, como mostra a figura 8. Quando o vírus foi transmitido de maracujazeiro para maracujazeiro, por meio de enxertia, uma vez que não é transmitido mecanicamente entre estas plantas, os sintomas foram sempre severos. O mesmo sempre ocorreu com *N. benthamiana* inoculada com extrato de tecido infectado de maracujazeiro.

Figura 8 - Sintomas do PLLMV em *N. benthamiana* após sucessivas transferências por plantas dessa espécie

Análises de PCR foram realizadas com o DNA total extraído de *N. benthamiana* exibindo sintoma atenuado e confirmaram a presença do begomovirus (figura 9). Assim, sugere-se que os sintomas mais fracos induzidos pelo PLLMV nessa solanácea estejam associados a uma forma atenuada desse begomovirus. É do conhecimento geral que inoculações em hospedeiros alternativos podem ser utilizadas na busca de estirpes fracas de vírus em um processo chamado de filtração. Esta “filtração” de estirpes fracas pode ser explicada devido a estas plantas serem suscetíveis a apenas algumas estirpes do vírus ou a uma facilidade de movimentação ou replicação de algumas formas do complexo viral, que não predominam no hospedeiro preferencial. Essas estirpes fracas podem impedir o estabelecimento de outras mais severas no processo de proteção (MÜLLER; REZENDE, 2004). Até o momento, no entanto, não foi relatada em literatura a ocorrência de estirpes fracas desse begomovirus.

Figura 9 - Detecção do DNA A do begomovirus em plantas de *N. benthamiana* após a quarta transferência sucessiva do vírus, sendo (M) marcador 1 Kb, (1) *N. benthamiana* infectada (controle), (2) *N. benthamiana* sadia e (3) *N. benthamiana* infectada com a forma fraca do vírus

Diante desse resultado, plantas de *N. benthamiana* foram mais uma vez inoculadas mecanicamente com o isolado viral proveniente de maracujazeiro, com o intuito de confirmar aquela observação. Na mesma data, foram inoculadas plantas sadias com inóculo do vírus atenuado obtido de *N. benthamiana*. As primeiras plantas inoculadas com o isolado proveniente de maracujazeiro apresentaram os sintomas severos do begomovirus, conforme esperado, enquanto as plantas inoculadas com o inóculo da forma atenuada proveniente de *N. benthamiana* exibiram o mesmo tipo de sintoma. Extrato de *N. benthamiana* exibindo sintomas severos foi inoculado em plantas da mesma espécie. Após o aparecimento de sintomas, esse processo foi repetido, para identificar o número de transmissões necessárias para a segregação de formas atenuadas do vírus. Estas apareceram após a quarta transferência.

2.5.5 Teste de proteção com a forma atenuada do PLLMV

A obtenção de uma forma atenuada do begomovirus do maracujazeiro estimulou o estudo para avaliar o efeito protetor contra a infecção com o isolado severo do vírus.

Foram realizados três testes de proteção utilizando três plantas de *N. benthamiana* em cada experimento. Para esses testes, plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas mecanicamente com a forma fraca do vírus e após a constatação do sintoma típico deste foi feita a inoculação de

desafio com a forma severa do PLLMV, proveniente de maracujazeiro, e avaliada a posterior expressão de sintomas nestas plantas. Também foram inoculadas plantas apenas com a forma atenuada, com o tampão e com o isolado proveniente de maracujazeiro como controles do experimento. Para confirmar a proteção foi realizado o teste de recuperação do isolado normal do vírus a partir das folhas do ponteiro das plantas de *N. benthamiana* inoculadas com a forma fraca e desafiadas com o isolado severo. Extratos dessas folhas foram inoculados mecanicamente em plantas de *N. benthamiana*. A ocorrência de sintomas severos seria indicativo da presença da forma severa do vírus e consequentemente ausência de proteção. Os resultados obtidos estão na tabela 8.

Tabela 8 - Notas de sintomas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com a forma fraca do PLLMV e desafiadas com extrato obtido em plantas de maracujazeiro infectado, 30 dias após a segunda inoculação

Experimento	Tratamento	Nº de plantas testadas	Nº de plantas testadas de acordo com a escala de notas de sintomas*		
			1	2	3
I	Forma fraca	3	3	-	-
	Sadia	1	-	-	1
II	Forma fraca	3	1	2	-
	Sadia	1	-	-	1
III	Forma fraca	3	3	-	-
	Sadio	2	-	-	2

* 1 = mosqueado sem deformação foliar, 2 = mosaico e deformação foliar em folhas jovens e 3 = mosaico e intensa deformação foliar em todas as folhas.

