



**Epidemiologia do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e manejo do maracujazeiro-azedo no Vale do Ribeira, São Paulo**

**Leilane Karam Rodrigues**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**INSTITUTO BIOLÓGICO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO**

**Epidemiologia do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e manejo do maracujazeiro-azedo no Vale do Ribeira, São Paulo**

**Leilane Karam Rodrigues**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**São Paulo**  
**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Rodrigues, Leilane Karam.

Epidemiologia do Cowpea aphid-borne mosaic virus e manejo do maracujazeiro-azedo no Vale do Ribeira, São Paulo. / Leilane Karam Rodrigues.

-- São Paulo, 2014.

134 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.  
Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.**

**ma.**

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Marcelo Eiras.

Versão do título para o inglês: Epidemiology of cowpea aphid-borne mosaic virus and passion fruit management in the Vale do Ribeira, São Paulo.

1. Afídeos 2. CABMV 3. Filogenia 4. Passiflora 5. Vetores I. Rodrigues,  
Leilane Karam. II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo)  
IV. Título

*IB/Bibl./2014/006*

---

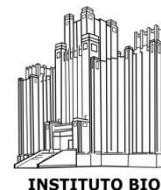


SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS  
AGRONEGÓCIOS

**INSTITUTO BIOLÓGICO**

**Pós-Graduação**

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo - SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Nome do candidato:** Leilane Karam Rodrigues

**Título:** Epidemiologia do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e manejo do maracujazeiro-azedo no Vale do Ribeira, São Paulo

**Orientador(a):** Marcelo Eiras

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a):Alexandre Pio Viana

\*Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a):Claudio Lúcio Costa

\*Instituição:Universidade de Brasília

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a):Marcelo Eiras

\*Instituição: Instituto Biológico

*Aos meus pais, Paulo e Marcia, por me apoiar,  
pelo amor, valores, educação e principalmente  
por sempre estarem ao meu lado.*

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Marcelo Eiras pela oportunidade, orientação, paciência e confiança em mim depositada, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho, além dos ensinamentos, companhia e ajuda nas coletas de campo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves pela paciência, colaboração nas viagens e coletas de campo, pelos ensinamentos de epidemiologia e identificação de afídeos, além de todo o apoio e dedicação.

Ao Dr. Erval Rafael Damatto Junior pela colaboração na execução deste trabalho, desde a disponibilização da área experimental, na APTA Vale do Ribeira, à formação das mudas e condução do pomar, além do auxílio na colheita dos frutos.

Aos membros da Banca de Defesa de Dissertação de Mestrado, Dr. Alexandre Pio Viana, Dr. Cláudio Lúcio Costa, Dr. Erval Rafael Damatto Junior e Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves, pelas correções e excelentes sugestões para melhoria da qualidade desta Dissertação.

À Dra. Lígia Maria Lembo Duarte, pela colaboração nas análises das sequências de nucleotídeos dos isolados de CABMV e ensinamentos de filogenia.

Ao senhor João Batista Sales, técnico de apoio da APTA Vale do Ribeira, por nos ceder, gentilmente, os dados meteorológicos.

À técnica do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, Alyne de Fátima Ramos, pelo auxílio, colaboração, pensamentos positivos e amizade.

A todos os pesquisadores e colegas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia: Maria Amélia Vaz Alexandre, Ligia Maria Lembo Duarte, Alexandre Levi Rodrigues Chaves, Marcelo Eiras, Marcos César Gonçalves, Eliana Borges Rivas, Addolorata Colariccio, Alyne de Fátima Ramos, Danielle Gobatto, Armando Toshikatsu Tomomitsu, Leonardo Assis da Silva, Amanda Canteli, Fernanda Bueno, Renato Brogia Ferreira e Daniel Lima, que colaboraram de forma direta ou indireta neste trabalho, pela excelente convivência, amizade, apoio, ensinamentos, e pelos agradáveis momentos de descontração.

Ao Professor Dr. Ricardo Harakava pela colaboração no sequenciamento das amostras.

À professora Andréa Dantas, pelo apoio, incentivo, pelos conhecimentos na área de fitopatologia e por ter aberto, mais uma vez, as portas da Faculdade Integral Cantareira para a realização das análises físico-químicas dos frutos.

Às estagiárias da professora Andréa Dantas, Denise pupo, Simone Mieko Yamamoto, Carmelia Braz Vieira, Mariana Mathiesen Stival e Janiele Sacramento Freitas que colaboraram nas análises físico-químicas dos frutos.

Ao colega M. Sc. Armando Toshikatsu Tomomitsu pela ajuda nas análises realizadas com o Programa R.

À amiga M. Sc. Danielle Gobatto, que esteve presente desde a faculdade, por ter ajudado nas análises dos frutos, estar na torcida das PCR que insistiam em dar errado e por todos os momentos de descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos do Projeto de Auxílio Regular à Pesquisa (proc. 11/11796-5), coordenado pelo Dr. Marcelo Eiras, que permitiram a realização deste trabalho.

E, finalmente, a todos os amigos e familiares que me apoiaram, incentivaram, e sempre estiveram prontos para ajudar no que fosse necessário.

*No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz bem feito ou não faz.*

*Ayrton Senna.*

RODRIGUES, L.K. **EPIDEMIOLOGIA DO *Cowpea aphid-borne mosaic virus* E MANEJO DO MARACUJAZEIRO-AZEDO NO VALE DO RIBEIRA, SÃO PAULO**. São Paulo-SP. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

O *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, *Potyvirus*) induz o endurecimento dos frutos do maracujazeiro que, atualmente, é a doença mais importante da passicultura. Devido à variabilidade genética do CABMV e a não disponibilidade de genótipos de maracujá-azedo resistentes, o conhecimento da biologia, ecologia e distribuição temporal e espacial da afidofauna torna-se necessário para a adoção de métodos alternativos de controle para o convívio com a doença. Diante disso, objetivou-se conciliar características fitotécnicas (produção de mudas em telados antiafídeos e sua introdução no campo com alturas distintas: 30 cm “mudas baixas” e 80 cm “mudas altas”) e fitossanitários (monitoramento das populações de afídeos vetores, incidência do CABMV e a influência da doença na produção), em um pomar situado no município de Pariquera-Açu (Vale do Ribeira, São Paulo). Foram também caracterizados molecularmente, isolados de CABMV provenientes de diferentes regiões produtoras de maracujá. O levantamento da afidofauna foi realizado utilizando armadilhas amarelas (água e adesiva), durante doze meses. O pomar, formado por 80 plantas (40 mudas altas e 40 mudas baixas), foi avaliado mensalmente por detecção sorológica do CABMV e expressão dos sintomas. A afidofauna foi constituída por 16 espécies, sendo o gênero *Aphis* caracterizado como o mais importante na epidemiologia do CABMV. A detecção do vírus e a expressão dos sintomas foram mais precoces nas plantas provenientes de mudas baixas. O rendimento de polpa, acidez total titulável e °Brix foram significativos em frutos obtidos de mudas altas. Essas observações reforçam a importância da produção de mudas em condições protegidas e formação do pomar utilizando mudas altas e livres do vírus. As análises filogenéticas das porções genômicas da capa proteica e inclusão cilíndrica indicaram uma elevada variabilidade genética dos isolados de CABMV provenientes de pomares de maracujazeiro-azedo de diferentes regiões do estado de São Paulo. Além disso, não foram observados, para os isolados de CABMV analisados, cladogramas definidos por região geográfica ou hospedeiro.

**Palavras chave:** Afídeos; CABMV; Filogenia; Maracujá; Passiflora; Vetores.

RODRIGUES, L.K. **EPIDEMIOLOGY OF *Cowpea aphid-borne mosaic virus* AND PASSION FRUIT MANAGEMENT IN THE VALE DO RIBEIRA, SÃO PAULO**. São Paulo-SP. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

### ABSTRACT

*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, *Potyvirus*) induces mosaic and blistering of leaves and fruit woodiness of passion fruit, and currently is one of the most important disease of this fruit crop in Brazil. The lack of virus resistance in commercial varieties of passion fruit, the importance of knowledge on genetic variability of CABMV, biology, ecology and temporal and spatial distribution of the aphid species are very important for the adoption of alternative control methods for living with the disease. The aims of this work were: (i) to evaluate technical parameters, including passion fruit seedlings production in aphid free conditions, their introduction in the field with different heights (30 cm small seedlings and 80 cm tall seedlings); and (ii) to analyze different plant healthy approaches, by monitoring aphid as vector population, CABMV incidence and influence of the disease on production, in an orchard of passion fruit, located in the municipality of Pariquera-Açu (Vale do Ribeira, State of São Paulo, Brazil). CABMV isolates, from different passion fruit producing regions, were characterized by RT-PCR followed by sequencing and phylogenetic analyses. Aphid populations were monitored using yellow traps (water and adhesive) for twelve months. The orchard, consisting of 80 plants (40 small seedlings and 40 tall seedlings), was monitored monthly by CABMV detection by PTA-ELISA and symptoms expression. The aphid fauna was composed by 16 different species, being the genus *Aphis* the most important in the epidemiology of CABMV. The virus and the expression of symptoms occurred earlier in plants from small seedlings. The pulp yield, titratable acidity and °Brix were significantly higher in fruits obtained from the tallest plants. These observations reinforce the importance of production and development of seedlings in green house, under protected conditions, and the formation of the orchards using virus-free tall seedlings. Phylogenetic analysis of the full-length coat protein (CP) and part of cylindrical inclusion (CI) indicated a high genetic variability of the passion fruit CABMV isolates from different regions of the State of São Paulo, with no defined clades by geographic region or host.

**Keywords:** Aphids; CABMV; Phylogeny; Passion fruit; *Passiflora*; Vectors

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 -Classificação proposta por Heie (1980) das superfamílias Phylloxeroidea e Aphidoidea em famílias, subfamílias, tribos e subtribos. Em azul, estão destacadas as subfamílias e tribos de afídeos com espécies associadas à transmissão de vírus de plantas.....	16
TABELA 2 -Tipos de interações vírus/vetor referentes aos modos de transmissão.....	28
TABELA 3 -Classificação geral (ou <i>status</i> ) das espécies de afídeos de acordo com a combinação dos índices de ocorrência e dominância.....	41
TABELA 4 -Classificação dos coeficientes de correlações.....	43
TABELA 5 -Listagem dos isolados de CABMV de maracujá-azedo, coletados em diferentes regiões produtoras de maracujá, região do genoma sequenciado e códigos das sequências depositadas no <i>GenBank</i> .....	46
TABELA 6 -Iniciadores utilizados como <i>primers</i> nas reações de RT-PCR.....	47
TABELA 7 -Isolados de <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) utilizados nas análises filogenéticas, os códigos de acesso no <i>GenBank</i> , a região do genoma analisada e a origem.....	49
TABELA 8 -Classificação geral (ou <i>status</i> ) das espécies de afídeos capturadas.....	54
TABELA 9 -Classificação geral de cada espécie relacionada com o coeficiente de <i>Pearson</i> para dois parâmetros (temperatura e pluviosidade) e os valores referentes a cada espécie.....	55
TABELA 10 - <i>Ranking</i> das espécies de afídeos de acordo com as estações do ano, e anualmente.....	58
TABELA 11 -Resultado da análise estatística pelo teste F da ANOVA das características rendimento de polpa e físico-químicos, acidez total titulável, sólidos solúveis totais (°Brix) e pH.....	71

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -Sistemas de condução recomendados para a cultura do maracujá: caramanchão (A) e espaldeira vertical (B).....8
- FIGURA 2 -Representação esquemática da organização genômica das espécies do gênero *Potyvirus*. Nos retângulos estão indicadas as diferentes proteínas resultantes da clivagem da poliproteína, após sua tradução. No terminal 5' da molécula de RNA está representada a proteína estrutural VPg e no terminal 3', a cauda de poliadenilação (An).....11
- FIGURA 3 - Sintomas induzidos pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em folhas e frutos de maracujá-azedo (*Passiflora edulis*). (A e B) Folha de maracujá-azedo apresentando sintomas de bolhas e mosaico; (C) foto de fruto sadio (1) e fruto deformado com tamanho e peso reduzidos (2). Amostras coletadas no pomar avaliado neste trabalho, no município de Pariquera-Açu, SP.....12
- FIGURA 4 -Sintomas induzidos pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), isolado proveniente do município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP, após inoculação mecânica em plantas indicadoras: A) folha de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) com mosaico e bolhas; B) folha de *C. ensiformis* com mosaico; e C) folha de *Chenopodium amaranticolor* com lesões necróticas locais.....13
- FIGURA 5 -Representação da morfologia externa típica dos insetos, ilustrada por um afídeo áptero (à esquerda) e alado (à direita).....17
- FIGURA 6 -Representação esquemática da morfologia de um afídeo alado com destaque para algumas das partes mais utilizadas para a identificação em nível de espécie. Nos retângulos coloridos estão representadas parte dos exemplos das características de algumas formas de cauda e suas cerdas, antena, asa, sífúnculo, inserção de antenas (frente da cabeça) e esclerotização.....18
- FIGURA 7 -Desenho esquemático de um corte longitudinal do corpo de um afídeo com os principais órgãos dos sistemas alimentar e digestório.....20
- FIGURA 8 -Ilustração dos modos de transmissão de vírus por afídeos de modo circulativo não propagativo e circulativo propagativo. Em ambos os modos de transmissão ocorre, inicialmente, a ligação do vírion à parede do intestino, provavelmente, por meio de receptores presentes nas membranas das células intestinais. Após o reconhecimento, a partícula viral poderá ultrapassar a primeira barreira do interior do inseto. A segunda barreira a ser ultrapassada é da célula do intestino para a hemolinfa, a qual terá a função de transportar esses vírions ou,

- no caso do modo propagativo, o material genético, até a glândula salivar. Os virions ao chegarem no canal salivar serão transmitidos para uma nova planta através do processo de alimentação/salivação.....24
- FIGURA 9 -Representação esquemática simplificada do modo de transmissão semipersistente do *Citrus tristeza virus* (CTV) mostrando a localização do cibário (lado esquerdo) e da ligação provável que deve ocorrer entre a partícula viral, por meio da proteína CPm, e o provável receptor presente na cutícula do cibário (lado direito).....25
- FIGURA 10 -Desenho esquemático de um corte longitudinal da porção anterior do estilete de um afídeo e as interações e estratégias envolvidas na transmissão não circulativa, indicando as diferentes proteínas (estruturais e não estruturais) dos vírus e os prováveis receptores localizados na parede do estilete dos afídeos. A estratégia auxiliar (*helper*) está ilustrada com os *Caulimovirus* (proteínas auxiliares P2 e P3) e *Potyvirus* (proteína auxiliar HC-Pro), enquanto que a estratégia de transmissão capsial (Cap) é exemplificada com os *Cucumovirus*. \*Apesar da adesão na ponta do estilete, o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimovirus*) é transmitido de modo semi-persistente.....27
- FIGURA 11 -À esquerda, no mapa do estado de São Paulo, observa-se a localização do município de Pariquera-Açu em relação ao município de São Paulo. A barra representa a escala para o mapa do Estado de São Paulo, em quilômetros. À direita, na foto aérea da Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), município de Pariquera-Açu, foi delimitada em linha tracejada de amarelo a área correspondente aos limites da fazenda, e em vermelho a localização do campo experimental onde foi implantado o pomar de maracujá-azedo.....33
- FIGURA 12 -(A) Estufa protegida com tela antiafídeos, instalada no interior de uma casa de vegetação, onde foram produzidas as mudas de maracujá-azedo variedade 'Sul Brasil', localizada na Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Pariquera-Açu, SP. (B) Mudanças altas (80 cm) e baixas (30 cm) prontas para serem levadas ao campo.....35
- FIGURA 13 -Croqui (fora de escala) da área experimental, indicando a localização do pomar de maracujá-azedo 'Sul Brasil' com as mudas baixas à esquerda (azul), e mudas altas à direita (laranja), além do posicionamento das armadilhas utilizadas para a captura dos afídeos.....36

FIGURA 14 -Estação meteorológica, localizada na Fazenda Experimental APTA-Polo Regional Vale do Ribeira.....	37
FIGURA 15 -Armadilhas amarelas utilizadas para captura de afídeos alados. Do lado esquerdo, armadilhas de água de <i>Moericke</i> e à direita armadilha amarela adesiva, ambas foram instaladas no pomar de maracujá-azedo e também na mata próxima ao experimento.....	39
FIGURA 16 -Mapa do Brasil com destaque para os estados de São Paulo (vermelho), Paraná (azul), Goiás (roxo) e Distrito Federal (amarelo) e a localização de cada cidade nos seus respectivos estados de onde foram sequenciados isolados de CABMV de maracujazeiro no presente trabalho.....	46
FIGURA 17 -Organização do genoma do CABMV com a localização das regiões de anelamento dos primers: da capa proteica – CP (Oligo dT-50-PacIM10; S primer e M10-rev) que permitem a amplificação de fragmentos de DNA de 1500 pares de bases; e da inclusão citoplasmática cilíndrica – CI (CIFor e CIRev), que permitem a amplificação de fragmentos de 700 pares de bases.....	48
FIGURA 18 -Croqui representativo (sem escala) da distribuição das repetições de cada tratamento dentro do pomar experimental de maracujá-azedo, para avaliação dos parâmetros físico-químicos e rendimento de frutos.....	50
FIGURA 19 Correlação entre o total de espécimes capturadas no período e as respectivas temperaturas médias e pluviosidade total mensal.....	52
FIGURA 20 -Porcentagem total de espécies de afídeos em cada classificação (comum, intermediária e rara) e a porcentagem correspondente a cada espécie de acordo com sua classificação geral.....	53
FIGURA 21 -Análise temporal e espacial da incidência e dispersão do CABMV no pomar avaliado, formado por plantas de maracujá-azedo ‘Sul Brasil’, oriundas de mudas altas e baixas, no município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP, no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.....	60
FIGURA 22 -Incidência do CABMV, traduzida em porcentagem de plantas infectadas, confirmado por PTA-ELISA, no pomar de maracujá-azedo ‘Sul Brasil’ formado por mudas baixas e altas, e a evolução do aparecimento dos sintomas ao longo do período avaliado, de novembro de 2012 a dezembro de 2013.....	63
FIGURA 23 -Dendrograma obtido a partir do índice de <i>Jaccard</i> evidenciando a tendência de dois agrupamentos de espécies de afídeos na cultura do maracujá no município de Pariquera-Açu (Vale do Ribeira/ SP).....	65

- FIGURA 24 Resultados das ampliações de DNA via RT-PCR dos isolados de CABMV, visualizados em géis de agarose 1,5%, apresentando os fragmentos de DNA de tamanho esperado de 1500 pb (capa proteica) e 700 pb (inclusão citoplasmática cilíndrica). M e M' - marcador de DNA 1Kb ladder (NORGEN®); Gel A: 1- Taubaté-SP, 2- Bauru-SP, 3- Monte Alegre do Sul-SP, 4- Adamantina-SP, 5- Controle positivo (*Turnip mosaic virus* - TuMV), 6- Controle negativo, 7- Jacupiranga-SP, 8- Fernão-SP, 9- Campinas-SP, 10- Garça-SP, 11- Alvinlândia-SP, 12- Ibiti-PR, 13- São José da Boa Vista-PR e 14- Urutaí-GO. Gel B: 1'- Controle positivo (TuMV), 2'- controle negativo, 3'- Urutaí-GO, 4'- Campinas-SP, 5'- Jacupiranga-SP, 6'- Monte Alegre do Sul-SP, 7'- Garça-SP, 8'- Fernão-SP, 9'- Planaltina-DF, 10'- Alvinlândia-SP, 11'- São José da Boa Vista-PR, 12'- Adamantina-SP.....66
- FIGURA 25 -Árvores filogenéticas obtidas da análise de sequências completas de nucleotídeos da capa proteica (CP) de diferentes isolados de CABMV. À esquerda, árvore de máxima parcimônia (MP), e à direita, árvore de máxima verossimilhança (MV). Sequências obtidas do *GenBank* estão indicadas em preto; em vermelho estão representados os isolados sequenciados no presente trabalho. Os códigos de acesso no *GenBank* estão indicados entre parênteses.....68
- FIGURA 26 Árvores filogenéticas obtidas da análise de sequências parciais de nucleotídeos da porção genômica correspondente à inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) de diferentes isolados de CABMV. À esquerda, árvore de máxima parcimônia (MP) e à direita árvore de máxima verossimilhança (MV). Sequências obtidas do *GenBank* apresentam cor preta; em vermelho estão representados os isolados sequenciados no presente trabalho. Os códigos de acesso no *GenBank* estão indicados entre parênteses.....69
- FIGURA 27 -Resultado da amplificação via RT-PCR, visualizada em gel de agarose 1,5%, de fragmentos de DNA com cerca de 700 pb da porção genômica correspondente à inclusão citoplasmática cilíndrica (CI), do isolado de CABMV proveniente de Pariqueira-Açu, Vale do Ribeira, SP. M- marcador 1 Kb DNA ladder (NORGEN®).....70

**ANEXOS**

ANEXO A - Gráficos de temperatura e pluviosidade de cada espécie de afídeo quando submetidas ao coeficiente de <i>Pearson</i> .....	108
ANEXO B - Índice de Jaccard utilizando o programa R e matriz desenhada para utilização no cálculo, onde o número 1 corresponde à espécie presente e 0 corresponde à espécie ausente no campo.....	112
ANEXO C - Dados de temperatura (média de cada 5 dias) e pluviosidade (média de cada cinco dias) das quatro estações do ano de 2013, obtidos na estação meteorológica da APTA-Pariquera Açu, Vale do Ribeira, SP.....	113

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>XV</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1.Histórico do desenvolvimento do cultivo do maracujá no Brasil.....	4
2.2.O Maracujá: características gerais, classificação botânica e origem.....	5
2.3.Obtenção de mudas e sistema de produção do maracujazeiro.....	7
2.4. <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV), o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM).....	9
2.5.Transmissão e disseminação de vírus de plantas.....	14
2.5.1.Afídeos: biologia, origem e papel na transmissão de vírus de plantas.....	15
2.5.2.Classificação dos modos de transmissão.....	21
2.5.2.1.Transmissão circulativa.....	22
2.5.2.2.Transmissão não circulativa.....	24
2.6.Aspectos da interação CABMV/afídeos/ambiente.....	29
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1.Localização da área experimental.....	33
4.2.Produção e indexação fitossanitária de mudas de maracujá-azedo para implantação do pomar experimental.....	34
4.3.Implantação do pomar .....	35
4.4..Compilação dos registros climáticos .....	36
4.5..Determinação da incidência do CABMV na área monitorada.....	37
4.6..Amostragem das plantas.....	37
4.7..Amostragem de afídeos alados.....	38
4.8. Identificação das espécies de afídeos alados capturados em armadilhas de <i>Moericke</i> .....	40
4.9.Análise descritiva da afidofauna alada identificada na área monitorada.....	40
4.10.Índice de Jaccard.....	42
4.11.Correlação de Pearson.....	42
4.12.Identificação e caracterização dos isolados de CABMV.....	43
4.12.1.Coleta e preservação das amostras de folhas de maracujá infectadas.....	43

4.12.2. Transmissão mecânica.....	44
4.12.3. Análises sorológicas.....	44
4.12.3.1. Adsorção de antissoro.....	44
4.12.3.2. <i>Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA)</i> .....	44
4.12.4. Análises moleculares.....	45
4.12.4.1. Extração de RNA.....	45
4.12.4.2. RT-PCR ( <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> ).....	47
4.12.4.3. Sequenciamento automático de DNA.....	48
4.12.4.4. Análises das sequências de DNA e filogenia.....	48
4.12.4.5. Análises de recombinação.....	49
4.12.5. Análises das características físico-químicos dos frutos produzidos das plantas oriundas de mudas altas e baixas.....	50
4.12.5.1. Acidez total titulável (ATT).....	51
4.12.5.2. Determinação do pH e sólidos solúveis totais (SST).....	51
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1. Incidência e classificação das espécies de afídeos.....	52
5.2. Incidência e análise mensal do CABMV e sua relação com a afidofauna vetora.....	58
5.3. RT-PCR, sequenciamento, análises das sequências e filogenia.....	66
5.4. Análises físico-químicas dos frutos e rendimento dos pomares.....	70
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. Introdução

O Brasil se destaca na produção de uma ampla gama de espécies frutíferas que abastecem o mercado durante o ano todo, proporcionando uma considerável rentabilidade em áreas relativamente pequenas, o que torna a fruticultura um dos investimentos mais atrativos do país (NASCIMENTO, 2003). O Brasil tem se consolidado, há décadas, como o terceiro maior produtor mundial de frutas, sendo este mercado liderado pela Índia e China, respectivamente (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2008; PERUCH et al., 2009). Estes países, juntamente com o Brasil, respondem por 42,3% da produção mundial de frutas cujo destino final é abastecer principalmente o mercado interno (CARVALHO; MIRANDA, 2009). Dentre as espécies frutíferas produzidas no Brasil, merece destaque o maracujazeiro (*Passiflora* sp.) que, em quantidade produzida (toneladas) e valor de produção (reais), ocupa a sétima posição sendo superado pelas culturas da laranja, banana, uva, mamão, maçã e manga (CARVALHO; MIRANDA, 2009).

O maracujá tem seu centro de origem na América Tropical. Pertence à família Passifloraceae, gênero *Passiflora*, com aproximadamente 500 espécies descritas, sendo a maioria originária do Brasil, com cerca de 120 espécies endêmicas relatadas (SOUZA; MELETTI, 1997; GANGA, 2004). Quanto à produção brasileira, a cultura do maracujá passou de 259.000 toneladas, em 1989, para 713.000 toneladas, em 2009, sendo que a área plantada praticamente dobrou neste mesmo período (AGRIANUAL, 2013).

Atualmente, o Brasil se destaca como maior produtor mundial de maracujá, apresentando aproximadamente 62 mil hectares de área cultivada e produção média anual de 920 mil toneladas (IBGE, 2013).

Mesmo tendo grande destaque econômico, a produção do maracujá ainda é limitada em nossas condições, devido, principalmente, à constatação de várias doenças de diferentes etiologias nos pomares. Dentre as doenças de importância estão as induzidas por vírus, sendo o endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM) a principal virose da cultura (COLARICCIO et al., 1987; CHAGAS, 1991; CHAGAS; COLARICCIO, 2006; ANJOS et al., 2001). O EFM pode ser atribuído a duas espécies de vírus: o *Passion fruit woodiness virus* (PWV) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), ambos pertencentes ao gênero *Potyvirus* (*Potyviridae*). O PWV foi originalmente descrito na Austrália como sendo o único vírus capaz de induzir o sintoma de endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Porém, na década de 1990, um isolado de *Potyvirus*, com propriedades biológicas semelhantes e moleculares divergentes ao PWV foi descrito causando endurecimento dos frutos de maracujá na África do Sul, sendo denominado South African passiflora virus (SAPV) (BRAND et al., 1993). Posteriormente, por meio de análises comparativas das

sequências de nucleotídeos da capa proteica confirmou-se que o SAPV se tratava de um isolado do CABMV capaz de infectar o maracujazeiro (McKERN et al., 1994).

No Brasil, a primeira descrição do EFM ocorreu na década de 1970, no estado da Bahia, causando quebra de produção nos cultivos de maracujá destinados à indústria de suco (YAMASHIRO et al., 1979). Na ocasião, por meio de técnicas biológicas, sorológicas e microscopia eletrônica, identificou-se o PWV como o agente etiológico do EFM (CHAGAS et al., 1981). Nesse período, o EFM foi relatado nos principais estados produtores de maracujá: Ceará (LIMA et al., 1985), Pernambuco (LORETO; VITAL, 1983), Sergipe (KITAJIMA et al. 1986), São Paulo (CHAGAS et al., 1992), Minas Gerais (SÃO JOSÉ et al., 1994), Goiás, Distrito Federal (INOUE et al., 1995), Pará (TRINDADE et al., 1999), Santa Catarina (COLARICCIO et al., 2008) e Mato Grosso do Sul (STANGARLIN et al., 2011). Entretanto, somente em 2004, a partir das análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da capa proteica, concluiu-se que os isolados brasileiros, identificados inicialmente como PWV, eram pertencentes à espécie CABMV (NASCIMENTO et al., 2004; 2006).

Além do PWV e CABMV, o *East Asian Passiflora virus* (EAPV) também está associado ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro (SHUKLA et al., 1994; TAYLOR; GREBER, 1973; IMAI et al., 1996; ADAMS et al., 2012). Estas três espécies são classificadas como *Potyvirus*, maior gênero da família *Potyviridae*, com mais de 146 espécies definitivas descritas (ADAMS et al., 2012). O CABMV já foi descrito em todas as variedades comerciais de maracujazeiro disponíveis, causando durante o desenvolvimento inicial das plantas sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar. Durante o período de produção, além da redução do porte das plantas, constatam-se o endurecimento dos frutos que apresentam ainda redução do tamanho, espessamento do pericarpo, baixo rendimento de polpa e número reduzido de sementes (PERUCH et al., 2009). Isolados do CABMV podem infectar também uma ampla gama de espécies de Fabaceae (SILVA et al., 2012). O vírus pode ser transmitido experimentalmente por inoculação mecânica para mais de 60 espécies de Amaranthaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Passifloraceae e Solanaceae (BASHIR et al., 2002). O vírus pode também ser transmitido por enxertia e pelo uso de ferramentas de corte (ZERBINI; MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

Dentre os afídeos descritos que transmitem e disseminam o CABMV merecem destaque as espécies: *Aphis craccivora* (Bock), *Aphis fabae* (Scopoli), *Aphis gossypii* (Glover), *Myzus persicae* (Sulzer), *Myzus nicotianae* (Blackman), *Toxoptera citricidus* (Kilkaldy), *Uroleucon ambrosiae* (Thomas) e *Uroleucon sonchi* (L.) (COSTA et al., 1995; INOUE et al., 1995). Entretanto, de acordo com levantamento realizado no Brasil, nenhuma destas espécies coloniza plantas de maracujá (SOUZA-SILVA; ILHARCO, 1995). Devido ao número considerável de espécies envolvidas na transmissão, e consequente eficiência na

disseminação, a incidência de CABMV tem sido elevada em cultivos de maracujá brasileiro, ocasionando perda do vigor das plantas e refletindo diretamente na diminuição do ciclo produtivo, tornando necessária a renovação anual dos pomares na tentativa de minimizar as perdas (NARITA, 2007).

Como manejo alternativo, diante da indisponibilidade de variedades resistentes no mercado, para diminuir a suscetibilidade das plantas de maracujá ao CABMV, recomenda-se a produção de mudas em condições protegidas com tela antiafídeos, e a introdução de mudas em estágio fenológico avançado no campo (MELETTI et al., 2010; 2011). Esta recomendação é baseada no fato de que, no Brasil, são descritas 115 espécies de afídeos, o que constitui apenas 2,8% da afidofauna mundialmente catalogada, tendo como agravante que a maioria delas apresenta hábito polífago (SOUSA-SILVA; ILHARCO, 1995). Aliada a esta condição, a habilidade de interação com os hospedeiros e reprodução partenogenética tornam os afídeos eficientes vetores de vírus, principalmente as espécies de *Potyvirus* que são transmitidos de maneira não persistente, ou seja, durante as picadas de prova (HARRIS et al., 2001). Além disso, a colonização da planta hospedeira não é essencial para a transmissão dos vírus de modo não persistente (COSTA, 1998). Devido à não obrigatoriedade da especificidade de espécies de afídeos para a transmissão, a polifagia e considerando que as etapas de aquisição e inoculação do CABMV ocorrem em segundos/minutos, o entendimento das interações vírus/hospedeiro/vetor/ambiente constitui um dos principais fatores a se considerar para se propor um manejo adequado. Vale lembrar que o controle da afidofauna por meio da aplicação de inseticidas não é eficiente para deter a disseminação dos vírus transmitidos de modo não persistente (SHUKLA et al., 1994).

Portanto, este trabalho teve como objetivo principal: avaliar o emprego de mudas de maracujá-azedo 'Sul Brasil', desenvolvidas livres de vírus (em telados antiafídeos) e levadas ao campo com 30 cm e 80 cm de altura, para a formação de um pomar, sendo avaliados diferentes características fitotécnicas e fitossanitárias, incluindo o monitoramento das populações de afídeos vetores, incidência do CABMV e a influência da doença do endurecimento dos frutos na produção. O emprego dessas tecnologias, consideradas de baixo custo, pode ser uma garantia para o incremento do rendimento da produção de maracujá e da renda do pequeno produtor do Vale do Ribeira. Além disso, os objetivos específicos desta dissertação consistiram do: (i) Monitoramento da afidofauna para identificar potenciais vetores do CABMV em um pomar de maracujá-azedo variedade 'Sul-Brasil' em campo experimental no município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP; (ii) Avaliação da resposta da variedade de maracujazeiro 'Sul-Brasil' frente ao CABMV e sua associação com a afidofauna vetora; (iii) Caracterização molecular de diferentes isolados do CABMV provenientes das principais regiões produtoras de maracujá do Estado de São Paulo.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Histórico do desenvolvimento do cultivo do maracujá no Brasil

O cultivo de maracujá, no Brasil, foi introduzido na década de 1960, em terras paulistas. Inicialmente, a cultura se instalou na região de Bebedouro e se expandiu para Votuporanga, firmando-se na década de 1980 no Vale do Ribeira, que chegou a responder, na época, por mais da metade da produção do estado de São Paulo (GONÇALVES; SOUZA, 2006). No ano de 1975, os estados da Bahia e Minas Gerais passaram a responder por 55% da produção. Já em 1993, a cultura se expandiu por várias regiões do Brasil e os principais estados produtores eram Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro e Sergipe (NASCIMENTO et al., 2006). Porém, o Brasil, até a década de 1970, ainda não figurava entre os principais países produtores de maracujá, devido à falta de demanda do mercado consumidor, inexistência de ciclos de produção definidos e restrição das áreas cultivadas. A cultura somente se consolidou economicamente a partir de 1986, com a ampliação significativa da área cultivada e utilização de mão de obra qualificada (RIZZI et al., 1998).

Segundo Ruggerio (1987), nos primeiros anos de cultivo intensivo, a maioria dos produtores de maracujá eram cafeicultores que utilizavam áreas ociosas com o intuito de obter uma complementação de renda. Porém, foi na agricultura familiar que o cultivo do maracujá se firmou como uma opção economicamente viável e responsável pela sua difusão em diversas regiões do país. Devido à expansão do cultivo do maracujá, no período de 1990 a 1996, constatou-se um aumento de 75% da área cultivada, refletindo na produção de frutos, que passou de 25 mil toneladas, em 1990, para 44 mil toneladas, em 1996 (MELETTI, 2011). A década de 1990, foi marcada pelo início da transformação do hábito de consumo do mercado interno de maracujá no Brasil, uma vez que, anteriormente a este período, 30% da produção era destinada ao consumo *in natura* e 70% para a indústria de suco. Já na década de 2000, 50% da produção passou a ser destinada para o consumo *in natura*. Em levantamentos realizados em 2006, verificou-se que 60% da produção era destinada ao consumo de fruta fresca e 40% para o processamento de suco e outros derivados (FERRAZ; LOT, 2006). Diante desta transformação, a produção de maracujá-azedo, passou a ter importante destaque na fruticultura brasileira, mesmo quando comparado com outras espécies de frutíferas tropicais que apresentam maior tradição de consumo (GONÇALVES; SOUZA, 2006). Na última década, o cultivo do maracujá se tornou uma oportunidade de capitalização a curto prazo, e neste contexto, a produção brasileira

passou de 409 mil toneladas, em 1996, para a 713 mil toneladas em 2001, graças aos avanços tecnológicos, que elevaram a produtividade em todas as regiões produtoras (IBGE, 2013).

A partir da década de 1990, diversos autores relataram mudanças significativas na distribuição geográfica dos pomares, bem como na redução da área cultivada, como observado em São Paulo, devido à incidência de doenças, principalmente as de etiologia viral (GONÇALVES; SOUZA, 2006). Este panorama ocorreu devido às agroindústrias de sucos que se fixaram em diversos estados, estimulando ainda mais a monocultura intensiva do maracujá. A utilização de novas tecnologias permitiu a adoção de técnicas de produção mais adequadas, como o emprego de cultivares e híbridos com elevada produtividade como os lançados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (MELETTI, 1999) e EMBRAPA (EMBRAPA, 2008). A esta característica soma-se também a qualidade de mudas levadas ao campo para a formação dos pomares (MELETTI, 2011).

Atualmente, o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de maracujá, sendo as regiões Nordeste, Sudeste e Norte responsáveis por 94% da produção nacional, com áreas de produção estimadas em 37.037, 6.146 e 4.590 hectares, respectivamente. O estado da Bahia consolida-se como o maior produtor nacional, seguido pelo Ceará, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Sergipe (NOVAES, 2002; PERUCH et al., 2009; IBGE, 2013). Enquanto a produção de maracujá atende à demanda do mercado interno, constata-se que a exportação ainda é pequena, ocorrendo em baixa escala na forma de fruta *in natura*, atendendo principalmente a comercialização de suco concentrado. A porcentagem de fruta fresca destinada à exportação está restrita a 1,5% do total produzido, pois o mercado interno consome quase que a totalidade da produção. Já o suco concentrado representa 76% do total da produção comercializada, sendo exportado para a Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha (MELETTI, 2011).

## **2.2. O Maracujá: características gerais, classificação botânica e origem**

O maracujá foi, provavelmente, o primeiro fruto silvestre nativo relatado nas Américas. Sua denominação, em Tupi, significa “alimento em forma de cuia” (MELETTI, 2000). Porém, é conhecido mundialmente como fruto da paixão, por sua flor representar, simbolicamente, os principais eventos relacionados à paixão de Cristo (REITTER, 1998). Acredita-se que ancestrais do gênero *Passiflora* tenham se originado na África, se dispersado para Europa e Ásia e se diversificado a partir de sua chegada à América Central (MUSCHNER et al., 2012).

