

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO
DO VIRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO MARACUJA
E SUA INCIDENCIA NA IBIAPABA

DESIRÉE ROLIM BEZERRA

012

BCT/UFCA CATIVO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA A COORDENAÇÃO DO CURSO
DE POS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, AREA DE
CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1992

632
B469 P

UFCA/BU/BCT

01/09/1992



R1153650
C559792
T632

Purificação e caracterização de
um isolado

B469p

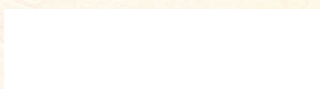
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B469p Bezerra, Desirée Rolim.
Purificação e caracterização de um isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá e sua insuficiência na Ibiapaba / Desirée Rolim Bezerra. – 1992.
59 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 1992.
Orientação: Prof. Dr. José Albersio de Araújo Lima.
1. Agronomia. I. Título.


CDD 630

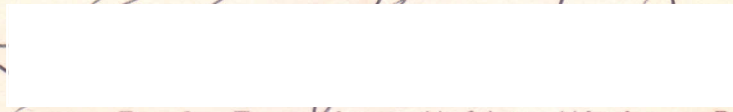
Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Agronomia com área de concentração em Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Referida Universidade.


A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.



Desirée Reilm Bezerra

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08 DE MAIO DE 1992


Prof. José Albersio de Araújo Lima, Ph.D.
Orientador da Dissertação


Prof. Francisco Valter Vieira, Dr.


Prof. José Xavier Filho, Dr.


Prof. Francisco Célio Guedes Almeida, Ph.D.
Coordenador do Curso

Aos meus pais, JOSÉ LIMA + e IDALIA
Ao meu esposo, GILVAN
Ao meu filho, DIEGO
A minha irmã, CÉLIA.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força e perseverança para realizar este trabalho.

Ao Professor JOSÉ ALBERSIO DE ARAUJO LIMA, pela dedicação, amizade e orientação na elaboração deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores FRANCISCO VALTER VIEIRA e JOSÉ XAVIER FILHO, pelas honrosas presenças na banca examinadora e valiosas sugestões apresentadas.

Aos bolsistas do laboratório de Bioquímica e, em especial, à LIGIA, pela amizade e colaboração na execução dos trabalhos de eletroforese.

A minha mãe, pela sua dedicação em todos os momentos de minha vida, o meu mais profundo reconhecimento.

Ao GILVAN, pelo amor, apoio e compreensão.

A minha irmã CÉLIA, pelo carinho maternal, grande apoio e estímulo.

Aos bolsistas e funcionários do Laboratório de Virologia Vegetal, pela grande amizade e colaboração na execução dos trabalhos de laboratório e casa-de-vegetação.

A ajuda prestada pela ANA CLAUDIA e PRINCESA na coleta de material na Serra da Ibiapaba.

Ao Professor JOSÉ HIGINO RIBEIRO DOS SANTOS, pela classificação da espécie de pulgão utilizada no estudo de

transmissão de vírus.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

S U M A R I O

	pag.
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 - Fonte Inicial do Vírus.....	13
3.2 - Gama Parcial de Hospedeiros do Vírus.....	13
3.3 - Estudos de Efeitos Citopáticos em Plantas infetadas.....	15
3.4 - Estabilidade do Vírus em Seiva.....	16
3.5 - Purificação do Vírus.....	16
3.6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida da Pro- teína Capsidial do Vírus.....	19
3.7 - Produção de Anti-soro Específico para o Vírus.	20
3.8 - Transmissão do Vírus por Pulgão.....	21
3.9 - Relacionamento Sorológico com outros Potyvirus	21
3.10 - Levantamento de Maracujazeiros Infetados por Vírus na Região da Ibiapaba.....	22

4 - RESULTADOS.....	24
4.1 - Gama Parcial de Hospedeiros do Vírus.....	24
4.2 - Purificação, Produção de Anti-soro e Análise da Proteína Capsidial do Vírus.....	31
4.3 - Efeitos Citopáticos em Plantas Infetadas e Es- tabilidade do Vírus em Seiva.....	36
4.4 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão.....	38
4.5 - Relacionamento Sorológico.....	40
4.6 - Levantamento de Plantas da Região da Ibiapaba Infetadas por Vírus.....	40
5 - DISCUSSÃO.....	45
6 - CONCLUSÕES.....	50
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA	PAGINA
1 Reações sintomatológicas e resultados sorológicos de espécies vegetais e cultivares inoculadas com o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá obtido em Tianguá, CE.....	27
2 Levantamento da incidência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá na Serra da Ibiapaba.....	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Sintomas de mosaico induzidos pelo isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, em <i>Macroptilium lathyroides</i>	25
2	Sintomas induzidos pelo isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, em maracujá	26
3	Diagrama do processo usado na purificação do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, a partir de <i>Macroptilium lathyroides</i>	32
4	Espectro de absorção ultra-violeta da preparação purificada do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, obtida a partir de <i>Macroptilium lathyroides</i>	34

- 5 Teste sorológico de dupla difusão em agar, contendo 0,8% de agar, 1,0% de NaN_3 e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para mostrar a especificidade do anti-soro produzido para o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, em estudo..... 35
- 6 Análise da proteína capsidial do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS..... 37
- 7 Lesões necróticas locais em folha de **Chenopodium amaranticolor** inoculada com o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá.. 39
- 8 Resultados de estudos de relacionamento sorológico entre o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do mararacujá em estudo e outros potyvirus..... 41

RESUMO

Neste trabalho de pesquisa estudou-se um vírus isolado de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) na Serra da Ibiapaba, Estado do Ceará, 3°30' a 4°42' Latitude Sul e 40°40' a 41°25' Longitude Oeste, quanto às suas características sorológicas, estabilidade em seiva, peso molecular da proteína capsidial, transmissibilidade por pulgão, sintomatologia, efeitos citopáticos em plantas infetadas e gama de hospedeiros. Com base nos resultados obtidos, e nos baixos graus de severidade detectados em condições de campo, nos pomares de maracujá visitados na Região da Ibiapaba, o vírus foi identificado como uma estirpe fraca do "passionfruit woodiness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujá), capaz de induzir em maracujá amarelo, sintomas de mosaico, bolhosidade e deformações foliares, sem causar, endurecimento nos frutos.

A estirpe de PWV em estudo foi capaz de infetar 14 espécies de dicotiledôneas distribuídas em 5 famílias botânicas, que reagiram de diferentes formas, com infecções sistêmicas e/ou localizadas. A maioria das espécies infetadas pertence a família Leguminosae, destacando-se *Macroptilium lathyroides* pela facilidade que apresentou para a manutenção, propagação e purificação do vírus. A escolha desta espécie e

junto do método adotado na purificação permitiu a obtenção de 18,24mg de vírus/Kg de folha e um anti-soro com boa especificidade. A elevada concentração de vírus em *M. lathyroides* também foi observada na rebrota das plantas infetadas, com 20 dias após a primeira coleta, o que permitiu uma segunda purificação.

O vírus foi transmitido com 50% de eficiência pelo pulgão *Aphis fabae*, a partir de plantas de maracujá para plantas de *M. lathyroides*, de forma não persistente.

Mediante observações ao microscópio ótico, inclusões citoplasmáticas semelhantes às descritas para os potyvirus foram encontradas em material foliar infetado pelo vírus.

Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) revelou um componente protéico principal com peso molecular de 36kDa e, outro menor, de 29kDa, em menor concentração, correspondente a uma provável degradação enzimática da proteína capsidial, durante o processo de purificação e estocagem do vírus.

Testes sorológicos mostraram que a estirpe do PWV em estudo é sorologicamente relacionada, com algumas estirpes do "cowpea aphid-borne mosaic virus" (CAMV, vírus do mosaico do caupi transmitido por pulgão) e outros potyvirus ainda não totalmente caracterizados, isolados de: *Canavalia ensiformes* (Poty-CE); *Cassia occidentales* (Poty-CO); *C. tora* (Poty-CT); *Glycine max* (Poty-soja); *Macroptilium atropurpureum* (Poty-siratiro); *M. lathyroides* (Poty-ML) e *Sesamum orientale* (Poty-SO).

A B S T R A C T

A virus isolate obtained from *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Yellow passionfruit) grown on the Ibiapaba Mountains in the State of Ceará, Brazil from 3°30' to 40°42' South Latitude and 40°40' to 41°25' West Longitude, was studied on the basis of its serological characteristics, stability in sap, molecular weight of its capsidial protein, aphid transmission, symptomatology, cytopathological effects in infected plants and host range. According to the obtained results, and the low degree of severity detected in the passionfruit orchards, the virus was identified as a mild strain of passionfruit woodiness virus (PWV), able to induce mosaic, blistering and leaf deformations in yellow passionfruit, without causing woodiness of the fruits.

The strain of PWV studied was able to infect 14 dicotyledon plant species, distributed in 5 botanical families that reacted in different ways, with systemic or local infections. The majority of infected species belongs to the family Leguminosae, among which *Macroptilium lathyroides* was selected for maintenance and propagation of the virus for its purification. The choice of the plant species combined with the method adapted for purification yielded 18,24mg of virus/Kg of fresh leaves and an antiserum of good quality. A high concentration of the virus in *M. lathyroides* was also observed in the infected plant regrowth which was

collected 20 days after the first samples and afforded a second purification.

The virus was transmitted with 50% of efficiency by *Aphis fabae*, from passionfruit plants to *M. lathyroides*, in a non-persistent manner.

Light microscope observations of epidermal cells from infected plants indicated the presence of inclusions similar to those described for the potyviruses.

Polyacrilamide gell eletrophoresis with sodium dodecil sulfate (SDS) of purified virus preparation revealed the presence of a main component protein with molecular weight of 36kDa. A smaller protein of 29kDa was also detected in less concentration, which probaly correspondes to an enzymatically degradation of the capsidial protein of 36kDa, during the process of purification and storage of the virus.

Serological tests showed that the strain of PWV studied is serologically related to cowpea aphid-borne mosaic virus and another potyviruses not totally characterized, isolated from: *Canavalia ensiformes* (Poty-CE); *Cassia occidentales* (Poty-CT); *Glycine max* (Poty-soja); *Macroptilium atropurpureum* (Poty-siratro); *M. lathyroides* (Poty-ML) and *Sesamum orientale* (Poty-SO).

1 - INTRODUÇÃO

Maracujá é o nome geral dado ao fruto e à planta de várias espécies tropicais e subtropicais do gênero *Passiflora*, sendo os tipos mais cultivados o amarelo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg, e o roxo, *P. edulis* Sims. Esta cultura expandiu-se rapidamente e, o Brasil, que alguns anos atrás, não figurava como exportador de suco concentrado, atualmente é um dos maiores produtores do mundo, ao lado de países como Austrália, Colômbia, Fiji, Havai, Nigéria, Peru, Quênia (FAO-1972, WHITTAKER, 1972).

O maracujá muito apreciado pelas qualidades gustativas, farmacodinâmicas e alimentares de seus frutos que contêm alto teor de açúcares, além de ácidos orgânicos, bem como riboflavina, niacina e ácido ascórbico. A maior importância econômica do fruto está no produto industrializado, sob a forma de suco concentrado (MANICA, 1981). Outros produtos são elaborados a partir do fruto, como néctares, marmeladas, refrescos concentrados, polpa, fruto em xarope e sorvetes.

Ainda não foram criadas variedades hortícolas de maracujá propriamente ditas nos diversos países produtores. Os plantios comerciais hão-se limitado basicamente, ao emprego de sementes da espécie *P. edulis* ou da sua variedade botânica *flavicarpa*.

O maracujá amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, há

sido intensamente cultivado no Havai, Brasil, parte da Austrália, Fiji, Sri-Lanka, regiões de baixas altitudes e temperaturas mais elevadas e geralmente apresenta frutos de maior tamanho, maior adaptação aos dias quentes e maior produção por hectare, quando comparado com o maracujá roxo (MEDINA, 1980).

Embora o clima permita o cultivo do maracujazeiro em quase todo o país, as principais regiões produtoras brasileiras são: Bonito-PE e arredores, Castanhal-PA, Feira de Santana-BA, Lagarto-SE e vizinhanças, Serra da Ibiapaba-CE, abrangendo uma área superior a 10.000 ha (RAMOS, 1983, KITAJIMA et al., 1986).