No primeiro teste as plantas não desenvolveram os sintomas severos do begomovirus, indicando que houve proteção pela forma fraca. Nesse teste não foi feita a recuperação biológica. No segundo teste duas plantas apresentaram sintomas de mosaico e leve deformação foliar apenas nas folhas jovens, sintomas estes que não progrediram com o desenvolvimento das plantas. Extratos das folhas jovens e maduras das três plantas do teste foram inoculados separadamente em plantas de *N. benthamiana* sadias, sendo que estas apresentaram apenas o sintoma fraco do vírus. No terceiro experimento as plantas desafiadas mais uma vez não apresentaram os sintomas severos do vírus. Extratos foliares dessas plantas foram inoculados em plantas sadias de *N. benthamiana*, onde foram novamente observados apenas os sintomas fracos, indicando a

recuperação apenas da forma atenuada do vírus. Isto indica que a forma fraca confere proteção contra a forma severa do PLLMV em plantas de *N. benthamiana*.

Há poucos relatos na literatura da ocorrência de estirpes atenuadas de begomovirus. Como exemplos podem ser citadas as estirpes fracas do *African cassava mosaic virus* (ACMV) e do *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG) encontradas em Uganda e que são parte do complexo de begomovirus que causam a doença do mosaico da mandioca (CMD), que ocasionou graves prejuízos a cultura durante a epidemia ocorrida em 1990 (PITA et al., 2001). Owor et al. (2004) relatam que posteriormente a esta epidemia, que praticamente devastou plantios com variedades suscetíveis, passou a observar um aumento na população de plantas com sintomas fracos, devido a seleção praticada pelos produtores. Diante desse fato, esses autores realizaram experimentos em condições de campo para quantificar o efeito da premunização com estirpes fracas desse vírus no desenvolvimento e produção das plantas, quando comparada com a daquelas inicialmente sadias e infectadas com estirpes severas do vírus. As plantas premunizadas tiveram melhor desenvolvimento e produção do que as não premunizadas no experimento realizado na região de Kamuli, mas não no teste em Serere, onde os valores foram semelhantes. Esses resultados indicam que a forma fraca do PLLMV, caso proteja plantas de maracujazeiro, poderá ser útil no futuro se houver maior incidência desse vírus em pomares dessa frutífera.

A forma atenuada do PLLMV foi transmitida para maracujazeiro por meio da enxertia de hastes de *N. benthamiana* sobre maracujazeiro sadio. Não houve “pegamento” das hastes de *N. benthamiana* nos porta-enxertos, no entanto uma haste permaneceu “viva” por tempo suficiente para permitir a passagem do vírus para uma planta de maracujá. Após cerca de 60 dias da enxertia algumas folhas exibiram clorose foliar tênue (figura 10 A). A infecção dessa planta foi confirmada por PCR (figura 10 B). Para excluir a possibilidade de contaminação com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em casa de vegetação foram feitos testes de ELISA com antissoro contra esse vírus e inoculação em plantas indicadoras desse vírus (dados não apresentados). Os resultados foram negativos. Quando extrato deste maracujazeiro foi inoculado mecanicamente em plantas de *N. benthamiana*, estas apresentaram os sintomas atenuados do begomovirus, confirmando assim sua presença no maracujazeiro. Essa planta está sendo multiplicada vegetativamente para futuros testes de proteção.

Figura 10 - Folha de maracujazeiro infectada com a forma atenuada do PLLMV (A) e detecção do DNA-A do begomovirus (B), sendo (M) marcador 1Kb, (1) *N. benthamiana* infectada, (2) *N. benthamiana* sadia, (3) *N. benthamiana* infectada com a forma fraca do vírus, (4) maracujazeiro infectado com o PLLMV, (5) maracujazeiro sadio e (6) maracujazeiro infectado com a forma fraca do vírus

3 CONCLUSÕES

- As espécies *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. morifolia*, *P. serrato-digitata*, *P. suberosa* e *P. foetida* são suscetíveis ao PLLMV, enquanto *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. mucronata* e *P. giberti* são resistentes a este vírus;
- O PLLMV não foi transmitido para *Chenopodium quinoa*, maracujá azedo, batateira, feijoeiro, trombeteira, guanxuma, tomateiro, pimentão e *N. glutinosa*, mas infectou *S. pimpinelifolium* e *N. benthamiana*;
- As sucessivas transmissões mecânicas do PLLMV em *N. benthamiana* permitiram a seleção de uma estirpe fraca e protetora deste begomovirus e
- *B. tabaci* biótipo B não foi capaz de transmitir o PLLMV.