O maracujazeiro (*Passiflora* spp.) pertence à ordem Passiflorales, família Passifloraceae, com 18 gêneros descritos (CUNHA et al., 2004). O gênero *Passiflora* tem seu centro de origem na América Tropical. Passifloraceae está dividida em duas tribos *Paropsieae* e *Passiflorieae*. A tribo *Passiflorieae* é originária do continente latino-americano e representada pelos gêneros *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L., sendo este último o mais importante economicamente, devido à sua diversidade: 23 subgêneros e 530 espécies descritas (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007). O Brasil é o centro de origem da maioria das espécies de *Passiflora*, com aproximadamente 140 espécies endêmicas (CERVI, 2005; BERNACCI et al., 2013). Estima-se que cerca de 50 espécies de Passifloraceae possuem frutas comestíveis (BRUCKNER; OTONI, 1999), sendo que as espécies comerciais mais produzidas são: *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo), *P. edulis* f. *edulis* Sims (maracujá-roxo), *P. alata* Dryand (maracujá-doce), *P. ligularis* Juss. (Granadilla) e *P. quadrangulares* (L.) (maracujá-açu) (CERVI, 2005; SÃO JOSÉ, 1994; SOUZA; MELETTI, 1999; BERNACCI et al., 2008).

Morfologicamente o maracujazeiro é descrito como uma planta trepadeira, perene, sublenhosa, pois apresenta caule lenhoso na base e herbáceo no ápice, de crescimento rápido e contínuo, frutificação precoce podendo atingir de 5 a 10 metros de comprimento (RUGGIERO et al., 1996). Possui sistema radicular pivotante, pouco profundo com maior número de raízes entre as 0,30 e 0,45m de profundidade e raio de 0,60m (MEDINA et al., 1980; MANICA, 1981; CUNHA et al., 2004). A reprodução depende de polinização cruzada, pois suas flores apresentam diferentes graus de autoincompatibilidade, sendo realizada de forma eficiente por abelhas mamangavas (*Xylocopa* spp.) (BENEVIDES et al., 2009, SIQUEIRA et al., 2009).

O maracujazeiro se desenvolve bem em clima quente e úmido, em altitudes de 100 a 900 m, característico de regiões tropicais e subtropicais, onde os principais fatores climáticos para seu desenvolvimento são temperatura (média 23° a 25°C), precipitação (800 a 1.750 mm distribuídas durante o ano), umidade relativa (em torno de 60%) e alta luminosidade (comprimento do dia acima de 11 horas diárias) (LIMA; BORGES, 2002). Esses fatores favorecem tanto a longevidade, rendimento do maracujazeiro como também o ataque de pragas e doenças (CUNHA et al., 2004).

A utilização do maracujá é bem variada podendo ser empregado para fins alimentícios (frutos), ornamental (flores) e farmacológico (folhas). O fruto é rico em cálcio, fósforo, vitaminas A e C, além de apresentar em menores proporções fibras, proteínas e outros minerais. Nas folhas, raízes e sementes encontram-se os princípios farmacológicos como a passiflorina, calmodilase e maracugina. Uma série de propriedades medicinais pode ser listada pelo conhecimento popular, mas ainda não estão comprovados cientificamente, podendo-se citar: tratamento para ansiedade, depressão, epilepsia, hemorroidas, histeria,

inflamações na pele, insônia, perturbações da menopausa, pressão alta, reumatismo e tensão nervosa (BORGUINI et al., 2008; TOMOMITSU et al., 2014).

Na produção de sucos concentrados os resíduos como cascas e sementes podem ser utilizados na fabricação de ração animal, óleo e pectina. A casca pode ser utilizada na fabricação de compotas e farinha (rica em fibras dietéticas) (BORGUINI et al., 2008). De acordo com Ferrari et al. (2004), o óleo extraído da casca do maracujá pode ser utilizado na alimentação animal e humana, na indústria de cosméticos, produção de tintas e sabão, devido às suas características físico-químicas, composição e elevado teor de ácidos graxos insaturados. A casca é rica em pectina, cuja forma sintética é usada na indústria de alimentos para dar firmeza a doces e geleias, ela também possui nicina, fonte de vitamina B3 que atua na produção de hormônios do crescimento e na prevenção de problemas gastrointestinais, além de ferro, cálcio, fósforo e sódio. Estas propriedades despertaram o interesse para a elaboração de produtos naturais que auxiliam no controle da glicemia. As sementes, por sua vez, podem ser utilizadas para a fabricação de óleos essenciais para a indústria alimentícia e de cosméticos (BORGUINI et al., 2008).

Entre as frutíferas comercializadas, o maracujá é considerado uma boa opção de cultivo por oferecer imediato retorno financeiro, devido ao seu rápido ciclo produtivo. Porém, é uma cultura que requer uso intenso de mão de obra e que demanda elevado custo de implantação, principalmente devido à necessidade da aquisição de mourões, arame e insumos. O maracujá geralmente é cultivado em pequenas propriedades, pomares de 3 a 5 hectares, que favorecem a fixação de mão de obra rural devido ao elevado nível de empregabilidade exigida pela necessidade de tratamentos culturais intensivos, conferindo forte caráter sócio cultural. Cada hectare de maracujá pode gerar de 3 a 4 empregos diretos (MELETTI, 2011).

### **2.3. Obtenção de mudas e sistema de produção do maracujazeiro**

A propagação de mudas de maracujazeiro é feita em escala comercial por sementes, mas também podem ser obtidas por estaquia e enxertia. Com a ocorrência generalizada da doença do “endurecimento dos frutos do maracujazeiro” (EFM), induzida pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), as mudas devem ser produzidas em viveiros revestidos com telado antiafídeos, localizados em áreas distantes de pomares comerciais, com o objetivo de isolar as mudas, evitando que as plantas adultas possam atuar como fonte de inoculo do vírus. O uso exclusivo de ferramentas de poda e desbaste e sua desinfecção

rotineira para a realização dos tratos culturais também é uma medida profilática necessária para evitar a disseminação do CABMV (OLIVEIRA et al., 2002; MELETTI, 2003).

As mudas devem ser produzidas em sacos plásticos pretos furados, com dimensão de 14x28 cm, que favorece o desenvolvimento das raízes sem que haja enovelamento. Para cada saco preto são depositadas de uma a duas sementes a uma profundidade máxima de 0,5 cm (MELETTI, 2011). As mudas se encontram aptas para o plantio no campo a partir do surgimento da primeira gavinha, 45 a 60 dias após a semeadura. Para áreas cuja incidência do CABMV é elevada, recomenda-se o atraso do plantio, introduzindo mudas mais desenvolvidas com folhas coriáceas e com maior deposição superficial de cera, as quais apresentarão, provavelmente, maior tolerância e resistência física às picadas de prova dos afídeos. Assim, a recomendação de manejo fitossanitário da cultura do maracujá para o Estado de São Paulo preconiza que as mudas sejam transplantadas com cerca de 50 cm de altura e 60 a 80 dias de idade (ABREU, 2008), chegando até a recomendação de 80 cm (NARITA, 2007).

O espaçamento da cultura é variável de acordo com as características da propriedade. Nas propriedades em que se utiliza de mecanização o espaçamento entre linhas varia de 3,0 a 4,0 metros. Naquelas em que o cultivo é manual, esse espaçamento pode ser reduzido para até 2,5 metros. Entretanto, o espaçamento recomendado entre plantas é de, 5,0 metros. Os sistemas de condução que têm obtido os melhores resultados são espaldeira vertical, com um único fio de arame, e o sistema de caramanchão (FIGURA 1) (ABREU, 2008).

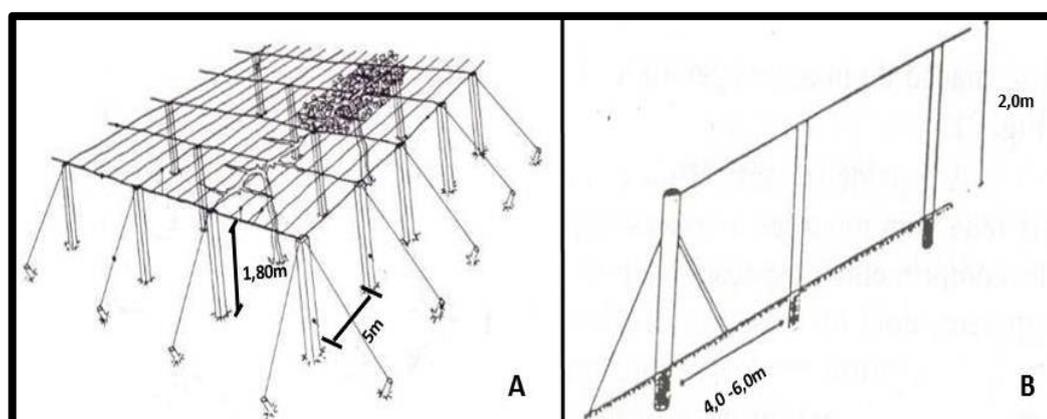


FIGURA 1: Sistemas de condução recomendados para a cultura do maracujá: caramanchão (A) e espaldeira vertical (B).

O maracujazeiro é uma planta alógama. A floração ocorrerá somente em condições de no mínimo 11 horas de luz, sendo que as flores abrirão por volta das 12 horas e fecharão à noite, e cada flor abrirá uma única vez. As flores do maracujá-azedo são hermafroditas e autoincompatíveis, sendo que o pólen produzido em determinada flor não poderá fecundá-la, e tampouco fecundar, de forma eficaz, as demais flores produzidas pela mesma planta (JUNQUEIRA et al., 2001). Em campo aberto, a polinização natural das flores do maracujazeiro é feita principalmente por mamangavas (*Xylocopa* spp.), mas pode ser também realizada pelo homem (polinização artificial) (BENVIDES et al., 2009).

A planta somente produzirá frutos se a polinização for cruzada, sendo que uma polinização realizada de forma não adequada resultará na produção de frutos de baixa qualidade e parcialmente vazios (MELETTI, 2011). A colheita é feita após 55 dias da abertura da flor, antes dos frutos caírem no chão. Quando colhidos no chão, além de terem sua qualidade comprometida, os frutos murcharão rapidamente, diminuindo seu tempo de prateleira. Em climas quentes a colheita do maracujá é ininterrupta durante 9 ou 10 meses (ABREU, 2008).

#### **2.4. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM)**

Mesmo tendo grande destaque econômico a produção do maracujá ainda é limitada, devido, principalmente, à presença de doenças nos pomares, principalmente de origem fúngica, bacteriana, induzida por fitoplasmas, nematoides e, principalmente, aquelas causadas por vírus (COLARICCIO et al., 1987; CHAGAS, 1991; ANJOS et al., 2001; JUNQUEIRA, 2005; CHAGAS; COLARICCIO, 2006; FISCHER; REZENDE, 2008).

No Brasil, os seguintes vírus já foram descritos em maracujazeiro: o *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), o *Passion fruit vein clearing virus* (PVCV, *Potyvirus*), o Purple granadilla mosaic virus (PGMV, vírus com partículas isométricas cuja posição taxonômica ainda não foi determinada), o Passion fruit green spot virus (PFGSV, um possível *Cytorhabdovirus*), o *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV, *Tymovirus*), o *Passion fruit woodiness virus* (PWV, *Potyvirus*) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, *Potyvirus*) (CHAGAS, 1991; BEZERRA et al., 1995; ANJOS et al., 2001; CHAGAS; COLARICCIO, 2006). Na última década (2002 e 2003), relataram-se dois novos vírus em maracujazeiro: Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV), espécie tentativa do gênero *Begomovirus*, parcialmente caracterizada e detectada no Estado da Bahia em coinfeção com o CABMV (NOVAES et al., 2002; 2003 a), e Passion fruit severe leaf distortion virus

(PSLDV), uma nova espécie de *Begomovirus* também detectada na Bahia (FERREIRA et al., 2010).

O EFM é uma das principais viroses da cultura e pode ser atribuído a duas espécies de vírus: o PWV e o CABMV. O PWV foi originalmente descrito na Austrália como sendo o único vírus capaz de induzir o sintoma de endurecimento dos frutos (TAYLOR et al. 1964). Contudo, Brand et al. (1993) após sequenciarem a porção genômica da capa proteica de uma estirpe da África do Sul e compará-la a uma estirpe da Austrália, concluíram que se tratava de uma nova espécie viral, posteriormente classificada e aceita pelo *Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus* (ICTV) como CABMV (ADAMS et al., 2012).

O EFM foi descrito pela primeira vez, no Brasil, em 1978, no município de Feira de Santana (BA), em plantios comerciais de maracujá-doce e de maracujá-azedo, que, em consequência da presença e dos danos causados pela doença, foram destinados à indústria de suco (YAMASHIRO; CHAGAS, 1979). Neste período, o vírus foi identificado por meio de técnicas biológicas e sorológicas, como pertencente à espécie PWV (CHAGAS et al., 1981). Concomitantemente, houve relatos da ocorrência do PWV nos estados de Pernambuco (LORETO; VITAL, 1983), Ceará (LIMA et al., 1985), Sergipe (KITAJIMA et al. 1986), São Paulo (CHAGAS et al., 1992), Minas Gerais (SÃO JOSÉ et al., 1994), Goiás e Distrito Federal (INOUE et al., 1995). Entretanto, análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da capa proteica permitiram que esses isolados virais, identificados inicialmente como PWV, fossem classificados como CABMV (NASCIMENTO et al., 2004). Levantamentos realizados posteriormente permitiram concluir a não ocorrência do PWV no Brasil, prevalecendo o CABMV, tanto em maracujazeiro como em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (NASCIMENTO et al., 2006).

Após o primeiro relato do EFM, na Bahia, foram registradas sucessivas ocorrências desta virose em todos os estados produtores de maracujá do Brasil. Levantamentos realizados (no período de 2003 a 2005) nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo, permitiram a constatação de que somente em municípios isolados das grandes áreas produtoras, como Eldorado e Sete Barras (Vale do Ribeira), ainda não havia sido detectado o CABMV em cultivos de maracujá. Porém, em 2010 e 2011, novos estudos realizados demonstraram que o vírus já estava presente nestes municípios e se disseminando em toda Alta Sorocabana (NARITA et al., 2012).

O CABMV, assim como os demais vírus associados ao EFM (PWV e o EAPV), pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*. Atualmente, o gênero *Potyvirus* é constituído por 146 espécies definitivas e 32 espécies tentativas. Além do CABMV, PWV e EAPV, há outras espécies de *Potyvirus* descritas em maracujá, causando clorose das folhas: *Passiflora chlorosis virus* - PaChV (BAKER; JONES, 2007) e o *Passiflora foetida*

virus Y – PfvY (TAYLOR; GREBER, 1973; BOCK; CONTI, 1974; SHUKLA et al., 1994; IMAI et al., 1996; FISCHER; REZENDE, 2008; MLOTSHWA et al., 2002; ADAMS et al., 2012).

O CABMV possui morfologia alongada e flexuosa, medindo cerca de 690-760 nm de comprimento e de 12-15 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por um RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos e uma fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa (BARROS et al., 2011; ADAMS et al., 2012). Essa poliproteína é clivada dando origem a dez proteínas funcionais (P1, HC-Pro, P3, 6K1 CI, 6K2, VPg, Pro, Nilb e CP). Há também outra ORF pequena denominada PIPO, sobreposta na região genômica correspondente à proteína P3, que codifica uma proteína de aproximadamente 25 kDa que está relacionada com o movimento do vírus célula a célula (CHUNG et al., 2008) (FIGURA 2).

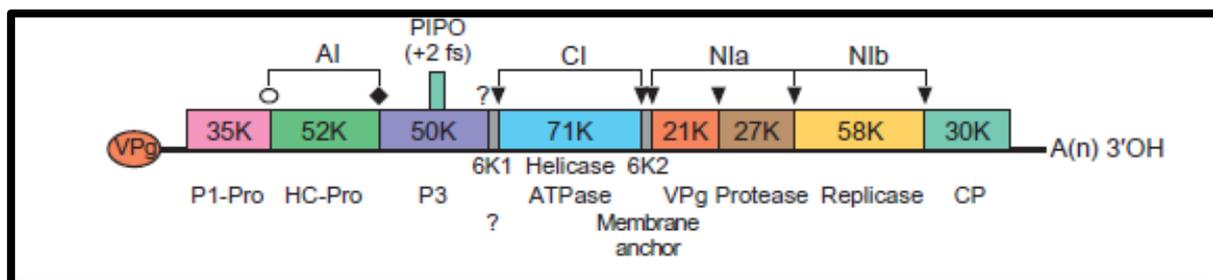


FIGURA 2: Representação esquemática da organização genômica das espécies do gênero *Potyvirus*. Nos retângulos estão indicadas as diferentes proteínas resultantes da clivagem da poliproteína, após sua tradução. No terminal 5' da molécula de RNA está representada a proteína estrutural VPg e no terminal 3', a cauda de poliadenilação (An). Fonte: Adams et al. (2012)

As funções de algumas destas proteínas virais como a P3 e as pequenas proteínas 6k1 e 6k2 ainda não foram elucidadas. Dentre as funções das proteínas dos *Potyvirus* estão: a replicação viral, o movimento a curtas (célula a célula) e a longas (sistêmico) distâncias, transmissão por afídeos e encapsidação do genoma viral, além da ação como proteases (*cis* e *trans*) e associação com supressão de silenciamento. Vale lembrar que a maioria das proteínas dos *Potyvirus* desempenha mais de uma função (MELO, 2011). A proteína denominada componente auxiliar (*Helper Component Protease*, HC-Pro) e a proteína da capa (CP), além de outras funções, estão conjuntamente relacionadas com a transmissão por afídeos (ver detalhes mais adiante no item 2.5.1). A HC-Pro é uma das proteínas mais estudadas e tem como funções conhecidas: (i) movimento do vírus tanto a longa distância quanto a curta distância; (ii) virulência (severidade dos sintomas); (iii) replicação viral; (iv) acúmulo de partículas virais nas células da planta hospedeira; (v) sinergismo; (vi) infecção e transmissão por sementes; (vii) supressão do mecanismo de silenciamento gênico, além de

possuir atividade de protease que cliva a própria poliproteína viral. A CP também é multifuncional, desempenhando os seguintes papéis durante o ciclo infeccioso do vírus na planta hospedeira: (i) movimento célula a célula; (ii) movimento a longa distância; (iii) replicação do genoma viral; (iv) encapsidação; (v) virulência; e (vi) transmissão pelo vetor (MELO, 2011).

O CABMV pode infectar todas as variedades comerciais de maracujazeiro, causando sintomas foliares de mosaico, bolhas e deformações. Os frutos não se desenvolvem e são frequentemente deformados, apresentando o pericarpo endurecido e espesso (FIGURA 3). A deformação dos frutos, aliada ao encurtamento do período de frutificação e a redução do conteúdo de polpa ocasionam quedas na produção do maracujá e consequente perda do seu valor comercial. Diante da severidade e dos danos causados pela infecção do CABMV, os produtores brasileiros tendem a adotar atualmente como manejo, a renovação anual de seus pomares. Inicialmente, a cultura do maracujá era conduzida como semiperene, com substituição dos pomares a cada 3 a 4 anos. Esta transformação do manejo e condução da cultura ocorreu após a disseminação do CABMV nas áreas destinadas à produção intensiva e a dificuldade de obtenção de variedades resistentes promissoras (BARROS, 2007).

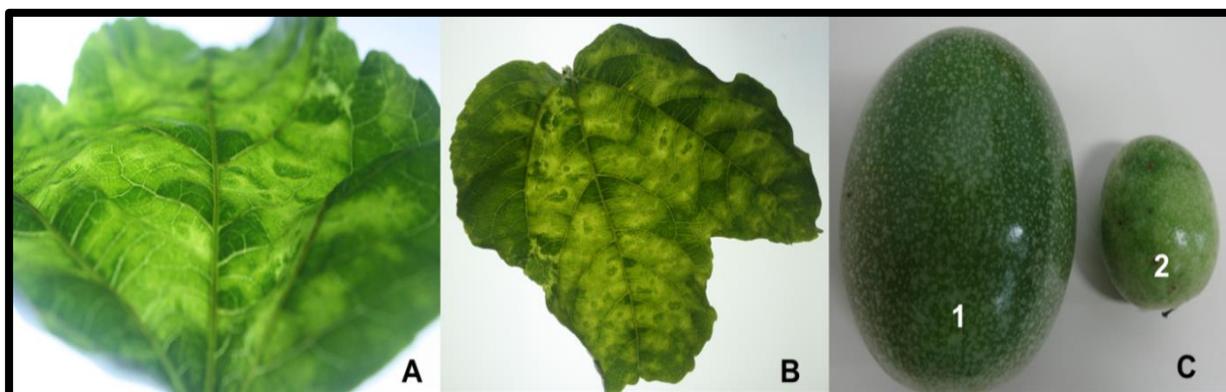


FIGURA 3: Sintomas induzidos pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em folhas e frutos de maracujá-azedo (*Passiflora edulis*). (A e B) Folha de maracujá-azedo apresentando sintomas de bolhas e mosaico; (C) foto de fruto sadio (1) e fruto deformado com tamanho e peso reduzidos (2). Amostras coletadas no pomar avaliado neste trabalho, no município de Pariquera-Açu, SP.

Isolados de CABMV podem infectar espécies de Fabaceae como: amendoim (*Arachis hypogaea* L.), crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), soja [*Glycine max* (L) Merr.], além de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. É importante ressaltar que este vírus também é um dos principais patógenos da cultura do feijão-caupi nos estados do Nordeste do Brasil e também na África, podendo acarretar

perdas de mais de 80% da produção (BASHIR et al., 2002). Segundo Silva et al. (2012), isolados de CABMV podem infectar uma ampla gama de espécies de Fabaceae como: *Canavalia ensiformes*, *Crotalaria juncea*, *C. incana*, *C. spectabilis*, *Cajanus cajan*, *Lupinus albus*, *Macroptilium atropurpureum*, *Neonotonia wightii*, *Senna occidentalis*, *Pisum sativum*, *Mucuna aterrina* e *M. cinerea*. O CABMV pode ser transmitido experimentalmente, por inoculação mecânica, para mais de 60 espécies de plantas indicadoras pertencentes às famílias Amaranthaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Passifloraceae e Solanaceae (BASHIR et al., 2002). Algumas destas plantas indicadoras como *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* podem desenvolver sintomas locais necróticos, e *Nicotiana benthamiana* e *Petunia hybrida* podem expressar sintomas sistêmicos de mosaico, bolhas, deformação foliar e encurtamento de entrenós (TAYLOR; GREBER, 1973; GIÓRIA; REZENDE, 1996; BASHIR et al., 2002; DAMIRI et al, 2013). Na FIGURA 4, observam-se sintomas sistêmicos de mosaico e bolhas em feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), e lesões locais em *Chenopodium amaranticolor*, após serem mecanicamente inoculadas com um isolado de CABMV proveniente do município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP.

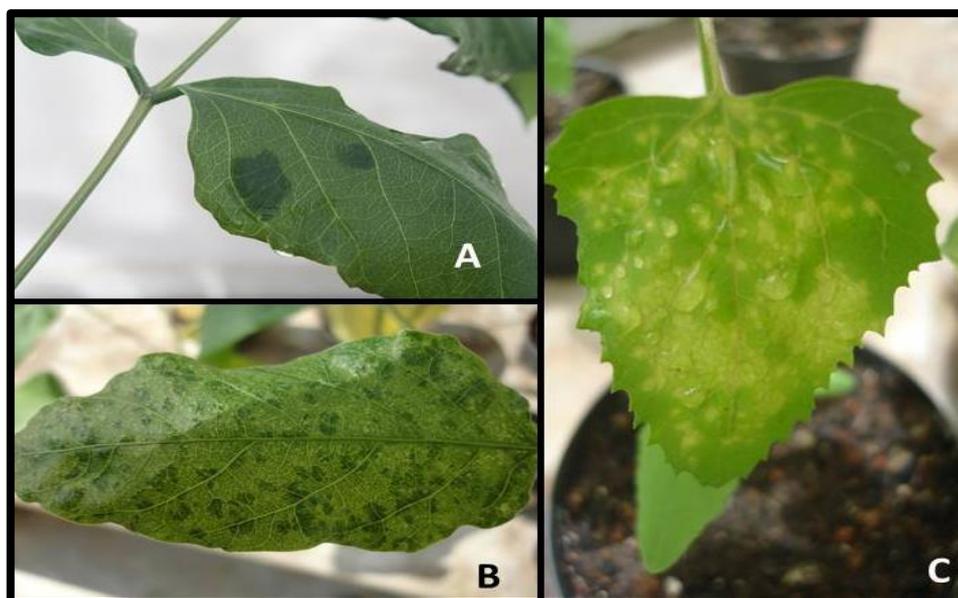


FIGURA 4: Sintomas induzidos pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), isolado proveniente do município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP, após inoculação mecânica em plantas indicadoras: A) folha de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) com mosaico e bolhas; B) folha de *C. ensiformis* com mosaico; e C) folha de *Chenopodium amaranticolor* com lesões necróticas locais.

## 2.5. Transmissão e disseminação de vírus de plantas

Os vírus de plantas por serem parasitas intracelulares obrigatórios e por não se disseminarem de forma livre, são na sua maioria, dependentes de organismos vetores. Além disso, os vírus de plantas, diferentemente dos vírus animais, para terem sucesso na infecção, são dependentes de ações mecânicas (injúrias) ou de sua introdução diretamente no interior da célula (papel dos vetores) para que possam atravessar a cutícula e a parede celular. Na natureza, há um número restrito de espécies de vírus que são estáveis fora da célula hospedeira, podendo ser disseminados, mesmo na ausência de vetores, por meio de enxertia natural de raízes, grãos de pólen produzidos por plantas infectadas e pelo contato entre folhas de plantas vizinhas. Na agricultura, há outras formas de disseminação, como: uso de ferramentas contaminadas durante os tratamentos culturais (poda, enxertia e desbastes), utilização de material vegetativo de propagação infectado (órgãos micropropagados, estacas, bulbos, tubérculos e rizomas), sementes, e, em casos extremos, até mesmo durante o manuseio de plantas com as mãos contaminadas (COSTA, 1998; BRAULT et al., 2010).

Os agentes biológicos responsáveis pela disseminação, transmissão e inoculação de vírus são classificados como vetores. A capacidade de romper as paredes celulares das células da planta até chegar ao citoplasma das células de diferentes tecidos, incluindo floema e xilema, a mobilidade frequente entre as plantas e a interação biológica específica (evidenciada pela interação entre proteínas virais e proteínas do vetor) são características que permitem classificar um organismo como vetor de vírus de plantas (HARRIS et al., 2001; BRAULT et al., 2010). Os vetores de vírus de plantas pertencem a grupos taxonômicos distintos: (i) artrópodes (insetos e ácaros); (ii) nematoides e (iii) “fungos” (zoospóricos). Todos os artrópodes e nematoides vetores de vírus de plantas são exclusivamente fitófagos. Os fungos, por meio de esporos móveis em água, utilizam mecanismos quimiotáticos específicos, que permitem localizar os tecidos do hospedeiro alvo, para então poder realizar a transmissão (COSTA, 1998). Maiores detalhes sobre a transmissão de vírus de plantas por fungos e nematoides podem ser obtidas na recente revisão de Bragard et al. (2013). Especificamente na presente revisão a ênfase será dada à transmissão por insetos, principalmente os afídeos (ver mais adiante no item 2.5).

Para um mesmo gênero de vírus de plantas pode haver mais de uma ordem de inseto vetor. Porém, cada espécie de vírus de plantas tem como vetor apenas um dos representantes do grupo de organismos conhecidos, uma vez que os vetores estabelecem uma relação única de transmissão com o vírus a ser transmitido (BRAGARD et al., 2013). Os vetores de vírus de plantas mais importantes são os insetos fitófagos sugadores, ou seja,

os que se alimentam por meio da introdução do aparelho bucal (estilete) para sugar a seiva ou o conteúdo celular da planta (ILHARCO, 1992).

Aproximadamente 48% dos fitovírus descritos dependem de vetores para a sua disseminação. Os principais insetos vetores de vírus de plantas pertencem às ordens Hemiptera, Coleoptera e Thysanoptera. Destas, a ordem mais importante é a Hemiptera, que se subdivide em quatro subordens: Coleorrhyncha, Heteroptera, Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha, sendo que nesta última estão inseridos os afídeos (conhecidos por pulgões), moscas-brancas e cochonilhas, responsáveis por, aproximadamente, 40% da transmissão do total dos vírus de plantas conhecidos (FERERES; MORENO, 2009).

### **2.5.1. Afídeos: biologia, origem e papel na transmissão de vírus de plantas**

Atualmente são descritas aproximadamente 4700 espécies de afídeos, sendo a grande maioria originária de clima temperado, e desse total apenas 450 espécies são capazes de colonizar plantas (BLANCKMAN; EASTOP, 2007). Em um estudo realizado por Eastop (1983), das 288 espécies avaliadas, 227 eram capazes de transmitir vírus, sendo que destas mais de 200 espécies pertenciam à subfamília Aphidinae. Os afídeos ocupam um papel importante na transmissão de vírus, sendo responsáveis por transmitir aproximadamente a metade dos vírus já descritos. Além disso, diferentemente dos outros insetos, os afídeos estabelecem uma relação inversa entre o número de espécies descritas e o número de espécies de plantas de acordo com o ambiente avaliado. Em condições de clima temperado observa-se um maior número de espécies de afídeos e uma baixa diversidade de espécies de plantas hospedeiras, o inverso é observado em condições tropicais e subtropicais (DIXON, 1987; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002).

Os afídeos pertencem à superfamília Aphidoidea, que é subdividida em dez famílias, dezesseis subfamílias, vinte e quatro tribos e seis subtribos (TABELA 1). As espécies de afídeos estão distribuídas em 599 gêneros e subgêneros, sendo a sua maioria relatada em clima temperado (DIXON, 1987; FABRICIO, 2003). Os afídeos somente foram considerados pragas agrícolas após a sua introdução em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, são relatadas 144 espécies de afídeos ocorrendo em plantas silvestres, da vegetação espontânea e diferentes segmentos de espécies de interesse econômico (fruticultura, olericultura, floricultura e ornamentais, comodites agrícolas, pastagens) (PERONTI; SOUSA-SILVA 2002).

TABELA 1: Classificação proposta por Heie (1980) das superfamílias Phylloxeroidea e Aphidoidea em famílias, subfamílias, tribos e subtribos. Em azul, estão destacadas as subfamílias e tribos de afídeos com espécies associadas à transmissão de vírus de plantas

<b>Família</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Tribo</b>	<b>Subtribo</b>
<b>SUPER FAMÍLIA PHYLLOXEROIDEA</b>			
Adelgidae			
Phylloxeridae			
<b>SUPER FAMÍLIA APHIDOIDEAE</b>			
Mindaridae			
Hormaphididae	Hormaphidinae		
Phloeomyzidae	Oregminae		
	Hormaphidinae		
Phloeomyzidae			
Theaxidae			
Anoeciidae			
Pemphigidae	Eriosomatinae	Eriosomatini	
		Tetraneurini	
	Pemphiginae	Prociphilini	
		Penphigini	
	Fordinae	Fordini	Baizongiina
			Geocina
			Fordina
Drepanosiphidae	Depanosiphinae	Neophyllaphidini	
		Paoliellini	
		Spicaphidini	
		Palaeosiphonini	
		Israelaphidini	
		Drepanosiphini	
	Phyllaphidinae	Phyllaphidini	Phyllaphidina
			Callaphidina
			Therioaphidina
	Chaitophorinae	Chaitophorini	
		Siphini	
Greenideidae	Greenideinae		
	Cervaphidinae		
<b>Aphididae</b>	<b>Baltichaitophorinae</b>		
	<b>Pterocommatinae</b>		
	<b>Aphidinae</b>	<b>Aphidini</b>	
		<b>Macrosiphini</b>	
Lachnidae	Lachninae	Stomaphidini	
		Lachnini	
	Cinarinae	Cinarini	
		Schizolachnini	
		Eulachnini	
	Treminae		

Fonte: Minks e Harrewijn (1987)

Os afídeos são insetos relativamente pequenos (1 a 5 mm de comprimento), seu corpo tem formato ovalar ou piriforme, apresentando coloração uniforme (podendo variar entre as cores verde, amarela, alaranjada, parda ou negra). Seu corpo é dividido em três partes: (i) cabeça, composta por olhos, ocelos, rostrum (aparelho alimentar) e um par de antenas, que pode apresentar de três a seis segmentos, sendo que entre todos os órgãos que compõem a cabeça, a inserção e o número de segmentos das antenas são as que apresentam as melhores características para a diferenciação de espécies; (ii) tórax, no qual estão inseridos os três pares de pernas ambulatórias e os dois pares de asas membranosas e hialinas (se forem alados); (iii) abdome, no qual encontra-se a cauda, que tem grande importância na taxonomia, principalmente na classificação em nível de espécie, e o par de sífúnculos, sendo que há espécies de afídeos que não possuem ou apresentam fendas dos ostíolos pouco visíveis. Os indivíduos podem ser ápteros ou alados (MIYAZAKI, 1987). Os indivíduos alados são, na maioria dos casos, considerados os de maior importância quando se refere à disseminação de vírus (FIGURA 5) (BROADBENT, 1950; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002). Há, entretanto, casos em que os ápteros também podem ser importantes na disseminação (RIBBANDS, 1963)

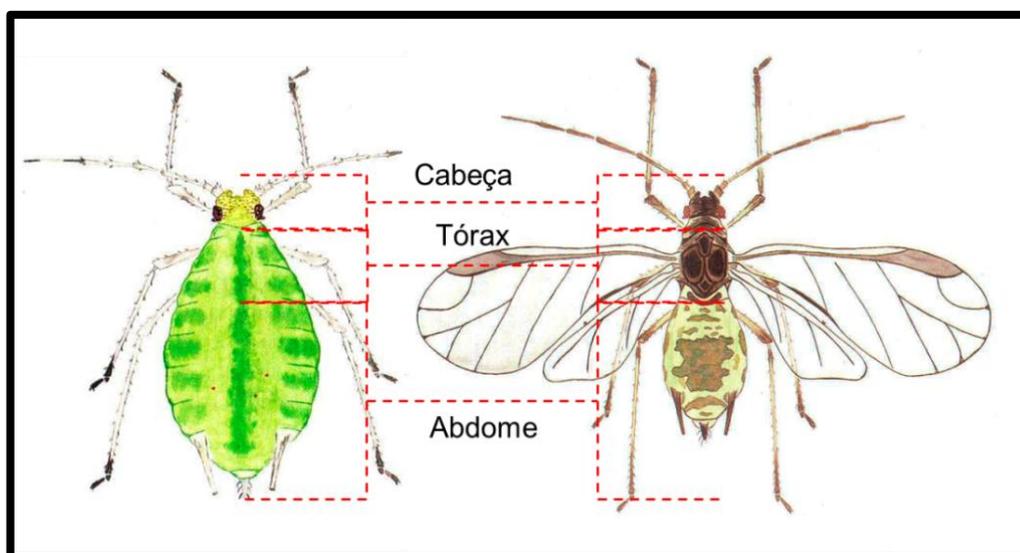


FIGURA 5: Representação da morfologia externa típica dos insetos, ilustrada por um afídeo áptero (à esquerda) e alado (à direita). Figura adaptada de Ilharco, 1992.

A identificação dos afídeos que colonizam plantas de interesse econômico, apesar de requerer capacitação em entomologia e conhecimento taxonômico, geralmente não é difícil. Isso se deve ao fato de haver um número restrito de afídeos relatados em plantas cultivadas, quando comparado com um sistema agroflorestral. Mas, no caso de não se

conhecer o hospedeiro, ou no caso dos afídeos serem capturados em armadilhas, a identificação se torna mais difícil, pois a identificação será baseada estritamente na diferenciação das características morfológicas, que muitas vezes são muito semelhantes. As características morfológicas utilizadas para a identificação dos afídeos são: (i) esclerotização; (ii) superfície cuticular; (iii) produção de cera; (iv) setas; (v) cor do afídeo vivo; (vi) tamanho e forma do corpo; (vii) cabeça; (viii) inserção de antena (*front of head* – frente da cabeça); (ix) antena; (x) tórax; (xi) pernas; (xii) asas; (xiii) abdome; (xiv) sifúnculo; (xv) cauda; (xvi) placa genital; (xvii) espiráculos; (xviii) tubérculos; (xix) tamanho e número de cerdas (FIGURA 6) (ILHARCO; VAN HARTEN, 1987).