No Estado do Ceará, a exploração comercial do maracujá amarelo teve início em 1972, nas Serras de Baturité e Ibiapaba. Nesta última região, a cultura teve um desenvolvimento bastante expressivo (EMATERCE & EPACE, 1988) e ainda hoje é uma fruteira de grande interesse para os municípios de Carnaubal, Guaraciaba do Norte, Ibiapina, São Benedito, Tianguá, Ubajara e Viçosa do Ceará, ocupando uma área de 1.100 ha, inferior aos 3.120 ha explorados em 1983 (EMATERCE & EPACE, 1988). Das doenças conhecidas hoje no Brasil e que afetam o maracujazeiro, destacam-se aquelas que causam grandes prejuízos, por se encontrarem presentes, praticamente em, todas as plantações do país. A Antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* Penz., a Cladosporiose ou Verrugose, cujo agente causal é o fungo *Cladosporium herbarum* Link., bem como aquelas que acarretam prejuízos em áreas localizadas como a Murcha ou Fusariose,

causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* Scllect e a Podridão do Pé cujo agente é o fungo *Phytophthora cinnamomi* Rands, são as mais comuns. Além dessas doenças há bacterioses como a "Morte Precoce", ocasionada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Takatsu, e nematoses. No caso particular da Serra da Ibiapaba, a "Morte Precoce" e a Antracnose são as moléstias que mais se destacam (DIAS, 1990; TORRES FILHO, 1991). Organismos do tipo micoplasma causam também prejuízos à cultura (KITAJIMA & CHAGAS, 1984; KITAJIMA et al., 1986), por serem responsáveis pelo superbrotamento, doença de ocorrência no Paraná (LIMA NETO et al., 1983), Pernambuco (KITAJIMA et al., 1981), Rio de Janeiro (KITAJIMA et al., 1978).

As doenças causadas por vírus vêm preocupando técnicos e produtores, uma vez que quando o vírus é introduzido em uma região, toda a área poderá tornar-se inviabilizada para o plantio. Segundo o levantamento de viroses e anomalias correlatas em diversas zonas produtoras do país, realizado por KITAJIMA et al. (1986), foram identificados os seguintes vírus, criando problemas ao maracujazeiro: "passionfruit woodiness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, potyvirus), originalmente descrito na Austrália (COBB, 1901) e aparentemente presente em diversos outros países; "cucumber mosaic virus" (CMV, vírus do mosaico do pepino, cucumovirus), causando mosaico e manchas anelares; um rhabdovirus, ocasionando enfezamento, clareamento das nervuras, entre outros sintomas; vírus do mosaico amarelo do

maracujazeiro, pertencente ao grupo tymovirus; vírus do mosaico do maracujá roxo, de partículas isométricas, transmissível mecanicamente, ainda não perfeitamente caracterizado e, outros de ocorrência ainda duvidosa no país. Na Serra da Ibiapaba foi constatada a presença do CMV, o vírus do enfezamento e, possivelmente, uma estirpe fraca do PWV (LIMA et al., 1985; KITAJIMA et al., 1986) .

O presente trabalho teve como objetivos principais a purificação e a obtenção de anti-soro para um vírus isolado de maracujá, na Serra da Ibiapaba, Ceará, sua caracterização biológica, sorológica e citopática nas plantas infetadas.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

As doenças causadas por vírus e micoplasmas ameaçam a viabilidade da cultura do maracujá no Brasil, depois que esta experimentou um notável impulso nos últimos anos, sendo explorada comercialmente em todo o país, principalmente nos Estados do Norte e Nordeste, onde se situam as principais zonas produtoras (KITAJIMA et al., 1986).

Entre as viroses que se manifestam sobre o maracujazeiro destaca-se a causada pelo "passionfruit woodiness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, potyvirus), originalmente descrito na Austrália (COOB, 1901; NOBLE, 1928; TAYLOR & GREBER, 1973). O vírus possui partículas alongadas e flexuosas e pertence ao grupo dos potyvirus. O PWV infeta várias espécies de *Passiflora*, além de plantas de quatro outras famílias botânicas (TAYLOR & KIMBLE, 1964; TEAKLE & WIDERMUTH, 1967), podendo infetar, experimentalmente, diversas leguminosas. Na Natureza, além de espécies de *Passiflora*, o vírus foi encontrado infetando *Centrosema pubescens* Benth, *Arachis hypogaea* L., *Glycine max* (L.) Merrill e *Macroptilium atropurpureum* Urb. (TAYLOR & GREBER, 1973). Os sintomas iniciais que caracterizam a moléstia são mosqueado e mosaico nas folhas mais novas, com posterior encurtamento dos internódios apicais e enfezamento da planta, o que faz com que a mesma deixe de crescer, conduzindo-a

freqüentemente à morte. Os frutos são pequenos, deformados e duros. O vírus é transmissível por meios mecânicos, conforme demonstrou MCKNIGHT (1953) e por espécies de afídeos, dos quais dois foram identificados como *Myzus persicae* Sulz e *Macrosiphum* sp. (NOBLE & NOBLE, 1938). MAGEE (1948) verificou que também *Aphis gossypii* Glover funciona como vetor do vírus. Este vírus produz inclusões típicas dos potyvirus no citoplasma de plantas infetadas (TAYLOR & GREBER, 1973; CHAGAS et al., 1981). Trata-se de uma virose muito comum ao maracujá roxo, com ocorrência na Austrália (COBB, 1901) e Tailândia (CHANG et al., 1981) onde causa grandes danos às plantações (TAYLOR & GREBER, 1973). Segundo ESCUDERO et al. (1988) foi encontrado, também, em Porto Rico, um vírus com partículas flexuosas, causando mosaico no maracujá, tendo sido o mesmo transmitido mecanicamente e pelos afídeos: *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, *A. gossypii*, *A. spiraecola* Patch e *M. persicae*.

No Brasil, o PWV foi constatado em vários Estados, entre eles: Bahia (CHAGAS et al., 1981), Ceará (LIMA et al., 1985), Pernambuco (LORETO & VITAL, 1983) e São Paulo (KITAJIMA & CHAGAS, 1984). Os isolados brasileiros apresentam sintomatologia semelhante à descrita na Austrália para PWV, não sendo, também transmissíveis pelas sementes de maracujá, mas, facilmente, por meios mecânicos e por afídeos (CHAGAS et al., 1981). Isolados brasileiros já foram purificados em alto grau de pureza, o que possibilitou a produção de anti-soro bastante específico e de bom título, ideal para trabalhos de sorodiagnose (MARINHO et al., 1984).

Estudos sobre relacionamento de PWV com outros potyvirus, hão mostrado ser o mesmo relacionado ao "bean common mosaic virus" (BCMV, vírus do mosaico comum do feijoeiro) (KITAJIMA et al., 1986), "soybean mosaic virus" (SoyMV, vírus do mosaico da soja), "blackeye cowpea mosaic virus" (BlCMV, vírus do mosaico do caupi blackeye), "cowpea green vein virus" (CGVV, vírus da faixa verde das nervuras do caupi), "cowpea rugose mosaic virus" (CRMV, vírus do mosaico rugoso do caupi) (LOVISOLO et al., 1986) e "passionfruit crinkle virus", um novo potyvirus isolado de maracujá na Tailândia (CHANG & LIN, 1989).

Para MAGEE (1948), os sintomas da moléstia assemelham-se àqueles ocasionados pelo "cucumber mosaic virus" (CMV, vírus do mosaico do pepino), que também induz endurecimento nos frutos de *Passiflora*. O CMV, ao contrário do PWV, possui partículas esféricas e faz parte do grupo do cucumovirus. Segundo TAYLOR & KIMBLE (1964), a sorologia é o método mais satisfatório para identificação destes dois vírus. TEAKLE et al. (1963) relataram uma moléstia do maracujá ornamental, *P. coerulea* L., na Califórnia, caracterizada pelo enfezamento da planta, mosqueado, distorção das folhas e endurecimento dos frutos, ocasionada pelo CMV (FRANCKI et al., 1979). No Brasil, já foram constatadas eventuais ocorrências deste vírus em plantações de São Paulo (COLARICCIO et al., 1984; 1987; KITAJIMA & CHAGAS, 1984). Em Feira de Santana-BA, uma estirpe incomum do CMV foi isolada de maracujá amarelo, em associação com PWV (CHAGAS et al., 1984). O CMV foi também encontrado na

Serra da Ibiapaba, CE (KITAJIMA et al., 1986). A infecção natural de maracujazeiros pelo CMV, no Brasil, em geral resultam em sintomas do tipo anéis, semi-anéis ou pontuações de cor amarela mais intensa, mas, nos frutos, não se tem constatado deformações ou endurecimentos marcantes, indicando que o CMV não estaria causando problemas sérios à cultura do maracujazeiro (COLARICCIO et al., 1987; KITAJIMA et al., 1986).

O vírus do enfezamento do maracujá, pertencente ao grupo rhabdovirus provoca redução do crescimento normal da planta, com encurtamento dos internódios, folhas coriáceas e um clareamento típico das nervuras, além de deformações no fruto e baixa produtividade (KITAJIMA & CRESTANI, 1985). Este parece estar largamente disseminado no Brasil, sem ser, contudo, o de maior gravidade (CHAGAS et al., 1987). Anomalias similares ao enfezamento, associadas a partículas virais do tipo rhabdovirus, foram constatadas nos seguintes Estados produtores: Ceará (Serra da Ibiapaba), Pernambuco (Bonito), Bahia (Feira de Santana), Paraná (Morretes), Rio Grande do Sul (Viamão e Guaíba) e São Paulo (Iguape) (KITAJIMA et al., 1986; CHAGAS et al., 1987), indicando que o enfezamento, originariamente descrito por BATISTA et al. (1981) em Sergipe e as anomalias descritas em outros Estados parecem ser causadas pelo mesmo rhabdovirus (KITAJIMA et al., 1986).

A etiologia viral do "enfezamento" foi baseada principalmente na sintomatologia, transmissibilidade por enxertia e constatação de partículas do tipo rhabdovirus

na cavidade perinuclear, em secções histológicas de plantas natural e artificialmente infetadas, observadas ao microscópio eletrônico, (KITAJIMA & CRESTANI, 1985; CHAGAS et al., 1987). Na Austrália, PARES et al (1983) relataram esse tipo de partícula em maracujá infetado pelo PWV, mas não o associaram a nenhuma moléstia. O rhabdovirus associado ao enfezamento e enfermidades similares parece ser, segundo KITAJIMA et al. (1986), o mais disseminado, ocorrendo praticamente em quase todas as regiões produtoras, ocasionando perdas consideráveis.