REFERÊNCIAS

- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.125, p. 311-325, 1994.
- BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 72-75, 2000.
- BROWN, J.K. The molecular epidemiology of begomoviruses. In: KHAN, J.A.; DYKSTRA, J. (Ed.). **Trends in plant virology**. New York: The Haworth Press, 2001. p: 297-316.
- BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly - transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 3, p. 220-225, 1992.
- _____. Introduction of an exotic whitefly (*Bemisia*) vector secondary spread of *Jatropha* mosaic virus, a geminivirus previously vectored exclusively by the *Jatropha* biotype. In: GERLING, D.; MAYER, R.T. (Ed.). **Bemisia'95: taxonomy, biology, damage, control and management**. Wimborne: Intercept Publ., 1996. p. 351-353.
- BROWN, J.K.; BIRD, J.; FLETCHER, D.C. First report of *Passiflora* leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 1264, 1993.
- BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. **Hibridização artificial de plantas**. Viçosa: Editora UFV. 1999. p. 379-399.
- COHEN, S.; DUFFUS, J.E.; LERSEN, R.C.; LIU, H.Y.; FLOCK, R.A. Purification, serology and vector relationships of Squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**. Lancaster, v. 73, p. 1669-1673, 1983.
- COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 475- 506.
- COSTA, A.S. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 24, p. 97-112, 1955.
- DE BARRO, P.J.; TRUEMAN, J.W.H.; FROHLICH, D.R. *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 95, p. 193-203, 2005.

ESCOBAR, L.A. **Flora de Colombia**. 10. *Passifloraceae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colômbia, 1988. 138 p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. 678 p.

FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 27-57, 2000.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A., MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L.A. **Virus taxonomy: eight report of the International Committee on Taxonomy of Virus**. London: Elsevier; Academic Press, 2005. 1259 p.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, Chichester, v. 153, p. 783-821, 2008.

FIRMINO, A.C. **Estudo da interação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e seu vetor, Bemisia tabaci biótipo B, e identificação de hospedeiras alternativas do vírus**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FISCHER, I.H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por Nectaria haematococca e Phytophthora parasitica**. 2002. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M.; NALDI FILHO, N.; SILVA, J.R. Ocorrência de *Nectria haematococca* em maracujazeiros no Estado do Rio de Janeiro e resistência de *Passiflora mucronata* ao patógeno. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 671, 2005.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Maracujá. In: _____. **Agrianual 2007: anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, 2007. p. 368-376.

GARDNER, D.E. Pathogenecity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to banana poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, St Paul, v. 73, p. 476-478, 1989.

GIORIA, R.; BOSQUE, 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**, Brasília, v. 26, p. 182-189, 2000.

GIORIA, R.; ESPINHA, L.M.; REZENDE, J.A.M.; GASPAR, J.O.; KITAJIMA, E.W. Limited movement of Cucumber mosaic virus (CMV) in yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 127-133, 2002.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P. S. **The insects**: an outline of entomology. 3rd ed. Davis: Blackwell, 2005. 505 p.

HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. **Virus – insect- plant interactions**. San Diego: Academic Press, 2001. 376 p.

HÖFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**. New York, v. 236, p. 288-295, 1997.

HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E.; WHITFIELD, A.E; REDINBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of Geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 1147-1151, 1998.

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

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 109, p. 195-219, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005.p. 81-108.

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

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

LIMA, J.S.; CARNAÚBA, J.P.; SILVA, S.C.; NASCIMENTO, L.D.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; AMORIM, E.P.R. Occurrence of Begomovirus on yellow passion fruit in Alagoas state. **Virus Review & Research**, São Paulo, v. 10, p. 140, 2005. Supplement:

LIU, S.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. Efficient whitefly transmission of *African cassava mosaic geminivirus* requires sequences from both genomic components. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1791-1794, 1997.