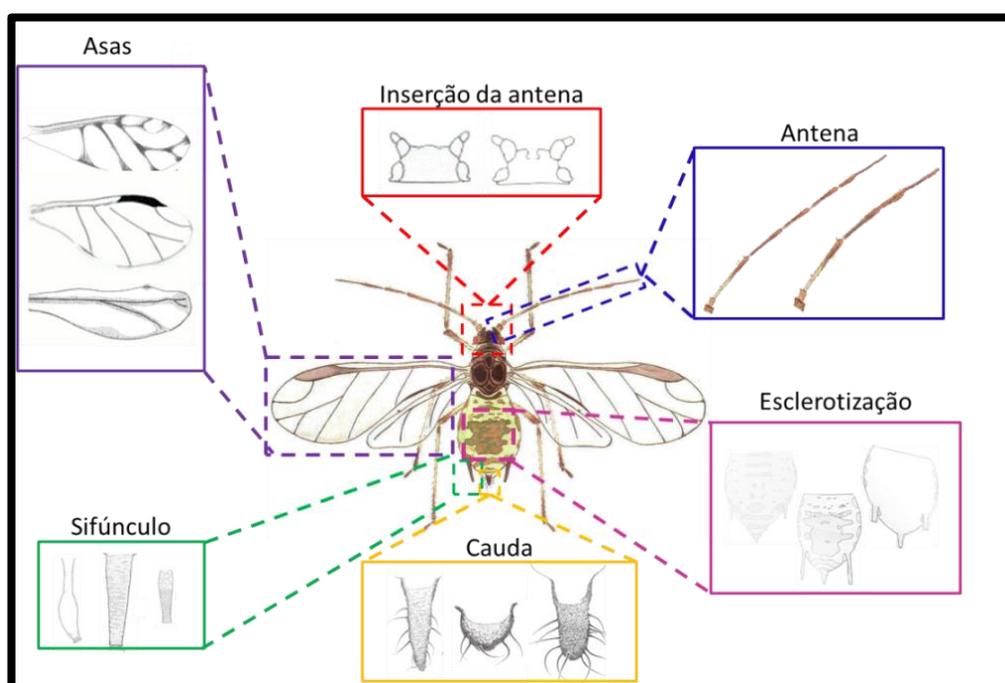


FIGURA 6: Representação esquemática da morfologia de um afídeo alado com destaque para algumas das partes mais utilizadas para a identificação em nível de espécie. Nos retângulos coloridos estão representadas parte dos exemplos das características de algumas formas de cauda e suas cerdas, antena, asa, sifúnculo, inserção de antenas (frente da cabeça) e esclerotização.

O ciclo de vida do afídeo pode ser de forma sexuada ou assexuada (partenogênese), e, normalmente, é regido de acordo com a interação com as plantas hospedeiras. Assim, as espécies de afídeos que não alternam de hospedeiros são classificadas como monocíclicas, já quando há alternância de hospedeiras, as espécies são denominadas de heterocíclicas (WILLIAMS; DIXON, 2007). Nas regiões tropicais e subtropicais as espécies de afídeos são, em sua grande maioria, anolocíclicos (ciclo incompleto), sendo a reprodução quase que exclusivamente por partenogênese telítoca, ou seja, tipo de reprodução assexuada em que

óvulos não fecundados irão gerar apenas fêmeas, sendo que nesse tipo de reprodução não há a presença de machos. As espécies holocíclicas, ou seja, que apresentam o ciclo completo (reprodução sexuada e assexuada) são prevalentes em clima temperado, ocorrendo ocasionalmente nos trópicos. Além disso, as espécies de afídeos podem ser classificadas como autoécia ou heteroécia, podendo, respectivamente, colonizar uma única hospedeira ou alternar hospedeiras (BLACKMAN, 1974). Esta característica garante a manutenção das colônias, tanto das formas ápteras como aladas e, conseqüentemente, propicia a transmissão e disseminação dos vírus (DIXON, 1977; BLANKMAN, 1987). Já nas regiões temperadas a reprodução ocorre tanto de forma partenogênica como sexuada, que dará origem a machos e fêmeas ovíparas (CARVER et al., 1991). Quanto à interferência dos fatores abióticos no ciclo biológico, o aumento ou decréscimo populacional das diferentes espécies de afídeos está relacionado diretamente às oscilações de temperatura, precipitação e condições nutricionais das plantas hospedeiras (ROBERT, 1987).

O aparelho bucal dos afídeos é classificado como picador sugador (formado por dois pares de estiletes, mandibulares e maxilares, um labrum e um labium) que é adaptado para penetração de tecidos e sucção de seiva (COSTA, 1998). A picada de alimentação dos afídeos é altamente especializada, penetrando seu estilete intercelularmente e algumas vezes, intracelularmente, buscando sempre atingir o floema dos seus hospedeiros, no qual se alimenta da seiva que pode suprir em parte as suas necessidades nutricionais (DIXON, 1998).

O canal alimentar do afídeo é composto pelo canal dos estiletes maxilares, da bomba de sucção e do tubo digestivo que é dividido em intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesentero) e intestino posterior (proctodeu). Os afídeos apresentam um órgão sensorial epifaringeal, crucial para o reconhecimento da hospedeira, fase denominada *host finding*, logo após o pouso de um voo migratório. Há também o sistema salivar que é composto por um par de glândulas principais e por um par de glândulas acessórias (FIGURA 7) (COSTA 1998). Diferente dos outros insetos sugadores, o aparelho digestivo dos afídeos envolve a parte inicial do mesêntero e a porção anterior do proctodeu, tendo como função armazenar nutrientes antes de iniciar a digestão (PONSEN, 1997). Dessa forma, o excesso de seiva passa diretamente pelo tubo digestório sendo eliminado em forma de gotículas pelo ânus, possibilitando assim a sucção contínua de seiva (GALLO et al., 2002).

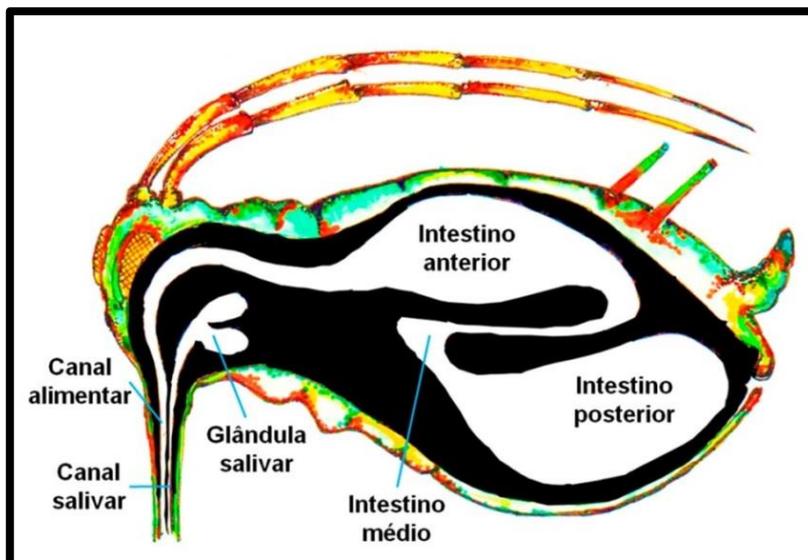


FIGURA 7: Desenho esquemático de um corte longitudinal do corpo de um afídeo com os principais órgãos dos sistemas alimentar e digestório.

Para que possa se alimentar, os afídeos devem encontrar seu hospedeiro. Dessa forma os afídeos possuem fotorreceptores responsáveis por resposta a estímulos visuais diferentes (MINKS; HARREWIJN, 1987). Kirtchner et al. (2005) utilizando a técnica de eletrorretinograma observaram que fêmeas aladas de *Myzus persicae* possuem três tipos de fotorreceptores diferentes que compõem seus olhos, sendo a primeira região sensível ao verde (530 nm), a segunda região sensível ao azul-esverdeado (490 nm) e a terceira região sensível ao ultravioleta (UV) (330-340 nm), sendo que esta última influencia o comportamento do inseto em termos de orientação, navegação, localização do hospedeiro e alimentação (FERERES; MORENO, 2009). Um dos estímulos para os afídeos encontrarem seu hospedeiro durante o voo é o contraste de cores entre o solo e o verde das plantas, além da energia refletida entre o solo e vegetação (KENNEDY et al., 1961). O comprimento de onda na faixa do UV atrai o afídeo no início do voo. Porém, no final do voo os afídeos são repelidos pelo UV e atraídos pela cor amarela, uma vez que esta tonalidade corresponde ao comprimento de onda que menos reflete o UV (NETO et al., 1976). Ao pousar na planta, os afídeos iniciam o reconhecimento, por meio de estímulos táteis e olfatórios, e verificando a textura das folhas quanto à topologia, exsudados dos tricomas, ceras cuticulares entre outras características da superfície foliar. Esse reconhecimento ocorre por meio de quimiorreceptores e mecanorreceptores (sensilas), localizadas nas antenas e lábio (FERERES; MORENO, 2009).

Após o reconhecimento da superfície da planta, o afídeo realiza a primeira picada, denominada de **picada de prova**. Esta é realizada em um período curto de tempo, geralmente menores que um minuto, e são limitadas às células da epiderme e parênquima

(mesófilo) das folhas. Caso o afídeo não reconheça a planta como hospedeira, ele realizará pequenos voos próximos, à procura de um hospedeiro favorável. Ao encontrar a planta hospedeira, o afídeo iniciará sua alimentação, alongando os estiletes até os vasos do floema (NETO et al., 1976). A penetração do estilete pode ser monitorada por meio da técnica *Electrical Penetration Graphs* (EPG), sendo possível detectar as picadas de prova na epiderme e no mesófilo até a sua chegada ao floema. Essa técnica permite associar duas subfases: uma de salivação e outra de ingestão do conteúdo celular pelo afídeo, que correspondem aos eventos de inoculação e aquisição do vírus, respectivamente (MORENO et al., 2011).

Com a colônia estabelecida na planta, os afídeos podem realizar dois tipos de movimentos denominados dispersão e migração. Na dispersão, as ninfas e adultos ápteros se redistribuem através das pontes formadas pelas folhas, ou até mesmo pelo solo para uma nova planta vizinha. Este movimento ocorre por meio da resposta a vários estímulos emitidos por feromônios de alarme, na presença de um inimigo ou por terem pousado em uma planta debilitada pela intensa alimentação da colônia (ROBERT, 1987). Já a migração é induzida pela deterioração gradual da planta hospedeira, condições climáticas desfavoráveis (pluviosidade e temperatura) e competição intraespecífica, provocando a migração de afídeos alados para outras plantas, e até mesmo para outras regiões, em busca de novas hospedeiras (DIXON, 1977; EASTOP, 1977; DIXON, 1998).

### **2.5.2. Classificação dos modos de transmissão**

A primeira constatação da eficiência dos afídeos como vetores de vírus se deu no ano de 1916, quando foi comprovada a transmissão do *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) por *Aphis gossypii* (DOOLITTLE, 1916). Botjes (1920) verificou que *Myzus persicae* podia transmitir o *Potato leafroll virus* (PLRV, *Polerovirus*) para batata. Foi nessa mesma época que também foram registradas as primeiras epidemias do *Sugarcane mosaic virus* (SCMV, *Potyvirus*) em variedades nobres de cana-de-açúcar ocasionadas por revoadas da espécie *Rhopalosiphum maidis* (BRANDES, 1920).

O primeiro sistema de classificação dos modos de transmissão de vírus de plantas por insetos vetores foi baseado no período de retenção do vírus no corpo do inseto, que na época foram denominadas como persistente e não persistente (WATSON; ROBERTS, 1939). Entretanto, Sylvester (1956) observou que alguns vírus podiam ser retidos, sem perder a infectividade, durante um curto período no vetor, o qual classificou como transmissão semipersistente. Posteriormente, Kennedy et al. (1962) propuseram uma nova

forma de classificar os modos de transmissão, sugerindo o critério de rota do vírus no corpo do vetor: *stylet born* para os vírus carregados nos estiletes e *circulavo* para os que são adquiridos, atingem a cavidade do corpo do vetor, passam pela glândula salivar (acessória) e são injetados com a saliva na planta receptora. Esse tipo de transmissão foi denominado circulativo. Alguns vírus, porém, além de circular pelo vetor, também apresentavam a capacidade de se replicar, sendo denominada essa relação de transmissão circulativa propagativa (PIRONE; BLANC, 1996).

Atualmente, adota-se a classificação proposta por Harris (1979), que divide os modos de transmissão em: (i) **circulativa (propagativa e não propagativa)** e (ii) **não circulativa (não persistente e semipersistente)**. A seguir, esses modos de transmissão serão discutidos em detalhe.

### 2.5.2.1. Transmissão circulativa

No modo de transmissão circulativa é necessária à ingestão do vírus pelo vetor. As partículas adquiridas ao chegarem ao ceco intestinal, deverão ser reconhecidas, muito provavelmente, por receptores específicos que auxiliarão a transposição do vírion para as células intestinais, e em seguida para a hemolinfa. Uma vez transposta essa primeira barreira (celular), as partículas deverão ser transportadas para a glândula salivar, tendo que ultrapassar uma nova barreira para que possam ser transmitidas (BRAULT et al., 2010). Neste caso, os vetores ao se alimentarem do conteúdo celular do floema da planta infectada (seiva), adquirem os vírus durante a alimentação e os transmitem durante a salivação, sendo o tempo entre a aquisição e a transmissão denominado período de latência (FERERES; MORENO, 2009; BRAULT et al., 2010). Esse modo de transmissão tem como característica tempos longos de aquisição e inoculação (horas/dias). Devido à circulação das partículas virais no interior do corpo do afídeo, o período de latência pode variar de horas a semanas (TABELA 2) (NG; PERRY, 2004; BRAGARD et al., 2013).

A transmissão circulativa é subdividida em **propagativa**, quando o vírus se replica no vetor e **não propagativa**, quando o vírus somente circula e não se replica no vetor. A transmissão circulativa não propagativa é observada quando as partículas virais ficam restritas às células do floema como é o caso das famílias *Nanoviridae* e *Luteoviridae*, que são transmitidas exclusivamente por afídeos, (FERERES; MORENO, 2009; BRAULT et al., 2010; BRAGARD et al., 2013). Pode-se citar, por exemplo, a interação do *Potato leafroll virus* (PLRV, *Polerovirus*) com *Myzus persicae*, em que as partículas virais circulam no vetor, havendo a dependência da interação da proteína do capsídeo viral com presumíveis

receptores presentes nas invaginações do epitélio do intestino posterior (proctodeu) do afídeo (FIGURA 8). Este processo transcorre pela endocitose das partículas virais que são envoltas por uma vesícula. Essas vesículas, por sua vez, serão transportadas e posteriormente degradadas na hemocele. Após a degradação, as partículas de vírus liberadas na hemocele interagem com a proteína simbionina, sintetizada por bactérias endosimbiontes do gênero *Buchnera*. Nesse processo, a simbionina atua como uma proteção, evitando a degradação das partículas virais e permitindo seu transporte até atingirem a lâmina basal das células das glândulas salivares acessórias. Vale ressaltar que isso ocorre apenas em algumas espécies de afídeos, o que demonstra um elevado nível de especificidade vírus/vetor na transmissão (VAN DEN HEUVEL et al., 1997).

A transmissão circulativa propagativa tem como característica a replicação do vírus no interior do vetor, acarretando um maior período de latência (FIGURA 8). Como exemplo, podem ser citados os membros da família *Rhabdoviridae*, que podem ser transmitidos por afídeos e cigarrinhas (BRAULT et al., 2010). A primeira constatação da circulação e replicação de um vírus no corpo do vetor foi feita por O'Loughlin e Chamber (1967), utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Os autores detectaram partículas de *Rhabdovirus* no citoplasma das células dos músculos, cérebro, glândulas salivares e em outros órgãos do afídeo vetor. Posteriormente, Peters e Black (1970) detectaram a presença de partículas de *Rhabdovirus* em culturas de células de ovários e tecidos embrionários de afídeos, confirmando a replicação viral. Geralmente, os *Rhabdovirus* não prejudicam seus insetos vetores, apresentando um baixo nível de replicação (BRAULT et al., 2010).

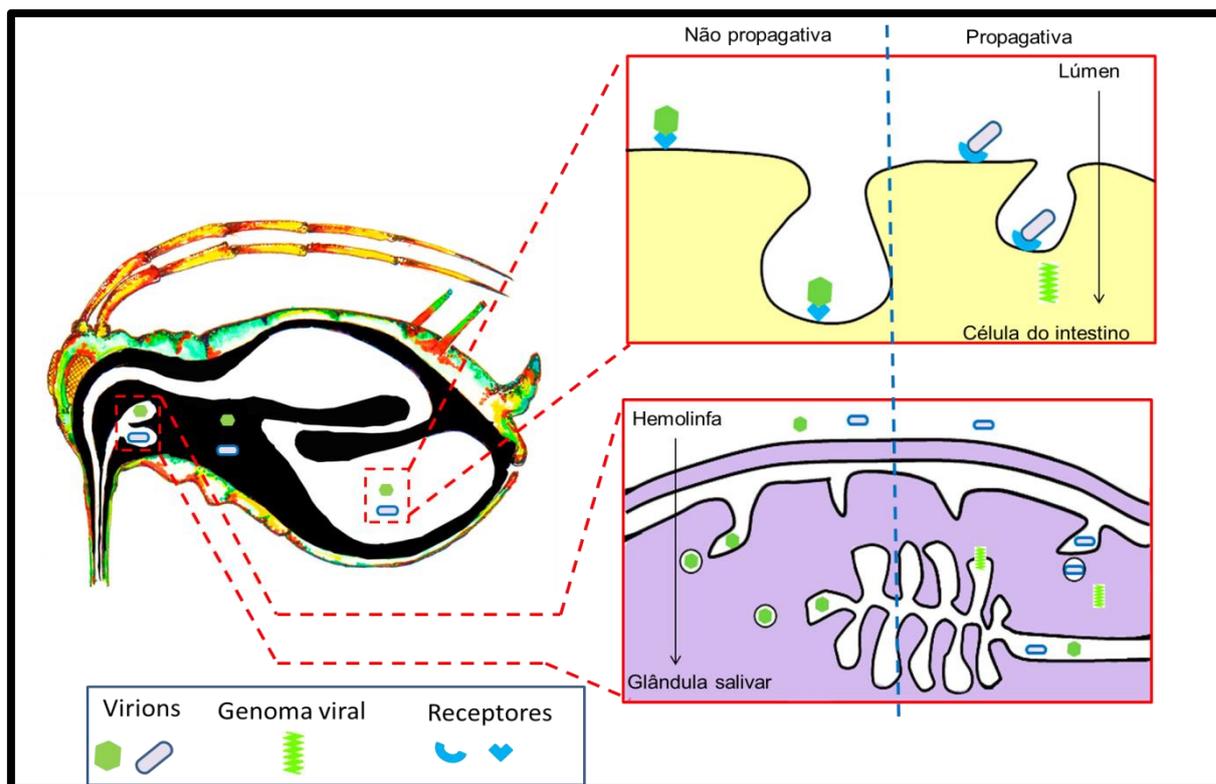


FIGURA 8: Ilustração dos modos de transmissão de vírus por afídeos de modo circulativo não propagativo e circulativo propagativo. Em ambos os modos de transmissão ocorre, inicialmente, a ligação do vírion à parede do intestino, provavelmente, por meio de receptores presentes nas membranas das células intestinais. Após o reconhecimento, a partícula viral poderá ultrapassar a primeira barreira do interior do inseto. A segunda barreira a ser ultrapassada é da célula do intestino para a hemolinfa, a qual terá a função de transportar esses vírions ou, no caso do modo propagativo, o material genético, até a glândula salivar. Os vírions ao chegarem no canal salivar serão transmitidos para uma nova planta através do processo de alimentação/salivação. Figura adaptada de Brault et al. (2010).

### 2.5.2.2. Transmissão não circulativa

A maioria dos vírus de plantas é transmitida por afídeos de forma não circulativa, que é subdividida em semipersistente e não persistente (TABELA 2) (NAULT, 1997; BLANC et al., 2011; BRAGARD et al., 2013). A **transmissão semipersistente** possui semelhanças quando comparada à transmissão não persistente, no que diz respeito à aquisição do vírus. Porém, neste tipo de transmissão as interações biológicas vírus/vetor ocorrem no cibário, região próxima ao sistema digestivo, tendo como característica a rápida aquisição (em minutos), retenção (dias) e inoculação (minutos/horas) (MARTIN et al., 1997; UZEST et al., 2007; BRAGARD et al., 2013). O *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closterovirus*), agente causal da tristeza do citros é transmitido de maneira semipersistente por afídeos que se alimentam do

floema da planta hospedeira. O vírus se liga ao receptor presente na cutícula do cibário do afídeo por meio da proteína CPm (UZEST et al., 2007), que é parte da proteína da capa (CP) (FIGURA 9) (NG; FALK, 2006).

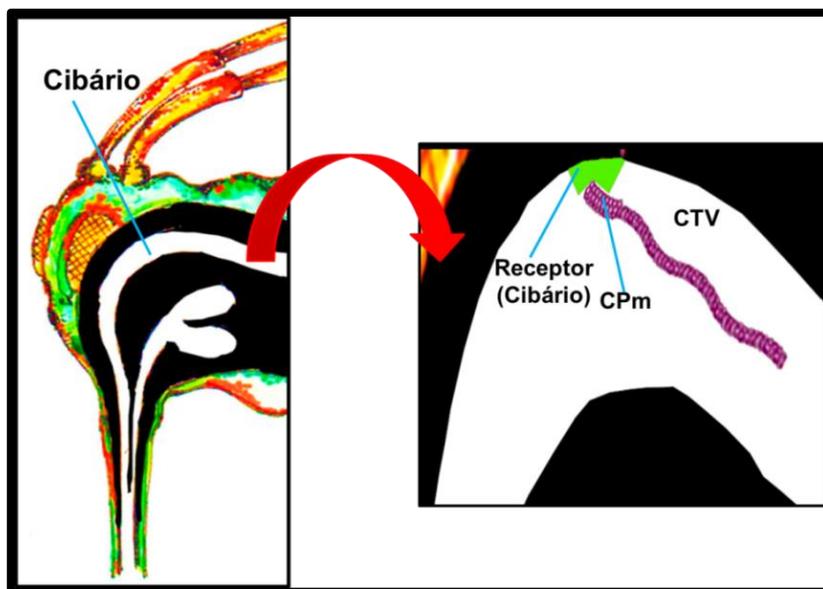


FIGURA 9: Representação esquemática simplificada do modo de transmissão semipersistente do *Citrus tristeza virus* (CTV) mostrando a localização do cibário (lado esquerdo) e da ligação que deve ocorrer entre a partícula viral, por meio da proteína CPm, e o provável receptor presente na cutícula do cibário (lado direito).

Na **transmissão não persistente**, o vetor, ao se alimentar de uma planta infectada, pode adquirir o vírus em poucos segundos. O vírus ficará retido durante minutos ou poucas horas, restritamente no canal alimentar, que no caso de insetos fitófagos sugadores como os afídeos, moscas-brancas e cigarrinhas, corresponde ao maxilar (PIRONE; BLANC, 1996). Esse tipo de transmissão é realizado durante as picadas de prova, que ocorrem na epiderme da planta, ou seja, para esse tipo de transmissão ocorrer, os afídeos vetores não precisam colonizar a planta hospedeira (HULL, 2002). Desta forma, o inseto vetor é capaz de transmitir o vírus a uma planta sadia logo após a sua aquisição em uma planta infectada. É importante ressaltar que fatores como temperatura e atividade de alimentação do vetor, antes, após e durante a aquisição do vírus, interferem na interação de modo prejudicial (COSTA, 1998). Os afídeos são os únicos insetos vetores que têm a capacidade de transmitir vírus de maneira não persistente, por serem especializados em realizar picadas de prova (JAMES; BRYCE, 2006).

Na transmissão não persistente há duas estratégias de interação vírus-vetor, denominadas: (i) **capsidial** e (ii) **componente auxiliar**. A relação que ocorre entre espécies

dos gêneros *Alfamovirus*, *Carlavirus*, *Crinivirus* e *Cucumovirus* com os afídeos vetores é denominada capsidial (Cap). Neste tipo de interação a capa proteica da partícula do vírus interage diretamente com a cutícula do canal estiletar do vetor (BRAULT et al., 2010). A primeira evidência dessa ligação foi obtida por Pirone (1964), que utilizou preparações purificadas de um isolado de CMV para alimentar artificialmente *M. persicae* através de uma membrana de para-filme, comprovando a transmissão do vírus pelo afídeo. Porém, o envolvimento do capsídeo com a transmissão do vírus só foi confirmada quando Chen e Francki (1990) utilizaram isolados transmissíveis e não transmissíveis de dois *Cucumovirus*, que apresentavam diferenças apenas na proteína capsidial (FIGURA 10).

A estratégia de interação via componente auxiliar é assim denominada, pois a interação entre a partícula viral e o estilete do inseto vetor não é feita diretamente, e sim intermediada por uma ou mais proteínas auxiliares (*helper component*). A interação entre *Caulimovirus*-afídeo, por exemplo, é intermediada pelas proteínas P2 e P3, responsáveis pela ligação entre a partícula viral e a cutícula do estilete do afídeo. O trabalho que descreve pela primeira vez a existência de receptores de vírus não circulativos com afídeos vetores foi realizado por Uzest et al. (2007). Este trabalho envolveu estudos de transmissão do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), vírus transmitido de modo semipersistente pelo afídeo *Brevicoryne brassicae*, e análises por microscopia de imonofluorescência, permitindo constatar que a proteína P2 do vírus se liga à cutícula, na porção anterior do estilete. Dos diversos tratamentos químicos e enzimáticos, com capacidade para destruição de lipídios, açúcares e proteínas, que foram utilizados, somente o tratamento com protease eliminou a ligação da proteína P2 com o estilete do afídeo. Estes resultados sugerem fortemente que o receptor do CaMV é uma proteína não glicosilada associada a matriz de quitina (UZEST et al., 2007). Os vírus pertencentes ao gênero *Caulimovirus* são transmitidos de modo não circulativo com propriedades similares aos vírus transmitidos de modo semipersistente e também não persistente, também denominada de transmissão bimodal (MORENO et al., 2011; e para uma revisão, ver BRAGARD et al., 2013). De acordo com Palacios et al. (2002) o CaMV pode ser adquirido tanto no floema quanto no mesofilo e epiderme da planta, mas a eficiência de aquisição do vírus aumenta quando o vetor atinge o floema. Isso se deve à presença da proteína P2, no mesofilo e na epiderme, que é adquirida pelo afídeo durante as picadas de prova. Porém, é no floema que está presente em maior concentração a proteína P3 e as partículas virais (FIGURA 10).

Finalizando a explanação dos modos de transmissão não persistente, a mais estudada é a interação observada na relação afídeo-*Potyvirus*, que também é conhecida como estratégia auxiliar. Esta interação é uma ponte entre a cutícula do estilete e a capa proteica do vírus, fenômeno conhecido como "*Bridge hypothesis*", que é realizada com o

auxílio da proteína não estrutural denominada “*helper component*” (HC-Pro) (FIGURA 10) (COSTA, 1998; RACCAH et al., 2001; BLANC et al., 2011).

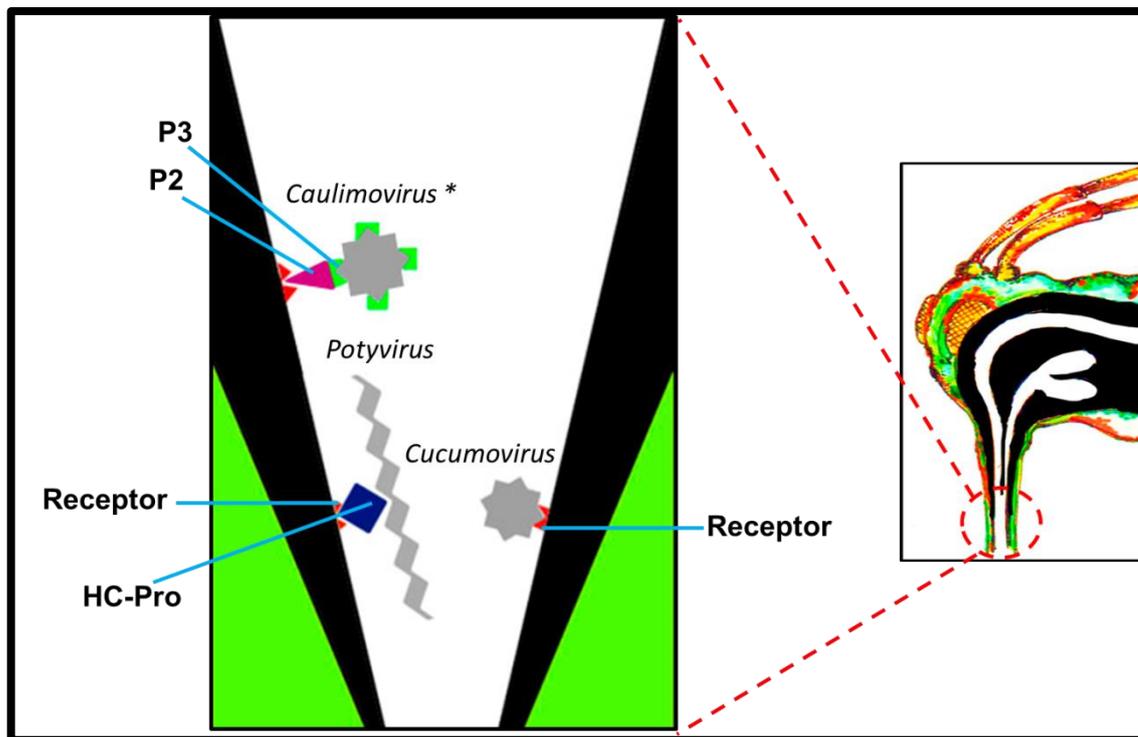


FIGURA 10: Desenho esquemático de um corte longitudinal da porção anterior do estilete de um afídeo e as interações e estratégias envolvidas na transmissão não circulativa, indicando as diferentes proteínas (estruturais e não estruturais) dos vírus e os prováveis receptores localizados na parede do estilete dos afídeos. A estratégia auxiliar (*helper*) está ilustrada com os *Caulimovirus* (proteínas auxiliares P2 e P3) e *Potyvirus* (proteína auxiliar HC-Pro), enquanto que a estratégia de transmissão capsidial (Cap) é exemplificada com os *Cucumovirus*. Figura adaptada de BRAUT et al., 2010. \*Apesar da adesão na ponta do estilete, o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimovirus*) é transmitido de modo semipersistente (BRAGARD et al., 20013).

A primeira evidência de que o componente auxiliar (HC-Pro) se tratava de uma proteína codificada pelo vírus, em vez de um metabólito produzido em resposta da planta à infecção, veio após a demonstração de que esta proteína, expressa pelo *Potato virus Y* (PVY, *Potyvirus*), era sorologicamente diferente do *Tobacco vein mottling virus* (TVMV, *Potyvirus*) (PIRONE; BLANC, 1996). Para que ocorra a intermediação e consequente transmissão é necessário que as partículas virais somente sejam retidas na parede do estilete na presença da HC-Pro. A HC-Pro deve ser adquirida antes ou durante a própria aquisição do vírus. A HC-Pro possui dois domínios funcionais envolvidos na transmissão: (i) KITC (sigla dos aminoácidos lisina-isoleucina-treonina-cisteína), envolvido na ligação da HC-Pro ao receptor do estilete; e (ii) PTK (prolina-treonina-lisina), relacionado à ligação da HC-Pro com a partícula viral no “motivo” DAG (ácido aspártico-alanina-glicina), localizado na região N-terminal da CP (RACCAH et al., 2001). A interação dos “motivos” da CP com os

“motivos” (prováveis receptores) presentes na parede do estilete do afídeo, apresenta elevada especificidade. Portanto, modificações nessas sequências conservadas de aminoácidos acarretarão em perdas na capacidade de transmissão do vírus (COSTA, 1998).

Na interação TVMV-afídeo também foi detectada a perda da capacidade de transmissão quando ocorreu a mudança de lisina por ácido glutâmico na sequência KITC (lisina-isoleucina-treonina-cisteína). Esta substituição, em posição equivalente, também causou a perda de atividade da HC-Pro em isolados de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) e PVY. Outro domínio da HC-Pro que regula a atividade biológica de transmissão é encontrado na metade do terminal carboxílico e consiste da sequência PTK (prolina-treonina-lisina). Em uma estirpe de ZYMV a transmissão por afídeo resultou na perda quase total da atividade da HC-Pro, quando a treonina foi trocada por alanina (T para K) no domínio PTK (COSTA, 1998).

Porém, alguns fatores na interação vírus/vetor devem ser considerados quando se trata da transmissão não persistente. O primeiro fator é o volume de extrato de planta transferido para o hospedeiro, que pode variar de acordo com a capacidade tanto do estilete quanto do lume do canal maxilar, que apresenta capacidade máxima de 60  $\mu\text{m}^3$ . Desta forma, quanto maior a população da espécie de afídeo maior será a eficiência de transmissão (HARRIS; MARAMOROSCH, 1980). Outro fator é o número de partículas virais adquiridas pelo vetor. O vetor deverá adquirir no mínimo 100 partículas virais para que a transmissão não persistente possa ocorrer (PIRONE; THORNBURY, 1988). Entretanto, mais recentemente Moury et al. (2007), avaliando a transmissão de dois variantes de PVY por *Myzus persicae*, mostraram que uma média de 0,5 a 3,2 partículas de vírus foram suficientes para a transmissão, valores estes muito abaixo daqueles encontrados por Pirone e Thornbury (1988).

TABELA 2: Tipos de interações vírus/vetor referentes aos modos de transmissão

Tipo de transmissão	Circulativa		Não circulativa	
	Propagativa	Não propagativa	Não persistente	Semipersistente
Tempo de aquisição	min/h	min/h	s/min	s/h
Tempo de retenção	dias/meses	dias/meses	s/min	min/h
Tempo de inoculação	min/h	min/h	s/min	s/h
Persistência	+	+	-	-
Replicação no vetor	+	-	-	-
Tipo de interação (vírus/vetor)	Interna	Interna	Externa (Cap/HC-Pro)	Externa (Cap-CPm)
Presença na hemolinfa	+	+	-	-
Latência	Semanas	h/dia	-	-
Transmissão transovariana	Frequente	-	-	-

Tabela adaptada de BRAULT et al. (2010)

Legendas: HC-Pro (componente auxiliar); Cap (capsidial); CPm (porção da capa proteica); ausente (-), presente (+)

## 2.6. Aspectos da interação CABMV/afídeos/ambiente

Em condições naturais o CABMV é transmitido de maneira não persistente, ou seja, durante as picadas de prova, por diversas espécies de afídeos (YUKI et al., 2006). No Brasil, as espécies de afídeos descritas como vetoras do CABMV são: *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli, *A. solanella* Theobald, *Toxoptera citricida* Kilkaldy, *Uroleucon ambrosiae* Thomas, *U. sonchi* L. e *Myzus nicotianae* Blackman (COSTA et al., 1995; INOUE et al., 1995). O CABMV também pode ser transmitido durante as práticas culturais como enxertia e poda, utilizando ferramentas de corte contaminadas pelo vírus (ZERBINI; MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, devido às condições ambientais favoráveis, elevadas populações de afídeos permanecem no campo durante os doze meses do ano, colonizando e realizando migrações de plantas da vegetação espontânea (reservatórios) para culturas de importância econômica (CARVALHO et al., 2002). Este fato pode favorecer o aumento da pressão de inoculo de diversas espécies de vírus no campo, causando epidemias (COSTA, 1998). Não há constatação, até o presente momento, de afídeos colonizando plantas de maracujá. Porém, na ausência de um hospedeiro ideal *A. gossypii* e *T. aurantii* já foram relatados colonizando plantas de maracujá (Di PIERO et al., 2006).

Uma forma de se estimar, indiretamente, quais são as espécies que constituem a afídofauna que apresentam potencial de atuarem como vetores de vírus não persistentes no campo é utilizando armadilhas atrativas que refletem os comprimentos de onda na faixa entre 500-600 nm, correspondente às variações de cores verde e amarelo (FERERES et al., 1999). As formas aladas são atraídas por comprimentos de ondas mais longos, inicialmente pelo amarelo e em menor intensidade pelo verde (ILHARCO, 1992). A atração por comprimentos de ondas mais longos foi comprovada por Kennedy et al. (1961), ao realizarem experimento com *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea*). Os autores observaram que os afídeos efetuaram pousos com maior frequência em beterraba (*Beta vulgaris*) e, após medir o comprimento de onda de ambas as culturas, constataram que a beterraba emite um comprimento de onda superior ao observado em couve.

Para a realização desses monitoramentos podem ser utilizados três tipos de armadilhas: (i) bandeja amarela de água (MOERIKE, 1955), utilizada para capturar as espécies aladas de afídeos que fazem revoadas no local; (ii) verde do tipo azulejo (Irwin, 1999), que, por ser mais seletiva, é utilizada para determinar as espécies de afídeos alados envolvidas na transmissão e disseminação de vírus transmitidos de forma não persistente; e (iii) amarela adesiva, utilizada para determinar o comportamento da revoada da afídofauna local (GARCEZ, 2012; KILALO et al., 2013).

O comportamento da reovada da população de afídeos é importante para adotar estratégias de manejo e controle de viroses no campo. Este princípio é válido principalmente para a adoção de estratégias de controle de vírus em culturas onde não há a disponibilidade de variedades com genes de resistência específicos, como é o caso da interação CABMV-maracujá (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; MELLO, 2009; MACIEL et al., 2009). Diversos métodos de controle já foram testados para o CABMV em maracujazeiros no Brasil, sendo que nenhum se mostrou eficiente. Novaes e Rezende (2003b) observaram que a proteção cruzada, utilizando três estirpes fracas do vírus, não foi eficiente no controle do CABMV, provavelmente devido à distribuição irregular e/ou concentração baixa das estirpes fracas nas plantas. Fato que pode ter contribuído para a manutenção de sítios de infecção para as estirpes fortes. A utilização de extratos de cogumelos (*Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes*) reduziram a infectividade do CABMV, quando as folhas foram pré-tratadas em casa de vegetação, para posterior inoculação mecânica do vírus. Porém, constatou-se a não eficiência na proteção quando a transmissão foi realizada por afídeos (DI PIERO et al., 2010). O sucesso do uso de plantas transgênicas de maracujá no controle do CABMV já foi relatado por Alfenas et al. (2005) e Trevisan et al. (2006). No entanto, Alfenas et al. (2005) relataram que as plantas transgênicas obtidas somente foram resistentes ao isolado de CABMV utilizado para a transformação.