Em vários plantios de maracujazeiros em Papucaia, município de Cachoeiras de Macacu, no Estado do Rio de Janeiro, foram encontradas algumas plantas exibindo nas folhas um mosaico amarelo, "yellow net" e encrespamento (CRESTANI et al., 1984) ocasionado por um novo vírus do grupo tymovirus encontrado no Brasil, designado de "passionfruit yellow mosaic virus" (PYMV, vírus do mosaico amarelo do maracujá) (CRESTANI et al., 1986). Estes sintomas foram reproduzidos em, aproximadamente, duas semanas, por enxertia ou transmissão mecânica, para mudas de maracujá amarelo e transmitido com baixa eficiência pelo crisomelídeo *Diabrotica speciosa* Kirk, mas não pela semente (KITAJIMA et al., 1986). Preparações "leaf dip" de plantas doentes mostraram grande número de partículas isométricas, ca. 30nm em diâmetro e também vesículas na periferia dos cloroplastos, típicas de infecções por tymovirus (CRESTANI et al., 1984). Após purificado, as partículas virais foram infectivas e um anti-soro altamente específico e de alto

título foi produzido (KITAJIMA et al., 1986). Estudos sorológicos comparativos revelaram que este vírus pertence ao grupo dos tymovirus, com relacionamento próximo aos seguintes tymovirus: "clitoria yellow vein virus", "desmodium yellow mosaic virus" e "kennedya yellow mosaic virus" e, de forma mais distante, com "turnip yellow mosaic virus". Segundo BARRADAS (1983), este vírus é o segundo membro dos tymovirus encontrado no Brasil, depois do vírus da necrose do tomateiro. Na região de Bonito-PE, foi encontrado um isolado do vírus sorologicamente relacionado, porém, distinto, e que induz um mosaico menos intenso (CRESTANI et al., 1984). O PYMV, juntamente com o "grandilla mosaic virus" (GMV, vírus do maracujá roxo) acham-se, por enquanto, restritos a pequenas regiões isoladas das principais áreas produtoras, mas pela facilidade com que podem ser transmitidos, são potencialmente perigosos (KITAJIMA et al., 1986). No município de Cotia-SP, o GMV foi observado em plantas de maracujá roxo, no município de Cotia-SP que apresentavam mosaico foliar, clareamento das nervuras, faixas cloróticas além de deformação e endurecimento dos frutos. Um vírus isométrico com ca. de 24 nm de diâmetro foi isolado a partir de plantas exibindo tais sintomas (CHAGAS et al., 1984). No campo, os sintomas parecem ser severos nos meses mais frios, havendo, pelo padrão de disseminação da doença na cultura, sugestões da existência de um vetor. Posteriormente, foi demonstrado que o vírus pode ser transmitido mecanicamente para o maracujá amarelo, não o

sendo, no entanto, por afídeos (KITAJIMA et al., 1986). Experimentalmente, o crisomelídeo, *D. speciosa*, transmitiu este vírus de maracujá roxo para maracujá roxo (OLIVEIRA, 1986; OLIVEIRA et al., 1986). Em secções ultrafinas, ao microscópio eletrônico, foram visualizados acúmulo de material fibrilar na mitocôndria e formação de cristais intracelulares constituídos por partículas virais, em tecidos de plantas infetadas (VEGA & CHAGAS, 1983). Estudos sorológicos mostraram não ser este vírus sorologicamente relacionado com nenhum outro vírus isométrico (KITAJIMA et al., 1986).

Na literatura há referências a outras anomalias de etiologia viral, mas que ainda não foram constatadas no Brasil. Entre os vírus responsáveis por tais anomalias alguns merecem ser mencionados. "Passionfruit latent virus" (PLV, vírus latente do maracujá, carlavírus), isolado e descrito na Alemanha em *P. caerulea* por SCHNEPT & BRANDES (1962). Segundo BOS & RUBIOHUERTOS (1971), as partículas apresentam-se com distribuição típica dos carlavírus, formando agregados citoplasmáticos. "Chlorotic spot virus" (CSP, vírus da mancha clorótica) é outro vírus descrito por VAN VELSEN (1961), que foi recuperado de *Passiflora foetida* L. onde causa manchas cloróticas nas folhas. É mecanicamente transmissível para algumas espécies de *Passiflora*, mas não para *P. edulis*, por *A. gossypii*. Segundo MULLER et al. (1974), *P. gracilis* Jacq. pode ser infetado, experimentalmente, pelo "citrus tristeza virus" (CTV, vírus da tristeza dos citros,

closterovirus) através do pulgão *Toxoptera citriudus* Kirk, acarretando nas plantas doentes clorose e morte prematura.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Fonte Inicial do Vírus

Plantas sadias de maracujá foram inoculadas mecanicamente com extrato preparado a partir de amostras foliares coletadas de plantas exibindo sintomas de mosaico em pomares de maracujá da Serra da Ibiapaba. Uma das plantas inoculadas, mantidas em casa-de-vegetação, apresentando sintomas semelhantes àqueles observados em condição de campo foi selecionada como fonte inicial do vírus.

O inóculo para a transmissão mecânica do vírus foi preparado através de maceração do material foliar infetado na proporção de 1g de tecido para 2ml de solução tampão de fosfato de potássio 0,05M, pH 7,5. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado em gaze dupla e à parte líquida, coletada em bécher, adicionou-se pequena quantidade do abrasivo "carborundum". O vírus foi inoculado, friccionando-se as partes superiores das folhas com pedaços de gaze embebidos no extrato contendo o mesmo.

3.2 - Gama Parcial de Hospedeiros do Vírus

Para a determinação da gama de hospedeiros do vírus em estudo, foram efetuadas inoculações em 32 espécies vegetais, pertencentes a 8 famílias, sendo a maioria da

família Leguminosae. Estas plantas foram cultivadas em condições de casa-de-vegetação, usando-se três vasos para cada espécie, com três a quatro plantas por vaso, dos quais um foi mantido sem inoculação para servir como testemunha. A seguir são relacionadas as espécies vegetais e cultivares inoculadas com o vírus: *Arachis hypogaea* L. (amendoim); 'CE-68-11', 'CE-73-30', 'CE-73-33', 'CE-57-422', 'CE-55-437', 'Georgia', 'PI-165-317' e 'Tatu'; *Canavalia brasiliensis* L. (fava-de-papagaio); *C. ensiformis* DC. (feijão-de-porco); *Carica papaya* L. (mamoeiro); *Cassia occidentalis* L. (manjerioba); *C. tora* L. (matapasto liso); *Centrosema brasilianum* Benth; *C. pascuorum* Mart; *C. pubescens* Benth (Jitirana); *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn; *C. quinoa* Willd; *C. murale* L.; *Clitoria ternatea* L. (cunhã); *Crotalaria incana* L. (gergelim bravo); *C. striata* DC.; *Cucumis anguria* L. (maxixe); *C. melo* L. (melão); *C. sativus* L. (pepino); *Cucurbita pepo* L. (abobrinha); *Glycine max* (L.) Merril (soja) 'IAC-2', 'IAC-70223' e 'PELICANO'; *Gomphrena globosa* L.; *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (feijão-de-rola); *Nicotiana benthamiana* Domin.; *Nicotiana tabacum* L. (fumo); *Passiflora edulis* Simms; *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg; *Phaseolus lunatus* L. (fava) '01', '02', '03', '06', '15', '26', '27' e '32'; *P. membranascens* Benth; *P. vulgaris* L. (feijão comum) 'Carioquinha', 'CNF 5520', 'ENGOPA-DURO 201', 'HF-465-63-1', 'IPA-1', 'IPA-6', 'JALO 558', 'MINEIRO PRECOCE', 'P445', 'RIO BAIO', 'RIO DOCE', 'VENEZUELA 118' e 'XODO-BAT58'; *Sesamum orientale* L. (gergelim); *Vigna mungo* (L.) Hepper (feijão mungo) '01', '02' e '19'; e *V.*

unguiculata (L.)Walp. (feijão-de-corda) 'Aparecido', 'Blackeye', 'Branquinho', 'Carrapicho', 'EPACE 10', 'Frade preto', 'Macaibo', 'Otilia', 'Pitiuba', 'Quarentão', 'Quarenta dias', 'Roxinho', 'Sempre verde', 'Seridó' e 'Setentão'. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação por um período de aproximadamente 30 dias, após a inoculação a fim de que a infecção viral fosse detectada mediante os sintomas apresentados pelas plantas e confirmada através de testes sorológicos.

3.3 - Estudos de Efeitos Citopáticos em Plantas Infetadas

Como forma complementar de diagnose e caracterização da infecção ocasionada pelo vírus, células de plantas infetadas de maracujá amarelo e feijão-de-rola foram submetidas a estudos ao microscópio ótico. Camadas de células da epiderme foliar foram removidas e coradas com uma combinação de calcomina laranja e luxol verde brilhante, por períodos de 5 a 10min, de acordo com o método desenvolvido por CHRISTIE (1967) e aperfeiçoado por CHRISTIE & EDWARDSON (1977). Antes das camadas de células serem montadas com "euparal" em lâminas microscópicas, os excessos de corantes eram removidos em álcool absoluto. Em seguida, as células foram examinadas ao microscópio ótico visando detectar a presença de inclusões de valor diagnóstico.

3.4 - Estabilidade do Vírus em Seiva

O Ponto de Inativação Térmica (PIT), a Longevidade "in vitro" (LIV) e o Ponto Máximo de Diluição (PMD) foram determinados para o vírus em estudo, usando-se como planta teste, *C. amaranticolor*, hospedeira de lesão necrótica local. O PIT foi encontrado pelo aquecimento de amostras de extratos obtidos pela maceração de folhas de plantas de maracujá infetadas pelo vírus em água destilada, a diferentes temperaturas por um período de 10min. A temperatura inicial foi de 45°C e a final de 75°C e, as intermediárias foram obtidas pelo aumento gradativo da temperatura inicial de 5 em 5°C. Logo após resfriadas em gelo, as amostras foram inoculadas mecanicamente em folhas separadas das plantas testes. A LIV foi determinada em extrato de plantas de maracujá infetadas, obtido em água destilada na proporção de 1:2 (peso/volume). Amostras do extrato com o vírus foram mantidas em condições de laboratório (24-28°C) por períodos de 0, 24, 48 e 72h, após o que eram inoculadas na planta teste. Para a determinação do PMD trabalhou-se com o extrato bruto da seiva obtido através da maceração das folhas de maracujá com sintoma do vírus e posterior diluição para 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} com água destilada, antes que a inoculação das folhas da planta teste fosse efetuada.

3.5 - Purificação do Vírus

Pelo fato das plantas de *M. lathyroides* (feijão-de-

-rola) infetadas pelo isolado do vírus em estudo apresentarem bons sintomas sistêmicos, caracterizados por mosaico severo, bolhosidade e deformações foliares, indicando bom nível de concentração viral, referida espécie vegetal foi selecionada para propagação do vírus, objetivando sua purificação. Em razão do tamanho reduzido das folhas do feijão-de-rola, foram usadas cerca de 500 plantas, cujas folhas, sistemicamente infetadas, foram coletadas 18 dias após a inoculação e utilizadas na purificação com clarificação em n-butanol, descrito por LIMA (1978) e LIMA et al. (1979), com algumas modificações. O material foliar coletado foi macerado em liquidificador com solução tamponada de fosfato de potássio (KHPO_4) 0,5M, pH 7,5 contendo 1% de sulfito de sódio. O extrato resultante da maceração foi filtrado em gaze dupla, ao qual adicionou-se, lentamente, 8% de n-butanol, ficando a mistura submetida a agitação constante, em condições de baixa temperatura, durante 3,0h. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 4.000g por 10 min, em centrífuga JANETZKI T32 com a finalidade de retirar os fragmentos vegetais. Ao sobrenadante obtido foi adicionado 8% de polietileno glicol (PEG) 6.000 (PM), em agitação constante, por um período de 1,0h. Em seguida, a mistura foi submetida a uma baixa centrifugação de 12.000g durante 10min, em centrífuga Sorval RC-5B. O precipitado obtido foi ressuspendido em 1,0ml de tampão KHPO_4 0,02M, pH 8,2 + 0,1% de 2-mercapto-etanol (2-ME) e submetido a centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο ($d= 1,28$) a 120.000g durante 18h, em ultracentrífuga Beckman L7-55. A

banda viral, de aproximadamente 3,0mm, localizada a 70mm abaixo da borda do tubo foi coletada, diluída em tampão de KHPO_4 0,02M pH 8,2 e submetida a um ciclo de centrifugações diferenciais, com uma ultracentrifugação final de 85.000g durante 90min para precipitação e concentração das partículas virais, que foram ressuspendidas no mesmo tampão. Todas as preparações virais conseguidas foram analisadas no espectro-fotômetro de luz ultra-violeta Variant DMS-70, usando-se a faixa de comprimento de onda de 220 a 340nm, com o objetivo de avaliar o grau de pureza das preparações virais e estimar as concentrações dos vírus nas mesmas. Para o cálculo da concentração do vírus em estudo, utilizou-se coeficiente de extinção ($E_{260}^{0,1\%} = 2,8$) obtido por STACE-SMITH & TREMAINE (1980) para o "potato virus y" (PVY, vírus Y da batatinha, potyvirus), vírus padrão do grupo potyvirus.

Todas as preparações virais foram também testadas quanto a infetividade, mediante a inoculação de plantas saudas de *C. amaranticolor*, *P. edulis* f. *flavicarpa* e *M. lathyroides*.

A rebrota das plantas de *M. lathyroides* infetadas 20 dias após a primeira coleta foi também utilizada numa segunda purificação viral, seguindo a metodologia anteriormente descrita.

O extrato e as soluções empregadas na purificação do vírus eram mantidos a frio (4-10°C) em todas as etapas da purificação e o roteiro empregado é o mostrado na Figura 3.