LIU, S.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; MARKHAM, P.G. Identification of genes directly and indirectly involved in the insect transmission of *African cassava mosaic geminivirus* in *Bemisia tabaci*. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 5-11, 1998.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, 2009. No prelo.

MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. *Tomato yellow leaf curl virus*: host range and virus-vector relationships. **Plant Pathology**, London, v. 41, p. 12-125, 1992.

MARKHAM, P.G.; BEDFORD, I.D.; LIU, S.; FROLICH, D.; ROSELL, R.; BROWN, J.K. The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci*. In: GERLING, D.; MAYER, R. T. (Ed.). **Bemisia'95**: taxonomy, biology, damage, control and management. Wimborne: Intercept Publ., 1996. p. 69-75.

MELETTI, L.M.M. Maracujá-amarelo: cultivares IAC conquistam a preferência nacional. **O Aronômico**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 23-25, 2001.

METHA, P.; WYMAN, J.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleroydidae*) with two tomato-infecting geminiviruses. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 87, p. 1285-1290, 1994.

MOREIRA, A.G.; ALVES, A.C.C.N.; CAMARGO, L.E.A.; OTTONI, J.R.; REZENDE, J.A.M. Ocorrência de Begomovirus em maracujazeiro no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 215, 2006. Suplemento:

MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomovirus in the yeast two-hybrid system. **Virology**. New York, v. 276, p. 404- 416, 2000.

MÜLLER, G.R.; REZENDE, J.A.M. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Disease of fruits and vegetables**: diagnosis and management. Amsterdam: Kluwer Academic, 2004. v. 1, p. 361-369.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 2002. 213 p.

NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Chichester, v. 151, n. 9, p.1797-1809, 2006.

NOVAES, Q.S.; FREITAS-ASTUA, J.; SÃO JOSÉ, A.R.; YUKI, V.A.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Infecção mista de maracujazeiro com o *Passion fruit woodiness virus* e um begomovirus no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 648, 2002.

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

NUNES, E.S.; BROWN, J.K.; MOREIRA, A.G.; WATSON, G.; LOURENÇÃO, A.L.; PIEDADE, S.M.S.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. First report and differential colonization of *Passiflora* species by the Biotype B of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) in Brazil. **Neotropical Entomology**, Itabuna, 2008. No prelo.

OWOR, B.; LEGG, J.P.; OKAO-OKUJA, G.; OBONYO, R.; KYAMANYWA, S.; OGENGALATIGO, M.W. Field studies of cross protection with Cassava mosaic Geminiviruses in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 243-249, 2004.

PARRY, J.N.; DAVIS, R.I.; THOMAS, J.E. *Passiflora* virus Y, a novel virus infecting *Passiflora* spp. in Australia and Indonesia province of Papua. **Australian Plant Pathology**, Sidney, v. 3, p. 423-427, 2004.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-465.

PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 725-737, 2001.

PICÓ, B.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 151-196, 1996.

PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARE, A.; OTIM-NAPE, G.W.; FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 655-665, 2001.

REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Viroses e fitoplasmose do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., 2003, Campos dos Goytacazes. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.L.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 340-347, 1993.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NOGEURIA FILHO, G.C.; FERREIRA, F.R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 3, p. 552-554, 2004.

ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I.; BROWN, J.K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, p. 239-246, 1999.

SALOMÃO, T.A.; ANDRADE, V.M.M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 20-39.

SANTOS, C.D.G.; D'ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomateiro com a mosca-branca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 664-673, 2003.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

SSERUWAGI, P.; LEGG, J.P.; MARUTHI, M.N.; COLVIN, J.; REY, M.E.C.; BROWN, J.K. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations and presence of the B biotype and non-B biotype that can induce silverleaf symptoms in squash, in Uganda. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 147, p. 253-265, 2005.

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

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: The MIT Press, 1996. 224 p.

WU, Z.C.; HU, J.S.; POLSTON, J.E.; ULLMAN, D.E.; HIEBERT, E. Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of abutilon mosaic geminivirus in Hawaii. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 608-613, 1996.

WYATT, S.D.; BROWN, J.K. Detection of subgroup II geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 1288-1293, 1996.

ZHANG, Y; UYEMOTO, J.K.; KIRKPATRICK, B.C. A small procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 71, p. 45-50, 1998.