Para retardar a infecção do CABMV em plantas de maracujá no campo, preconiza-se a utilização de mudas sadias obtidas em ambientes protegidos e com estágio fenológico avançado (MELETTI, 2010). Essas mudas devem ser produzidas em estufas protegidas com telado antiafídeo, para evitar o contato com os afídeos virulíferos. Além disso, para reduzir a pressão de inóculo local é importante fazer a eliminação de pomares em fim de produção antes de introduzir novo pomar em uma nova área. Preconiza-se também a eliminação de plantas da vegetação espontânea que possam apresentar potencial de atuar como reservatório dos vírus. Cuidados com as podas e desbastes durante os tratamentos culturais também são importantes para evitar a inoculação mecânica do vírus de uma planta infectada para uma sadia (SAMPAIO et al., 2008).

O CABMV também é um vírus de importância na cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), na região nordeste do Brasil (LIMA et al., 2005). Entretanto, a epidemiologia do CABMV é bastante distinta quando comparada com a observada na cultura do maracujá. As principais diferenças são: (i) no maracujazeiro o CABMV não é transmitido por sementes, diferentemente do feijão-caupi, em que a transmissão do CABMV é realizada também por sementes infectadas (KONATE; NEYA, 1996; NARITA; YUKI; PAVAN, 2011); (ii) a entrada do vírus (início da infecção) nos pomares de maracujá ocorre de fora para dentro, ou seja, os afídeos se tornam virulíferos em fontes de infecção primária, provavelmente leguminosas da vegetação espontânea infectada (reservatórios do vírus). Nos cultivos de feijão-caupi, a

chegada do vírus ocorre tanto de dentro para a fora, a partir de sementes infectadas, como de fora para dentro, quando ocorre a migração e consequentes picadas de prova dos afídeos alados virulíferos (ATIRI; LIGAN, 1986); (iii) até o momento não foram desenvolvidas cultivares de maracujá com resistência ao CABMV que também apresentassem características agronômicas adequadas. Isso é reflexo das dificuldades de cruzamentos controlados devido às incompatibilidades genéticas entre as espécies selvagens de maracujazeiro, e também à baixa variabilidade genética entre as cultivares de maracujá-azedo frente à resistência ao CABMV (SANTOS, 2013). Ao contrário, para o feijão-caupi existem cultivares com ambas as características desejáveis: resistência genética ao CABMV e boas características agronômicas (JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012); (iv) o maracujazeiro não é colonizado naturalmente por nenhuma espécie de afídeo, enquanto que o feijão-caupi pode ser preferencialmente colonizado por afídeos da espécie *A. craccivora* (QUINTELA et al., 1991; SOUSA-SILVA; ILHARCO, 1995); (v) o controle químico ou biológico dos afídeos é ineficiente, já que os vetores do CABMV não colonizam o maracujá-azedo. Porém, para o feijão-caupi, como há a colonização das plantas pelos afídeos, o controle químico, principalmente com o uso de piretroides, e a utilização de controle biológico (inimigos naturais adequados) são estratégias que podem reduzir significativamente a disseminação do CABMV (ATIRI; LIGAN, 1986; BELLIURE et al., 2011).

### 3. Objetivos

- Monitoramento da afidofauna visando à descrição da população, distribuição temporal e espacial das espécies de afídeos capturadas utilizando armadilhas de água e adesiva;
- Identificação e estimativa indireta das potenciais espécies de afídeos vetores do CABMV em um pomar de maracujá-azedo variedade 'Sul-Brasil', localizado no município de Parquera-Açu (Vale do Ribeira/ SP);
- Avaliação da resposta da variedade de maracujá-azedo 'Sul-Brasil' utilizando mudas altas e baixas e o seu reflexo epidemiológico frente à sua associação com a afidofauna local, infecção, incidência e disseminação do CABMV;
- Caracterização molecular e análises filogenéticas de diferentes isolados do CABMV, provenientes de maracujá-azedo de regiões produtoras situadas nos estados de São Paulo, Paraná, Goiás e Distrito Federal;
- Avaliação das características físico-químicas e rendimento de frutos de maracujá-azedo da variedade 'Sul-Brasil', obtidos a partir de amostragens realizadas em plantas oriundas de mudas altas e baixas, na presença da virose.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Localização da área experimental

O experimento referente à avaliação da relação da afidofauna com a disseminação do CABMV, em pomar de maracujá-azedo, foi conduzido durante doze meses (de outubro de 2012 a outubro de 2013) na Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), situada no município de Pariquera-Açu (SP), nas coordenadas geográficas de 24°36'41.14"S de latitude, 47°53'8.07"O de longitude e 39 m acima do nível do mar, localizada a 217 km da capital São Paulo (FIGURA 11).

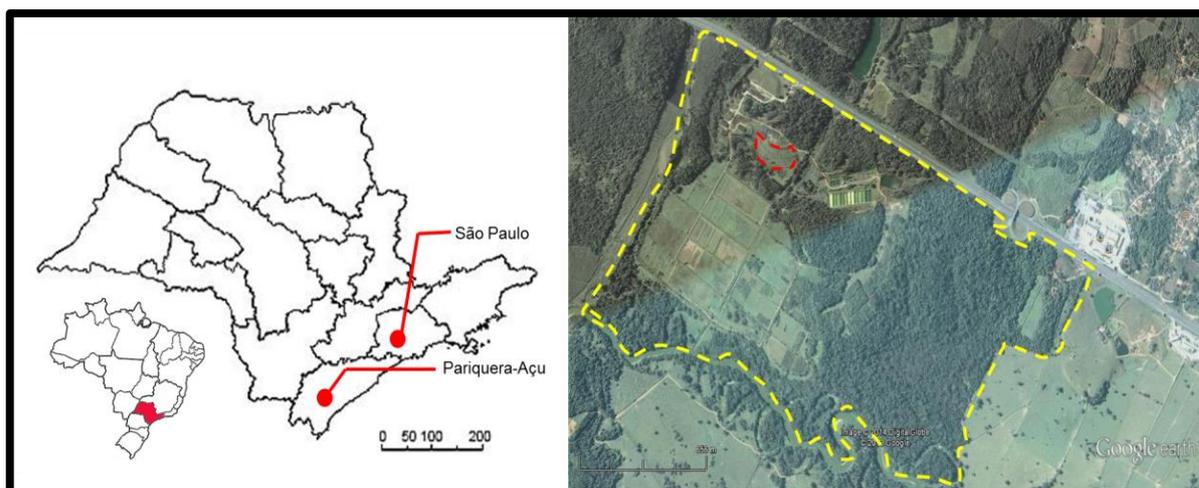


FIGURA 11: À esquerda, no mapa do estado de São Paulo, observa-se a localização do município de Pariquera-Açu em relação ao município de São Paulo. A barra representa a escala para o mapa do Estado de São Paulo, em quilômetros. À direita, na foto aérea da Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), município de Pariquera-Açu, foi delimitada em linha tracejada de amarelo a área correspondente aos limites da fazenda, e em vermelho a localização do campo experimental onde foi implantado o pomar de maracujá-azedo. Fonte: Google Earth.

#### **4.2. Produção e indexação fitossanitária de mudas de maracujá-azedo para implantação do pomar experimental**

As mudas de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas para a implantação e avaliação da área experimental, foram obtidas a partir de sementes da variedade 'Sul Brasil'. A semeadura foi realizada em sacos plásticos de polietileno (15 cm x 30 cm), contendo terra de barranco. Duas a três sementes foram dispostas a uma profundidade de três centímetros e, posteriormente, cobertas com substrato comercial (Plantimax®), sendo, após a germinação, realizado raleio, visando manter apenas uma planta por saco. A adubação foi realizada 10 dias após a emergência das plântulas com 5 gramas de NPK Osmocote® Plus 14-14-14 (liberação lenta). Da fase de semeadura à introdução do pomar no campo, as mudas de maracujá foram mantidas em condição de telado antiafídeo com irrigação por aspersão (FIGURA 12). Para assegurar a integridade fitossanitária das mudas de maracujá, quanto à isenção da infecção pelo CABMV, um telado antiafídeo foi montado no interior de uma casa de vegetação. As mudas utilizadas na área experimental foram obtidas a partir de semeaduras realizadas em dois meses distintos do ano, sendo que em abril de 2012 foi realizada a semeadura para a obtenção das mudas altas (0,80 m a 1,00 m) e, em julho de 2012, foram realizadas as semeaduras para a obtenção das mudas baixas (0,30 m) (FIGURA 12). Antes das mudas serem levadas para campo procedeu-se a indexação por PTA-ELISA utilizando antissoro policlonal específico para a detecção do CABMV. As mudas produzidas no telado foram previamente identificadas pelo sistema de numeração arábico, seguido da letra "A" para mudas altas e "B" para mudas baixas. Esta identificação foi seguida durante a introdução do pomar no campo e mantida até o final do ciclo de produção.



FIGURA 12: (A) Estufa protegida com tela antiáfídeos, instalada no interior de uma casa de vegetação, onde foram produzidas as mudas de maracujá-azedo variedade 'Sul Brasil', localizada na Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Pariquera-Açu, SP. (B) Mudanças altas (80 cm) e baixas (30 cm) prontas para serem levadas ao campo.

### 4.3. Implantação do pomar

O pomar de maracujá-azedo, subdividido em dois tamanhos de mudas [altas "A" (80 cm) e baixas "B" (30 cm)], foi introduzido na área experimental no dia dez de outubro de 2012. Para cada sistema de plantio avaliado ("A" e "B") foram plantadas 200 mudas, das quais somente as 40 mudas centrais de cada tratamento foram monitoradas periodicamente, por PTA-ELISA e inspeção visual dos sintomas, para a detecção do CABMV (vide 4.12.3.2). As mudas foram conduzidas de acordo com as recomendações fitotécnicas da cultura, ou seja, tutoradas com mourões de madeira e arame liso (espaldeira vertical) (FIGURA 13). A área do pomar foi preparada dois meses antes do plantio das mudas, com uma subsolagem, seguida de aplicação de calcário dolomítico e gradagem do solo. As covas de plantio tinham a dimensão de 20 x 50 cm e foram preparadas no mesmo dia do plantio. A adubação de implantação consistiu de 1,5 kg de Itale Flora S<sup>®</sup> (03-03-1,5 + 1,5% Ca, 1% Mg, 2% S, 0,2% Zn, 0,2% B + 50% de matéria orgânica), 0,5 kg de Itale Flora 212<sup>®</sup> (02-12-00 + 9% Ca, 1% Mg, 2% S, 0,2% Zn, 0,2% B + 25% de matéria orgânica) e 100 g de Itale KS<sup>®</sup> (00-00-38 + 9% S + 15% de matéria orgânica). A adubação de formação ocorreu após 30 e 60 dias do

plantio das mudas e consistia de 40 g e 60 g por planta de Itale Nitropot 31<sup>®</sup> (21-00-10), respectivamente, e aos 90 dias foram aplicados 265 g por planta de Itale Nitropot 29<sup>®</sup> (215-00-14). A adubação de produção iniciou-se no mês de março de 2013, com 40 g de sulfato de amônio e 30 g de cloreto de potássio por planta, a cada trinta dias, até o final da safra.

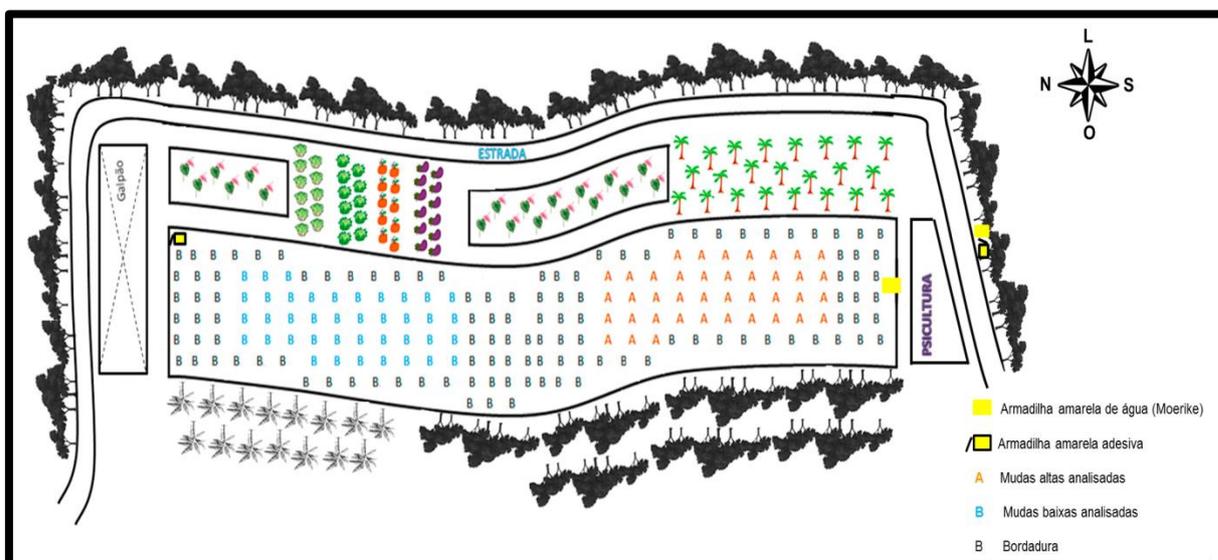


FIGURA 13: Croqui (fora de escala) da área experimental, indicando a localização do pomar de maracujá-azedo 'Sul Brasil' com as mudas baixas à esquerda (azul), e mudas altas à direita (laranja), além do posicionamento das armadilhas utilizadas para a captura dos afídeos. 🌴 - palmito-pupunha; 🌺 - antúrio; 🍆 🍅 🥬 🥦 - horta; 🌿 - germoplasma de banana; 🌳 - mata.

#### 4.4. Compilação dos registros climáticos

Os dados referentes às temperaturas médias e os índices pluviométricos mensais foram obtidos a partir da obtenção do registro das temperaturas diárias (máxima e mínima) e da pluviosidade, fornecidos pela estação meteorológica instalada na Fazenda Experimental do Polo Regional do Vale do Ribeira, distante 300 m da área onde foi implantado o pomar (FIGURA 14).



FIGURA 14: Estação meteorológica, localizada na Fazenda Experimental APTA-Polo Regional Vale do Ribeira.

#### 4.5. Determinação da incidência do CABMV na área monitorada

Para determinar a incidência do CABMV (ID-CABMV), na área experimental, foi utilizada a fórmula proposta por Gibbs (1983), onde:

$$\text{Incidência da doença no campo}\% = \frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número de plantas coletadas}} \times 100$$

As plantas de maracujazeiro foram monitoradas, mensalmente, quanto à presença do CABMV por meio de PTA-ELISA (ver item 4.12.3.2).

#### 4.6. Amostragem das plantas

As coletas de folhas de maracujá, para a detecção do CABMV por PTA-ELISA, iniciaram no mês de novembro de 2012, um mês após a introdução do pomar no campo. Inicialmente, o material vegetal foi amostrado mensalmente e composto por fragmentos da folha apical. A partir do quinto mês (março de 2013), quando o pomar já estava formado, as amostragens passaram a ser realizadas em períodos quinzenais.

As amostragens de folhas para a indexação por PTA-ELISA foram individualizadas e padronizadas para cada planta monitorada. Até o período de quatro meses após a

introdução da cultura no campo foram coletados fragmentos de folhas desenvolvidas a partir do terceiro nó apical. Após o quinto mês, quando as plantas foram induzidas a se bifurcarem para a formação da cortina para iniciar a produção, foram realizadas, em cada ramo desenvolvido, duas amostragens de folhas em pontos equidistantes. Este procedimento de amostragens múltiplas é preconizado para culturas arbustivas, para minimizar resultados falso-negativos, uma vez que os períodos de replicação e distribuição do vírus neste tipo de planta hospedeira pode ser irregular (NUTTER JR., 1997). Para posterior comparação da disseminação do CABMV foram amostradas quarenta plantas de cada sistema de plantio (mudas altas e baixas), totalizando oitenta análises sorológicas mensais. Simultaneamente a estas avaliações, as plantas de maracujá das bordaduras também foram amostradas e analisadas por PTA-ELISA.

#### **4.7. Amostragem de afídeos alados**

Para a realização da amostragem (captura) e o monitoramento da afídofauna local foram utilizadas armadilhas amarelas adesivas comerciais (BIOTRAP<sup>®</sup>) e bandejas amarelas com água (MOERICKE, 1955). O levantamento dos afídeos iniciou-se juntamente com a introdução do pomar de maracujá no campo e as amostragens para a detecção do CABMV. Todas as amostragens vegetais e coleta de armadilhas foram realizadas mensalmente. O monitoramento da atividade de voo e classificação das espécies de afídeos foram conduzidos pela fixação de armadilhas de *Moericke*. As armadilhas adesivas amarelas foram utilizadas para determinar os períodos de picos de revoadas de afídeos, sem discriminar as espécies. As armadilhas de *Moericke* foram confeccionadas em bandejas plásticas (35,0 cm x 30,0 cm de área/ 7,0 cm de altura), pintadas com tinta sintética amarela em seu interior e marrom no seu exterior. Estas armadilhas foram depositadas sobre suporte metálico a 20 centímetros de altura do solo, sendo uma delas fixada na face Sul do pomar de maracujá e outra na faixa de transição da Mata Atlântica que circunda a face Sul da área experimental (FIGURA 15).



FIGURA 15: Armadilhas amarelas utilizadas para captura de afídeos alados. Do lado esquerdo, armadilhas de água de *Moericke* e à direita armadilha amarela adesiva, ambas foram instaladas no pomar de maracujá-azedo e também na mata próxima ao experimento.

Para a manutenção das armadilhas de água, estas foram completadas periodicamente com uma solução contendo água, detergente comercial e formol (10%). Em cada período de avaliação, o conteúdo das bandejas foi vertido para frascos de vidro com tampa plástica e devidamente identificados quanto à data de coleta. Para prolongar o período de conservação dos insetos capturados e posterior triagem e identificação dos afídeos, o conteúdo de cada frasco foi completado com álcool etílico 70%.

As armadilhas amarelas adesivas utilizadas apresentavam área de contato com dimensão de 11,0 cm x 20 cm, com ambas as faces impregnadas com cola, e foram afixadas em haste metálica a 80 cm de altura em relação ao solo e posicionadas na face Norte do pomar experimental de maracujá e também na área de Mata Atlântica. Estas armadilhas foram recolhidas, acondicionadas em filme plástico transparente, devidamente identificadas quanto à data de coleta e mantidas em geladeira para posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, ser feita a contagem do número de espécimes de afídeos capturados (FIGURA 15).

#### 4.8. Identificação das espécies de afídeos alados capturados em armadilhas de Moericke

Para a determinação da afidofauna da área amostrada, o conteúdo total de insetos capturados nas armadilhas de Moericke foi triado, sendo os espécimes de afídeos separados para posterior identificação. A classificação foi realizada utilizando chaves dicotômicas específicas para espécies de afídeos (CHANEY; LEE, 1992, EASTOP et al., 1993; COSTA et al., 1993; BLACKMAN; EASTOP, 2000). Os caracteres morfológicos utilizados para diferenciação das espécies de afídeos alados capturadas seguiram o preconizado por Costa et al. (1993), que consideram: (i) coloração e manchas das regiões dorsais e ventrais; (ii) tamanho, coloração e forma do sifúnculo e região terminal da cauda; (iii) conformação das asas; (iv) inserção, tamanho e número dos segmentos de antena; e (v) número de cerdas caudais. Após a identificação, os exemplares das espécies identificadas foram quantificados, registrados e acondicionados em microtubos contendo álcool etílico (70%) e devidamente identificados com a data de coleta, local e tipo de armadilha utilizado.

#### 4.9. Análise descritiva da afidofauna alada identificada na área monitorada

Para determinar a diversidade específica das espécies de afídeos alados capturados na área monitorada, utilizaram-se os dados obtidos em armadilhas de *Moericke*. O método utilizado para a determinação da diversidade o índice de Shannon (1948).

$$H' = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Onde:

$p_i = n_i/N$  (densidade da espécie na amostra),  $n_i$  = Número de indivíduos da espécie  $i$ ,  $N$  = número total de indivíduos.

As escalas adotadas para expressar os valores de diversidade foram:  $H' > 3,0$  (alta diversidade);  $3,0 \geq H' \geq 2,0$  (média diversidade);  $2,0 \geq H' \geq 1,0$  (baixa diversidade).

Para estimar o comportamento biológico individual de cada espécie de afídeo, dentro da comunidade avaliada, aplicaram-se os índices de ocorrência, dominância e classificação

geral (*status*) (ABREU; NOGUEIRA, 1989). Para tanto, foi considerado o número estimado de afídeos alados por m<sup>2</sup>, capturados nas armadilhas de *Moericke*.

$$\text{Ocorrência} = \frac{Nc''sp''}{Nt''c''} \times 100$$

**Espécie acidental: 0% a 25%**

**Espécie acessória: 26% a 50%**

**Espécie constante: 51% a 100%**

Onde:

**Nc "sp"** (número de coletas onde foi registrada a espécie avaliada); **Nt "c"** (número total de coletas realizadas).

$$\text{Dominância} = \frac{Ni''sp''}{Nt''ic''} \times 100$$

**Espécie acidental: 0% a 2,5%**

**Espécie acessória: 2,6% a 5,0%**

**Espécie dominante: 5,1% a 100%**

Onde:

**Ni "sp"** (número de indivíduos da mesma espécie/m<sup>2</sup>); **Nt "ic"** (número total de indivíduos coletados/m<sup>2</sup>); Os valores são referentes à somatória das espécies de afídeos/m<sup>2</sup> no trimestre referente à cada estação do ano (primavera, verão, outono e inverno).

A classificação geral ou *status* das espécies que compõem a afidofauna amostrada foi obtida combinando os índices de ocorrência e dominância, de acordo com o descrito por Abreu e Nogueira (1989) (TABELA 3).

TABELA 3: Classificação geral (ou *status*) das espécies de afídeos de acordo com a combinação dos índices de ocorrência e dominância

Ocorrência	Dominância	Classificação Geral
Constante	Dominante	Espécie comum
Constante	Acessória	Espécie intermediária
Acessória	Acidental	Espécie intermediária
Constante	Acidental	Espécie intermediária
Acessória	Acessória	Espécie intermediária
Acessória	Dominante	Espécie intermediária
Acidental	Acidental	Espécie rara

#### 4.10. Índice de Jaccard

O índice de *Jaccard* foi obtido por meio do método de associação de médias (*arithmetic average clustering* ou UPGMA), que calcula a média aritmética da similaridade do objeto a ser incluído no grupo com cada um dos outros objetos do grupo (VALENTIN, 2000). Para o teste foi utilizado o pacote *Vegan* do programa R versão 3.0.2, e a montagem da matriz no programa do pacote office (Excel). Os comandos utilizados para a análise no programa foram:

```
teste <- read.csv("Excel.csv", header = T, row.names = 1, sep = ";")
```

Onde:

**teste**: é o nome que deseja dar à sua matriz; e **Excel.csv**: é o nome da matriz salva no formato csv.

```
clust_teste <- vegdist(teste, method = "jaccard")
```

Onde:

**teste**: é o nome atribuído à matriz na formula anterior; e **clust\_teste**: é o nome atribuído para o teste de *Jaccard*.

```
plot(hclust(clust_teste, method = "average"), hang = -1)
```

Onde:

**clust\_teste**: é o nome atribuído para o teste de *Jaccard* na formula anterior.

#### 4.11. Correlação de Pearson

A correlação de Pearson foi calculada a partir da fórmula descrita abaixo, utilizando como variáveis as temperaturas médias e pluviosidades totais mensais que foram correlacionadas com o número total de cada espécie capturada, sendo as correlações classificadas de acordo com a tabela 4.

$$r_{xy} = \frac{\sigma_{xy}}{\sqrt{\sigma_x^2 \times \sigma_y^2}}$$

Onde:  $\sigma_{xy}$  (estimador da variância entre as variáveis x e y);  $\sigma_x^2$  (estimador da variância da variável x); e  $\sigma_y^2$  (estimador da variância da variável y).

TABELA 4: Classificação dos coeficientes de correlações

<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>Correlação</b>
$r = 1$	Perfeita positiva (Pp)
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva (Fp)
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva (Mp)
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva (Fp)
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva (Ip)
0	Nula (N)
$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa (In)
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa (Fn)
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa (Mn)
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa (Fn)

Fonte: Figueredo Filho e Silva Junior (2009)

## 4.12. Identificação e caracterização dos isolados de CABMV

### 4.12.1. Coleta e preservação das amostras de folhas de maracujá infectadas

Para a realização dos estudos de identificação e caracterização dos isolados de CABMV, provenientes das amostragens realizadas no campo experimental situado em Pariquera-Açu, e posterior comparação com os isolados já descritos no Brasil e no mundo, folhas de maracujazeiros com sintomas de mosaico e deformação foram coletadas, desidratadas e armazenadas em presença de cloreto de cálcio a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas amostras, devidamente armazenadas, foram utilizadas nos ensaios biológicos de transmissão mecânica para diferentes plantas hospedeiras indicadoras, identificação sorológica e caracterização molecular.

#### 4.12.2. Transmissão mecânica

O extrato vegetal foi preparado através da trituração das folhas de maracujá-azedo infectadas, em presença de solução sulfito de sódio 0,5%, pH 6,0 na proporção de 1:5 (g/ml), adicionando-se carborundum (400 mesh) como abrasivo (SILVA, 2012) e inoculado em plantas de maracujá-azedo 'Sul-Brasil', 'IAC-275' e em feijão-de-porco. Os controles constaram de plantas da mesma espécie e da mesma idade, cujas folhas foram friccionadas apenas com sulfito de sódio 0,5% e carborundum (400 mesh). Após a inoculação as plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação.

#### 4.12.3. Análises sorológicas

##### 4.12.3.1. Adsorção de antissoro

Para a detecção sorológica do CABMV, realizou-se, previamente, a adsorção do antissoro em folhas sadias de *C. ensiformes* para evitar reações cruzadas decorrentes do reconhecimento de proteínas da planta como antígeno. Folhas sadias de *C. ensiformes* foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, acrescido de "tween 20" (5%) e polivinilpirrolidona (PBSTPo) na proporção 1:10 (g/mL). Acrescentou-se, ao extrato obtido, o antissoro na proporção 1:2000 (antissoro/extrato) seguido de um período de incubação a 37°C por uma hora. Após esta fase, o extrato foi submetido à centrifugação, o sobrenadante foi coletado, e ao volume final acrescentou-se 0,5% de soro albumina bovina (BSA).

##### 4.12.3.2. *Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA)*

Para a detecção do CABMV foi utilizado 0,1 g de folhas de maracujá-azedo coletadas de cada amostra foi triturada em tampão carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 (1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub> para 500 mL de água destilada) na proporção 1:10 (g/mL). Folhas de maracujazeiros sadios, mantidos em casa de vegetação com tela antiáfideo, foram utilizadas como controle negativo. O controle positivo foi constituído de folhas com sintomas, provenientes de plantas de maracujá inoculadas mecanicamente com

um isolado de CABMV, previamente identificado e mantido em casa de vegetação. Tanto as amostras quanto os controles foram aplicados com um volume padronizado de 50 µL em placas de ELISA e incubados a 37°C por 2h. Após a sensibilização da placa com o antígeno, procedeu-se a lavagem (3X) com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4 acrescido de 0,05% de Tween 20<sup>®</sup> (PBST). Em seguida, foram aplicados 50µL do antissoro adsorvido contra o CABMV, para cada amostra (AS-CABMV) Em seguida, realizou-se incubação seguida da lavagem (3X), como descrito anteriormente, aplicando para cada amostra 50 µL de anticorpo (anticoelho) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma<sup>®</sup>), diluído na proporção de 1:30000 em PBSTPo. Novamente a placa foi submetida à incubação e lavagem (3X), seguida da aplicação do substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma<sup>®</sup>), diluído em tampão substrato pH 9,8 (9,7ml de dietalonamina + 0,02 g de cloreto de magnésio + 0,02 g de azida sódica em 100 ml de água destilada). Após 30 minutos foram realizadas as leituras de absorbância das amostras aplicadas na placa utilizando o aparelho *Microplate Reader 3550-UV* (Bio-Rad), com comprimento de onda selecionado em 405 nm. Foram consideradas positivas as amostras com leitura três vezes superior à média das leituras do controle negativo (CLARK; ADAMS, 1977).

#### **4.12.4. Análises moleculares**

##### **4.12.4.1. Extração de RNA**

A extração de RNA total foi feita a partir de 0,1 g de folha infectada de maracujá-azedo de diferentes regiões (TABELA 5 e FIGURA 16), com auxílio de almofariz e pistilo (previamente esterilizados), e adicionando-se nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>); o material foi triturado até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida adicionou-se 1 mL do produto comercial TRizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). As amostras foram vertidas em microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses), devidamente identificados e incubados durante 5 minutos. Em seguida adicionaram-se 200 µL de clorofórmio, submetendo os tubos à agitação vigorosa em *vortex*. As amostras foram então incubadas por mais 3 minutos e submetidas à centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C. Em seguida transferiu-se o sobrenadante para tubos novos (microtubos 1,5 mL e livres de RNAses), adicionaram-se 500 µL de álcool isopropílico, que foram homogeneizados por inversão, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Em seguida, os tubos

permaneceram por 15 minutos a temperatura ambiente para a total evaporação do álcool. O conteúdo precipitado foi ressuspensionado em 40 µL de água DEPC e mantido a -20°C.

TABELA 5: Listagem dos isolados de CABMV de maracujá-azedo, coletados em diferentes regiões produtoras de maracujá, região do genoma sequenciado e códigos das sequências depositadas no *GenBank*

<b>Código no GenBank</b>	<b>Região do genoma</b>	<b>Localidade do isolado</b>
KC777406	CP	São José da Boa Vista-PR
KC777407	CP	Planaltina-DF
KC777401	CP	Adamantina-SP
KC777402	CP	Jacupiranga-SP
KC777403	CP	Fernão-SP
KC777404	CP	Alvinlândia-SP
KC777400	CI	Urutaí-GO
KC777399	CI	Ibaiti-PR
KC777398	CI	São José da Boa Vista-PR
KC777397	CI	Monte Alegre do Sul-SP
KC777396	CI	Jacupiranga-SP
KC777395	CI	Fernão-SP
KC777394	CI	Garça-SP
KC777393	CI	Alvinlândia-SP
KC777392	CI	Campinas-SP
KC777391	CI	Adamantina-SP
KC777390	CI	Bauru-SP
KC777389	CI	Planaltina-DF

CP- capa proteica; CI- Inclusão cilíndrica.

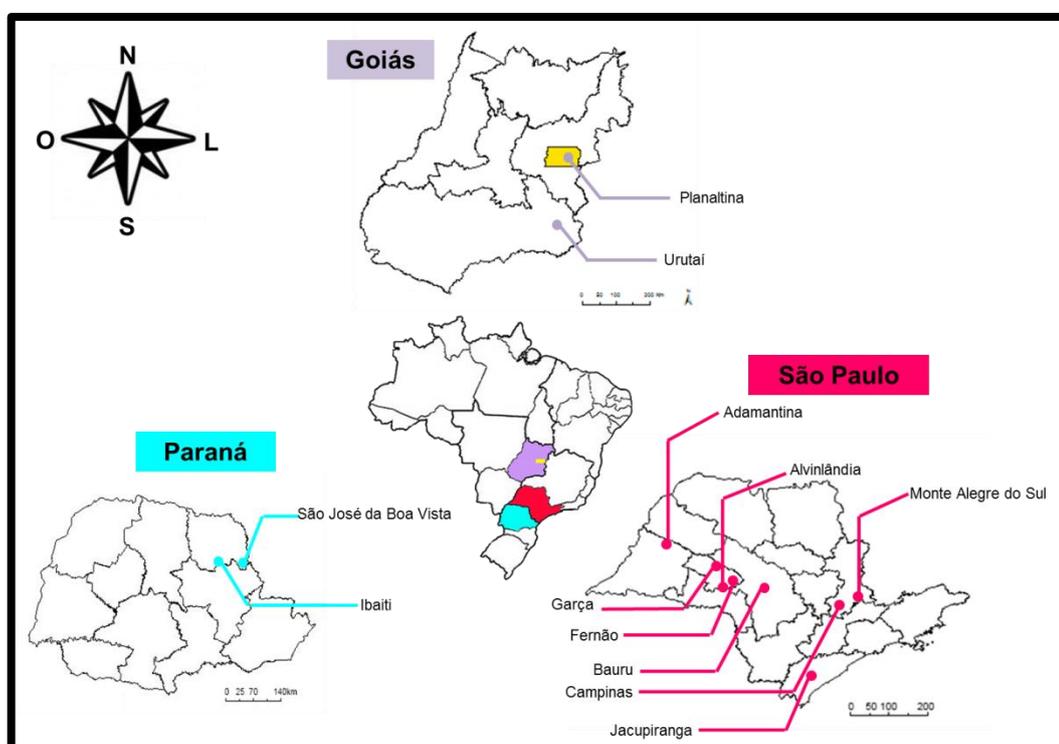


FIGURA 16: Mapa do Brasil com destaque para os estados de São Paulo (vermelho), Paraná (azul), Goiás (roxo) e Distrito Federal (amarelo) e a localização de cada cidade nos seus respectivos estados de onde foram sequenciados isolados de CABMV de maracujazeiro no presente trabalho.

#### 4.12.4.2. RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)

Para a RT-PCR foram utilizados 3  $\mu\text{L}$  de RNA total, os quais foram transferidos para microtubos contendo 1  $\mu\text{L}$  (50 pmoles/mL) do oligonucleotídeo (*primers*) complementar. Os tubos foram incubados a 70°C por 3 minutos e colocados imediatamente em gelo. Em seguida, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de tampão (5x) da enzima transcriptase reversa (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs, 2,5 mM) e 200 u/ $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{L}$ ) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega). Esta mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C.

Para as reações de PCR foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  (5 u/ $\mu\text{L}$ ) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 5  $\mu\text{L}$  de tampão (10x), recomendado pelo fabricante, 1  $\mu\text{L}$  de cloreto magnésio (50 mM), dNTPs (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  dos *primers* (50 pmoles/mL) (TABELA 6). As amostras foram amplificadas em termociclador PTC100 (MJ Research) e as condições para amplificação da CP foram: 3min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30s a 94°C, 1min a 55°C, 2 min a 72°C, com uma extensão final de 10min a 72°C. Para amplificação dos fragmentos correspondentes da CI as condições foram: 5min a 92°C, seguidos de 40 ciclos de 50s a 92°C, 1min a 54°C, 1min e 30s a 72°C, com uma extensão final de 5min a 72°C (FIGURA 17). Após as amplificações, os fragmentos de DNA foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

TABELA 6: Iniciadores utilizados como *primers* nas reações de RT-PCR

Porção genômica	Primer	Sequência dos primers	Fragmento esperado	Referência
CP	Oligodt50-PacIM10 (c)	5' aagcagtgttatcgagattaattaaT <sub>(50)</sub> 3'	-	NICOLINI et al. (2011)
	M10 (c)	5' aagcagtgttatcaacgcaga 3'	1700 pb	CHEN et al. (2001)
	S-primer (h)	5' ggxaayaayagyggxazcc 3'		
CI	CI-Rev (c)	5' acicrtytcdatdatrttigitgc 3'	700 pb	HA et al. (2008)
	CI-For (h)	5' ggivvigtiggiwsiggiartaaciac 3'		

(c) – complementar; (h) – homólogo

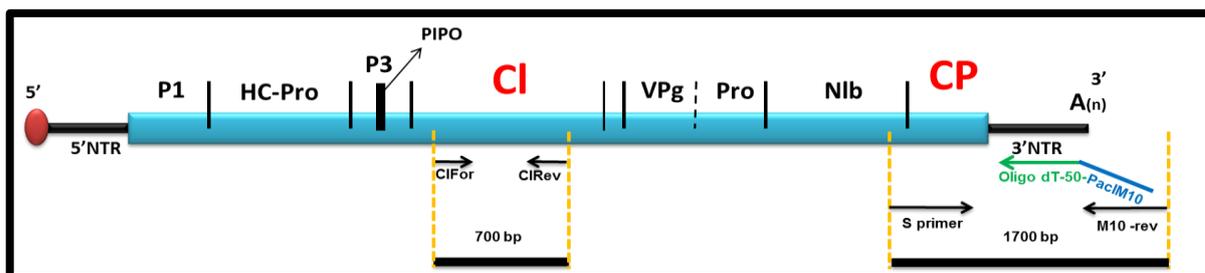


FIGURA 17: Organização do genoma do CABMV com a localização das regiões de anelamento dos primers: da capa proteica – CP (Oligo dT-50-PacIM10; S primer e M10-rev), que permitem a amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 1500 pares de bases; e da inclusão citoplasmática cilíndrica – CI (CIFor e CIRev), que permitem a amplificação de fragmentos de cerca de 700 pares de bases.

#### 4.12.4.3. Sequenciamento automático de DNA

Os produtos de DNA amplificados via RT-PCR foram eluídos de géis de agarose com o kit Concert™ Rapid Gel (GIBCO BRL®), precipitados e ressuspendidos em água estéril, de acordo com a recomendação dos fabricantes. Os produtos de DNA purificados foram submetidos a sequenciamento direto pelo método de terminação em cadeia (SANGER et al., 1977), utilizando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) e o sequenciador ABI 377 – ABI Prism/Applied Biosystems, conforme instruções do fabricante.