3.6 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida da Proteína Capsidial do Vírus

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada de acordo com o método desenvolvido por LAEMMLI (1970). A polimerização ocorreu à temperatura ambiente. O vírus purificado mantido em solução 0,02M de KHP0_4 , pH 8,2, mais 2% de SDS, resultou em soluções finais com concentração de, aproximadamente, 1mg de vírus por ml de solução. Foram aplicadas 5 μ l, 10 μ l e 15 μ l por cavidade do gel. A eletroforese foi desenvolvida à temperatura ambiente, com corrente constante e igual a 10 mA por placa de gel por aproximadamente 4h.

As proteínas β -galactosidase (PM 116kDa), albumina bovina (PM 66kDa), albumina de ovo (PM 45kDa), gliceraldeído -3-fósforo (PM 36kDa), anidrase carbônica (PM 29kDa), tripsinogênio (PM 24kDa) e inibidor de tripsina (PM 20kDa) foram usadas como padrões para estimar o valor do peso molecular da proteína capsidial do vírus.

Após a eletroforese as bandas de proteínas foram localizadas através da colocação da placa de gel em solução corante, constituída de "Coomasie" Azul Brilhante G (0,25%) em metanol a 50% e ácido acético glacial (90,8:9,2). O descoramento foi feito pela imersão das placas em solução de ácido acético a 10%.

Estimou-se o peso molecular da proteína capsidial do vírus, representando-se num gráfico, os pesos moleculares das proteínas padrões, no eixo dos "y", e, suas respectivas

distâncias percorridas após o término da eletroforese, no eixo dos "x". No mesmo gráfico marcou-se também a distância percorrida pela proteína do vírus e, pela posição na reta padrão, estimou-se o seu peso molecular, segundo sua correspondência no eixo dos "y".

3.7 - Produção de Anti-soro Específico para o Vírus

Coelho da raça Nova Zelândia com, aproximadamente, 6 meses de idade foi utilizado na produção de anti-soro para o vírus purificado. Inicialmente, coletou-se uma amostra de sangue do animal para obtenção de soro normal. A preparação viral foi emulsificada com o adjuvante incompleto de Freund em iguais proporções, sendo a mistura injetada nas patas traseiras e na coxa do coelho. Ao todo, foram aplicados 4,0mg de vírus, distribuídos em 3 aplicações. Aproximadamente um mês após a primeira injeção o sangue passou a ser coletado, semanalmente, através de cortes feitos na veia marginal da orelha do coelho imunizado. As amostras de sangue coletadas foram colocadas para coagular em banho-maria a 37°C por 60min e em seguida, centrifugadas a 3.000g por 10min, havendo sido o soro coletado, submetido a centrifugação de 10.000g por 10min, na centrífuga Sorval RC-5B, para sua clarificação. O soro obtido foi transferido para recipientes de vidro, etiquetados e armazenados em "freezer".

3.8 - Transmissão do Vírus por Pulgão

Foram desenvolvidos testes de transmissibilidade do vírus por pulgão em condições de casa-de-vegetação, utilizando-se pulgões de uma colônia de *Aphis fabae* Scopoli (Homoptera, Aphididae), identificado pelo professor J.H.R. dos SANTOS da Universidade federal do Ceará. Após um período de jejum de 2h, aproximadamente, os pulgões foram colocados para se alimentar em folhas de maracujá de plantas infetadas, por 30seg, para aquisição do vírus e, logo em seguida, transferidos para as plantas sadias de *M. lathyroides*, havendo-se usado 5 pulgões por cada planta teste, onde foram mantidos por 24h. Depois das inoculações com pulgões, as plantas foram observadas diariamente, por um período de 20 a 25 dias com relação ao aparecimento dos sintomas típicos do vírus. Todas as plantas com sintomas ou suspeitas de sintomas foram testadas sorologicamente, para confirmação da presença do vírus.

3.9 - Relacionamento Sorológico com Outros Potyvirus

Com o uso do anti-soro obtido para o vírus em estudo, realizaram-se testes de dupla difusão em agar, com vistas à determinação do seu relacionamento sorológico com os seguintes potyvirus: "papaya ringspot virus-P" (PRSV-P, vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe P = papaya); (PRSV-W, vírus da mancha anelar do mamoeiro, estirpe W = melancia);

"passionfruit woodness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujá); "cowpea aphidborne mosaic virus" (CAMV, vírus do mosaico do caupi, transmitido por pulgão) isolados em Pentecoste (CAMV-PT), Quixadá (CAMV-QX), Piauí (CAMV-PI) e Rio Grande do Norte (CAMV-RN) e potyvirus não caracterizados, isolados de *C. ensiformis* (Poty-CE), *C. occidentales* (Poty-CO), *C. tora* (Poty-CT); *G. max* (Poty-Soja), *M. atropurpureum* (Poty-Siratiro), *M. lathyroides* (Poty-ML) e *S. orientale* (Poty-SO).

Em todos os testes, procurou-se sempre colocar o antígeno homólogo (vírus em estudo) ao anti-soro, em orifício vizinho ao do vírus heterólogo, a fim de possibilitar a detecção de possíveis esporões entre os respectivos vírus.

3.10 - Levantamento de Maracujazeiros Infetados por Vírus na Região da Ibiapaba

Inspeções de campo foram realizadas, visando-se efetuar o mapeamento da incidência de vírus em pomares de maracujá, em municípios da Região da Ibiapaba-CE. Ao tempo das visitas de inspeção, procurou-se coletar amostras foliares de plantas com sintomas, para identificação e isolamento dos vírus envolvidos, mediante testes laboratoriais e de casa-de-vegetação.

As amostras de maracujá foram coletadas de pomares localizados nos municípios de Guaraciaba, Ibiapina, São Benedito, Tianguá e Ubajara, procurando-se sempre, coletar

folhas exibindo sintomas típicos de virose, em diferentes graus de severidade. Todas as amostras coletadas foram testadas sorologicamente, mediante testes de dupla difusão em agar contra anti-soro específico para o vírus em estudo e algumas com anti-soro para o CMV. Quando se suspeitava da existência de estirpes distintas, em razão da formação de esporão nos testes sorológicos, o material era inoculado em mudas sadias de maracujá, em casa-de-vegetação, para estudos posteriores, visando-se confirmar a formação de esporão com o antígeno homólogo ao anti-soro usado. Os antígenos usados em todos os testes sorológicos foram preparados pela maceração de folhas com sintomas ou suspeita de sintomas, em água destilada, na proporção 1:1 (peso/volume) e, o extrato obtido, misturado com uma solução a 3,0% de SDS na proporção 1:1, usando-se, sempre, placas com meio constituído de Agar Noble (0,85%), Azida de Sódio (NaN_3 1,0%), SDS (0,5%) e água destilada.

4 - RESULTADOS

4.1 - Gama Parcial de Hospedeiros do Vírus

O vírus isolado de *P. edulis* f. *flavicarpa* na Serra da Ibiapaba infetou 14 das 32 espécies vegetais artificialmente inoculadas, no estudo da gama parcial de hospedeiros. O mesmo ocasionou sintomas sistêmicos nas seguintes espécies vegetais: *Canavalia brasiliensis*; *C. ensiformes*; *Cassia occidentalis*, *Centrosema brasilianum*; *Crotalaria incana*; *G. max* 'Pelicano'; *M. lathyroides* (FIGURA 1); *N. benthamiana*; *Passiflora edulis* (FIGURA 2A); *P. edulis* f. *flavicarpa* (FIGURA 2B); *Phaseolus lunatus* '15'; *P. vulgaris* 'Carioquinha'; 'CNF 5520', 'Engopa Duro 201', 'P-445', 'Rio Baio', 'Rio Doce', 'Venezuela-118' e 'Xodó-bat-58' e *S. orientale* e *V. mungo* '01' (TABELA 01). De outra parte, as espécies *Cassia tora*; *Centrosema pascuorum*; *C. pubescens*; *Chenopodium amaranticolor*; *C. quinoa*; *P. membranacens*; *P. vulgaris* 'JALO 558' e 'Mineiro Precoce' reagiram somente na forma de lesões necróticas ou cloróticas locais (TABELA 1).



FIGURA 1: Sintomas de mosaico induzidos pelo isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, em *Macroptilium lathyroides*.

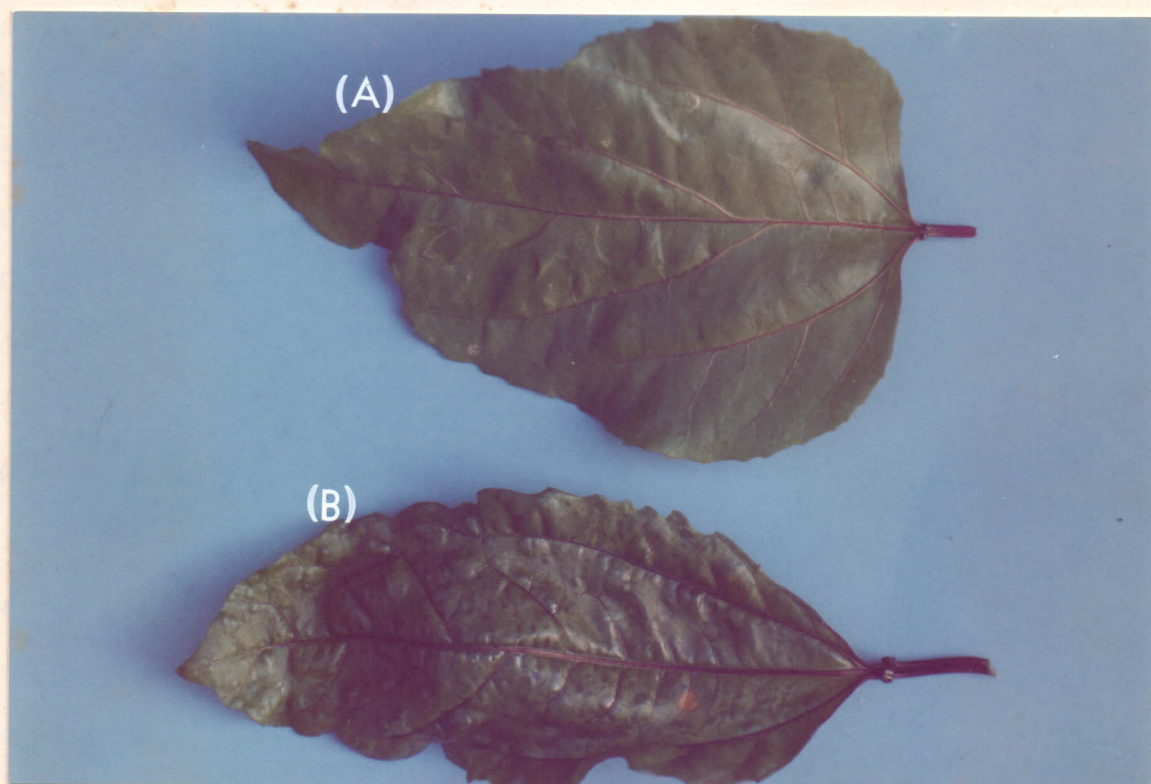


FIGURA 2: Sintomas induzidos pelo isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, em maracujá. A) Folha de *Passiflora edulis* apresentando mosaico leve B) Folha de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* mostrando bolhosidade, deformação foliar e mosaico.

TABELA 1 - Reações sintomatológicas e resultados sorológicos de espécies vegetais e cultivares inoculadas com o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá obtido em Tianguá, CE.