#### 4.12.4.4. Análises das sequências de DNA e filogenia

As sequências da capa proteica (CP) dos isolados caracterizados neste trabalho foram comparadas com outras sequências já depositadas no *GenBank* (TABELA 7), com o auxílio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa BioEdit 7.2.0. As árvores filogenéticas foram preparadas através do programa PAUP 4.0b10, utilizando os métodos de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV). A árvore da CP teve como modelo estatístico TRN+G (G= 0,5689) com as seguintes frequências de bases: f(A)=0,33, f(C)=0,18, f(T)=0,26 e f(G)=0,21. A árvore da CI foi construída com base no modelo estatístico HKY+I com as frequências de bases f(A)=0,33, f(C)=0,21, f(G)=0,20, f(T)=0,26. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap* com 1.000 replicações. O grupo externo adotado foi de um isolado do *Passion woodiness virus* (PWV).

TABELA 7: Isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) utilizados nas análises filogenéticas, os códigos de acesso no *GenBank*, a região do genoma analisada e a origem

<b>Código no GenBank</b>	<b>Região do genoma</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Localidade do isolado</b>
DQ397525	CP	<i>Passiflora edulis</i>	Areia Vermelha-MG
HQ880243	CP/CI	<i>P. edulis</i>	Minas Gerais
DQ397526	CP	<i>P. edulis</i>	Bonito-PE
HQ880242	CP/CI	<i>Arachis hypogaea</i>	Brasil
JF833418	CP	<i>Vigna unguiculata</i>	Macaíba- RN
JF833417	CP	<i>V. unguiculata</i>	Macaíba- RN
JF833419	CP	<i>V. unguiculata</i>	São Lourenço da Mata-PE
JF833422	CP	<i>V. unguiculata</i>	São Lourenço da Mata-PE
AF348210	CP/CI	<i>V. unguiculata</i>	Zimbabwe, África
X82873	CP	<i>V. unguiculata</i>	Zimbabwe, África
JF427592	CP	<i>V. unguiculata</i>	Austrália
DQ397530	CP	<i>P. edulis</i>	Vera-Cruz-SP
DQ397529	CP	<i>P. edulis</i>	Venda Nova do Imigrante-ES
DQ397531	CP	<i>P. edulis</i>	Parapuã-SP
AY253911	CP	<i>P. edulis</i>	Neópolis-SE
AY253910	CP	<i>P. edulis</i>	Conde-PB
DQ397528	CP	<i>P. edulis</i>	Itaberaba-BA
DQ397527	CP	<i>P. edulis</i>	Alhandra-BA
DQ397532	CP	<i>P. edulis</i>	Brasília-DF
KC777406*	CP	<i>P. edulis</i>	São José da Boa Vista-PR
KC777407*	CP	<i>P. edulis</i>	Planaltina-DF
AY433950	CP	<i>P. edulis</i>	Vera-Cruz-SP
KC777401*	CP	<i>P. edulis</i>	Adamantina-SP
KC777402*	CP	<i>P. edulis</i>	Jacupiranga-SP
KC777403*	CP	<i>P. edulis</i>	Fernão-SP
KC777404*	CP	<i>P. edulis</i>	Alvinlândia-SP
AY434454	CP	<i>P. edulis</i>	Alta Paulista-SP
AY433951	CP	<i>P. edulis</i>	Vera-Cruz-SP
KC777400*	CI	<i>P. edulis</i>	Urutaí-GO
KC777399*	CI	<i>P. edulis</i>	Ibaiti-PR
KC777398*	CI	<i>P. edulis</i>	São José da Boa Vista-PR
KC777397*	CI	<i>P. edulis</i>	Monte Alegre do Sul-SP
KC777396*	CI	<i>P. edulis</i>	Jacupiranga-SP
KC777395*	CI	<i>P. edulis</i>	Fernão-SP
KC777394*	CI	<i>P. edulis</i>	Garça-SP
KC777393*	CI	<i>P. edulis</i>	Alvinlândia-SP
KC777392*	CI	<i>P. edulis</i>	Campinas-SP
KC777391*	CI	<i>P. edulis</i>	Adamantina-SP
KC777390*	CI	<i>P. edulis</i>	Bauru-SP
KC777389*	CI	<i>P. edulis</i>	Planaltina-DF

CP – capa proteica; CI – inclusão cilíndrica; \* - isolados sequenciados neste trabalho.

#### 4.12.4.5. Análises de recombinação

As sequências utilizadas na construção das árvores filogenéticas, para ambas as regiões do genoma (CP e CI), foram submetidas às análises de recombinação, utilizando o programa RDP 3 ALPHA 4 (MARTIN et al., 2010).

#### 4.12.5. Análises das características físico-químicas dos frutos produzidos das plantas oriundas de mudas altas e baixas

Para as análises físico-químicas dos frutos de maracujá-azedo variedade ‘Sul-Brasil’, empregou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado composto por dois tratamentos (plantas oriundas de mudas altas e baixas), sendo cada tratamento composto de dez repetições. Para a realização dessas análises, os tratamentos foram subdivididos em cinco linhas de plantio, sendo cada linha composta por duas repetições, e cada repetição composta de um metro de linha plantada. Os frutos foram coletados duas vezes por semana, durante o mês de junho de 2013, oito meses após o plantio (FIGURA 18). Após a amostragem, os frutos foram avaliados quanto às seguintes características: (i) peso de polpa; (ii) peso de fruto; e (iii) rendimento de fruto. A pesagem (em gramas) dos frutos foi realizada logo após a sua colheita. Após a pesagem, os frutos foram despulpados, sendo obtido o peso de polpa sem sementes (em gramas). O rendimento do fruto foi calculado dividindo o valor total de peso da polpa sem sementes pelo valor total do peso dos frutos.

As avaliações de acidez titulável total (ATT), teor de sólidos solúveis totais (°brix) e pH foram realizadas no Laboratório de Fitossanidade da Faculdade Integral Cantareira. Os dados foram computados e para a realização da ANOVA foi utilizada a média de cada repetição. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de análise estatística *Assistat 7.7 beta*.

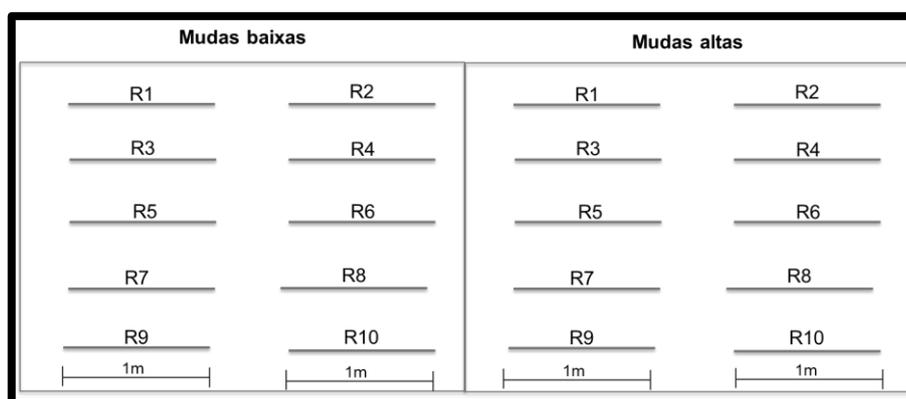


FIGURA 18: Croqui representativo (sem escala) da distribuição das repetições de cada tratamento dentro do pomar experimental de maracujá-azedo, para avaliação dos parâmetros físico-químicos e rendimento de frutos.

#### 4.12.5.1. Acidez total titulável (ATT)

Os frutos de maracujá foram despulpados e, após a extração com o auxílio de um aparelho de homogeneização (*mixer*), obteve-se um suco que, após a filtragem em peneira fina, foi diluído em uma proveta graduada na proporção 1:10 (10 mL de suco da amostra : 90 mL de água destilada). O filtrado obtido foi então reservado em duas partes iguais para a realização de repetições. Por gotejamento, foram acrescentadas três gotas de fenolftaleína em cada repetição. Com o auxílio de uma bureta foi titulado cuidadosamente ao suco extraído + fenolftaleína a solução de NaOH 1 N, com agitação vigorosa constante até ocorrer a viragem de cor da solução para róseo (PREGNOLLATTO; PREGNOLLATTO 1985). Após a titulação anotou-se o valor de NaOH utilizado e aplicou-se a fórmula:

$$AT = \frac{VxNx 100}{P} x M$$

Onde:

**AT:** porcentagem de acidez titulável de ácido cítrico (%);

**V:** volume de NaOH utilizado (mL);

**N:** normalidade da solução de NaOH;

**P:** massa (g) ou volume (mL) de cada amostra inicial;

**M:** miliequivalente ácido cítrico anidro, neste caso 0,064.

#### 4.12.5.2. Determinação do pH e sólidos solúveis totais (SST)

O pH foi mensurado com o auxílio do aparelho *Digimed DM 20*, utilizando a polpa de frutos de maracujá *in natura*, previamente preparada para a realização da acidez titulável (índice 4.12.5.1).

Para a obtenção dos sólidos solúveis (°Brix), uma gota do suco da polpa de maracujá concentrado foi aplicada ao refratômetro (varia na faixa de 0-32, ideal para frutas) para se efetuar a leitura. Todos os dados obtidos, para cada amostragem, foram devidamente anotados.

Após as medições do pH, da acidez titulável e sólidos solúveis totais foi determinado também o *Ratio*, utilizando a fórmula:

$$Ratio = \frac{SS}{AT}$$

## 5. Resultados

### 5.1. Incidência e classificação das espécies de afídeos

Durante os meses monitorados de novembro de 2012 a dezembro de 2013, utilizando armadilha amarela de *Moericke*, foi possível estimar uma revoada absoluta de 9.114 espécimes de afídeos alados por m<sup>2</sup> do pomar sobre a área cultivada por maracujá-azedo. Com o auxílio de chaves de identificação (ver item 4.8) foi constatado que as revoadas foram compostas por dezesseis espécies de afídeos pertencentes a dez gêneros distintos. As espécies identificadas foram: *Aphis fabae* (Scopoli), *Aphis craccivora* (Koch), *Aphis gossypii* (Glover), *Aphis nasturtii* (Kaltenbach), *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe), *Aphis spiraecola* (Patch), *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), *Brevicoryne brassicae* (Linné), *Hyperomyzus lactucae* (Linné), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Myzus persicae* (Sulzer), *Pemphigus* spp., *Pentalonia nigronervosa* (Coquerel), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe), *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Uroleucon ambrosiae* (Thomas).

De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo índice de *Shannon*, foi obtido um valor de diversidade (H') de 0,977, indicando uma baixa diversidade de revoadas de espécies de afídeos sobre a cultura do maracujá, presentes na área monitorada (ITEM 4.9). Na armadilha fixada na mata não foi registrada a captura de afídeos alados. Quando avaliadas as correlações da temperatura e pluviosidade que interferiram na afidofauna, pôde-se observar que somente a temperatura média atuou de forma fraca negativa na dinâmica populacional local, enquanto que a pluviosidade não foi um fator limitante, uma vez que se caracterizou como ínfima positiva (FIGURA 19).

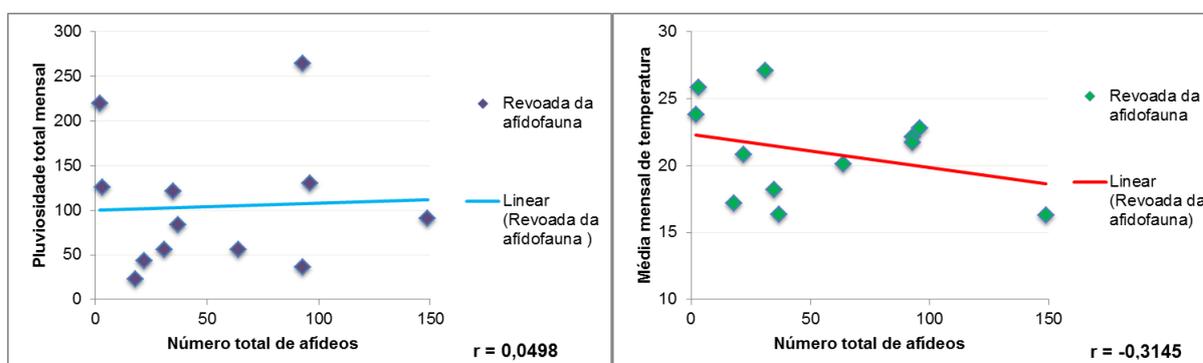


FIGURA 19: Correlação entre o total de espécimes capturadas no período e as respectivas temperaturas médias e pluviosidade total mensal

Das espécies capturadas, 50% apresentam hábito polífago (*A. craccivora*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *A. solani*, *M. euphorbiae*, *M. persicae* e *T. aurantii*) e 50% apresentam hábito oligófago (*A. nerii*, *B. brassicae*, *H. lactucae*, *Pemphigus* spp., *P. nigronevosa*, *T. citricidus* e *U. ambrosiae*).

Para a determinação da dinâmica populacional e descrição temporal da população de afídeos que sobrevoaram a cultura, os períodos de avaliação foram divididos de acordo com as quatro estações do ano: (i) verão, de janeiro a março de 2013; (ii) outono, de abril a junho de 2013; (iii) inverno, de julho a setembro de 2013; e (iv) primavera, de outubro a novembro de 2013.

Por meio da compilação dos resultados do comportamento de revoadas da afidofauna sobre o pomar de maracujá, foi evidenciado que sete espécies se caracterizaram como intermediárias (1.343 espécimes/ m<sup>2</sup> correspondendo a 22,55%), três espécies foram comuns (4.324 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 72,5%) e seis espécies foram raras (295 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 4,95%) (FIGURA 20).

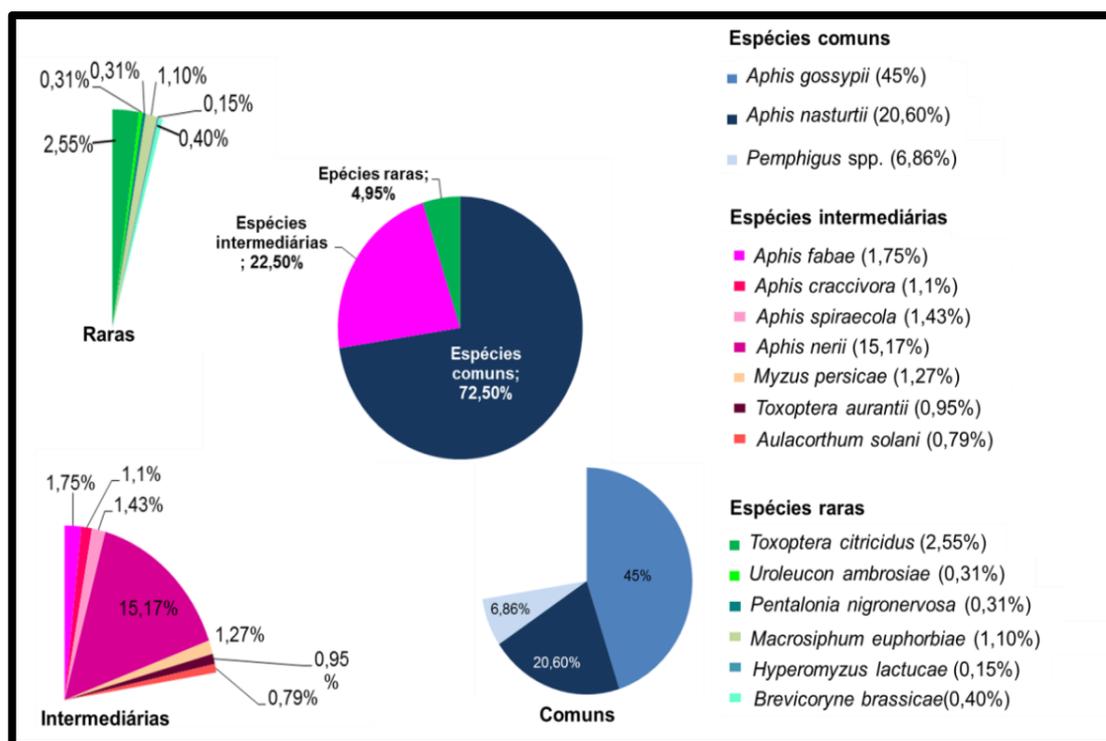


FIGURA 20: Porcentagem total de espécies de afídeos em cada classificação (comum, intermediária e rara) e a porcentagem correspondente a cada espécie de acordo com sua classificação geral.

Somando os quatro períodos avaliados, o gênero *Aphis* foi o mais abundante, totalizando 5.076 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 85,15% do total da população de afídeos

estimada. A maior revoada deste gênero foi verificada no inverno, quando foram capturadas 1.647 espécimes aladas.

*Aphis gossypii* foi capturada em todos os meses monitorados totalizando 2.686 espécies/m<sup>2</sup>, correspondendo a 53% da população do gênero *Aphis* no período. Esta condição permitiu classificar *A. gossypii* como espécie comum nas quatro estações do ano, na área monitorada (TABELA 8). No entanto, foi no período de outono que esta espécie realizou as maiores revoadas (1.229 espécimes/m<sup>2</sup>), que correspondeu a 46% do total de exemplares identificados de *A. gossypii*. Por meio das análises de *Pearson*, foi observada uma correlação positiva no comportamento populacional desta espécie para os parâmetros abióticos avaliados (T°/Fp; Pluv/lp) (TABELA 9). Estes resultados permitiram concluir que os fatores abióticos considerados não interferiram negativamente na dinâmica populacional de *A. gossypii*. Apesar de se constatar que as correlações ambientais também foram positivas para *A. nerii* (T°/Fp; Pluv/Fp), esta espécie foi classificada como intermediária na classificação geral, sendo caracterizada como rara no verão e inverno, intermediária no outono e comum na primavera (TABELA 8 e TABELA 9). Durante o período de monitoramento, foram capturados 905 espécimes/m<sup>2</sup> que correspondeu a 17,82% do gênero *Aphis*. No entanto, a maior revoada de *A. nerii* foi registrada na primavera (847 espécimes/m<sup>2</sup>, 93,59%).

TABELA 8: Classificação geral (ou *status*) das espécies de afídeos capturadas

Espécies	Estações				Ano/2013
	Verão	Outono	Inverno	Primavera	
<i>Aphis craccivora</i>	Rara	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária
<i>Aphis fabae</i>	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária
<i>Aphis gossypii</i>	Comum	Comum	Comum	Comum	Comum
<i>Aphis nasturtii</i>	Intermediária	Intermediária	Comum	Intermediária	Comum
<i>Aphis nerii</i>	Rara	Intermediária	Rara	Comum	Intermediária
<i>Aphis spiraecola</i>	Rara	Intermediária	Intermediária	Rara	Intermediária
<i>Aulacorthum solani</i>	Rara	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária
<i>Brevicoryne brassicae</i>	Rara	Rara	Rara	Intermediária	Rara
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Rara	Rara	Rara	Intermediária	Rara
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Intermediária	Rara	Intermediária	Intermediária	Rara
<i>Myzus persicae</i>	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária
<i>Pemphigus</i> spp.	Intermediária	Comum	Intermediária	Intermediária	Comum
<i>Pentalonia nigronervosa</i>	Rara	Intermediária	Rara	Intermediária	Rara
<i>Toxoptera aurantii</i>	Intermediária	Rara	Intermediária	Intermediária	Intermediária
<i>Toxoptera citricidus</i>	Rara	Rara	Intermediária	Intermediária	Rara
<i>Uroleucon ambrosiae</i>	Rara	Intermediária	Rara	Intermediária	Rara

TABELA 9: Classificação geral de cada espécie relacionada com o coeficiente de *Pearson* para dois parâmetros (temperatura e pluviosidade) e os valores referentes a cada espécie

Espécies	Status geral	Correlação de Pearson	
		Pluviosidade/ valor de r	Temperatura/ valor de r
<i>Aphis craccivora</i>	I	IN / -0,1776	FN / -0,3481
<i>Aphis fabae</i>	I	IN / -0,0872	MN / -0,6982
<i>Aphis gossypii</i>	C	FP / 0,2039	IP / 0,0593
<i>Aphis nasturtii</i>	C	IN / -0,0136	FN / -0,4477
<i>Aphis nerii</i>	I	FP / 0,1090	FP / 0,2132
<i>Aphis spiraecola</i>	I	FN / -0,3137	MN / -0,5487
<i>Aulacorthum solani</i>	I	MN / -62,11	FN / -0,3748
<i>Brevicoryne brassicae</i>	R	IN / -0,0818	FP / 0,2026
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	R	FN / -0,1663	MP / 0,5328
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	R	FP / 0,3450	IN / -0,0775
<i>Myzus persicae</i>	I	MP / 0,5087	FP / -0,1213
<i>Pemphigus spp.</i>	C	FN / -0,1318	FN / -0,2605
<i>Pentalonia nigronervosa</i>	R	FN / -0,3740	FP / 0,1262
<i>Toxoptera aurantii</i>	I	IP / 0,0938	IP / 0,0604
<i>Toxoptera citricidus</i>	R	FN / -0,1139	FN / -0,4145
<i>Uroleucon ambrosiae</i>	R	FN / -0,1051	FP / 0,2735

C: espécie comum; I: espécie intermediária; R: espécie rara; IP: ínfima positiva; FP: fraca positiva; MP: moderada positiva; I negativa; IN: ínfima negativa; FN: fraca negativa; MN: moderada negativa. Os gráficos referentes às correlações e aos índices de temperatura e precipitação estão disponibilizados nos anexos A e D.

Para as espécies *A. craccivora*, *A. fabae* e *A. spiraecola* as correlações ambientes foram negativas, ou seja, interferiram nas suas dinâmicas populacionais e temporais (TABELA 9). Estas condições, registradas para estas três espécies às caracterizaram como espécies intermediárias na classificação geral. Comparando os comportamentos populacionais, estas espécies foram predominantemente intermediárias nas diferentes estações do ano, com exceção de *A. spiraecola* e *A. craccivora* que se comportaram como raras no verão (TABELA 8).

Com relação à dinâmica populacional, *A. craccivora* apresentou uma baixa revoada com estimativa de 66 espécimes/m<sup>2</sup> (1,31% do total capturado do gênero). A maior revoada ocorreu no outono (38 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondente a 57,72% do total de exemplares). *Aphis fabae* teve uma revoada estimada de 105 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 2,00% da população do gênero e sua maior revoada foi registrada no inverno (57 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 54,40%). *Aphis spiraecola*, seguiu o mesmo comportamento de revoada observada para as espécies intermediárias de *Aphis* com estimativa de 86 espécimes/m<sup>2</sup> (1,69% do gênero), sendo a sua maior revoada registrada no outono (47 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondente a 54,65% do total de exemplares da espécie).

Somente para *A. nasturtii* constatou-se correlação nula para a condição de precipitação, enquanto a temperatura foi negativa (TABELA 9). Seu comportamento referente às revoadas foi estimada em 1.228 indivíduos/m<sup>2</sup> (24,20%) da população do

gênero. A maior revoada ocorreu no período de inverno (1.124 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 91,51% do total de exemplares dessa espécie).

Para as demais espécies de afídeos, que não compõem o gênero *Aphis*, constatou-se que, para *M. persicae* e *M. euphorbiae* a correlação de precipitação foi positiva, ou seja, não interferiu negativamente no comportamento de revoada sobre a cultura do maracujá (TABELA 9). No entanto, a temperatura para estas espécies apresentou correlação negativa, o que se pode inferir que este fator foi determinante para a classificação geral dessas espécies como intermediária e rara, respectivamente. Estas espécies foram predominantemente classificadas como intermediárias durante as diferentes estações do ano, sendo que somente no outono *M. euphorbiae* caracterizou-se como espécie rara (TABELA 8). Analisando a abundância, na classificação geral, destas duas espécies, constatou-se que *M. persicae* apresentou uma média de 76 espécimes/m<sup>2</sup> (0,83% do total de espécies capturadas) (FIGURA 20). A maior revoada ocorreu no inverno (29 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 38,15% de exemplares desta espécie). Por sua vez, *M. euphorbiae* apresentou uma revoada estimada de 66 espécimes/m<sup>2</sup>, (1,11% do total de espécies capturadas) (FIGURA 19). O maior pico de revoada ocorreu na primavera (28 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 42% do total de exemplares dessa espécie).

Para as espécies *U. ambrosiae*, *P. nigronervosa*, *T. citricidus*, *B. brassicae* e *H. lactucae* a correlação da precipitação foi negativa, podendo-se concluir que este fator foi preponderante para a regulação destas espécies e classificação geral como raras. No entanto, a correlação dessas espécies com a temperatura foi positiva, não sendo este fator o principal regulador das revoadas na área monitorada (TABELA 8 e TABELA 9).

De acordo com análise descritiva, *U. Ambrosiae* apresentou uma revoada estimada de 19,4 espécimes/m<sup>2</sup> (0,31% do total de espécies capturadas). Já *P. nigronervosa* apresentou uma revoada estimada de 409 espécimes/m<sup>2</sup> (6,87% do total de espécies capturadas). Ambas as espécies estiveram presentes em baixas populações no campo, sendo que seus picos de revoadas ocorreram no outono e primavera. Baixos índices de revoadas também foram constatados para *T. citricidus* que foram estimados em 152 espécimes/m<sup>2</sup> (2,55% do total de espécies capturadas), o maior pico de revoada ocorreu no inverno (114 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 75% do total dessa espécie). *B. brassicae* e *H. lactucae* apresentou uma revoada estimada de 38 espécimes/m<sup>2</sup> (0,63% do total de espécies capturadas), sendo que somente na primavera foram relatadas revoadas de ambas as espécies (FIGURA 20).

Apesar de ser classificada como espécie intermediária, *T. aurantii* apresentou correlação positiva para as variáveis precipitação e temperatura. O mesmo não foi possível concluir para a espécie *A. solanii*, que apesar de ser classificada como espécie intermediária a sua correlação com a precipitação e temperatura foi negativa. Porém, para ambas as

espécies prevaleceu a classificação intermediária, com exceção do outono, para *T. aurantii*, e verão para *A. solanii*, quando estas espécies se caracterizaram como raras (TABELA 8 e TABELA 9). Com relação à dinâmica de revoadas, *T. aurantii* compôs 57,14 espécimes/m<sup>2</sup> (0,95% do total de espécies) e *A. solanii* apresentou uma revoada composta por 47 espécimes/m<sup>2</sup> (0,78% do total das espécies) (FIGURA 20).

Apesar da correlação negativa tanto para precipitação quanto para a temperatura, constatou-se que *Pemphigus* spp. foi uma espécie comum nas revoadas registradas no pomar de maracujá, sendo capturados 409 espécimes/m<sup>2</sup> (6,86% do total de espécies). O maior pico de revoada foi registrado durante o outono (276 espécimes/m<sup>2</sup>, que correspondeu a 67,48% do total dessa espécie) (TABELA 8; TABELA 9 e FIGURA 20).

De acordo com a descrição generalizada da afidofauna capturada na área monitorada, as maiores revoadas ocorreram no inverno (1.933 espécimes/m<sup>2</sup>, correspondendo a 32,42% do total de espécies capturadas). No entanto, foi durante a primavera que se constatou a maior riqueza, em diversidade de espécies, sobrevoando o campo (15 espécies). No verão, registrou-se o menor número de afídeos sobrevoando o campo (914 espécimes/ m<sup>2</sup>), bem como uma menor diversidade de espécies. Em todas as estações do ano o gênero *Aphis* foi o mais abundante, mantendo-se em primeiro lugar no *ranking* de espécies (TABELA 10).

TABELA 10: *Ranking* das espécies de afídeos de acordo com as estações do ano, e anualmente

<b>Ranking</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Ano/2013</b>
1	<i>A. gossypii</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>A. nasturtii</i>	<i>A. nerii</i>	<i>A. gossypii</i>
2	<i>A. nasturtii</i>	<i>Pemphigus</i> spp.	<i>A. gossypii</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>A. nasturtii</i>
3	<i>Pemphigus</i> spp. <i>A. fabae</i>	<i>A. spiraecola</i> <i>A. craccivora</i>	<i>T. citricidus</i> <i>Pemphigus</i> spp.	<i>T. citricidus</i> <i>A. nasturtii</i> <i>B. brassicae</i> <i>M. euphorbiae</i>	<i>A. nerii</i> <i>Pemphigus</i> spp.
4	<i>M. euphorbiae</i> <i>M. persicae</i> <i>T. aurantii</i>	<i>A. fabae</i> <i>A. nasturtii</i> <i>A. solani</i> <i>M. persicae</i>	<i>A. fabae</i>	<i>T. aurantii</i>	<i>T. citricidus</i>
5		<i>A. nerii</i>	<i>A. nerii</i>	<i>A. craccivora</i> <i>A. fabae</i> <i>M. persicae</i>	<i>A. fabae</i>
6		<i>P. nigronevosa</i> <i>U. ambrosiae</i>	<i>A. spiraecola</i>	<i>A. solani</i> <i>H. lactucae</i> <i>Pemphigus</i> spp. <i>P. nigronevosa</i> <i>U. ambrosiae</i>	<i>A. spiraecola</i>
7			<i>A. craccivora</i> <i>A. solani</i> <i>M. euphorbiae</i> <i>M. persicae</i> <i>T. aurantii</i>		<i>M. euphorbiae</i> <i>M. persicae</i>
8					<i>A. craccivora</i> <i>T. aurantii</i> <i>A. solani</i>
9					<i>B. brassicae</i> <i>U. ambrosiae</i> <i>P. nigronevosa</i>
10					<i>H. lactucae</i>
11					
12					
13					
14					

## 5.2. Incidência e análise mensal do CABMV e sua relação com a afidofauna vetora

Durante a avaliação da incidência do CABMV, nos dois sistemas de cultivo do maracujazeiro (mudas altas e baixas), constatou-se a primeira detecção do vírus, por PTA-ELISA e expressão de sintomas, em mudas baixas, cinco meses após a introdução do pomar no campo. Essa detecção ocorreu no mês de março, período de transição do verão para o outono. Simultaneamente, foi observado que 8,57% das plantas provenientes de mudas baixas estavam infectadas. Deste total, apenas uma das plantas havia desenvolvido sintomas de mosaico foliar, típicos daqueles induzidos pelo CABMV, enquanto que as demais se apresentavam assintomáticas, porém positivas em PTA-ELISA. Nesse mesmo

período, plantas oriundas de mudas altas não foram positivas quando submetidas a teste sorológico e também não foi observada a expressão de sintomas típicos do CABMV (FIGURA 21). Correlacionando a população de afídeos registrada no mês anterior à detecção do vírus no campo (fevereiro), foi possível inferir que apesar das baixas revoadas ocorridas nesse mês, as espécies *A. gossypii* (19,04 afídeos/m<sup>2</sup>) e *T. aurantii* (9,52 afídeos/m<sup>2</sup>) foram provavelmente, responsáveis pela introdução do CABMV no pomar.

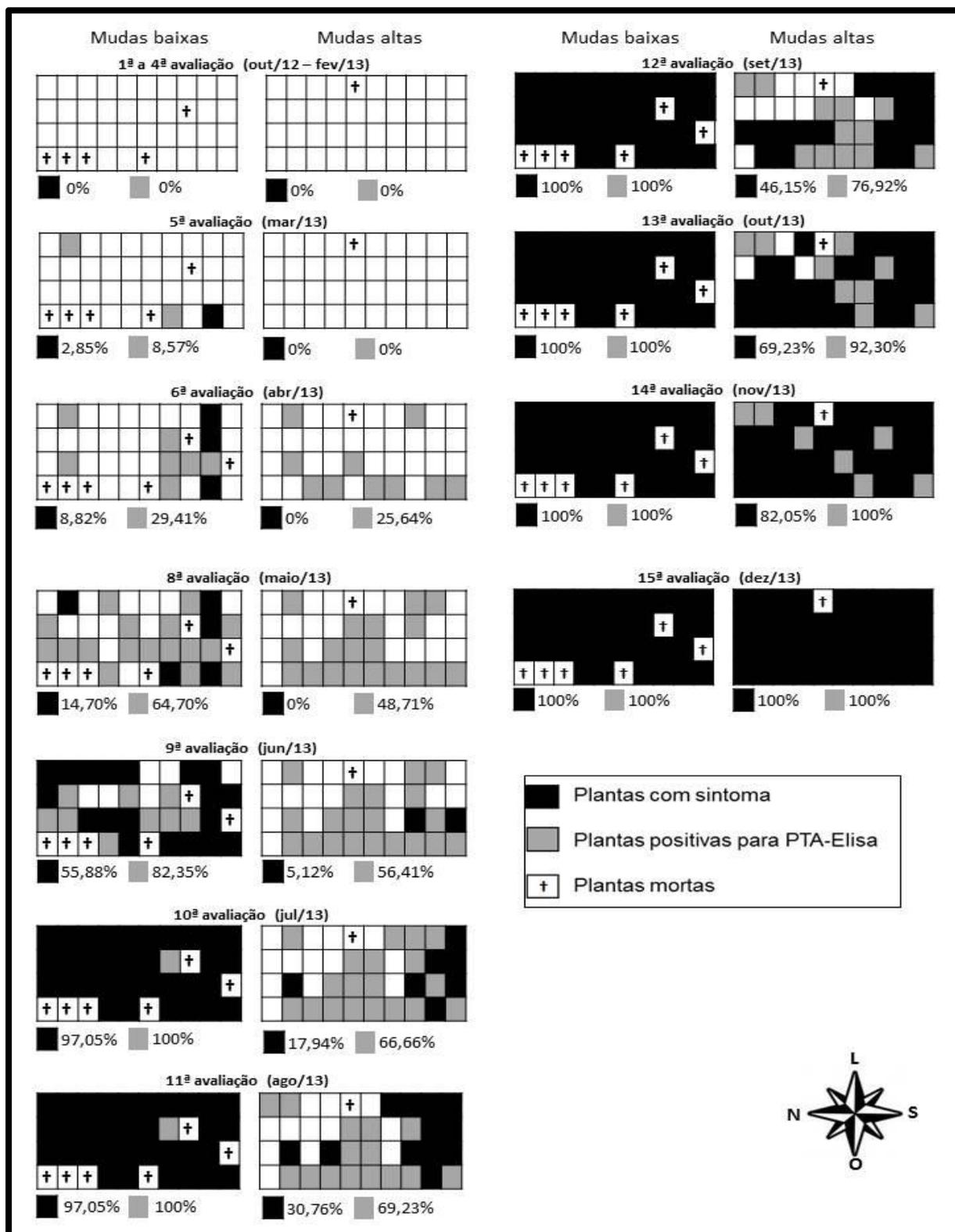


FIGURA 21: Análise temporal e espacial da incidência e dispersão do CABMV no pomar avaliado, formado por plantas de maracujá-azedo ‘Sul Brasil’, oriundas de mudas altas e baixas, no município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP, no período de outubro de 2012 a dezembro de 2013.

No mês de abril (2013) foi registrado índice de infecção de 29,41% nas plantas provenientes de mudas baixas. Neste mesmo período, as plantas provenientes de mudas altas apresentaram um índice de infecção de 25,64% (FIGURA 21). A estimativa da população de afídeos que sobrevoou o pomar no mês anterior, e que provavelmente atuou como vetora do CABMV, foi prevalentemente constituída por *A. gossypii*, que efetuou baixas revoadas no pomar (19,04 indivíduos/m<sup>2</sup>). Este fato reforça que mesmo presentes em baixas populações, *A. gossypii* é importante na epidemiologia do CABMV na região do Vale do Ribeira.

Nos meses subsequentes, após o registro da entrada do CABMV no pomar de maracujá, no mês de maio a porcentagem de plantas oriundas de mudas baixas infectadas foi de 64,70%, com um acréscimo de 35,29%, em relação ao mês anterior. Quando se comparou a porcentagem de infecção de ambos os sistemas avaliados, constatou-se que mudas altas apresentavam 15,98% a menos de índice de infecção (48,71%), em relação às mudas baixas. No entanto, plantas provenientes de mudas altas, positivas em PTA-ELISA, eram assintomáticas (FIGURA 21). A partir da confirmação de que, mais de 50% das plantas de maracujá monitoradas, provenientes de mudas altas e baixas, já estavam infectadas, foi possível concluir que o CABMV havia se estabelecido no campo. Esse período correspondeu ao sétimo mês após a introdução das mudas. Correlacionando a abundância de afídeos alados registrada no mês de abril, com os índices de infecção obtidos em maio, constatou-se que nesse intervalo de tempo houve uma maior riqueza de afídeos pertencentes às espécies: *A. craccivora*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *A. solani*, *M. persicae*, *Pemphigus* spp., *P. nigronevosa* e *U. ambrosiae*. Destas espécies, *A. gossypii* novamente foi a mais abundante, correspondendo a 83,37% do total da população de afídeos estimada (667 afídeos/m<sup>2</sup>), confirmando o relato anterior de sua importância não somente na introdução, como também na disseminação do CABMV.

No mês de junho (oitavo mês após a implantação do pomar), 82,35% das plantas provenientes de mudas baixas foram positivas para o CABMV, representando um acréscimo de 17,65% de infecção em relação ao mês anterior. No entanto, foi nesse período que as plantas provenientes de mudas altas expressaram os primeiros sintomas típicos aos induzidos pelo CABMV apresentando 56,41% de índice de infecção, 7,70% a mais que no mês anterior (FIGURA 21). Novamente prevaleceu o gênero *Aphis* (*A. gossypii* e *A. spiraecola*), que correspondeu a 72,13% da afidofauna, seguido por *A. solani* e *Pemphigus* spp. Com relação ao gênero *Aphis*, constatou-se que novamente *A. gossypii* foi o mais abundante, correspondendo a 68,8% das espécies capturadas.