ESPÉCIES	REAÇÕES (*) SINTOMATOLÓGICAS		RESULTADOS (**) SOROLÓGICOS
	LOCAIS	SISTEMICAS	
- Cultivares			
Arachis hypogea			
'CE-55-437'	-	-	(-)
'CE-57-422'	-	-	(-)
'CE-68-11'	-	-	(-)
'CE-73-30'	-	-	(-)
'CE-73-33'	-	-	(-)
'Georgia'	-	-	(-)
'PI-165-317'	-	-	(-)
'TATU'	-	-	(-)
Canavalia brasiliensis	-	M	(+)
C. ensiformis	-	M	(+)
Cariaca papaya	-	-	(-)
Cassia occidentalis	-	M	(+)
C. tora	LNe	-	(-)
Centrosema brasilianum	LC1	M	(+)
C. pascuorum	LNe	-	(-)
C. pubescens	LC1	-	(-)
Chenopodium amaranticolor	LNe	-	Nt
C. quinoa	LNe	-	Nt

TABELA 1 - (CONTINUAÇÃO)

ESPÉCIES	REAÇÕES (*)		RESULTADOS (**) SOROLÓGICOS
	LOCAIS	SISTEMICAS	
- Cultivares			
<i>C. murale</i>	-	-	(-)
<i>Clitoria ternatea</i>	-	-	(-)
<i>Crotalaria incana</i>	-	M	(+)
<i>C. striata</i>	-	-	(-)
<i>Cucumis anguria</i>	-	-	(-)
<i>C. melo</i>	-	-	(-)
<i>C. sativus</i>	-	-	(-)
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-	(-)
<i>Glycine max</i>			
'IAC-2'	-	-	(-)
'IAC-70223'	-	-	(-)
'Pelicano'	-	M	(+)
<i>Gonphrena globosa</i>	-	-	(-)
<i>Macroptilium lathyroides</i>	LNe	B,MS	(+)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	M	(+)
<i>N. tabacum</i>	-	-	(-)
<i>Passiflora edulis</i>	-	M	(+)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	-	B,DF,M	(+)
<i>Phaseolus lunatus</i>			
'01'	-	-	(-)
'02'	-	-	(-)
'03'	-	-	(-)
'06'	-	-	(-)

TABELA 1 - (CONTINUAÇÃO)

ESPÉCIES	REAÇÕES (*)		RESULTADOS (**) SOROLOGICOS
	LOCAIS	SISTÊMICAS	
- Cultivares			
Phaseolus lunatus			
'15'	-	LC1	(+)
'26'	-	-	(-)
P. membranascens	LNe	-	(-)
P. vulgaris			
'Carioquinha'	-	ML	(+)
'CNF-5520'	-	ASS	(+)
'Engopa ouro 201'	-	ASS	(+)
'HF-465-63-1'	-	-	(-)
'IPA-6'	-	-	(-)
'JALO 558'	LC1	-	(-)
'Mineiro precoce'	LC1	-	(-)
'P-445'	-	ML	(+)
'Rio baio'	LNe	MS	(+)
'Rio doce'	-	ASS	(+)
'Venezuela'	-	LNe, ML	(+)
'Xodó-bat-58'	-	ASS	(+)
Sesamum orientale	-	M	(+)
Vigna mungo			
'01'	-	M	(+)
'02'	-	-	(-)
'19'	-	-	(-)
'Aparecido'	-	-	(-)

TABELA 1 - (CONTINUAÇÃO)

ESPÉCIES	REAÇÕES (*) SINTOMATOLÓGICAS		RESULTADOS (**) SOROLÓGICOS
	LOCAIS	SISTÊMICAS	
- Cultivares			
Vigna mungo			
'Blackeye'	-	-	(-)
'Epace-10'	-	-	(-)
'Frade preto'	-	-	(-)
'Carrapicho'	-	-	(-)
V. unguiculata			
'Macaibo'	-	-	(-)
'Otilia'	-	-	(-)
'Pitiúba'	-	-	(-)
'Quarentão'	-	-	(-)
'Quarenta dias'	-	-	(-)
'Roxinho'	-	-	(-)
'Sempre verde'	-	-	(-)
'Seridó'	-	-	(-)
'Setentão'	-	-	(-)

*: ASS= aparentemente sem sintoma; B= bolhosidade; DF= deformações foliares; LCl= lesões cloróticas; LNe= lesões necróticas; M= mosaico; ML= mosaico leve; MS= mosaico severo e "-"= sem sintoma.

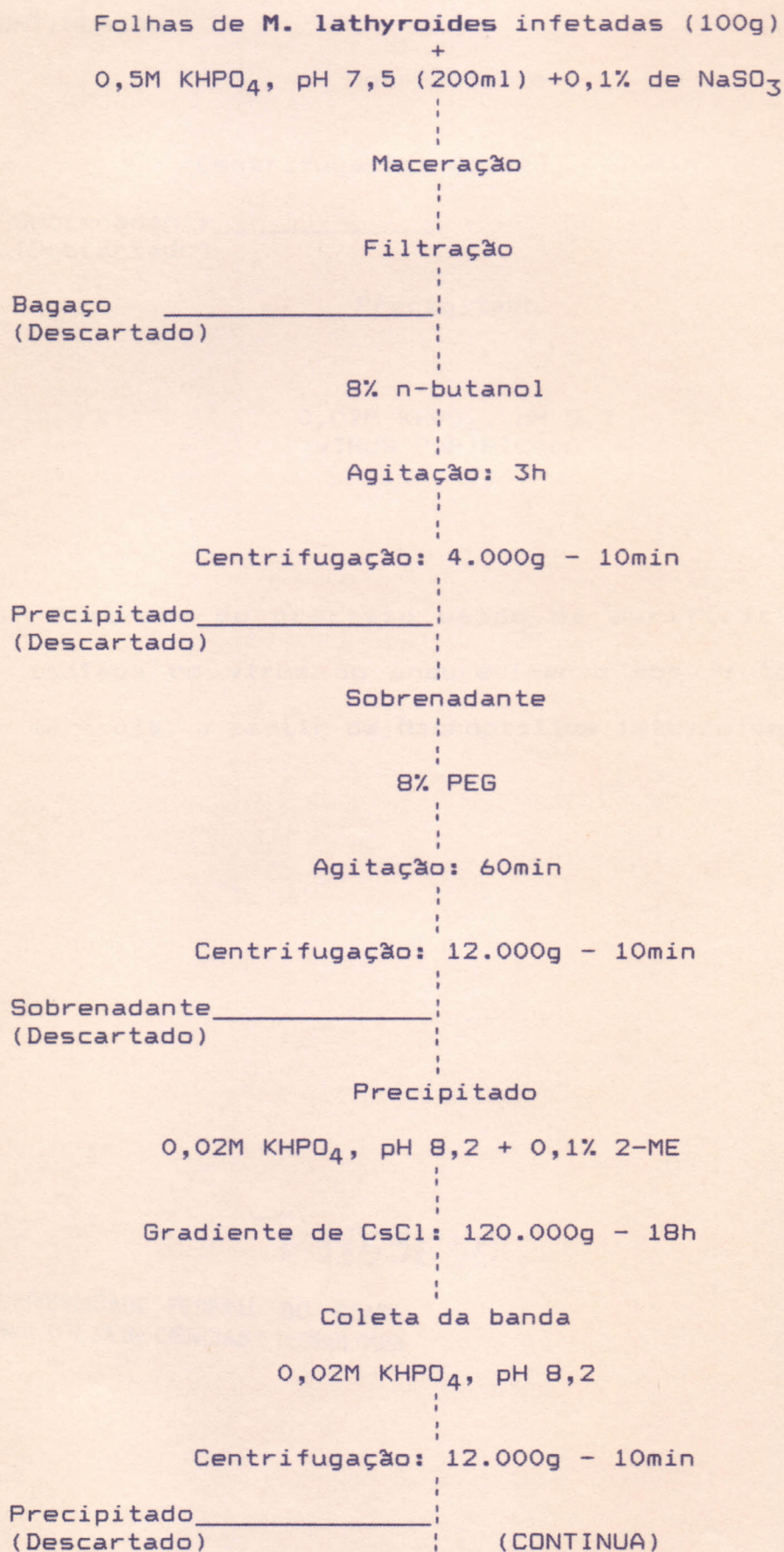
** : (+)= reação sorológica em teste de dupla difusão em agar;
(-)= ausência de reação.

Nt= Não testadas

4.2 - Purificação, Produção de Anti-soro Específico e Análise da Proteína Capsidial do Vírus

O roteiro usado na purificação do vírus (FIGURA 3) mostrou-se bastante eficiente, permitindo a obtenção de preparação purificada com concentração final máxima de 18,24mg de vírus por kg de tecido infetado. O n-butanol, a pâr de promover uma boa clarificação do extrato foliar de *M. lathyroides*, não afetou a constituição química e a integridade biológica do vírus. As preparações virais obtidas apresentaram espectros de absorção, com um máximo em 259nm e um mínimo entre 245-246nm (FIGURA 4). Após correção para luz desviada as razões entre as absorções nos comprimentos de onda 260 e 280nm (A_{260}/A_{280}) e máxima e mínima (A_{max}/min) foram 1,34 e 1,01, respectivamente. As preparações virais mostraram-se infectivas em *C. amaranticolor*, *M. lathyroides* e maracujá. O *M. lathyroides*, apesar de desenvolver pequena quantidade de massa verde por planta, apresentou boas qualidades para propagação do vírus, ensejando um elevado nível de concentração viral nos tecidos foliares, especialmente, 20 dias após a coleta para a primeira purificação.

Outro indicativo do bom nível de pureza da preparação viral purificada foi o grau de especificidade do anti-soro obtido (FIGURA 5) a partir do coelho imunizado com a mesma. Desde a primeira sangria, efetuada aos 10 dias depois da última injeção do vírus no coelho, o anti-soro manifestou boa reação com o antígeno homólogo, preparado a



CONTINUAÇÃO:

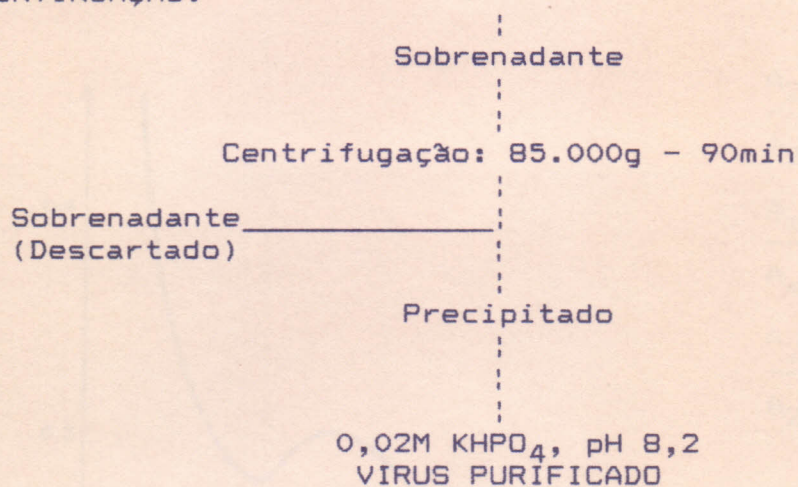


FIGURA 3: Diagrama do processo usado na purificação do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, a partir de *Macroptilium lathyroides*.

R1153650.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

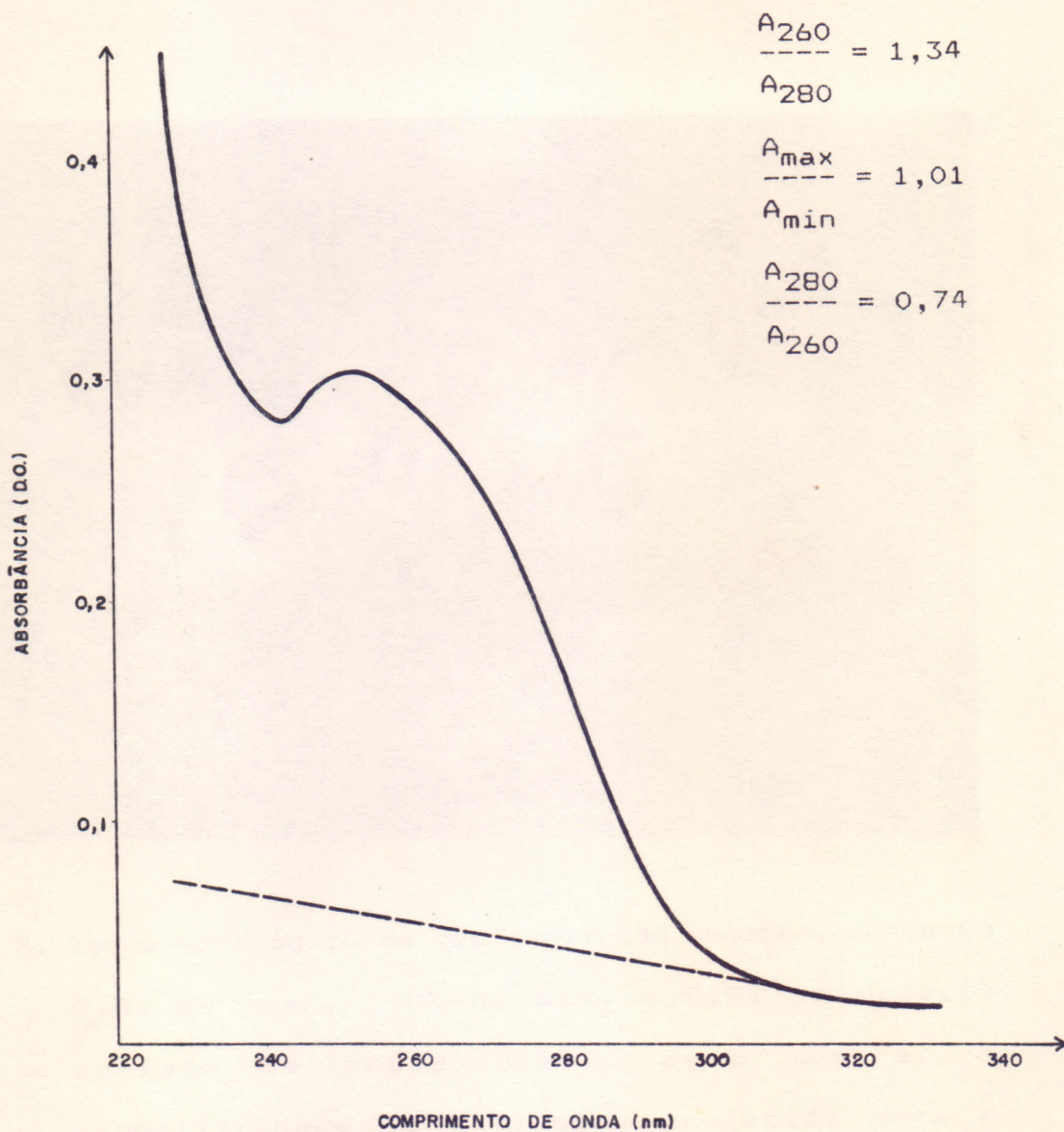


FIGURA 4: Espectro de absorção ultra-violeta da preparação purificada do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, obtida a partir de *Macroptilium lathyroides*.

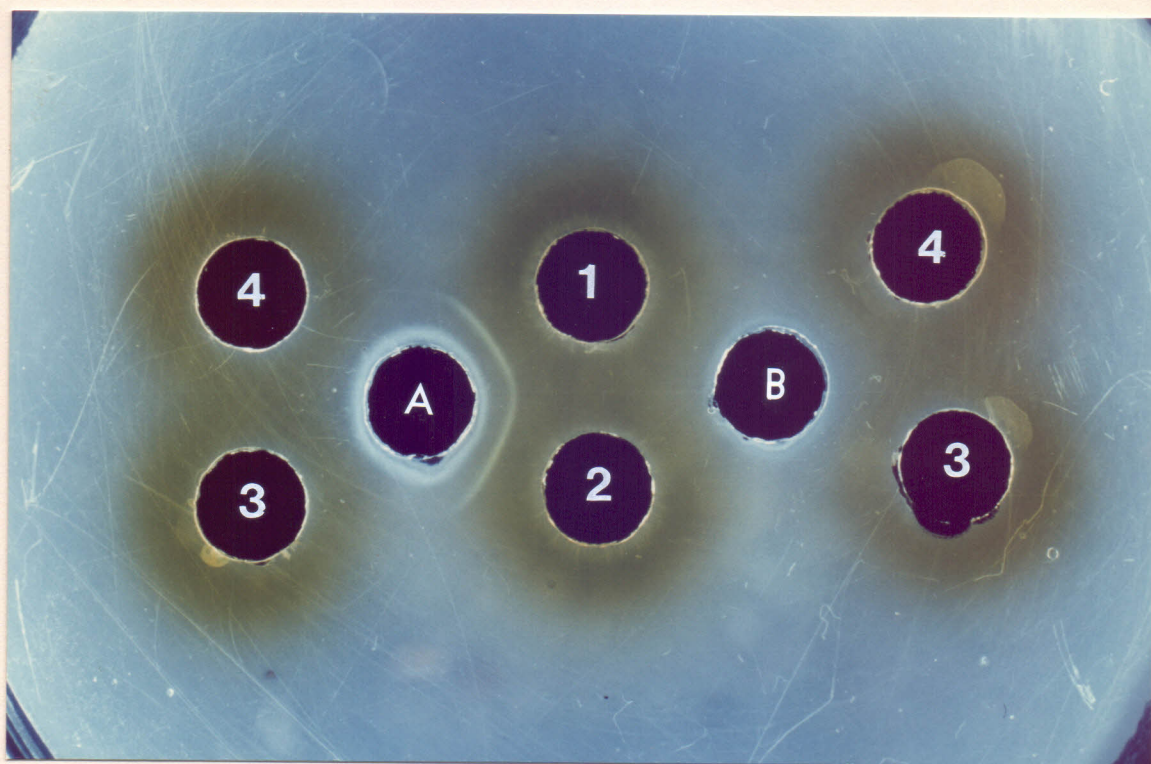


FIGURA 5: Teste sorológico de dupla difusão em agar, contendo 0,8% de agar, 1,0% de NaN_3 e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), para mostrar a especificidade do anti-soro produzido para o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá (PWV, passionfruit woodiness virus), em estudo. Os orifícios centrais foram preenchidos com anti-soro específico para o isolado do PWV em estudo (A) e soro normal (B). Os orifícios (1 e 2) com o homólogo do PWV e (3 e 4) com extrato de planta sadia.

partir de plantas de feijão de rola e de maracujá infetadas, sem nenhum tipo de reação com extratos foliares de plantas sadias das mesmas espécies, em testes de dupla difusão em agar contendo SDS (FIGURA 6).

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da preparação purificada do vírus em estudo revelou a presença de um principal componente protéico, com peso molecular estimado em 36kDa e outro menor com peso de 29kDa (FIGURA 6-A). Este último pode ter surgido da degradação do componente principal durante a estocagem da preparação purificada, sob condições de refrigeração (LIMA, 1978).

Os pesos moleculares de todas as proteínas observadas na placa e suas respectivas distâncias percorridas no gel de poliacrilamida estão assinalados no gráfico representado pela FIGURA 6-B.

4.3 - Efeitos Citopáticos em Plantas Infetadas Estabilidade do Vírus em Seiva

Através de observações realizadas ao microscópio ótico, foi possível visualizar inclusões citoplasmáticas de natureza protéica em células de plantas de *M. lathyroides* e *P. edulis* f. *flavicarpa* infetadas pelo vírus, semelhantes às descritas para os potyvirus.

Os estudos sobre estabilidade do vírus em seiva mostraram um PIT entre 60 e 65°C para o mesmo, uma vez que as folhas de *C. amaranticolor* inoculadas com o vírus submetido à temperaturas acima de 60°C não apresentaram

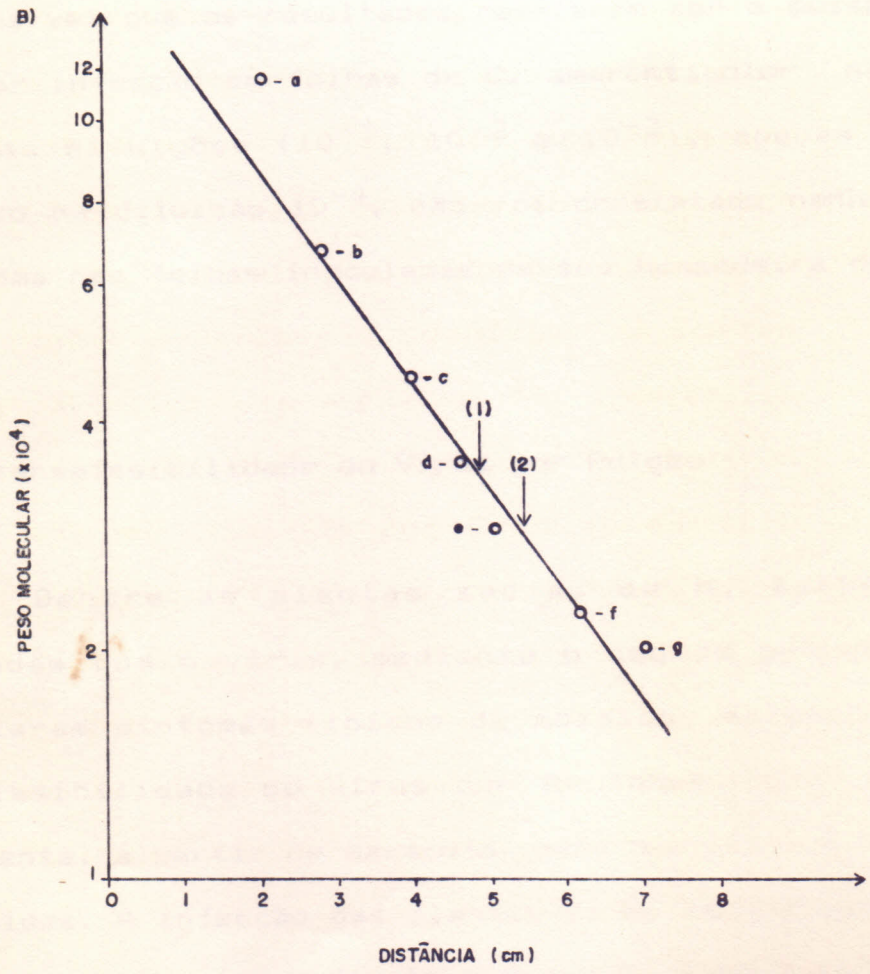
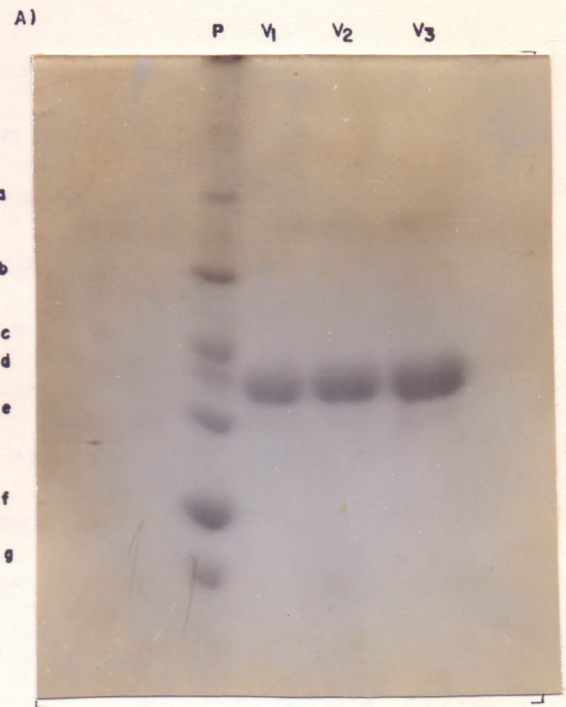


FIGURA 6: Análise da proteína capsidial do isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá, mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

A) Fotografia da placa com preparações virais em diferentes concentrações (V_1 , V_2 e V_3) e proteínas padrões (P). B) Determinação do peso molecular da proteína capsidial do vírus. Os círculos no gráfico representam, de cima para baixo, as seguintes proteínas padrões: a) β -glicosidase (PM 116 kDa), b) albumina bovina (PM 66 kDa), c) albumina de ovo (PM 45 kDa), d) gliceraldeído-3-fósforo (PM 36 kDa), e) anidrase carbônica (PM 29 kDa), f) Tripsinogênio (PM 24 kDa) e g) inibidor de tripsina (PM 20,1 kDa). As distâncias no eixo X correspondem às medidas na placa. Os pesos moleculares estimados são os seguintes: (1) 36kDa e (2) 29kDa.

nenhuma lesão necrótica. Por outro lado, folhas da mesma planta, inoculadas com o vírus tratado às temperaturas de 45 e 50°C por 10min, expressaram numerosas lesões (FIGURA 7) e, aquelas inoculadas com extrato foliar contendo o vírus, submetido às temperaturas de 55 e 60°C por 10min, desenvolveram menor número de lesões, indicando que o vírus foi gradativamente diminuindo sua infetividade, à medida que a temperatura era elevada. Após um período de 24 horas, em condições de laboratório, o vírus contido em extrato foliar de plantas infetadas tornou-se não infetivo, indicando um LIV entre 24 e 48 horas. O PMD do vírus ficou entre 10^{-3} e 10^{-4} , uma vez que os resultados revelaram ser o mesmo capaz de causar infecção em folhas de *C. amaranticolor* nas três primeiras diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), apenas quando inoculado na diluição 10^{-4} , não foi constatado nenhum tipo de sintoma nas folhas inoculadas da sua hospedeira de lesão local.