No mês de julho (nono mês, após a implantação do pomar), 100% das plantas provenientes de mudas baixas já expressavam sintomas evidentes em todos os ramos da planta. Porém, nas análises por PTA-ELISA e observação dos sintomas realizada nas

plantas provenientes de mudas altas constataram-se 66,66% de plantas infectadas, sendo que destas apenas 17,94% expressavam sintomas (FIGURA 21). Nesse período, *A. gossypii* foi a espécie mais abundante (51,51%), sendo que as demais espécies deste gênero (*A. craccivora*, *A. fabae*, *A. nasturtii*, *A. nerii*, *A. spiraecola*) também foram relatadas. As espécies *M. persicae* e *Pemphigus* spp. complementaram a afidofauna local nesse período.

Nos demais meses avaliados (agosto, setembro, outubro e novembro), que compreenderam a décima à décima terceira avaliação de campo, observou-se uma média de disseminação gradual do CABMV de 10,35% ao mês. Nesse período, espécies de afídeos do gênero *Aphis* foram os mais representativos, porém, a diversidade das demais espécies também foi representativa (FIGURA 21).

Finalmente, em novembro (décimo quarto mês), o índice de infecção em plantas oriundas de mudas altas atingiu 100% do pomar. No entanto, foi no mês de dezembro (décimo quinto mês) que todas as plantas de maracujá provenientes dos dois sistemas de cultivo já haviam expressado sintomas (FIGURA 21).

Vale ressaltar que, de acordo com a detecção pontual do CABMV, foi possível observar que a entrada e disseminação do vírus no campo ocorreram no sentido noroeste. A fase inicial de infecção, de ambos os sistemas de produção avaliados, ocorreu quase que simultaneamente, porém as plantas provenientes de mudas altas apresentaram um maior período de latência com relação à expressão de sintomas (FIGURA 21 e FIGURA 22).

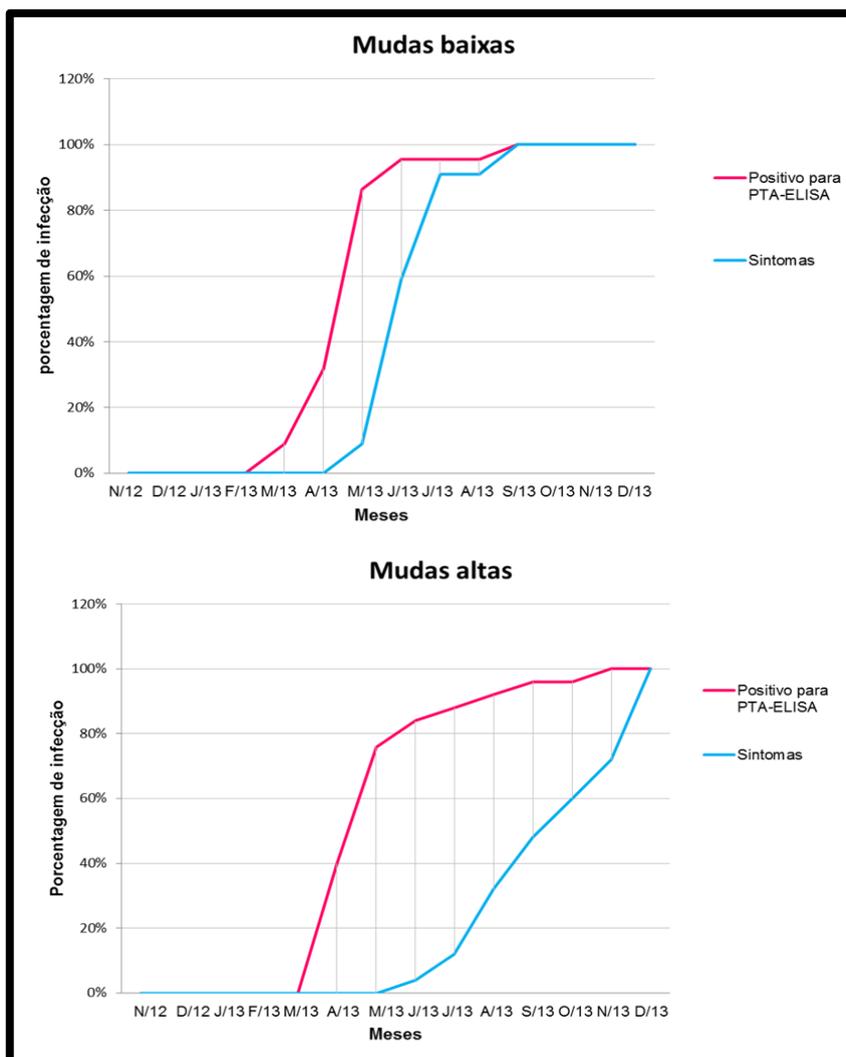


FIGURA 22: Incidência do CABMV, traduzida em porcentagem de plantas infectadas, confirmado por PTA-ELISA, no pomar de maracujá-azedo 'Sul Brasil' formado por mudas baixas e altas, e a evolução do aparecimento dos sintomas ao longo do período avaliado, de novembro de 2012 a dezembro de 2013.

Na análise temporal e espacial da afidofauna no campo de maracujá, obtida pelo índice de *Jaccard* constatou-se, pelo ponto de corte ( $\alpha=0,76$ ), uma sobreposição de espécies evidenciando a formação de dois clados distintos. Este fato indica que a maioria das espécies tende a ocorrer simultaneamente, independente da estação do ano (FIGURA 23). O clado mais representativo para a epidemiologia do CABMV, tanto em diversidade quanto em abundância, prevaleceu durante as estações outono, inverno e primavera. Este agrupamento foi composto por dez espécies (62,5% das espécies identificadas), sendo o principal agrupamento constituído por 80% de espécies polífagas (*A. craccivora*, *A. spiraeicola*, *T. aurantii*, *Aphis nasturtii*, *A. fabae*, *M. euphorbiae*, *M. persicae* e *A. gossypii*) e 20% de oligófagas (*A. nerii* e *Pemphigus* spp.), que foram classificadas como comuns e intermediárias na cultura do maracujazeiro (TABELA 9 e FIGURA 23).

O segundo clado foi constituído por quatro espécies (25% das espécies identificadas), que apresentaram a tendência de ser agrupar durante o outono e inverno. Este clado foi constituído pelas espécies *A. solanii* (polífaga/intermediária) e *P. nigronervosa*, *T. citricidus* e *B. brassicae* (oligófagas/raras). Resultado que permite concluir que, epidemiologicamente, esta sobreposição de espécies apresentou importância secundária na transmissão e disseminação do CABMV (FIGURA 23).

O terceiro clado foi constituído pelas espécies *H. lactucae* e *U. ambrosiae* (oligófagas/raras) os quais tem em comum suas hospedeiras. No entanto, nas análises descritivas, essas espécies foram consideradas acidentais, o que permite inferir a pouca importância dessas espécies na epidemiologia do CABMV, na área monitorada (FIGURA 23).

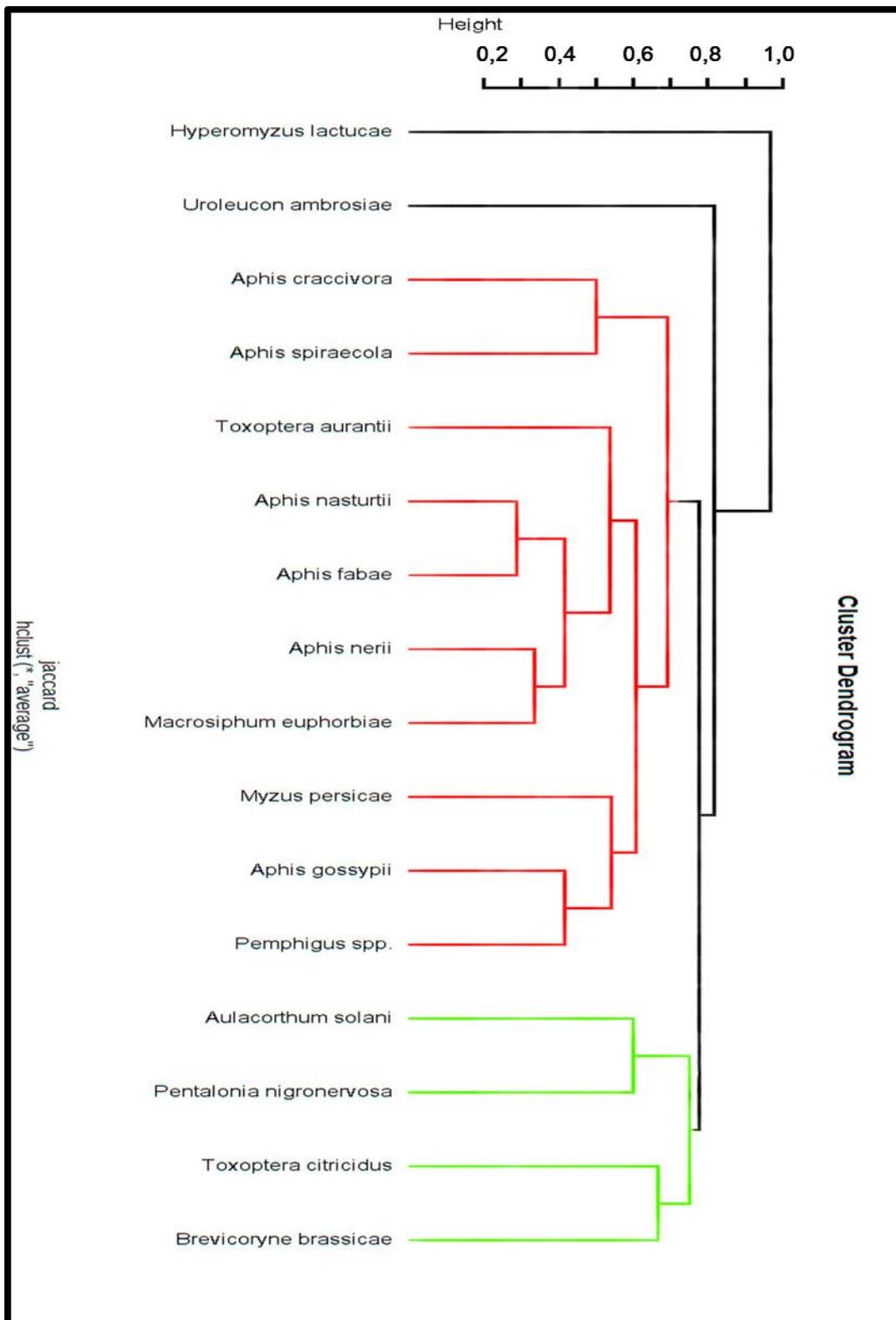


FIGURA 23: Dendrograma obtido a partir do índice de *Jaccard* evidenciando a tendência de dois agrupamentos de espécies de afídeos na cultura do maracujá no município de Pariqueira-Açu (Vale do Ribeira/ SP).

### 5.3. RT-PCR, sequenciamento, análises das sequências e filogenia

O RNA total extraído das folhas coletadas com sintomas de mosaico e bolhas, das diferentes amostras de maracujá-azedo coletadas em diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, além de amostras do Paraná, Goiás e DF, foram submetidas a RT-PCR com primers desenhados para anelar em duas regiões específicas do genoma do CABMV (CP e CI). Os resultados de RT-PCR possibilitaram a confirmação da presença de bandas de tamanho esperado: cerca de 1500 pb para CP completa e cerca de 700 pb para a CI (FIGURA 24). Os fragmentos de DNA amplificados foram eluídos dos géis de agarose e sequenciados, sendo as sequências alinhadas e submetidas à análise filogenética.

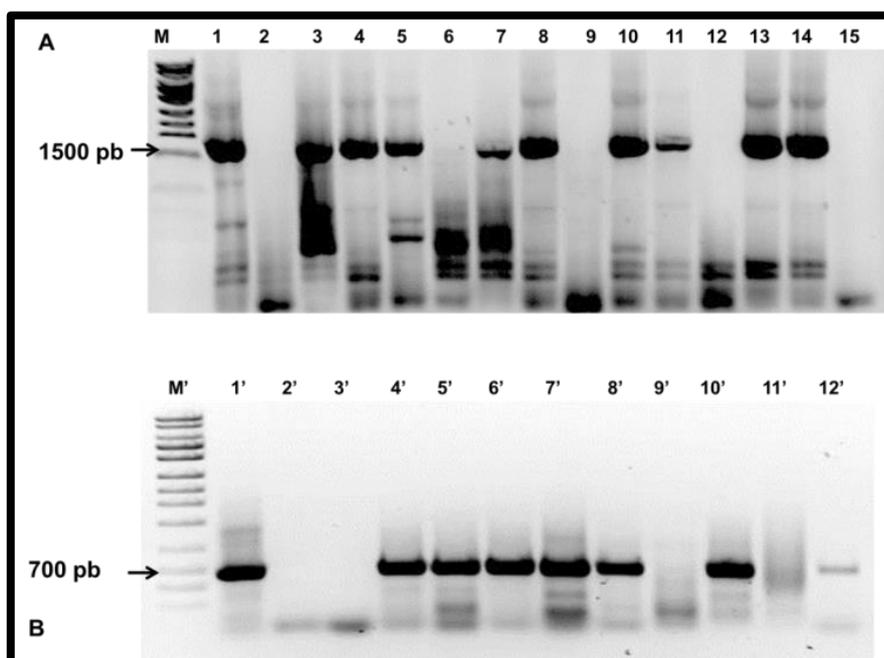


FIGURA 24: Resultados das ampliações de DNA via RT-PCR dos isolados de CABMV, visualizados em géis de agarose 1,5%, apresentando os fragmentos de DNA de tamanho esperado de 1500 pb (capa proteica) e 700 pb (inclusão citoplasmática cilíndrica). M e M' - marcador de DNA 1Kb ladder (NORGEN®); Gel A: 1- Taubaté-SP, 2- Bauru-SP, 3- Monte Alegre do Sul-SP, 4- Adamantina-SP, 5- Controle positivo (*Turnip mosaic virus* - TuMV), 6- Controle negativo, 7- Jacupiranga-SP, 8- Fernão-SP, 9- Campinas-SP, 10- Garça-SP, 11- Alvinlândia-SP, 12- Ibatí-PR, 13- São José da Boa Vista-PR e 14- Urutaí-GO. Gel B: 1'- Controle positivo (TuMV), 2'- controle negativo, 3'- Urutaí-GO, 4'- Campinas-SP, 5'- Jacupiranga-SP, 6'- Monte Alegre do Sul-SP, 7'- Garça-SP, 8'- Fernão-SP, 9'- Planaltina-DF, 10'- Alvinlândia-SP, 11'- São José da Boa Vista-PR, 12'- Adamantina-SP.

Na análise filogenética de máxima parcimônia (MP) para a região da CP observou-se a formação de quatro grupos distintos (FIGURA 25). Os isolados de CABMV do estado de

São Paulo, provenientes dos municípios de Jacupiranga (Vale do Ribeira), Adamantina, Fernão, Alvinlândia e Garça, sequenciados no presente trabalho, agruparam-se com outros isolados provenientes de São Paulo, depositados no *GenBank* (AY433950, AY434454, AY433951), e esse grupo monofilético foi sustentado com um alto valor de *bootstrap* (93%). O isolado de São José da Boa Vista (S.J.B.V-PR), do estado do Paraná, apresentou 98% de identidade com o isolado do Distrito Federal (DQ397532), sendo que ambos se agruparam em um clado sustentado com valor de *bootstrap* de 82%, juntamente com o isolado de Planaltina (Distrito Federal, DF), além de outros isolados do CABMV depositados no *GenBank* (DQ397527, DQ397528, AY253910). Todos os isolados desses grupos eram provenientes de maracujá-azedo. O maior clado observado na árvore filogenética foi constituído tanto de isolados de maracujá-azedo (DQ397530, DQ397529, DQ397531, AY253911), quanto de feijão-caupi (JF833418, JF833417, JF833419, JF833422, AF348210, X82873, JF427592), além de um de amendoim (*Arachis hypogaea*) (HQ880242). Dois desses isolados são provenientes do Zimbábue, África (X82873, 004013) e um proveniente da Austrália (JF427592), e essa monofilia foi sustentada por 100% de *bootstrap*. Nesse clado houve a tendência de se agrupar isolados de leguminosas, provenientes do Rio Grande do Norte e Pernambuco (JF833418, JF833417, JF833419, JF833422), sustentados por valores de *bootstrap* de 74%.

Nas análises de máxima verossimilhança (MV) da região da CP (FIGURA 25), também não houve a tendência de os isolados se agruparem por círculo de hospedeiros, visto que isolados de feijão-caupi, amendoim e maracujá-azedo agruparam-se em um mesmo clado. Os isolados de CABMV de *Vigna unguiculata* do Rio Grande do Norte e Pernambuco formaram um grupo monofilético, sustentado com valores de *Bootstrap* de 85%. O isolado de São José da Boa Vista agrupou-se no mesmo ramo do isolado do Distrito Federal (DQ397532). Os isolados provenientes do Zimbábue de *Vigna unguiculata*, e outro isolado proveniente da Austrália agruparam-se com isolados brasileiros de maracujá-azedo. Na árvore obtida sob condições de MV o grupo de São Paulo se dividiu em dois subgrupos e o isolado proveniente de Fernão (SP) agrupou-se em um grande clado formado pelos demais isolados disponíveis no *GenBank*.

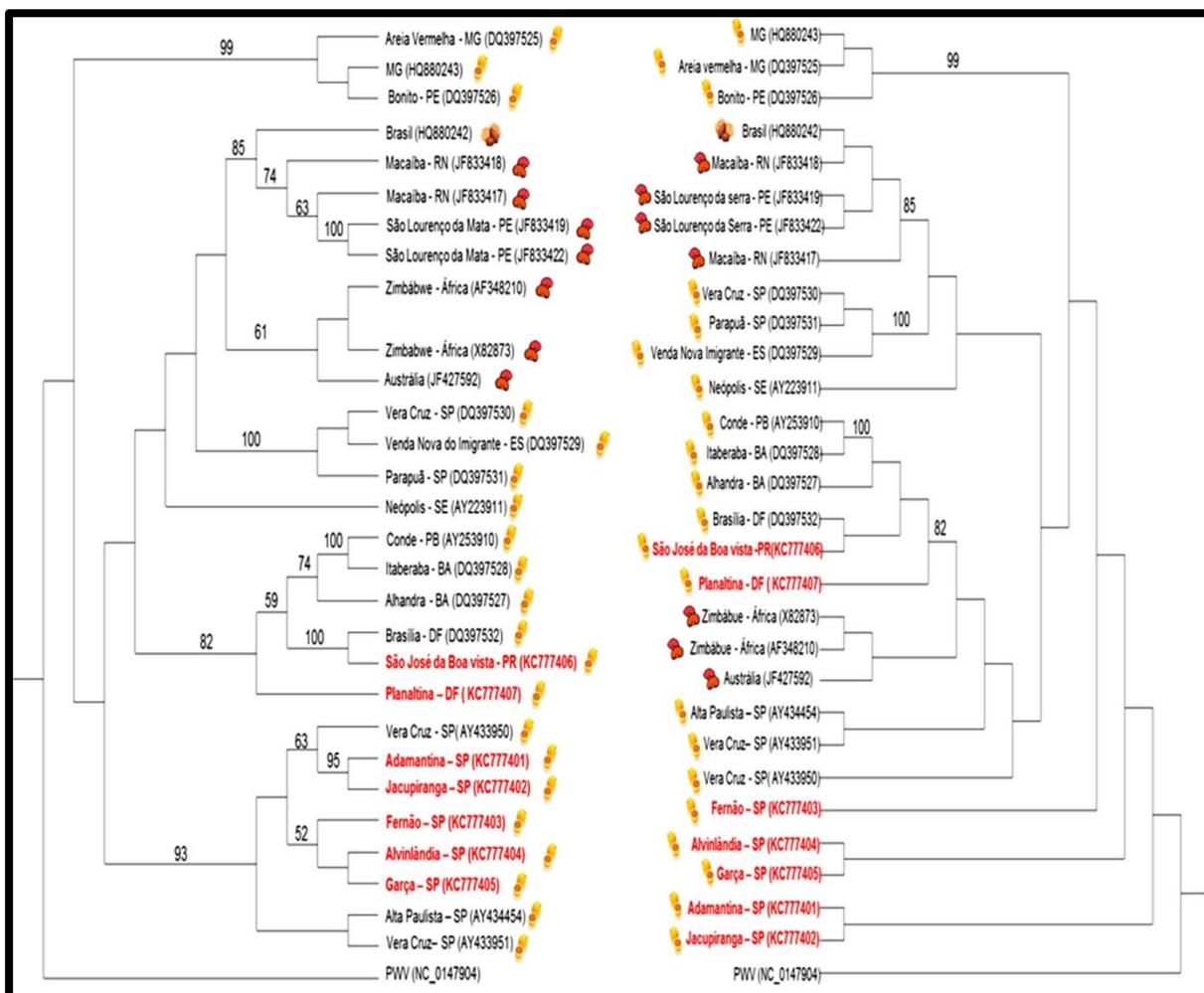


FIGURA 25: Árvores filogenéticas obtidas da análise de sequências completas de nucleotídeos da capa proteica (CP) de diferentes isolados de CABMV. À esquerda, árvore de máxima parcimônia (MP), e à direita, árvore de máxima verossimilhança (MV). Sequências obtidas do *GenBank* estão indicadas em preto; em vermelho estão representados os isolados sequenciados no presente trabalho. Os códigos de acesso no *GenBank* estão indicados entre parênteses. Os desenhos representam: 🍈 - maracujá-azedo (*Passiflora edulis*); 🍲 - feijão-caupi (*Vigna unguiculata*); 🥜 - amendoim (*Arachis hypogaea*).

Para as duas análises filogenéticas realizadas (MP e MV) para a região genômica do CABMV correspondente à parte da inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) (FIGURA 26), obtiveram-se resultados semelhantes. Os isolados sequenciados neste trabalho ficaram separados em dois grupos em ambas as árvores: (i) o primeiro correspondente aos isolados de Bauru-SP, Adamantina-SP, Garça-SP, Fernão-SP, Alvinlândia-SP, Jacupiranga-SP, São José da Boa Vista-PR; e (ii) o segundo correspondente aos isolados de Campinas-SP, Monte Alegre do Sul-SP (MAS), Ibaiti-PR, Planaltina-DF e Urutaí-GO

Para a CP observaram-se nove eventos de recombinação, sendo que para os isolados recombinantes de MG (HQ880243), Areia Vermelha-MG (DQ397525) e Bonito-PE

(DQ397526), a recombinação foi derivada, provavelmente, dos isolados de Jacupiranga-SP (KC777402) e Planaltina-DF (KC777407), ambos sequenciados no presente trabalho. Já o isolado recombinante proveniente de Neópolis-SE (AY223911) foi derivado, provavelmente, da recombinação entre o isolado de Fernão-SP (KC777403) e o isolado de Parapuã-SP (DQ397531). Eventos de recombinação não foram identificados para a CI.

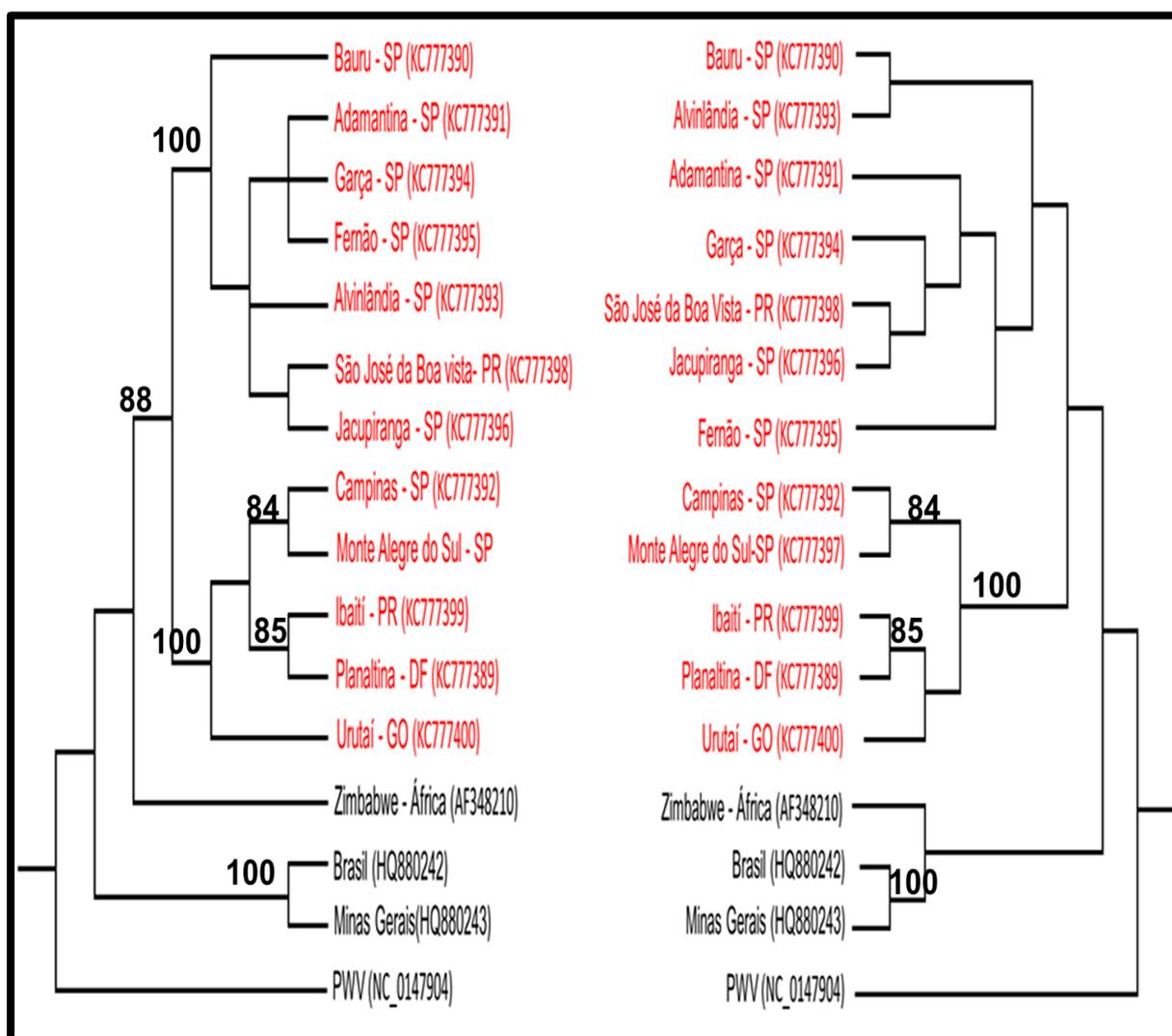


FIGURA 26: Árvores filogenéticas obtidas da análise de seqüências parciais de nucleotídeos da porção genômica correspondente à inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) de diferentes isolados de CABMV. À esquerda, árvore de máxima parcimônia (MP) e à direita árvore de máxima verossimilhança (MV). Seqüências obtidas do *GenBank* apresentam cor preta; em vermelho estão representados os isolados sequenciados no presente trabalho. Os códigos de acesso no *GenBank* estão indicados entre parênteses.

A identidade do isolado viral de Pariquera-Açu foi obtida por meio de PTA-ELISA, inoculação mecânica em plantas indicadoras e RT-PCR para a região genômica da CI, o que comprova sua identidade como CABMV (FIGURA 27).

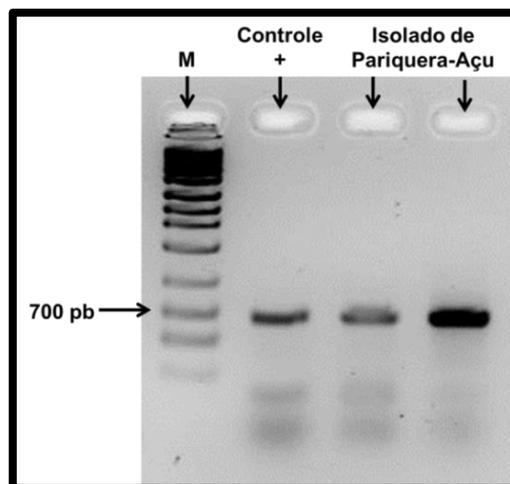


FIGURA 27: Resultado da amplificação via RT-PCR, visualizada em gel de agarose 1,5%, de fragmentos de DNA com cerca de 700 pb da porção genômica correspondente à inclusão citoplasmática cilíndrica (CI), do isolado de CABMV proveniente de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, SP. M- marcador 1 Kb DNA ladder (NORGEN®).

#### 5.4. Análises físico-químicas dos frutos e rendimento dos pomares

Quando realizadas as análises físico-químicas referentes aos parâmetros pH, acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis totais (°Brix) dos frutos de maracujá-azedo produzidos durante o primeiro ciclo de produção, foi possível constatar, estatisticamente, que houve diferença significativa para os parâmetros ATT e °Brix. O tratamento que obteve melhor resultado, para ambos os parâmetros ATT e °Brix foi proveniente de mudas altas (TABELA 11). No entanto, no teste de médias para determinar o parâmetro pH, obteve-se resultado estatisticamente não significativo.

Quanto ao rendimento de polpa, houve diferença altamente significativa entre os tratamentos, indicando que frutos de maracujá provenientes de plantas oriundas de mudas altas possuem um maior rendimento. Para todas as análises realizadas, os coeficientes de variação (CV%) foram relativamente altos, sendo que o maior valor foi observado para rendimento de polpa (TABELA 11).

TABELA 11: Resultado da análise estatística pelo teste F da ANOVA das características rendimento de polpa e físico-químicos, acidez total titulável, sólidos solúveis totais (°Brix) e pH

		Quadro de análise de variância				
		GL	SQ	QM	F	CV%
<b>Acidez total titulável (ATT)</b>	Tratamento	1	1,59048	1,59048	28,5658 **	5,33
	Resíduo	18	1,0022	0,05568		
<b>Sólidos solúveis totais (SST)</b>	Tratamento	1	3,26797	3,26797	14,4325**	4,72
	Resíduo	18	4,0,5758	0,22643		
<b>pH</b>	Tratamento	1	0,00415	0,00415	0,6390 ns	3,24
	Resíduo	18	0,1168	0,00649		
<b>Rendimento de polpa</b>	Tratamento	1	14363,91025	14363,91025	48,4410**	10,68
	Resíduo	18	5337,43419			

\*\* - significativo ao teste de médias; ns – não significativo.

## 6. Discussão

Devido aos danos causados pelo CABMV nos pomares de maracujazeiro, essa cultura, que há 20 anos era considerada semiperene, tornou-se anual (YUKI et al., 2006). A ausência de variedades de maracujazeiro que confirmam bons níveis de tolerância ou resistência, práticas culturais inadequadas e cultivos com baixa tecnificação, além da diversidade e quantidade de populações de afídeos vetores presentes no campo, são os principais fatores que contribuem para a manutenção do CABMV e, conseqüentemente, do EFM nos cultivos de maracujazeiro no Brasil (MACIEL et al., 2009). Além disso, apesar do CABMV ter um grande número de espécies de plantas hospedeiras experimentais, pouco se conhece a respeito das plantas que atuam como reservatórios naturais do CABMV (SILVA et al., 2012). Outro aspecto importante na epidemiologia do EFM, é a transmissão de modo não persistente, que dificulta o controle do vírus, uma vez que o controle químico e/ou biológico dos afídeos vetores é ineficiente (ATIRI, 1986; BELLIURE et al., 2011).

Em condições de campo, a infecção primária dos vírus transmitidos de maneira não persistente corresponde ao "limiar" da disseminação, sendo este um fator extremamente importante para o estabelecimento da infecção secundária. Portanto, a infecção primária depende não somente da abundância das revoadas dos afídeos, como também da diversidade, concentração populacional e proximidade de outras espécies de plantas que atuam como reservatórios do vírus (NELSON; TUTTLE, 1969). Porém, quando a espécie cultivada também é hospedeira do inseto vetor, uma considerável queda da disseminação do vírus, a partir da infecção secundária, é observada (WATSON; HEALY, 1953; NELSON; TUTTLE, 1969). Diante deste fato, a disseminação secundária dos vírus transmitidos de maneira não persistente é favorecida quando os seus vetores não colonizam a cultura, como observado no caso da interação das espécies do gênero *Aphis*, em especial *A. gossypii*, na transmissão e disseminação do CABMV, em maracujazeiro em Pariquera-Açu (Vale do Ribeira, SP). Esta relação também foi constatada em estudos epidemiológicos realizados na Costa do Marfim (África), quando se observou, em cultivos de maracujazeiros, a interação de *A. spiraecola* na epidemiologia do Passion fruit ringspot virus (PFRSV, *Potyvirus*) (WIJS, 1974)

No pomar de maracujazeiro monitorado em Pariquera-Açu, foram capturadas e identificadas dezesseis espécies de afídeos, indicando uma baixa diversidade da afidofauna. Esses dados corroboram com os já obtidos em pomares de maracujá, no Brasil, em levantamentos realizados por Narita (2007), na região da Alta-Paulista e Garcez (2012), na região Leste Paulista. Monitoramentos em pomares de maracujá, realizados no Kenya (África), mostraram que a afidofauna também é pouco diversificada, sendo registradas oito

espécies de afídeos (KILALO et al., 2013). Essa baixa diversidade da afidofauna é justificada, pois em regiões tropicais o número de espécies de afídeos tende a ser menor devido à elevada diversidade florística encontrada nessas regiões, o que torna mais difícil para uma determinada espécie de afídeo localizar e colonizar sua hospedeira (STERN et al., 1995).

Porém, quando considerada a relação entre afídeos polípagos e vírus transmitidos de maneira não persistente, a elevada diversidade de espécies de plantas em um ambiente pode se tornar um fator benéfico para a manutenção do inóculo da doença no campo. Diversas espécies de plantas silvestres e da vegetação espontânea, bem como plantas cultivadas podem não ser colonizadas por espécies de afídeos, porém, durante a picada de prova, caso sejam suscetíveis ao vírus, passam a atuar como reservatórios naturais. Fato constatado para o CABMV, em transmissões experimentais, realizadas em espécies de fabáceas da vegetação espontânea, silvestres e alimentícias (SILVA et al., 2012). Epidemiologicamente, outro exemplo a se considerar é a constatação do CABMV em cultivos de gergelim (*Sesamum indicum* L., Pedaliaceae), no Paraguai (GONZÁLES-SEGNANA et al., 2013).

Em contrapartida, os afídeos são mais abundantes em regiões temperadas, não devido somente à baixa diversidade biológica de espécies botânicas, como também devido à condição climática favorável (DIXON; KINDLMANN, 1990). Este fato foi fortemente evidenciado em levantamentos da afidofauna realizados na Finlândia no período de 2007 a 2010, em áreas tradicionalmente utilizadas para a produção intensiva de batata semente, intercaladas com florestas mistas de *Betula* spp., *Pinus* spp. e *Picea* spp, situadas na Zona Costeira do Golfo de Bothnia (64°46N, 25°32E) (KIRCHNER et al., 2013). De acordo com estes autores, as condições climáticas no período de avaliação foram de temperatura média de 5°C e precipitação máxima acumulada no período de 400 mm, o que favoreceu positivamente a afidofauna local, constituída por 41 espécies.

No levantamento da afidofauna, em Pariquera-Açu, esta característica regulatória das espécies de afídeos com relação às condições bioecológicas foi confirmada pela ausência de afídeos nas amostragens realizadas nas armadilhas amarelas (adesivas e de água *Moericke*), dispostas na Mata Atlântica adjacente ao pomar de maracujá. Esses resultados divergem aos descritos por Lazzarotto e Lazzari (1998) e Tavares (1996), que relataram, respectivamente, uma diversidade de 87 e 38 espécies de afídeos em áreas de Mata Atlântica. Porém, amostragens da afidofauna, também realizadas ao nível do mar, em uma área de Mata Atlântica situada no estado do Paraná, Lazzari e Lazzarotto (2005) descreveram uma menor diversidade de espécies de afídeos que variou, de acordo com as condições climáticas registradas, entre 27 a 34 espécies capturadas. Esses resultados divergem aos obtidos em Pariquera-Açu, provavelmente devido à sua localização

geográfica, pois de acordo com Qiao e Zhang (2004), quanto mais negativo for o gradiente latitudinal, no hemisfério Sul, maior será a riqueza de espécies de afídeos. Fato constatado para o posicionamento geográfico referente à latitude de Pariquera-Açu (24°36'41.14"S), superior às registradas nos levantamentos da afidofauna realizados no Estado do Paraná.

Do total de espécies de afídeos capturadas no pomar de maracujá monitorado, 50% eram polípagas, o que permite estabelecer que estas espécies apresentavam o hábito de alterar de hospedeira de forma facultativa ou obrigatória (POWELL; HARDIE, 2001). De acordo com Lazzari e Lazzarotto (2005) as espécies polípagas podem distribuir-se mais amplamente, tanto temporal quanto espacialmente, dependendo da disponibilidade de plantas hospedeiras. Este fator rege a abundância de algumas espécies de afídeos que podem estar presentes durante todo ano, mas com épocas de maior incidência, enquanto outras ocorrem apenas em uma estação do ano (CERMELI, 1970). Esta característica é fundamental na epidemiologia dos vírus transmitidos de maneira não persistente, uma vez que, dentre os insetos vetores descritos, os afídeos se caracterizam por serem os mais eficientes devido à polifagia da maioria das espécies e por serem os únicos que realizam picadas de prova (PIRONE; PERRY, 2002).