4.4 - Transmissibilidade do Vírus por Pulgão

Dentre as plantas sadias de *M. lathyroides* inoculadas com o vírus, mediante o uso de pulgões, 50% apresentaram sintomas típicos de mosaico, evidenciando a transmissibilidade do vírus por *A. fabae*, de forma não persistente, a partir de maracujá, para plantas sadias de *M. lathyroides*. A infecção das plantas de *M. lathyroides* com o vírus foi confirmada mediante testes de dupla difusão em agar contra anti-soro específico para o mesmo.



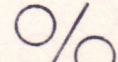

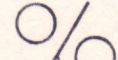
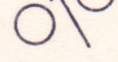
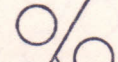
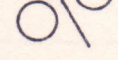

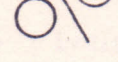

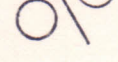


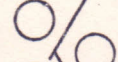
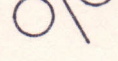
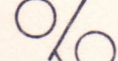
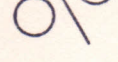
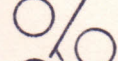
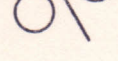
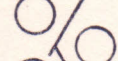
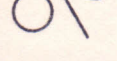
FIGURA 7: Lesões necróticas locais em folha de *Chenopodium amaranticolor* inoculada com o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá.

4.5 - Relacionamento Sorológico

Estudos sorológicos em teste de dupla difusão em agar-gel contendo SDS, com anti-soro específico para o vírus em estudo mostraram ser o mesmo sorologicamente idêntico ao PWV (FIGURA 9) e relacionado, porém distinto dos seguintes potyvirus: CAMV-PT, CAMV-QX, CAMV-RN, Poty-CO, Poty-CT, Poty-CT, Poty-ML, Poty-Siratro, Poty-SO e Poty-soja. Todos estes vírus reagiram com o anti-soro para o isolado de PWV em estudo, apresentando a formação de esporão resultante do prolongamento da reação homóloga sobre as reações heterólogas (FIGURA 8). Por outro lado, nenhuma reação sorológica foi visualizada nos testes envolvendo os potyvirus CAMV-PI; PRsV-P E PRsV-W (FIGURA 8).

4.6 - Levantamento de Plantas da Região da Ibiapaba Infetadas por Vírus

Um total de 408 amostras foliares, representando igual número de plantas de maracujá, foram coletadas em pomares da Região da Ibiapaba, sendo 47 de Guaraciaba do Norte, 132 de Ibiapina, 80 de São Benedito, 79 de Tianguá e 70 de Ubajara. Entre estas, apenas 6 amostras não apresentaram resultados positivos, quando testadas, sorologicamente, contra o anti-soro para o isolado de PWV em estudo. Todas as demais amostras reagiram com o anti-soro para o PWV (TABELA 2), sendo que algumas apresentaram a formação de esporão com o antígeno homólogo ao anti-soro.

ANTIGENOS	ANTI-SORO
PWV-H	→  ← PWV
CAMV-PI	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
CAMV-PT	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
CAMV-QX	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
CAMV-RN	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-CE	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-CO	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-CT	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-ML	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-Siratro	→  ←
PWV-H	→  ← PWV
Poty-SO	→  ←


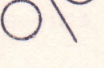
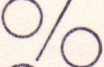
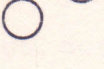


ANTIGENOS	ANTI-SORO
PWV-H	→  ← PWV
Poty-Soja	→  ← PWV
PWV-H	→  ← PWV
PR _s V-P	→  ← PWV
PWV-H	→  ← PWV
PR _s V-W	→  ← PWV

FIGURA 8: Resultados de estudos de relacionamento sorológico entre o isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá em estudo e outros potyvirus.

Tais amostras mostraram-se infetivas quando inoculadas em plantas sadias de maracujá, mantidas em casa-de-vegetação. Novos testes sorológicos com as plantas infetadas em regime de casa-de-vegetação confirmaram a presença do esporão, constatada com amostras coletadas nos pomares.

Aproximadamente 20 amostras escolhidas ao acaso, dentre aquelas de cada município, não reagiram com anti-soro específico para o CMV, em teste de dupla difusão em agar.

TABELA 2- Levantamento da incidência do vírus do endureciemtno dos frutos do maracujá na Serra da Ibiapaba, CE, 1991.

MUNICIPIOS SITIOS	Área com maracujá (ha)	Nº de amostras foliares cole- tadas	Nº de amostras com PWV em tes- tes sorológicos
GUARACIABA DO NORTE			
- Santa Terezinha	1,0	47	46
IBIAPINA			
-Tauã	1,0	38	37
-Jurema	1,5	62	61
-Cocalzinho	2,0	32	32
SAO BENEDITO			
-São Francisco	2,0	64	64
-Sítio Pejoaba	1,0	16	16
TIANGUA			
-Pedra Fina I	1,5	54	53
-Pedra Fina II	1,0	25	23
UBAJARA			
-TAISA	600,0	70	70
TOTAL	611,0	408	402

5 - D I S C U S S Ã O

Com base em resultados laboratoriais envolvendo estudos sorológicos, de estabilidade de vírus em seiva, peso molecular da proteína capsidial, transmissibilidade por pulgão, sintomatologia, efeitos citopáticos em plantas infetadas e gama de hospedeiros, aliados ao baixo grau de severidade detectado em condições de campo, identificou-se o vírus em estudo como uma estirpe fraca do "passionfruit woodiness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujá). A estirpe do PWV em causa foi isolada na Serra da Ibiapaba a partir de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) com sintomas foliares mais severos que os ocasionados em *P. edulis* (maracujá roxo), sem, contudo, ocasionar sintomas de endurecimento dos frutos. Em *P. edulis* a estirpe fraca de PWV, aqui caracterizada, ocasionou somente mosaico leve, o que a distingue da estirpe severa descrita por COBB (1901) na Austrália, responsável por endurecimento dos frutos em *P. edulis* e da estudada por TAYLOR & KIMBLE (1964) em Queensland, capaz de provocar a morte de mudas de *P. edulis*, artificialmente inoculadas.

Estudos de uma gama de hospedeiros revelaram que a estirpe de PWV foi capaz de infetar 14 espécies de dicotiledôneas distribuídas em 5 famílias botânicas.

Leguminosae: *C. brasiliensis*, *C. occidentalis*, *C. brasilianum*, *C. incana*, *G. max*, *M. lathyroides*, *P. lunatus*; *P. mungo* e *P. vulgaris*; Passifloraceae: *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*; Pedilaceae: *S. orientale*; Chenopodiaceae: *C. amaranticolor* e *C. quinoa* e Solanaceae: *N. benthamiana*. Segundo TEAKLE & WIDERMUTH (1967) e TAYLOR & GREBER (1973) o PWV infeta 44 dicotiledôneas distribuídas em 5 famílias. TAYLOR & GREBER (1973) citam como principais hospedeiras do PWV, algumas espécies das famílias Leguminosae e Passifloraceae. Dentre as leguminosas citadas por TAYLOR & GREBER (1973), *Crotalaria usaramoensis* Bak. e *Macroptilium atropurpureus* Urb. não foram testadas contra a estirpe em estudo e apenas *A. hypogea* não foi infetada pelo vírus. Possivelmente, as cultivares de *A. hypogea* testadas não faziam parte das cultivares suscetíveis testadas por TAYLOR & GREBER (1973).

A escolha de *M. lathyroides* para propagação e purificação do vírus, aliada ao método adotado na purificação, possibilitou a obtenção de preparações virais com bons graus de pureza e concentração. Segundo MARINHO E KITAJIMA (1989), uma preparação viral com concentração na faixa de 15 - 20mg/kg de folha é considerada satisfatória para os potyvírus. A obtenção de anti-soro de boa especificidade, não reagindo com extrato de plantas sadias, constituiu outro indicativo do bom nível de pureza da preparação viral purificada. A rebrota das plantas de *M. lathyroides* infetadas, 20 dias após a primeira coleta, para purificação, apresentou folhas com excelentes sintomas

(FIGURA 2) e elevada concentração de vírus, permitindo uma segunda purificação.

As duas bandas de proteínas, com pesos moleculares de 36 e 29kDa, detectadas nos estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida, deveu-se, possivelmente, a uma degradação enzimática da proteína capsidial de 36kDa durante o processo de purificação e estocagem do vírus (HIEBERT & McDONALD, 1976; LIMA et al., 1979). LIN et al. (1989) constataram somente um tipo de proteína de 36kDa no capsídeo de PWV, em análise da eletroforese em gel de poliacrilamida.

As inclusões citoplasmáticas encontradas nas células epidermais de plantas infetadas pela estirpe de PWV em estudo, correspondem àquelas descritas por TAYLOR & GREBER (1973) e têm valor diagnóstico a nível da microscopia ótica (CHRISTIE, 1967; CHRISTIE & EDWARDSON, 1977; LIMA et al., 1979).

Os testes de transmissibilidade mostraram que o vírus em estudo pode ser transmitido, eficientemente, pelo afídeo *A. fabae* a partir de plantas de *M. lathyroides*, de forma não persistente. Embora não haja sido testado na presente pesquisa, possivelmente referida espécie de afídeo deverá transmitir o vírus de *M. lathyroides* para maracujá, e de maracujá para maracujá. De acordo com a literatura, o PWV é transmitido de maneira não persistente por espécies de afídeos, das quais duas foram identificadas como *M. persicae* (NOBLE & NOBLE, 1938) e *A. gossypii* (MAGEE, 1948). Segundo TAYLOR & GREBER (1973), mudas de *P. edulis* ou de *M. lathyroides* servem para testes de transmissão do PWV por

vetores. As pequenas variações observadas com as características da estabilidade do vírus em seiva entre a estirpe de PWV em análise e as descritas na literatura para PWV (TAYLOR & GREBER, 1973), devem-se, provavelmente, às diferenças inerentes às estirpes do vírus estudadas, das características da seiva da espécie utilizada como fonte de vírus e da temperatura, na qual foram realizados os experimentos.

A estirpe do PWV em estudo mostrou-se sorologicamente relacionada com algumas estirpes do CAMV e com outros potyvirus ainda não totalmente caracterizados. De acordo com informações citadas na literatura, o PWV é relacionado sorologicamente com os seguintes potyvirus: "bean common mosaic virus" (BCMV, vírus do mosaico comum do feijoeiro) (KITAJIMA et al., 1986), "soybean mosaic virus" (SoyMV, vírus do mosaico da soja), "blackeye cowpea mosaic" (BlCMV, vírus do mosaico do caupi blackeye), "cowpea green vein virus" (CGVV, vírus da faixa verde das nervuras do caupi) e "cowpea rugose mosaic virus" (CRMV, vírus do mosaico rugoso do caupi) (LOVISOLO et al., 1986). Segundo BOCK & CONTI (1974) o CAMV e o BlCMV são dois potyvirus relacionados e, bastante semelhantes. O relacionamento sorológico entre vírus pertencentes ao grupo dos potyvirus é muito comum, o que não se verifica entre vírus pertencentes a grupos distintos (PURCIFULL & BATCHELOR, 1977; LIMA, 1978).

O levantamento realizado na Serra da Ibiapaba evidenciou a presença de PWV em todos os pomares de *P. edulis* f. *flavicarpa* visitados, ocasionando mosaicos em

diferentes graus de severidade, sem induzir endurecimento nos frutos, indicando tratar-se de estirpe fraca. O acompanhamento periódico de referidos pomares e estudos complementares de casa-de-vegetação servirão para melhor avaliar-se o grau de virulência da estirpe prevalente na Região e a possibilidade do seu aproveitamento em programas de proteção cruzada em outras regiões.