Vale ressaltar que plantas de maracujá não são colonizadas por nenhuma espécie de afídeo em condições de campo. Fato também constatado durante o monitoramento (dados não apresentados). Entretanto, *A. gossypii* e *T. aurantii*, na ausência de outras plantas hospedeiras, já foram descritas colonizando maracujazeiro (SOUZA-SILVA; ILHARCO 1995). Em condições de casa de vegetação, Di Piero et al. (2006) também constataram que maracujazeiros são passíveis de serem colonizados por *A. gossypii*, na ausência de plantas de Solanaceae e Cucurbitaceae.

Das dezesseis espécies de afídeos capturadas durante o levantamento, seis eram pertencentes ao gênero *Aphis* que, de acordo com estudos taxonômicos, é constituído por cerca de 500 espécies que se encontram indistintamente distribuídas em todos os continentes. A maioria destas espécies é registrada no Hemisfério Norte, sendo poucas nativas da América do Sul, Nova Zelândia e Austrália (<http://aphidsonwordplants.info>, data de acesso 18 de março de 20013). Porém, trabalhos de filogenia, associando métodos moleculares e morfométricos, apontam que as espécies de afídeos descritas no Hemisfério Norte são ancestrais das espécies relatadas como comuns no Hemisfério Sul (VON DOHLEN; TEULON, 2003).

De acordo com a abundância e diversidade de afídeos alados pertencentes ao gênero *Aphis* capturados no pomar de maracujá monitorado, foi possível concluir que estes são, epidemiologicamente, os principais responsáveis pela transmissão e disseminação do CABMV em Pariquera-Açu (Vale do Ribeira). A maioria das espécies pertencentes a esse gênero são polípagas e colonizam diversas espécies de plantas de Fabaceae e Asteraceae,

o que garante a manutenção de um grande número de espécies desse gênero no campo durante praticamente todo ano (BLACKMAN; EASTOP, 2000). Fato constatado no campo monitorado, uma vez que das seis espécies de *Aphis* descritas, apenas *A. nerii* se caracteriza como espécie oligófaga (SOUSA-SILVA; ILHARCO, 1995). Estudos epidemiológicos em pomares de maracujá-azedo realizados em municípios das regiões do Leste Paulista (Campinas, Pinhalzinho) e Oeste Paulista (Marília, Guaimbê e Ocaçu), demonstraram que o gênero *Aphis*, de acordo com a abundância, apresentou potencial para a transmissão e disseminação do CABMV, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho (YUKI, 1990; NARITA, 2007; GRACEZ, 2011).

De acordo com Dixon et al. (2009), a relação entre as temperaturas máximas e mínimas atuam, de forma generalizada, no desenvolvimento dos insetos. Esta condição permite obter uma classificação baseada na variação filogenética, que não pode ser estatisticamente comprovada. Assim, de acordo com a influência da temperatura na biologia dos insetos, esses mesmos autores descrevem que as espécies de insetos, de acordo com a ordem, podem se agrupar em dois complexos distintos: (i) Hemipteroide; e (ii) Endopterigota. No complexo Hemipteroide estão inseridas as ordens Psocoptera, Thysanoptera e Hemiptera; no complexo Endopterigota estão compreendidas as ordens Neuroptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera. Porém, no complexo Hemipteroide, onde estão inseridos os afídeos, é que se observa a maior influência das variações da temperatura na biologia das populações. Fato observado no levantamento da afidofauna realizada no presente trabalho, cuja temperatura média anual foi de aproximadamente 21°C, atuando de forma fraca negativa na dinâmica populacional da afidofauna na área monitorada, e estando de acordo com os resultados obtidos por Charnov e Gillooly (2003), que relataram que as variações termais mais favoráveis para os insetos estão em torno de 20°C. Portanto, no caso do município de Pariquera-Açu, provavelmente um dos fatores limitantes mais impactantes para a determinação da baixa diversidade e de revoadas das espécies que compuseram a afidofauna local foi a qualidade dos alimentos (diversidade florística e estágio de desenvolvimento das plantas), e não as condições ambientais. De acordo com Lazzari e Lazzarotto (2005), a disponibilidade de alimento interfere diretamente na flutuação sazonal das espécies que compõem a afidofauna local devido, principalmente, ao hábito alimentar dos afídeos. De acordo com Dixon e Kindlmann (1990), há uma maior quantidade de afídeos em regiões onde a riqueza de plantas hospedeiras é menor, como acontece em monoculturas, ao contrário a eficiência desses insetos de encontrar suas plantas hospedeiras é mais baixa onde há maior diversidade de espécies vegetais. De acordo com Pautasso e Powell (2009), a riqueza de espécies de afídeos está diretamente relacionada com a interferência humana no ambiente, como observado nas vastas áreas de monocultura da Europa, onde condições ambientais também

são favoráveis (clima temperado, baixa diversidade florística). Condições inversas foram observadas para o estabelecimento da afidofauna na área monitorada, uma vez que o Vale do Ribeira apresenta a maior área preservada de Floresta de Mata Atlântica do Brasil, onde são registradas diferentes formações florestais como manguezal, jundu e mata tropical fluvial, com uma grande diversidade de espécies silvestres como jequitibás, canelas, figueiras, guapuruvus, além de outras espécies do substrato arbustivo, com áreas reduzidas destinadas somente à produção de maracujá, banana, chá, abacate, goiaba e plantas nativas (açai e pupunha) (DIEGUES, 2007; AGRIANUAL, 2013).

No campo de maracujá monitorado, as maiores revoadas de afídeos ocorreram: (i) no inverno com temperaturas médias entre 12°C a 21°C e pluviosidade de 181 mm, concentrada na última semana de julho e na metade de setembro; e (ii) no outono com temperaturas variando entre 15°C a 25°C e pluviosidade total de 221 mm, concentrada na penúltima semana de junho. Segundo Ilharco (1992), a ocorrência da maioria das espécies de afídeos é registrada durante as estações do ano em que as temperaturas são mais amenas. Isto se deve ao fato das espécies presentes, no Brasil, serem originárias de regiões temperadas (DIXON et al., 1987; PAUTASSO; POWELL, 2009). No entanto, Lamborot e Guerrero (1979) relatam que o crescimento populacional dos afídeos é favorecido em períodos mais secos, fato que está de acordo com os resultados obtidos durante o monitoramento realizado em Pariquera-Açu quando, no verão, foi registrado o menor número de exemplares de afídeos capturados, sendo que nesse período as temperaturas médias oscilaram entre 20 a 28°C e a pluviosidade total foi de 590 mm, distribuída entre os meses de janeiro a março de 2013 (ANEXO C). Comportamento semelhante foi observado por Garcez (2012), que também constatou um decréscimo da população de afídeos no período do verão, na região Leste Paulista. Carvalho et al. (2002) demonstraram que períodos com pluviosidades prolongadas são desfavoráveis aos afídeos, visto que estes se encontram em partes vulneráveis da planta, podendo ser lavados com facilidade. No período avaliado, por meio da correlação de *Pearson*, constatou-se que a pluviosidade não foi um fator preponderante para os relatos de baixo índice de revoadas registradas, uma vez que esta condição ambiental se caracterizou como ínfima positiva para a afidofauna local.

Fatores climáticos influenciam diretamente e distintamente para cada espécie de afídeo, interferindo pontualmente na dinâmica populacional da afidofauna (ROBERT, 1987). Durante o período de levantamento realizado no pomar de maracujá em Pariquera-Açu, *A. gossypii*, *T. aurantii* e *A. nerii*, foram beneficiadas pelos índices pluviométricos e de temperaturas médias registradas, ou seja, apresentaram correlações positivas e não interferiram negativamente na dinâmica populacional destas espécies. No entanto, a baixa densidade populacional de algumas dessas espécies ocorreram, provavelmente, por outros

fatores, não climáticos. Porém, as populações compostas por *A. fabae*, *Pemphigus* spp., *A. craccivora* e *A. solanii* foram negativamente influenciadas pelos índices pluviométricos e de temperaturas. No caso das espécies *A. nasturtii*, *U. ambrosiae*, *P. nigronervosa*, *T. citricidus*, *B. brassicae* e *H. lactucae*, o fator limitante na dinâmica populacional foi a temperatura, enquanto que os índices pluviométricos não interferiram na sua dinâmica populacional (Anexo C).

Neste trabalho, de acordo com as análises de abundância e diversidade e, conseqüente descrição da afidofauna local, foi possível constatar que as espécies do gênero *Aphis* foram as mais importantes na epidemiologia do CABMV.

De acordo com as características bioecológicas, *Aphis gossypii* apresenta distribuição mundial, sendo considerada a espécie de afídeo mais abundante em regiões de clima tropical, podendo se alimentar de 912 espécies pertencentes a 116 famílias botânicas (PECCOUD et al., 2010; BLACKMAN; EASTOP, 2011). Por ser uma espécie que coloniza um amplo espectro de plantas, *A. gossypii* esteve presente no campo durante todo o período de coleta realizada no pomar de maracujá monitorado, sendo também considerada a mais abundante e ocupando a primeira posição no *ranking* geral e classificação como espécie comum. As maiores revoadas foram constatadas durante o outono, quando as temperaturas médias registradas foram de 20°C. Soglia et al. (2002), em estudos realizados em casa de vegetação com crisântemo, demonstraram que a faixa ideal para o desenvolvimento de *A. gossypii* está entre 18 e 25°C. Vale ressaltar que, no pomar monitorado, durante três estações do ano, com exceção do inverno, as temperaturas médias ficaram nesta mesma faixa (ANEXO C). Este resultado corrobora com os obtidos por Garcez (2012), que também classificou a espécie como comum na região do Leste Paulista, e Kilalo et al. (2013) que relataram que esta espécie foi a mais capturada em regiões distintas no Kenya, África.

É importante ressaltar que *A. gossypii*, além de ter sido relatada no pomar de maracujá durante todo o período monitorado, é também descrita como uma eficiente espécie vetora do CABMV, com taxa de transmissão variando entre 75 a 100% (DI PIERO et al., 2006). No entanto, Costa et al. (1995) em ensaios experimentais, relataram uma eficiência de transmissão dessa espécie de 33,3%. Estes resultados, referentes à eficiência de transmissão, associados à dinâmica populacional da afidofauna descrita no pomar de maracujá, em Pariquera-Açu, confirmam a importância de *A. gossypii* na epidemiologia do CABMV no Vale do Ribeira. Além disso, *A. gossypii* tem uma forte especialização ecológica com Cucurbitaceae (melão, abóbora, abobrinha e melancia), Malvaceae (algodão, oca e hibisco ornamental), Solanaceae (batata, pimenta, pimentão e berinjela), citros e algumas plantas ornamentais incluindo crisântemo e *Hibiscus* spp. (EBERT; CARTWRIGHT, 1997). Porém, de acordo com Carletto et al. (2009), no Brasil, há exclusivamente a ocorrência de *A.*

*gossypii* derivada do grupo das malváceas, originárias exclusivamente de plantas de algodão (*cotton-derived*). É importante também ressaltar que, independentemente da condição climática e das características biológicas e ecológicas da área monitorada, *A. gossypii* se caracteriza como uma das espécies mais abundantes e importantes na epidemiologia de várias doenças causada por vírus. Fato constatado em estudos epidemiológicos da disseminação do *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato virus G* (SPVG) e *Sweet potato virus 2* (SPV2), espécies de *Potyvirus* transmitidas de maneira não persistente por afídeos, em áreas de cultivo intensivo de batata-doce localizadas na Luisiana e Mississipi (EUA) (WOSULA et al., 2013).

Por sua vez, *Aphis nasturtii* é relatada em quase todos os continentes, com exceção da Austrália, e coloniza um extenso grupo de plantas herbáceas, principalmente no verão (MULLER, 1978). No entanto, no presente trabalho, as maiores revoadas dessa espécie foram constatadas no inverno, ocupando o primeiro lugar no *ranking* das espécies capturadas. Essa espécie já foi relatada apresentando uma eficiência de 15% na transmissão do *Potato virus Y* (PVY, *Potyvirus*) para batata (SINGH et al., 1996), indicando o seu moderado potencial para atuar na transmissão de outros *Potyvirus* como o CABMV.

*Aphis nerii* é uma espécie que se caracteriza por ocorrer durante todo o ano, principalmente em regiões tropicais e subtropicais e tendem a formar grandes colônias, principalmente no verão, em plantas ornamentais (GROETERS, 1993). No entanto, esse afídeo não ocorreu o ano todo no campo experimental, apresentando maior abundância na primavera, quando ocupou o primeiro lugar no *ranking* das espécies capturadas. Ao contrário, *Aphis craccivora*, apesar de ser uma espécie comum em regiões de clima temperado moderado e tropical (BLACKMAN; EASTOP, 2011), e mesmo estando presente no campo em baixas populações, provavelmente não é determinante para a disseminação do CABMV, pois, em condições experimentais não foi capaz de transmitir o vírus (COSTA et al., 1995). *Aphis spiraecola*, por sua vez, apresenta distribuição mundial (CAO et al., 2012), e em estudos realizados na Costa do Marfim, África, foi o principal vetor do Passion fruit ringspot virus, uma espécie tentativa do gênero *Potyvirus* (WIJS, 1974). Apesar da eficiência de transmissão do CABMV ainda não ter sido avaliada, esse afídeo tem potencial para atuar como vetor desse vírus no campo e atuar diretamente na epidemiologia do EFM. Outra espécie que pode ser muito importante na epidemiologia do CABMV é *Aphis fabae*, que se caracteriza por colonizar um vasto círculo de plantas hospedeiras pertencentes a diversas famílias botânicas, incluindo algumas essências florestais e muitas plantas herbáceas cultivadas, além de ocorrer em todos os continentes (KIM et al., 2006). Em condições experimentais, *A. fabae* transmitiu o CABMV com uma eficiência de 40% (GARCEZ, 2012). Além disso, Garcêz et al. (2011) identificaram *A. fabae* colonizando plantas de *Solanum nigrum*, em pomares de maracujazeiro no município de Pinhalzinho, SP.

Outras espécies não pertencentes ao gênero *Aphis* também foram relatadas realizando revoadas sobre o pomar de maracujá monitorado. *Myzus persicae* esteve presente durante todo o período de monitoramento, porém em baixas populações. No entanto, este afídeo é um eficiente vetor de espécies de potyvírus, apresentando, por exemplo, eficiência de transmissão de 40% para o PVY e 37,5% para o CABMV em maracujá-azedo (SINGH et al., 1996; COSTA, 1996). No inverno, constatou-se a maior revoada dessa espécie quando as temperaturas registradas ficaram em torno de 17°C. Costa (1970) observou que as maiores revoadas de *M. persicae* ocorrem em temperaturas entre 16°C e 20°C. No presente trabalho, observou-se que o fator climático determinante para a dinâmica populacional dessa espécie no campo foi a temperatura, sendo que no verão, época que se constataram as maiores temperaturas não houve revoada dessa espécie, no entanto nas outras três estações as temperaturas médias ficaram na faixa ideal para o estabelecimento de colônias em reservatórios naturais e revoadas sobre a cultura do maracujá.

As espécies *U. ambrosiae*, presente no outono e primavera, e *T. citricidus*, presente no inverno e primavera, ocorreram com baixos índices populacionais. Porém, estas duas espécies, em ensaios experimentais apresentaram alta eficiência na transmissão do CABMV, que variou entre 50% e 37,5%, respectivamente (COSTA, 1996).

As espécies *B. brassicae* e *H. lactucae*, que sobrevoaram o campo em baixas concentrações na primavera e se caracterizaram como espécies raras, não foram consideradas importantes para a epidemiologia do CABMV, uma vez que em condições experimentais não transmitiram o vírus (COSTA et al., 1995, COSTA, 1996). Da mesma forma, *Pemphigus* spp., apesar de ter sido classificado como espécie comum na região, provavelmente não se caracteriza como um importante vetor para o CABMV, uma vez que a sua biologia não o favorece como vetor por ser um afídeo oligofágo, com pouca mobilidade por colonizar especificamente raízes de diversas espécies de Asteraceae.

Com relação à incidência, o vírus foi detectado, inicialmente, nas plantas oriundas de mudas baixas, sendo que sua disseminação também foi mais rápida entre as plantas provenientes desse sistema de cultivo, quando comparadas ao pomar formado por mudas altas. Algumas hipóteses podem ser discutidas para explicar esse resultado, como por exemplo: (i) a cor verde menos intensa das folhas novas das mudas baixas pode ser mais atrativa para os afídeos (KENNEDY; STROYAN, 1959), o que aumentaria o número de visitas ou pousos nessas folhas e, conseqüentemente, possibilitaria um maior número de picadas de prova, aumentando a eficiência de transmissão; (ii) mudas levadas ao campo mais desenvolvidas (mudas altas – 80 cm de altura), neste caso com mais que o dobro da altura e com mais de três meses de idade, quando comparadas com as mudas baixas (30 cm), são menos susceptíveis à infecção pelo CABMV, principalmente devido ao seu maior

estádio de desenvolvimento fenológico, permitindo maior acúmulo de cera nas folhas, que atua como barreira física, minimizando a eficiência das picadas de prova (MELETTI et al., 2010).

Portanto, independentemente da região de cultivo do maracujá, a adoção de medidas preventivas de controle devem ser estimuladas entre os produtores. Porém, essas medidas se fazem ainda mais importantes em regiões onde o cultivo do maracujá já está fixado por muitos anos, fato constatado no Vale do Ribeira. A produção de mudas em condições protegidas por telados antiafídeos e a formação de pomares com mudas fenologicamente mais desenvolvidas são práticas já recomendadas para outras regiões do estado de São Paulo (MELETTI, 2011; NARITA, 2012) e devem ser adotadas nos municípios produtores de maracujá do Vale do Ribeira. O escape também tem sido uma medida interessante para retardar o aparecimento do vírus nos pomares. Em regiões em que a cultura do maracujá é relativamente nova, observa-se um atraso na chegada do CABMV, como observado por Garcez (2012), na região de Pinhalzinho, SP, em que o vírus somente foi detectado após o décimo terceiro mês da implantação do pomar, o que garantiu, no mínimo, mais um ciclo de produção.

Outro fator a ser considerado refere-se à implantação do pomar em períodos fora das maiores revoadas de afídeos, possibilitando adequar o desenvolvimento das plantas sem comprometer a produção. No entanto, foi no verão que ocorreram as menores revoadas de afídeos, época que não é recomendada para implantação do pomar no campo, uma vez que nessa época o maracujá já iniciou seu primeiro ciclo de produção. Quando considerado o período ideal para introdução das mudas no campo (agosto a outubro), observou-se que a implantação tardia (outubro) do pomar é prática recomendada, uma vez que as revoadas foram menores na primavera, quando comparadas ao outono. No entanto, ressalta-se que as espécies do gênero *Aphis* foram abundantes durante todo o período avaliado. Para tanto, avaliações anuais sucessivas multipontuais da afidofauna na região do Vale do Ribeira são necessárias para uma maior compreensão e adequação da melhor época de plantio do maracujá.

Acreditava-se que, até início da década de 1990, o vírus causador da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (EFM), no Brasil, era o *Passion fruit woodiness virus* (PWV). No entanto, Nascimento et al. (2004; 2006), a partir de sequenciamento e análises filogenéticas da região genômica do vírus correspondente à capa proteica (CP), concluíram que os isolados virais descritos anteriormente, por meio de testes biológicos e sorológicos, como sendo o PWV, eram, na verdade, pertencentes à espécie *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Posteriormente, outros grupos de pesquisa confirmaram a predominância do CABMV como o único vírus responsável pela doença do EFM no Brasil (NARITA, 2007; BARROS et al., 2011; GARCÊZ, 2012; MELO, 2011; NICOLINI et al., 2012;

SILVA et al., 2012; SANTOS, 2013). Neste trabalho as sequências de CP completa, obtidas dos isolados de maracujá provenientes das diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, Paraná, Goiás, e Distrito Federal confirmaram a predominância do CABMV como agente etiológico da doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil.

Com objetivo de se obter uma reconstrução filogenética robusta para os isolados de CABMV, foram realizadas análises filogenéticas de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) para duas regiões genômicas diferentes, capa proteica (CP) e inclusão citoplasmática cilíndrica (CI), ambas consideradas importantes para a taxonomia dos *Potyvirus* (ADAMS et al., 2005; 2012).

De modo geral as análises foram semelhantes. Em MP para a CP, os isolados de CABMV foram distribuídos em quatro grupos. Os isolados de São Paulo sequenciados neste trabalho formaram um grupo monofilético sustentado por um alto valor de *bootstrap*. No entanto, os isolados provenientes do Distrito Federal e Paraná permaneceram em um clado formado por um isolado do Distrito Federal e com outros isolados do Nordeste. Vale ressaltar que o maior grupo formado foi constituído por isolados de CABMV provenientes tanto de diferentes regiões geográficas quanto de diferentes hospedeiras (leguminosas e maracujá). No entanto, na análise de MV a região correspondente à CP não foi observada a separação de grupos de acordo com origem geográfica e hospedeiro principal. No entanto, ao contrário, Nicolini et al. (2012), de acordo com análises filogenéticas da CP de diferentes isolados de CABMV, observaram a formação de cinco grupos distintos, denominados de “genótipos”, sendo cada “genótipo” representado por um hospedeiro diferente. Provavelmente, essa diferença decorreu da análise de sequências de isolados provenientes de regiões geográficas muito próximas, o que inevitavelmente levou à formação de alguns clados com grupos de mesma origem geográfica e mesma hospedeira. Além disso, a presença de isolados de Fabaceae em diferentes clados (“genótipos”), incluindo um denominado “genótipo” 4 (Passion-flower-3), que contem isolados de maracujazeiro (NICOLINI et al., 2012), reforçam a tese de que os isolados de CABMV não se agrupam de acordo com o hospedeiro.

Barros et al. (2011), ao analisarem sequências de nucleotídeos da CP de isolados de CABMV, constataram uma tendência de agrupamento por origem geográfica e não em função do hospedeiro ou severidade dos sintomas. Nascimento et al. (2004) também obtiveram resultados semelhantes quando analisaram as sequências da CP, havendo uma correlação entre o nível de identidade da CP dos isolados e sua origem geográfica, o que não ocorreu quando se correlacionou a sequência da CP com a capacidade dos isolados infectarem maracujazeiro. Esse resultado foi reforçado por Damiri et al. (2013), que ao analisarem sequências de nucleotídeos da CP de isolados africanos de CABMV, não observaram o agrupamento dos isolados de acordo com o hospedeiro, visto que isolados

virais de maracujá-azedo agruparam-se com isolados de abobrinha (*Curcubita pepo* cv. 'Caserta'). As análises filogenéticas realizadas no presente trabalho corroboram com os resultados obtidos pelos autores acima mencionados, no que se refere ao não agrupamento dos isolados de acordo com suas hospedeiras. Porém, nas análises realizadas neste estudo, não foi evidenciada uma tendência de agrupamentos de acordo com a origem geográfica.

Gibbs et al. (2008) em estudo de filogenia da CP de *Potyvirus* demonstraram que os isolados de CABMV presentes no Brasil foram, provavelmente, derivados de uma estirpe de CABMV de feijão-caupi proveniente da África, sendo trazidos por escravos africanos durante a colonização das Américas. Entretanto, nas análises de MV da região da CP dos isolados de CABMV sequenciados neste trabalho, observou-se que aqueles provenientes de São Paulo permaneceram numa posição mais basal, enquanto que os dois isolados provenientes da África permaneceram em clados mais internos. Análises com maior número de sequências devem ser realizadas para confirmar a hipótese de Gibbs et al. (2008). Porém, as sequências utilizadas pelos autores não foram disponibilizadas no trabalho, o que impede análises mais completas.

Vale ressaltar que, no Brasil, a cultura do maracujá iniciou-se no Estado de São Paulo, mais precisamente na cidade de Bebedouro, na década de 1960. Posteriormente, somente vinte anos mais tarde, no início da década de 1980, a cultura se instalou no Vale do Ribeira, região que compreende o município de Jacupiranga e Pariquera-açu, de onde provem um dos isolados sequenciados neste trabalho (GONÇALVES; SOUZA, 2006; MELETTI, 2011). Interessante verificar que, na filogenia da CP, observou-se que isolados paulistas, principalmente os provenientes da região de Jacupiranga e Adamantina, apresentaram uma posição mais basal na árvore filogenética, podendo-se inferir que as linhagens que deram origem a esses isolados, provavelmente, são ancestrais dos demais isolados de CABMV brasileiros. Além disso, o isolado proveniente de Jacupiranga (estado de São Paulo) também se apresentou como o principal (*major*) parental dos recombinantes provenientes dos estados de Minas Gerais (HQ880243 e DQ397525) e Pernambuco (DQ880242). Esses resultados estão de acordo com a evolução do cultivo do maracujazeiro no Brasil (MELETTI, 2011) e deixam dúvidas sobre a origem do CABMV, inicialmente atribuída às introduções de feijão-caupi provenientes da África (GIBBS et al., 2008). Nicolini et al. (2012), porém, não observaram eventos de recombinação entre os isolados de CABMV analisados, possivelmente por não terem analisado as sequências de São Paulo estudadas neste trabalho.

Quando as análises filogenéticas foram realizadas para parte da região da CI (parcial) também não foi possível observar agrupamentos de acordo com região geográfica e hospedeiros. Uma das dificuldades nessas análises da CI, é que há apenas três

sequências completas disponíveis no *GenBank* e nenhuma da CI, o que impossibilita comparações mais abrangentes. Porém, o que chamou a atenção, é que nas análises filogenéticas da CI, observou-se que a divisão dos grupos ocorreu de acordo com as regiões em que a cultura do maracujá já era difundida há mais tempo, como nos municípios de Bauru-SP, Alvinlândia-SP, Adamantina-SP, Garça-SP, Jacupiranga-SP, Fernão-SP e São José da Boa Vista-PR. Isolados virais de áreas em que a cultura do maracujá foi introduzida recentemente, como Campinas-SP, Monte Alegre do Sul-SP, Planaltina-DF e Urutaí-GO permaneceram no mesmo grupo monofilético.

No Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, a busca por novas áreas de cultivo de maracujá, distantes das áreas tradicionais, tem sido um meio de, pelo menos, promover um atraso na entrada do CABMV nos pomares novos (GARCEZ et al., 2011). Porém, mesmo distante das áreas em que o vírus é endêmico e de pomares infectados, o vírus acaba entrando no sistema, o que levanta a hipótese de que deve haver importantes fontes de inoculo naturais ainda não determinadas. É possível que em áreas novas de cultivo de maracujá o reservatório do CABMV esteja em espécies de Fabaceae da vegetação nativa, e que, muito provavelmente, o vírus tenha se adaptado para infectar maracujá, como sugerido por Gibbs et al. (2008). Espécies de Fabaceae da vegetação nativa do gênero *Senna* spp. e *Macroptilium* spp., além outras Fabaceae utilizadas para adubação verde como *Crotalaria* spp. e *Mucuna* spp., podem estar fazendo este papel, uma vez que já foram confirmadas como hospedeiras do CABMV (NICOLINI et al., 2012; SILVA et al., 2012).

A obtenção e implantação de mudas altas no campo pode, em princípio, parecer mais oneroso, principalmente devido aos custos com mão de obra e gastos com água de irrigação. No entanto, esse custo pode ser compensado no momento de implantação do pomar devido à menor perda de mudas altas em relação às baixas, refletindo em menor gasto para a reposição. Além disso, quanto à qualidade de polpa e rendimento de frutos, observou-se que os frutos produzidos a partir de plantas oriundas de mudas altas se mostraram superiores. Outro fator a ser considerado foi a infecção pelo CABMV, que apesar das mudas altas não terem retardado a entrada do vírus no pomar, ocorreu um maior período de latência, que pode ter refletido na qualidade e produção por, pelo menos, mais um ciclo produtivo. Dessa forma, o produtor não teria custos para a implantação de um novo pomar, compensando os gastos iniciais para a produção de mudas altas.

A partir das principais expressões dos sintomas, nos frutos de maracujá, induzidos pelo CABMV como espessamento do pericarpo, redução do tamanho e do volume de polpa e deformações torna-se inviável a sua comercialização *in natura*, pois a sua classificação é atribuída de acordo com os parâmetros de tamanho (diâmetro) e defeitos encontrados no fruto (CEAGESP, 2004b). O melhor rendimento de polpa associado às melhores qualidades

físico-químicas, pode proporcionar, principalmente ao pequeno agricultor, a manutenção do pomar por pelo menos mais um ciclo produtivo, mesmo depois da detecção do vírus, tendo como opção o escoamento da produção para a fabricação de produtos derivados do maracujá, sendo o principal subproduto o suco (ROSSI et al., 2001). O alto índice de acidez do suco é um fator desejável para a indústria, uma vez que a acidez reduz a adição de acidulantes no suco (NASCIMENTO, 1996). Essa característica também é interessante para o mercado de fruta fresca, uma vez que o consumidor prefere frutos mais doces e menos ácidos (CAVICHOLI et al., 2008).

Há alguns padrões estabelecidos pelo mercado com relação aos parâmetros físico-químicos para que o fruto se adeque à faixa de aceitação comercial. No caso da ATT, pode variar de 3,2% a 4,5%, e no caso dos sólidos solúveis totais é aceitável de 13 a 15°Brix (COSTA et al., 2008). Os frutos de maracujá-azedo 'Sul-Brasil', avaliados no presente trabalho, em ambos os sistemas de produção, atenderam às exigências do mercado para consumo *in natura* e para a indústria, uma vez que apresentaram médias de ATT em torno de 4,42 e 11°Brix. Vale ressaltar que os valores dos coeficientes de variação, observados nas análises físico-químicas dos frutos, podem estar relacionados à heterozigotidade das plantas, pelo fato destas serem oriundas de propagação por sementes, o que provavelmente resultou em uma elevada variabilidade genética entre as plantas avaliadas (SILVA et al., 2005).

O mercado de sucos encontra-se em constante ascensão no Brasil, o que torna a comercialização da polpa, principalmente congelada, um investimento lucrativo e com custos relativamente baixos para o produtor (MORZELLE et al., 2009). O comércio de polpa congelada é uma alternativa para estocar a produção e vender quando os preços estiverem mais interessantes, geralmente nas entressafas, além de proporcionar o aproveitamento das frutas impróprias para o comércio *in natura*. Outra opção para o produtor comercializar a segunda safra de maracujá (normalmente com 100% das plantas infectadas pelo CABMV) seria a personalização do seu produto, o que pode diferenciá-lo dos demais, agregando valor, aumentando a renda e garantindo a sua fixação no campo. Outra opção seria a comercialização de folhas para a indústria fitoterápica uma vez que o CABMV não interfere na síntese das vias metabólicas secundárias dos alcaloides e flavonoides (TOMOMITSU et al., 2014).

Em estudos realizados por Ribeiro et al. (2012), avaliando diferentes estádios fenológicos de mudas de maracujá (0,30 cm, 0,70 cm, 1,10 cm, 1,50 cm e 1,90 cm), os autores constataram que o tamanho de frutos, qualidade de polpa e produtividade apresentaram melhores resultados em mudas tardias. Por sua vez, Laredo (2013) utilizando mudas maracujazeiro cv. Redondo, em diferentes estádios fenológicos observaram que para os parâmetros número de gavinhas, comprimento dos ramos, número de folhas, número

médio de flores; peso de fruto, diâmetro do fruto, teor de sólidos solúveis, acidez total titulável e produtividade média (kg/ha), resultados foram superiores quando as mudas foram introduzidas tardiamente. Esses dados corroboram aos obtidos no presente trabalho, quando foi constatado que frutos colhidos de plantas oriundas de mudas altas (0,80 cm) apresentaram melhores resultados físico-químicos e rendimento de polpa.

Em resumo, no presente trabalho, análises filogenéticas indicaram uma elevada variabilidade genética de isolados de CABMV provenientes de pomares de maracujá-azedo de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo e alguns pomares do Paraná, Goiás e Distrito Federal. Porém, não houve um claro agrupamento dos isolados por região geográfica ou por hospedeiro. No pomar monitorado no presente trabalho foram capturadas e identificadas 16 espécies de afídeos, sendo que espécies do gênero *Aphis* foram consideradas as mais importantes na epidemiologia do CABMV no Vale do Ribeira. Diante da não disponibilidade de variedades de maracujazeiro resistentes ao CABMV, e em função da dificuldade e ineficiência do controle químico dos afídeos vetores, visando à redução da suscetibilidade do maracujazeiro ao CABMV, foi avaliado um pomar formado com mudas altas e mudas baixas da mesma variedade ('Sul Brasil'). Observou-se que, tanto a chegada do vírus, o aparecimento dos sintomas nas plantas como a disseminação do vírus no pomar, foi mais rápido nas plantas oriundas de mudas baixas. Além disso, alguns parâmetros como rendimento de polpa, ATT e °Brix foram significativamente superiores em frutos colhidos de plantas oriundas de mudas altas. Essas observações reforçam as recomendações da importância da produção de mudas em condições protegidas com tela antiafídeos, e a formação do pomar com mudas desenvolvidas (com pelo menos 80 cm de altura) e livres de vírus. O emprego dessas tecnologias, consideradas de baixo custo, pode ser uma garantia para o incremento do rendimento da produção de maracujá e da renda do pequeno produtor do Vale do Ribeira.

## 7. Conclusões

- Análises filogenéticas de isolados de CABMV, provenientes de diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, Paraná, Goiás e Distrito Federal, indicaram uma elevada variabilidade genética;
- De acordo com as análises filogenéticas, realizadas com sequências da capa proteica (CP) e da inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) de isolados de CABMV, não foi possível observar agrupamentos por região geográfica e/ou hospedeiro;
- A afidofauna local que sobrevoou o pomar de maracujá, situado em Pariquera-Açu (Vale do Ribeira, SP), foi constituída por dezesseis espécies de afídeos pertencentes a onze gêneros;
- Revoadas constantes de afídeos foram descritas no pomar de maracujá durante todo o período de monitoramento da afidofauna. Porém, as espécies apresentaram a tendência de se separar e formar dois grupos sobrepostos distintos com grande potencial para a disseminação do CABMV, independentemente do período do ano considerado;
- Das espécies de afídeos que sobrevoaram o pomar de maracujá, 50% eram oligófagas e 50% eram polífagas, o que permitiu constatar um equilíbrio da população, com relação ao hábito alimentar;
- Apesar do equilíbrio da população de afídeos, com relação ao hábito alimentar, a maioria das espécies polífagas foi mais abundante, favorecendo a introdução, transmissão, manutenção e consequente disseminação do CABMV no pomar de maracujá;
- Os parâmetros epidemiológicos empregados para a descrição da afidofauna permitiram estabelecer que os afídeos do gênero *Aphis* se caracterizaram como os principais vetores associados à transmissão do CABMV;
- Dentre as seis espécies do gênero *Aphis* relatadas, *A. gossypii* foi a mais abundante e comum no pomar de maracujá, o que evidenciou a sua importância na epidemiologia do CABMV, na área monitorada;

- Mesmo com a constatação de baixas revoadas e da baixa diversidade de espécies de afídeos, a afidofauna alada relatada neste trabalho, apresentou grande potencial para a transmissão e disseminação do CABMV;
- A introdução do vírus no pomar ocorreu, praticamente, no mesmo período para ambos os sistemas de cultivo (mudas altas e mudas baixas), porém, a expressão dos sintomas foi tardia no pomar constituído por mudas altas;
- A introdução de tecnologias de produção de mudas em condições protegidas, como por exemplo, em telados antiafídeos, associada à produção de mudas mais desenvolvidas, levadas a campo com no mínimo 80 cm de altura, são práticas recomendadas para o desenvolvimento da passicultura no Vale do Ribeira.

## 8. Referências

- ABREU, A.P.; SOUZA, M.M.; SANTOS, E.A.; PIRES, M.V.; PIRES, M.M.; ALMEIDA, A.A.F. *Passion flower* hybrids and their use in the ornamental plant Market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v.184, p.389-399, 2008.
- ABREU, P.C.O.V.; NOGUEIRA, C.R. Spatial distribution of species at Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Ciência e Cultura**, v.41, p.897-902, 1989.
- ADAMS, M.J., ZERBINI, F.M., FRECHA, R., RABENSTEIN, F., STENGER, D.C.; VALKONEN, J.P.T. **Potyviridae**. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press. 2012. p.1069-1089.
- ADAMS, M.J.; ANTONIN, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the Family *Potyviridae*. **Archives of Virology**, v.150, p.459-479, 2005.
- AGRIFANUAL, 2013. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP, 480p.
- ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; SANTANA, E.N.; NASCIMENTO, A.V.S.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Transgenic passionfruit expressing na RNA derives from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* are resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.33-38, 2005.
- ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil Central**. Planaltina DF: Embrapa Cerrados, 17p. 2001.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2008. Editora Gazeta Santa Cruz. Santa Cruz do Sul – RS. 2008. p.10-20.
- ATIRI, G.I.; LIGAN, D. Effect of pyrethroids (cypermethrin and deltamethrin) on the disease expression. of *cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.15, p.31-37, 1986.
- BAKER, C.A.; JONES, L. A New Potyvirus found in *Passiflora incence* in Florida. **Plant Disease**, v.91, p.227. 2007.
- BARROS, D. R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA, J. E. A.; ANTUNES, T. F. S.; ZERBINI, F. M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of Cowpea aphis-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, v.156, p.1085-1091, 2011.
- BARROS, D.R. **Análise comparativa do genoma de dois isolados de Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) proveniente de diferentes hospedeiros**. 2007. 67p. Dissertação (mestrado em Fitopatologia)- Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFUOH, A. Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: a review. **International Journal of Pest Management**, v.48, p.155-168, 2002.