6 - CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos com esta pesquisa em condições de laboratório, de casa-de-vegetação e de campo, pode-se concluir que:

A) O vírus isolado de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na Serra da Ibiapaba, Ceará, pertence ao grupo dos potyvírus.

B) O vírus possui características sorológicas, sintomatológicas, citológicas de plantas infetadas, estabilidade em seiva, peso molecular da proteína capsidial, transmissibilidade por pulgão e gama de hospedeiros semelhantes às do "passionfruit woodiness virus" (PWV, vírus do endurecimento dos frutos do maracujá).

C) Os graus de severidade do vírus em *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, constatados em condições de campo e casa-de-vegetação, indicam tratar-se de uma estirpe fraca do PWV.

D) A espécie vegetal *Macroptilium lathyroides* é apropriada para multiplicação, propagação e purificação do PWV, possibilitando, inclusive, uma segunda purificação com elevada concentração de vírus, a partir da rebrota das plantas já utilizadas em purificação anterior.

E) O anti-soro específico ao PWV, obtido neste

trabalho, será útil na diagnose e seleção de estirpes fracas do vírus.

F) O isolamento de estirpes fracas poderá ser útil em outras regiões, além da Ibiapaba, através de programas envolvendo proteção cruzada.



7 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARRADAS, M.M. Caracterização do vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) e sua identificação como um tymovirus. Universidade de São Paulo, S. Paulo. 1983. 90p. 1983. (Tese, Doutorado).

BATISTA, F.A.S.; GOMES, R.C.; RAMOS, V.F. Ocorrência de uma anomalia de possível causa virótica ou semelhante a vírus, provocando enfezamento do maracujazeiro. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 4, Recife-PE, 1981. Anais...Recife, 1981. 1408-1413.

BOCK, K.R. & CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus. Descriptions of Plant Viruses, no 134. Commonw Mycolo. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 1974. 4p.

BOS, L. & RUBIO-HUERTOS, M. Intracellular accumulation of passiflora latent virus in *Chenopodium quinoa* Neth. J. Plant Pathol. 77:145-153. 1971.

CHAGAS, C.M.; CATROXO, M.H.; OLIVEIRA, J.M.; FURTADO, E.L. Ocorrência do vírus do clareamento das nervuras do maracujazeiro no Estado de São Paulo. Fitopatol. bras. 12:275-278. 1987.

CHAGAS, C.M.; COLARICCIO, A.; KUDAMATSU, M.; LIN, M.T.;

- BRIOSO, P.S.T.; KITAJIMA, E.W. Estirpe incomum do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fitopatol. bras.* 9:402. 1984 (Res).
- CHAGAS, C.M.; JOAZEIRO, P.P.; KUDAMATSU, M.; VEGA, J. Mosaico do maracujá roxo, uma nova virose no Brasil. *Fitopatol. bras.* 9:241-247. 1984.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) no Est. da Bahia, causado por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. *Fitopatol. bras.* 6:259-268. 1981.
- CHANG, C.A. & LIN, H.H. Passionfruit crinkle virus, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. *Plant Protection Bulletin* 31:409-410. 1989.
- CHANG, C.A.; WANG, H.L.; CHEN, Y.L.; CHOU, T.Y. The investigation and identification of a virus of passionfruit in Taiwan. *Plant Protection Bulletin* 23:267 1981. (Res).
- CHRISTIE, R.G. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusion in epidermal strips. *Virology* 31:268-271. 1967.
- CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Florida Agric. Exp.*

Stn. Monogr. Ser. 9. 1977. 150p.

COBB, N.A. Woodiness of the passionfruit. *Agric. Gaz.* 12:407-418. 1901.

COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M.; MIZUKI, M.K.; VEGA, J.; CEREDA, E. Infecção natural do maracujá amarelo pelo vírus do mosaico do pepino no Estado de São Paulo. *Fitopatol. bras.* 12:254-257. 1987.

COLARICCIO, A.; KUDAMATSU, M.; CHAGAS, C.M.; VEGA, J.; CEREDA, E. Possível ocorrência do vírus do mosaico do pepino (CMV) em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Est. S. Paulo. *Summa Phytopathol.* 10:118. 1984 (Res).

CRESTANI, O.A.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; MARINHO, V.L.A. Passionfruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathol.* 76:951-955. 1986.

CRESTANI, O.A.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; MARINHO, V.L.A.; PIMENTEL, J.P. Uma nova virose em maracujazeiro - mosaico amarelo - causada por um tymovirus. *Fitopatol. bras.* 9:394 1984. (Res).

DIAS, S.C. Morte precoce do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) causada por patógenos que afetam a parte aérea da planta. Universidade de Brasília, Brasília, 1990, 137p. (Tese, Mestrado)

EMATERCE/Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do

Ceará & EPACE/Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará.
Sistema de produção para cultura do maracujá; Região da
Ibiapaba-CE. Fortaleza. 1988. 24p.

ESCUADERO, J.; MONLLOR, A.C.; BIRD, J.; ZETTLER, F.W. Mosaic
of passionfruit (*Passiflora edulis*) in Puerto Rico.
Phytopathol. 78:857. 1988. (Res).

FAO. Products de frutales tropicales. Tendencias y
perspectivas de la producción y el comercio de pinã
enlatado y productos de frutos tropicales exoticas. Roma,
FAO, 1972. 52p. (Série sobre produtos, 51)

FRANCKI, R.I.B.; MOSSOP, D.W.; HATTA, T. Cucumber mosaic
virus. Description of Plant viruses, no 213. Commonw
Mycolo. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
1979. 6p.

HIEBERT, E. & McDONALD, J.G. Capsid protein heterogeneity in
turnip mosaic virus. *Virology* 70:144-150. 1976.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de
etiologia viral e associadas a organismos do tipo
micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatol. bras.*
11:409-432. 1986.

KITAJIMA, E.W. & CHAGAS, C.M. Problemas de viroses ou de
etiologia micoplasmática na cultura do maracujazeiro no
Brasil. *Fitopatol. bras.* 9:393. 1984. (Res).

KITAJIMA, E.W. & CRESTANI, O.A. Association of a rhabdovirus

- with passionfruit vein clearing in Brazil. *Fitopatol. bras.* 10:661-688. 1985.
- KITAJIMA, E.W.; ROBBS, C.F.; KIMURA, O. Envassouramento do maracujá amarelo na Baixada Fluminense, moléstia associada a microorganismos do tipo micoplasmas. *Fitopatol. bras.* 3:91. 1978. (Res).
- KITAJIMA, E.W.; ROBBS, C.F.; KIMURA, O; WANDELEY, L.J.G. O "irizado" do chuchuzeiro e o superbrotamento do maracujá: duas enfermidades associadas a microorganismos do tipo micoplasma constatadas nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco. *Fitopatol. bras.* 6:115-122. 1981.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.
- LIMA, J.A.A. Blackeye cowpea mosaic virus: purification partial characterization, serology and immunochemical and cytological techniques for detection of a virus-infected legume seeds. University of Florida, Gainesville, 154p. 1978. (Tese, Doutorado)
- LIMA, J.A.A. Inclusões em catavento induzidas pelos potyvirus. *Fitopatol. bras.* 5:219-220, 1980.
- LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Purification, partial characterization and serology of blackeye cowpea mosaic virus. *Phytopathol.* 69:1252-1258. 1979.

- LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G.; KITAJIMA, E.W. Isolamento de um potyvirus de plantas de maracujá com sintomas de mosaico. *Fitopatol. bras.* 10:305. 1985. (Res).
- LIMA NETO, V. da C.; LIMA, M.L.R.Z. da C.; SOUZA, V.B.V. de; MACANHAO, T.C.; OHLSON, O.de C.; MALUCELLI N, H. Superbrotamento do maracujazeiro associado a microorganismos do tipo micoplasma em culturas do município de Morretes-PR. *Rev. Set. Cien. Agr.* 5.: 83-86. 1983.
- LIN, N.S.; CHEN, Y.K.; HSU, U.H. Immunological detection of passionfruit woodiness virus. *Botanical Bulletin of Academic Senica.* 30:31-37. 1989.
- LORETO, T.J.G. & VITAL, A. Viroses e micoplasmoses do maracujá em Pernambuco. Informe SERDV, ano IV, 1983. 23p.
- LOVISOLO, O.; MARINHO, V.L.A.; LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. Reações sorológicas do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro ("passionfruit woodiness virus") com outros potyvirus. *Fitopatol. bras.* 11:358. 1986. (Res).
- MAGEE, C.J. Woodiness on mosaic disease of passionfruit. *Agric. Gaz.* 9: 199-208. 1948.
- MANICA, I. *Fruticultura tropical: 1. Maracujá.* São Paulo, Ed. Ceres. 1981. 160p.
- MARINHO, V.L.A. & KITAJIMA, E.W. Um método simplificado de purificação de potyvirus. *Fitopatol. bras.* 14:91-93. 1989.

MARINHO, V.L.A.; LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; CRESTANI, O.A.

Purificação do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro e produção de anti-soros específicos. *Fitopatol. bras.* 9:414. 1984. (Res).

McNIGHT, T. The woodiness virus of the passion vine. *Qd. J. Agric. Sci.* 10:4-35. 1953.

MEDINA, J.C. *Maracujá, da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas, ITAL, 1980. 76p.

MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, I.J.B. Additional evidences that the tristeza virus mutiplies in *Passiflora* species. Conf. IN: *Org. Citrus Virol.*, 6, 1974. *Anais...* 75-78., 1974.

NOBLE, R.J. Some observations on the woodiness disease or bullet disease of passionfruit. *J. Proc. Roy. Soc.* 62:79-98. 1928.

NOBLE, R.J. & NOBLE, N.S. Aphid vectors of the "woodiness" or bullet disease of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) *Proc. Roy. Soc.* 72:293-317. 1938.

OLIVEIRA, C.R.B. *Caracterização do vírus do mosaico do maracujá roxo*. Universidade de Brasília, Brasília, 1986. 54p. (Dissertação, Mestrado)

OLIVEIRA, C.R.B.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, C.L. Caracterização do vírus do mosaico do maracujá roxo. *Fitopatol. bras.*

11:358. 1986. (Res.)

PARES, R.D. MARTIN, A.B.; MORRISON, W. Rhabdovirus like particles in passionfruit. *Aust. Plant Pathol.* 1:51-52. 1983.

PURCIFULL, D.E. & BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) - treated plant viruses and viral inclusions. *Univ. Florida Agric. Exp. Stn. Tech. Bulletin No 788 (Tech)*, 1977. 39p.

RAMOS, W.F. A cultura do maracujá no Est. Sergipe e perspectiva de expansão. IN: Encontro Estadual da Cultura do Maracujá, 2, Lagarto, 1982. *Anais... Aracajú*, 1983. p 8-42.

SCHNEPF, E. & BRANDES, J. Uber ein virus *Passiflora* sp. *Phytopathol. Z.* 433:102-105. 1962.

STACE-SMITH, R. & REMAINE, J.H. Purification and composition of potato virus Y. *Phytopathol.* 60:1785-1789. 1980.

TAYLOR, R.H. & GREBER, R.S. *Passionfruit woodiness virus*. Description of Plant Viruses. no 122. *Commonw Mycolo. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England*. 1973. 4p.

TAYLOR, R.H. & KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses wich cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.). *Aust. J. Agric. Sci.* 15:560-570. 1964.

TEAKLE, D.S., GILL, C.C., TAYLOR, R.H. & RAABE, R.D. Cucumber mosaic virus in *Passiflora* in California. *Plant.*

Dis. 7:677-678. 1963.

TEAKLE, D.S. & WIDERMUTH, G.B. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. *Qd. J. Agric. Anim. Sci.* 24:173-186. 1967.

TORRES FILHO, J. Estudo sobre o controle da bacteriose ou "morte precoce" (*Xanthomonas campestris pv. passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1991. 51p. (Dissertação, Mestrado)

VAN VELSEN, R.J. Chlorotic spot, a virus disease of *Passiflora foetida* in New Guinea. *Papua and New Guinea Agric. J.* 13:160-166. 1961.

VEGA, J. & CHAGAS, C.M. Citopatologia causada por um vírus isolado de maracujá roxo. *Fitopatol. bras.* 8:621. 1983. (Res).

WHITTAKER, D.E. Passion fruit Agronomy, processing and marketing. *Trop. Sci.*, 14:59-77. 1972.