BELLIURE, B.; AMORÓS-JIMÉNEZ, R.; FERERES, A.; MARCOS-GARCIA, M.A. Antipredator behaviour of *Myzus persicae* Affects transmission efficiency of *Broad bean wilt virus 1*. **Virus Research**, v.159, p.206-214, 2011.

BENEVIDES, C.R.; GAGLIANONE, M.C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florais na região norte fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, p.415-421, 2009.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C, MILWARD-de-AZEVEDO, M.A; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. (2013) *Passifloraceae*. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov/jabot/floradobrasil/FB128567>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2013.

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

BEZERRA, D. R.; LIMA, J. A. A.; XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.553-560, 1995.

BLACKMAN, L.R. **Reproduction, cytogenetics and development**. In: MINKS, A.K.; HARREWING, P. (Eds). *Aphids: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier. (word crop pests, 2A) p.163-191, 1987.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Additions and amendments to “Aphids on the World’s Plants”**. **Zootaxa**. v.2774, p.57-68, 2011. Disponível em: <<http://www.mapress.com/zootaxa/2011/f/zt02774p068.pdf>> Acesso em: 06 de março de 2014.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Taxonomic issues**. In: VAN EMDEN, H.F.; HARRINGTON, R. (Eds.). *Aphids as crop pests*. CABI Publishing, Wallingford, p.1-29, 2007.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Aphids in the world’s crops. An identification and information guide**. John Wiley & Sons, New York, 2000 476p.

BLACKMAN, R.L. **Invertebrates types-Aphids**. Ginn e Co Ltda, London, 1974, p.1-175.

BLANC, S.; UZEST, M.; DRUCKER, M. New research horizons in vector-transmission of plant viroses. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p.483-491, 2011.

BOCK, K.R.; CONTI, M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, n.134, 1974.

BORGUINI, M.G.; SAMPAIO, A.C.; LEONEL, S. **Uso de subprodutos do maracujazeiro na alimentação animal nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos**. 2008. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=18212>>. Acesso em: 30 jun.2013.

BOTJES, J.O. **De bladrolziekte van de aardappelpant**. 1920.

BRAGARD, C.; CACIAGLI, P.; LEMAIRE, O.; LOPEZ-MOYA, J.J.; MACFARLANE, S.; PETERS, D.; SUSI, P.; TORRANCE, L. Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. **Annual Review of Phytopathology**, v.51, p.177-201, 2013.

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

BRANDES, E.W. Artificial na insect transmission of sugar cane mosaic. **Journal of Agriculture Research**, v.19, p.131-138, 1920.

BRAULT, V.; UZEST, M.; MONSION, B.; JACQUOT, E.; BLANC, S. Aphids as transport devices for plant viroses. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.524-538, 2010.

BROVADBENT, L. The correlation of aphid number with the spread of leaf roll and rugose mosaic in potato crops. **Annals of Applied Biology**, v.37, p.58-65, 1950.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridização em Maracujá. In: BÓREM, A. (Ed.). **Hibridização artificial em plantas**. Viçosa: UFV, 1999, 546 p.

CAO, J.; LI, J.; NIU, J.; LIU, X.; ZHANG, Q. Population structure of *Aphis spiraecola* on pear trees in China identified using microsatellites. **Journal of Economic Entomology**, v.105, p.583-591, 2012.

CARLETTO, J.; LOMBAERT, E.; CHAVIGNY, P.; BRÉVAULT, T.; LAPCHIN, L.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivate host plants. **Molecular Ecology**, v.18, p.2198-2212, 2009.

CARVALHO, J.C.; MIRANDA, D. L. **As exportações brasileiras de frutas: um panorama atual**. Brasília: SOBER, 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/1300.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

CARVALHO, L.M.; BUENO, V.H.P.; MARTINEZ, R.P. Levantamento de afídeos alados em plantas hortícolas em Lavras-MG. **Ciência Agrotécnica**, v.26, p.523-532, 2002.

CARVER, M.; GROSS, G.F.; WOODWARD, T.E. Hemiptera. **The Insects of Australia**, p.429-509, 1991.

CAVICHIOLI, J.C.; RUGGIERO, C.; VOLPE, C.A. Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.649-656, 2008.

CERMELI, M. Notas preliminares sobre la fluctuacion de afídeos em Cagua, Estado Aragua, Venezuela. **Agronomie Tropicale**, v.20, p.311-321, 1970.

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

CERVI, A. C. Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950 – 2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras. **Estudos de Biologia**, v.27, p.19-24, 2005.

CHAGAS, C. M. **Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil**. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). A cultura do maracujazeiro no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 1991, p.175-186.

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

CHAGAS, C.M.; COLARICCIO, A. **Doenças causadas por vírus e associadas a fitoplasmas**. In: Aspectos Fitossanitários do maracujazeiro. São Paulo. Instituto Biológico São Paulo, p.21-36, 2006.

CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA JR., C.T.; LOPES, L.C.; FERRARI J.T.; BELLUZI, B.M. Ocorrência do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.187-190, 1992.

CHANEY, R.L.; LEE, Y.M. Field Identification Guide to Aphids. **Quebec Vegetable Crops**, 1992.

CHARNOV, E.L.; GILLOOLY, J.F. Thermal time: body size, food quality and the 10 °C rule. **Evolutionary Ecology Research**, v.5, p.43–51, 2003.

CHEN, B.; FRANCKI, R.I.B. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. **Journal of General Virology**, v.71, p.939-944, 1990.

CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, v.146, p.757-766, 2001.

CHUNG, B. Y. W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.5897-5902, 2008.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p. 475-483, 1977.

COLARICCIO, A.; CHAGAS, C. M.; MIZUKI, M. K.; VEJA, J.; CEREDA, E. Infecção natural do maracujá amarelo pelo vírus do mosaico do pepino no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.254-257, 1987.

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

Compania de Entrepostos e Armazenagens Gerais de São Paulo, CEAGESP. **Classificação do maracujá**. Disponível em: <[www.ceagesp.com.br](http://www.ceagesp.com.br)>. Acesso em: 18 jan, 2014b.

COSTA, A.F.; BRÁS, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro (VEFM) por afídeos (Hemiptera-Aphididae). **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.376, 1995.

COSTA, A.F. **Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos de maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa***. 1996. 129p. Doutorado, Viçosa, Minas Gerais. Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 1996.

COSTA, A.M.; COHEN, K.O.; TUPINAMBÁ, D.D.; BRANDÃO, L.S.; SILVA, D.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Propriedades físicas e físico-químicas de maracujás cultivados no sistema orgânico e convencional em consórcio com mandioca**. Comunicado técnico 158, Embrapa. 2008.

COSTA, C.L. Variações sazonais da migração de *M. persicae* em Campinas nos anos 1967-1969. **Bragantina**, v. 29, p.347-360, 1970.

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas - I. Insetos. In: LUZ, W.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.103-171, 1998.

COSTA, C., EASTOP, V.F.; Blackman, R.L. Brasileiro Aphidoidea: I. Key to families, subfamilies and account of the Phylloxeridae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p.197-215, 1993.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. **Aspectos Botânica**. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Eds.). Maracujá: Produção e qualidade na Passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.69-93, 2004.

DAMIRI, B.V.; AL-SHAHWAN, M.A.; AL-SALEH. O.A.; AMER, M.A. Identification and characterization of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* isolates in Saudi Arabia. **Journal of Plant Pathology**, v.95, p.79-85. 2013.

DIEGUES, A.C. **O Vale do Ribeira e Litoral de São Paulo: meio-ambiente, história e população**. 41p. 2007. Disponível em: <<http://nupaub.fflch.usp.br/sites/nupaub.fflch.usp.br/files/color/cenpec.pdf>> Acesso em: 17 de fev. 2014.

DI PIERO, R.M.; NOVAES, Q.S.; PASCHOLATI, S.F. Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Lentinula edodes* Mushrooms on the Infection of Passionflower with *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.269-278, 2010.

DI PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do *Passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização do maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, v.35, p.139-140, 2006.

DIXON, A.F.G. **Aphid ecology**. London: Chapman e Hall. 1998, 286p.

DIXON, A.F.G.; HONEK, A.; KEIL, P.; KOTELA, M.A.A.; SIZLING, A.; JAROSIK, V. Relationship between the minimum and maximum temperatures thresholds for development in insects. **Functional Ecology**, v.23, p.257-264, 2009.

DIXON, A.F.G; KINDLMANN, P. Role of plant abundance in determining the abundance of herbivorous insects. **Oecologia**, v.83, p.281-283, 1990.

DIXON, A.F.G; KINDLMANN, P.; LEPS, J.; HOLMAN, J. Why there are so few species of aphids especially in the tropics. **American Naturalist**, v.129, p.580-592, 1987.

DIXON, A.F.G. Aphid ecology: life cycles, polymorphism, and population regulation. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v.8, p.329-353, 1977.

DOOLITTLE, SP.P. A new infectious mosaic disease of cucumber. **Phytopathology**, v.6, p.145-147, 1916.

EASTOP, V.F., COSTA, C.L.; BLACKMAN, R.L.. Brazilian Aphidoidea. III Sub-family Drepanosiphinae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p.1349-1355, 1993.

EASTOP, V.F. **The biology of the principal aphid virus vectors**.. In: PLUMP, R.T.; THRESH, J.M.(Eds.). *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. p.115-132, 1983.

EASTOP, V.F. **Worldwide importance of aphids as virus vector**. In: HARRIS, K.F.; MARAMOSCH, K. (Eds). *Aphids as Virus Vector*. New York: Academic Press, p.4-44, 1977.

EBERT, T.A.; CARTWRIGHT, B. Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera:Aphididae). **Southwestern Entomologist**, v.22, p.116-153, 1997.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Notícias. 2008. Disponível em: <[www.embrapa.br/noticias](http://www.embrapa.br/noticias)>. Acesso em: 08 ago. 2013.

FABRÍCIO, T. M. **Diversidade, variação sazonal e importância econômica dos afídeos (Homoptera: Aphidoidea) na Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antonio – SP) e nas áreas agrícolas e silviculturas do entorno.** 2003. 122p. Dissertação (Mestrado ecologia e recursos naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

FERERES, A.; KAMPMEIER, G.E.; IRWIN, M.E. Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with potyviridae. **Entomological Society of America**, v.92, p.542-548, 1999.

FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspect influencing plant virus transmission by homopteram insect. **Virus Research**, v.141, p.158-168, 2009.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: Aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p.101-102, 2004.

FERRAZ, J.V.; LOT, L. **Fruta para consumo *in natura* tem boa perspectiva de renda.** In: AGRIANUAL 2007: anuário da agricultura brasileira. Maracujá. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio p.387-388, 2006.

FERREIRA, S.S.; BARROS, D.R.; ALMEIDA, M.R.; ZERBINI, F.M.Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, v.59, p.221-230, 2010.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. **Passifloraceae.** In: Kubitzki, K. (Ed.) In: The families and genera of vascular plants. Berlin, Springer. v.9, p.270-281, 2007.

FIGUEREDO FILHO, D.B; SILVA JUNIOR, J.A. Desenvolvendo os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v.18, p.115-146, 2009.

FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Disease of passionflower (Passiflora spp.). **Pest Technology**, v.2, p.1-19, 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R..P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRMAIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola.** Piracicaba, FEALQ, 2002. 920p.

GANGA, R. M.D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E.G.M.; GRILI, G.V.; GONÇALVES, M.M.; CHAGAS, E.A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares RFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.494-498, 2004.

GARCÊZ, R.M. **Aspectos epidemiológicos do Cowpea aphid-borne mosaic virus em maracujazeiros e sua associação com a afidofauna.** 2012. 82p. Mestrado. São Paulo, SP. Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico, 2012.

GARCÊZ, R.M.; SILVA, L.A; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; MELETTI, L.M.M.; AZEVEDO-FILHO, J.A.; COLARICCIO, A. **Monitoring of the aphid fauna of vector-borne viruses in**

a newly introduced yellow passion-fruit crop. In: Hemipteran-Plant Interactions Symposium. Resumo número 39. 2011.

GIBBS, A. A. **Simple coevolution method for describing or comparing the distributions of virus-affected in a plant community.** In: PLUMB, R.T.; THRESH, J.M. (Eds.). Plant viruses Epidemiology: The spread and control of insect-borne virus, p.39-50, 1983.

GIBBS, A.J.; MACKENZIE, K.J.; GIBBS, M.J. The potyvirus of Australia. **Archives of Virology**, v.153, p.1411-1420, 2008.

GIBBS, A.J.; OHSHIMA, K.; PHILLIPS, M.J.; GIBBS, M.J. The prehistory of *Potyriviruses*: their initial radiation was during the dawn of agriculture. **PLoS ONE**, v.3, p.1-11, 2008.

GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M. **Reação de diferentes espécies, principalmente de leguminosas, a seis isolados de Vírus do Endurecimento dos frutos de Maracujazeiro.** In: Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Resumo, p.437, 1996.

GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. Fruta da paixão: panorama econômico do maracujá no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, p.29-35, 2006.

GONZÁLEZ-SEGNANA, L.R.; FARIÑA, A.E.; GONZÁLEZ, D.D.; MELLO, A.P.O.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Alternative host of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in sesame (*Sesamum indicum*) crops grown in Paraguay. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.6, p.539-542, 2013.

GROETERS, F.R. Tests for host-associated fitness trade-offs in the milkweed-oleander aphid. **Oecologia**, v.93, p.406–411, 1993.

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

HARRIS, K. F. **Leafhoppers and aphids as biological vectors:** vector-virus relationships. In: HARRIS, K. F.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). Leafhopper vectors and plant disease agents. New York: Academic Press, p. 217-308, 1979.

HARRIS, K. F.; MARAMOROSCH, K. (Eds.). **Vectors of Plant Pathogens**, New York –USA, Academic Press, 1980, 467p.

HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. (Eds.). **Virus-insect-plant interaction**, Academic Press: United States of America. 2001, 375p.

HEIE, O.E. The Aphidoidea (Hemíptera) of Fennoscandia and Denmark. I. general part. The families Mindaridae, Hormaphididae, Thelaxidae, Anoeciidae, and Pemphigidae. **Fauna Entomologica Scandinavica**, v.9, p.1-236, 1980.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. Great Britain, Academic Press, 2002. 1001p.

ILHARCO, F.A. **Equilíbrio Biológico de Afídeos**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 1992.

ILHARCO, F.A.; VAN HARTEN, A. **Sistemática**. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Eds). World crop pests: Aphids their biology, natural enemies and control. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Netherlands, p.51-77, 1987.

IMAI, H.; OHMORI, T.; KUROKAWA, Y.; MUTA, T.; ARAI, K. New Record of *Passion fruit woodiness virus* in Japan. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 62, p.459-465, 1996.

INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Distribuidor de vírus. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, v.16, p.26-29, 2002.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Maracujá: área plantada e quantidade produzida. Brasília, 2011**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 jun. 2013.

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.; JUQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.81-110, 2005.

JUNQUEIRA, N.T.V.; VERAS, M.C.M.; NASCIMENTO, A.C.; CHAVES, R.C.; MATOS, A.P.; JUNQUEIRA, K.P. **Importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrado. 2001, 18p.

KENNEDY, J.S.; DAY, M.F.; EASTOP, V.F. **A conspectus of aphids as vectors of plant viruses**, London, Commonwealth Institute of Entomology, 1962.

KENNEDY, J.; SBOOTH, C.O.; KERSHAW, W.J.S. Host finding by aphids in the field. **Annals of Applied Biology**, v.49, p.1-21, 1961.

KENNEDY, J.S.; STROYAN, H.L.G. Biology of aphids. **Annual Review Entomology**, v.4, p.139-160, 1959.

KILALO, D.C.; OLUBAYO, F.M.; ATEKA, E.M.; HUTCHINSON, J.C.; KIMENJU, J.W. Monitoring of Aphid Fauna in Passionfruit Orchards in Kenya. **International Journal of Horticultural & Crop Science Research**, v.3, p.1-18, 2013.

KIM, H., LEE, W & LEE, S. Three new records of the genus *Aphis* Hemiptera : Aphididae from Korea. **Journal of Asia Pacific Entomology**, v.9, p.301-312, 2006.

KIRCHNER, S.M.; HILTUNEN, L.; DORING, T.F.; VIRTANEN, E.; PALOHUHTA, J.P.; VALKONEN, J.P.T. Seasonal phenology and species composition of the aphid fauna in a northern crop production area. **PLOS ONE**, v.8, p.1-12, 2013.

KIRCHNER, S.M.; DOERING, T.F.; SAUCKE, H. Evidence for trichromacy in the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulz.) (hemiptera:Aphididae). **Journal of Insect Physiology**, v.51, p.1255-1260, 2005.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidade de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.409-32, 1986.

KONATE, B.G.; NEYA, B.J. Rapid detection of cowpea aphid-borne mosaic virus in cowpea seeds. **Annals of Applied Biology**, v.129, p.261-266, 1996.

LAMBOROT, C.H.L.; GUERRERO, S.M.A. Dinâmica populacional de los afídeos de cereales y sus enemigos naturales in la Provincia de Santiago durante las temporadas 1976 y 1977. **Investigación Agrícola**, v.5, p.23-32, 1979.

LAREDO, R.R. **Tamanho da muda na produção e qualidade dos frutos de maracujazeiro cv redondo amarelo**. 2013, 70p. Dissertação (mestrado em Agronomia/Fitotecnia – Produção vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

LAZZARI, S.N.M.; LAZZAROTTO, C.M. Distribuição altitudinal e sazonal de afídeos (Hemiptera, Aphididae) na Serra do Mar, Paraná, Brasil. **Resvista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.891-897, 2005.

LAZZAROTTO, C.M.; LAZZARI, S.M.N. Richness and diversity of aphids (Homoptera, Aphididae) along an altitudinal gradient the Serra do Mar, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p.977-983, 1998.

LIMA, A. A.; BORGES, A.L. **Solo e clima**. In: LIMA, A.A. (Ed.) Maracujá. Produção: Aspectos técnicos. Embrapa–SPI, Brasília, DF. p. 25-28, 2002.

LIMA, J.A.A.; SITTOLIN, I.M.; LIMA, R.C.A. **Diagnoses e Estratégias de Controle de Doenças Ocasionalmente por Vírus**. In: FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; LIMA, J.A.A.; SILVA, P.H.S. (Eds.). Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos. 1.ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p.405-459, 2005.

LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G.; KITAJIMA, E.W. Isolamento de um potyvirus de plantas de maracujá com sintomas de mosaico. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.305-308, 1985.

LORETO, T.J.G.; VITAL, A. **Viroses e Micoplasmoses do Maracujá em Pernambuco**. Informe SERDV (Serviço de Defesa Sanitária Vegetal), Recife, 1983.

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 Agrícola**, v.66, p.414-418, 2009.

- MANICA, I. **Fruticultura tropical 1: Maracujá**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981, 151 p.
- MARTIN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, v.78, p. 2701-2705, 1997.
- MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v.26, p.2462-2463, 2010.
- MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Cowpea aphid-borne mosaic virus-Morocco and South African Passiflora virus are strain of some potyvirus. **Archives of Virology**, v.136, p.207-217, 1994.
- MEDINA, J.C. et al. **Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização**. Campinas, ITAL. 1980, 207p.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do Maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 83-91, 2011.
- MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas (6). Jaboticabal, SP: Funep. 2010, 55p.
- MELETTI, L. M.M. **Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (Passifloraceae)** In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do Maracujazeiro. Campos dos Goytacazes, Palesras Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM>. 6. 2003.
- MELETTI, L. M.M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000, p. 145-153.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: IAC (Boletim Técnico no. 181). 1999, 64 p.
- MELLO, R.M. **Desempenho agrônomo e reação à virose do endurecimento dos frutos de Progenie de maracujazeiro azedo no Distrito Federal**. 2009. 134p. Mestrado. Brasília, DF: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009.
- MELO, J.R.F. **Patossistema cowpea aphid-borne mosaic vírus/maracujazeiro-amarelo: infectividade e invasão sistêmica de isolados e caracterização molecular**. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia vegetal) - Universidade federal de lavras, Lavras, 2011.
- MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. **World crop pests aphids: their biology, natural enemies and control**. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands, 1987, 450p.

MIYAZAKI, M. **Morphology of Aphids** In: MINKS, A.K.; HAWERWING, P. (Eds). *Aphids, their Biology. Natural Enemies and Control*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, v.2A, p.299-313, 1987.

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

MOERICKE, V. Über die Lebensgewohnheiten der geflügelten Blattläuse (Aphidina) unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens bei den Insekten. **Z. Angew. Entomol**, v.37, p.29-91, 1955.

MORENO, A.; TJALLINGII, W.F.; FERNANDEZ-MATA, G.; FERERES, A. Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. **Journal of General Virology**, v.93, p.662-667, 2011.

MORZELLE, M.C.; SOUZA, E.C.; ASSUMPTÃO, C.F.; FLORES, J.C.J.; OLIVEIRA, K.A.M. Agregação de valor a frutos de ata através do desenvolvimento de néctar misto de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e ata (*Annona squamosa* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.20, p.389-393, 2009.

MOURY, B.; FABRE, F.; SENOUSI, R. Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.17891-17896, 2007.

MUSCHNER, V.C.; ZAMBERLAN, P.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.34, p.1036-1043, 2012.

MÜLLER, F.P. Untersuchungen über Blattläuse mecklenburgischer Hochmoore. **Archives Freunde Naturg. Mecklenb**, v.18, p.31-41, 1978.

NARITA, N. **Epidemiologia do “Cowpea aphid borne mosaic virus” (CABMV) em maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP**. 2007. 65p. Dissertação (mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp, Botucatu, 2007.

NARITA, N.; YUKI, V. A.; NARITA, H. H.; HIRATA, A. C. S. Maracujá amarelo: tecnologia visando a convivência com o vírus do endurecimento dos frutos. **Pesquisa e Tecnologia**, v.9, 2012.

NARITA, N.; YUKI, V.A.; PAVAN, M.A. Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. **Summa Phytopathologica**, v.37, p.221, 2011.

NASCIMENTO, A. C. **Produtividade, incidência e severidade de doenças em nove genótipos de maracujazeiro azedo sob três níveis de adubação potássica no Distrito Federal**. 2003.133p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2003.

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

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

NASCIMENTO, T. B. **Qualidade do maracujá-azedo produzido em diferentes épocas no Sul de Minas Gerais**, 1996. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annual Entomological Society American**, v.90, p.521-541, 1997.

NELSON, M.R.; TUTTLE, D.M. The epidemiology of cucumber mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 of cantaloupe in an arid climate. **Phytopathology**, v.59, p.849-856, 1969.

NETO, S.S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N.A. **Manual de Ecologia dos Insetos**. Piracicaba – São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.

NG, C.K.J.; FALK, B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.44, p.183-212, 2006.

NG J.C.K., PERRY K.L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.505–511, 2004.

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

NOVAES, Q.S.; FREITAS-ASTUA, J.; 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**, v.52, p.648-654, 2003b.

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

NOVAES, Q. S. **Seleção de estirpes fracas de *Passion fruit woodiness virus* e tentativas de premunização para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro**. 2002. 74p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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 begomovírus no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.648, 2002.

NUTTER JR, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. **Crop Protection**, v.16, p.603-618, 1997.

O'LOUGHIN, G.T.; CHAMBERS, T.C. The systemic infection of an aphid by plant virus. **Virology**, v.22, p.262-271, 1967.

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

OLIVEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.L.; PEREIRA, A.V. Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de estacas de maracujazeiro-azedo (*P.edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.505-508, 2002.

PALACIOS, I.; DRUCKER, M.; BLANC, S.; LEITE, S.; MORENO, A.; FERERES, A. *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by aphids vector. **Journal of General Virology**, v. 83, p.3163-3171, 2002.

PAUTASSO, M.; POWELL, G. Aphid biodiversity is positively correlated with human population in European countries. **Oecologia**, v.160, p.839-846, 2009.

PECCOUD, J.; SIMON, J.C.; VON DOHLEN, C.; D'ACIER, A.C.; PLANTEGENEST, M.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F.; JOUSSELIN, E. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.474-487, 2010.

PERONTI, A. L. B. G.; SOUSA- SILVA, C. R. Aphis (Hemiptera: Aphidoidea) of ornamental plants from São Carlos, São Paulo state, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.50, p.137-144, 2002.

PERUCH, L. A. M.; SCHROEDER, A. L.; COLARICCIO, A.; GUIMARÃES, L.; CHAGAS, C. M. **Doenças do maracujazeiro amarelo**. Florianópolis, SC: EPAGRI (Boletim Técnico, 145) 2009, 99p.

PETERS, D.; BLACK, L.M. Infections of primary cultures of aphid cells with a plant virus. **Virology**, v.40, p.847-853, 1970.

PIRONE, T.P.; PERRY, K.L. Aphids: non-persistent transmission. **Advanced Botanical Reviews**, v.36, p.1-19, 2002.

PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.227-247, 1996.

PIRONE, T. P.; THORNBURY, D. W. Quantity of virus required for aphid transmission of a potyvirus. **Phytopathology**, v.78, p.104-107, 1988.

PIRONE, T.P. Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through membrane. **Virology**, v.23, p.107-108, 1964.

POSSEN, M.B. **Anatomy and physiology**: alimentary tract. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Eds). *World crop pests: Aphids their biology, natural enemies and control*. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Netherlands, p.79-97, 1987.

POWELL, G.; HARDIE, J. The chemical ecology of aphid host alternation: How do returnmigrants find the primary host plant? **Applied Entomological Zoology**, v.36, p.259-267, 2001.

PREGNOLLATO, W. e PREGNOLLATO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo; Adolfo Lutz, v.1, p.86, 1985.

QUINTELA, E.D.; NEVES, B.P.; QUINDERÉ, M.A.W.; Roberts, D.W. **Principais pragas do caupi no Brasil**. Goiânia, Embrapa CNPAF. Documentos 35, 38p, 1991.

QIAO, G.X.; ZHANG, G.X. Record of *Hormaphis Osten-Sachen* (Aphididae: Hormaphidinae) from China, with description of a new species. **Oriental Insects**, v.38, p.277-282, 2004.

RACCAH, S.; HUET, H.; BLANC, S. Potyvirus. In: HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. (Eds). **Virus-Insect-Plant Interactions**, p.181-206, 2001.

REITER, J. M. W. Instituto de planejamento e economia agrícola e Santa Catarina. **Maracujá**. Florianópolis, 69p, 1998.

RIBBANDS, C.R. The spread of *Myzus persicae* (Sulz) and of yellows viroses within a sugar beet crop. **Bulletin of Entomological Research**, v.54, p.267-283, 1963.

RIBEIRO, M.I.G.; SANTOS, V.A.; RAMOS, J.D.; CHAGAS, E.A.; LAREDO, R.R; SOUZA, A.G. **TAMANHO DA MUDA NA PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DOS FRUTOS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO**. In: XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves – RS, 2012.

RIZZI, L. C.; RABELLO, L. A.; MOROZINI- FILHO, W.; SAVASAKI, E. T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá-azedo**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SAA (Boletim Técnico, 235), 1998, 23 p.

ROBERT, Y. **Aphids and their environment**. In: MINKS, A.K.; HAWERWING, P. (Eds). *Aphids, their Biology. Natural Enemies and Control*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, v. 2A, p.299-313, 1987.

ROSSI, A.D.; ROSSI, F.S.; SILVA, J.R. **Análise setorial. Produção de sucos tropicais: maracujá**. Vera Cruz, AFRUVEC. 2001, 47p (Relatório técnico).

RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.218-246, 1987.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R. NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1996, 64p.

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

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS T. M. Pulgões: insetos vetores de viroses. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 3, n. 14, abril de 2006. Disponível em <[www.aptaregional.sp.gov.br/artigos](http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigos)> Acesso em: 24 jun. 2013.

SANTOS, E.A. **Melhoramento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) visando a resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus***. 2013. 143p. Doutorado. Campos dos Goytacazes, RJ. Centro de Ciências Tecnológicas Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2013.

SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do maracujazeiro: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB. 1994, 255p.

SHANNON, C. A mathematical theory of communication. **Bell Systems Technological Journal**, v, 27, p.379–423, 1948.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Cambridge: Cambridge University Press. 1994, 516p.

SILVA, F.M.; CORRÊA, L.S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. Enxertia de mesa em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.98-101, 2005.

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

SINGH, R.P.; KURZ, J.; BOITEAU, G. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.59, p.189-196, 1996.

SIQUEIRA, K.M.M.; KILL, L.H.P.; MARTINS, C.F.; LEMOS, I.B.; MONTEIRO, S.P.; FEITOZA, E.A. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do Vale do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.1-12, 2009.

SOGLIA, M.C.M., BUENO, V.H.P.; SAMPAIO, M.V. Desenvolvimento e Sobrevivência de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera:Aphididae) em Diferentes Temperaturas e Cultivares comerciais de Crisântemo. **Neotropical Entomology**, v. 31, p.211-216, 2002.

SOUSA-SILVA, C.R.; ILHARCO, F.A. **Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras**. São Carlos-SP, Editora da UFSCar. 85p. 1995.

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

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

STERN, D.L.; AOKI, S.; KUROSU, D.U. The life cycle natural history of the tropical aphid *Cerataphis fransseni* (Homoptera: Aphididae: Hormaphidinae), with reference to the evolution of host alternation in aphids. **Journal of Natural History**, v.29, p.231-242, 1995.

SYLVESTTER, E. S. Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. **Journal Economical Entomology**, v. 49, p. 789-800, 1956.

TAVARES, M.T. **Sobre afídeos (Hemiptera: Aphidoidea) e suas plantas hospedeiras no Estado de São Paulo**. VII Seminário Regional de Ecologia, Anais, p.127-135, 1996.

TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. **Passion fruit woodiness virus**. CMI/AAB, Description of Plant Viruses, n.122, 1973.

TAYLOR, R.H.; KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses which cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.24, p.173-186, 1964.

TOMOMITSU, A.T.; CHAVES, A.L.R.; DUARTE, L.M.L.; EIRAS, M.; SANTOS, D.Y.A.C. Effect of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* on growth and quantitative variation of total phenolics and flavonoids from *Passiflora edulis* Sims. **Boletim de Botânica**, v.32, 2014. No prelo.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C. MELETTI, L.M.M.; RESENDE, J.A.M. Resistance to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, v.90, p.1026-1030, 2006.

TRINDADE, D. R.; et al. Ocorrência do "Passion fruit woodiness virus" (PWV) em maracujazais no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.76-79, 1999.

UZEST, M.; GARGANI, D.; DRUCKER, M.; HÉBRAND, E.; GARZO, E.; CANDRESSE, T.; FERERES, A.; BLANC, S. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.17959-17964, 2007.

VALENTIN, J.L. **Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. Interciência, Rio de Janeiro, 2000, 117p.

VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M. et al. The N114 terminal region of Luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and essential for virus persistence in the aphid. **Journal of Virology**, v.71, p.7258-7265, 1997.

VON DOHLEN, C.D.; TEULON, D. A. J. Phylogeny and historical biogeography of new zealand indigenous aphidini aphids (Hemiptera, Aphididae): an hypothesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v.96, p.107-116, 2003.

WATSON, H.A.; ROBERTS, F. H. A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus* virus 3, potato virus Y, and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz.), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gel* (Koch). **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, v.127, p.543-576, 1939.

WATSON, M.A.; HEALY, M.J.R. the spread of beet yellows and beet mosaic viroses in the sugarbeet root crop. **Annals of Applied Biology**, v.40, p.189-183, 1953.

WIJS, J.J. The correlation between the transmission of passionfruit ringspot virus and population of flying aphids. **Netherlands Journal Ornallant Pathology**, v.80, p.133-144, 1974.

WILLIAMS, I.S.; DIXON, A.F.G. **Life cycles and polymorphism**. In: VAN-EMDEN H.; HARRINGTON, R. (Eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, p.69-85, 2007.

WOSULA, E.N.; DAVIS, J.A.; CLARK, C.A.; SMITH, T.P.; ARANCIBIA, R.A.; MUSSER, F.R.; REED, J.T. The role of aphid abundance, species diversity, and virus titer in the spread of sweetpotato potyviruses in Louisiana Mississippi. **Plant Disease**, v.97, p.53-61, 2013.

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. **Ocorrência de grave moléstia virótica em maracujá amarelo no Estado da Bahia**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Pelotas: SBF, v.5, p.915, 1979.

YUKI, V. A. **Epidemiologia e controle do mosaico (VMM – ME) em abobrinha-de-moita**. Piracicaba, 1990. 84 p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1990.

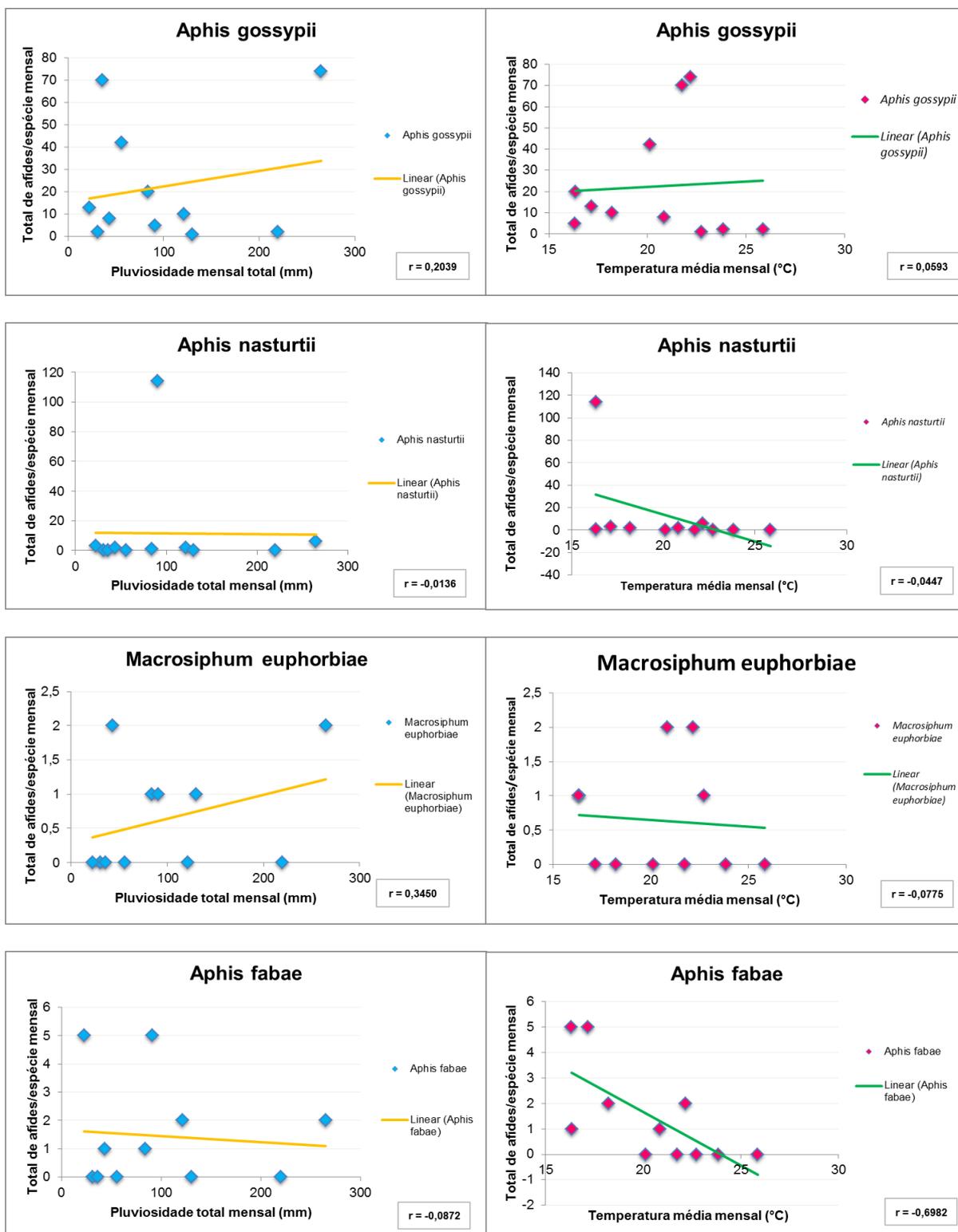
YUKI, V.A.; MIZOTE, F.A.; NARITA, N.; HOJO, H.; DELFINO, M.A.; OLIVEIRA, D.A. Epidemiologia do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p.19, 2006.

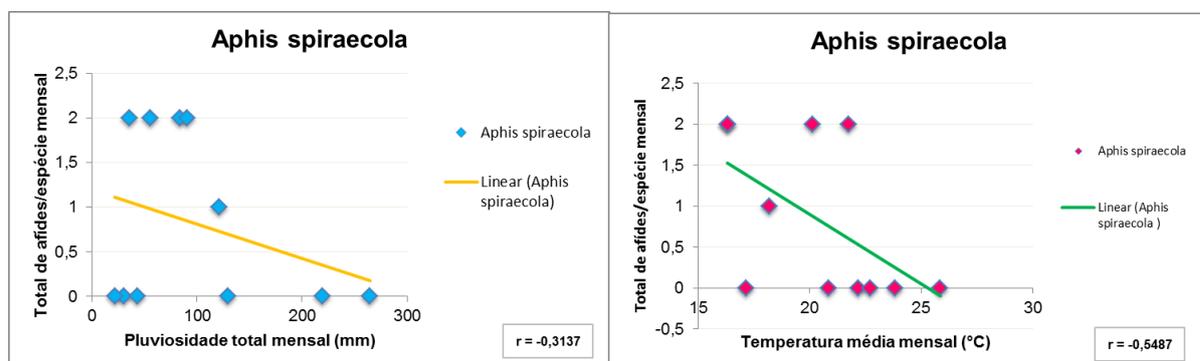
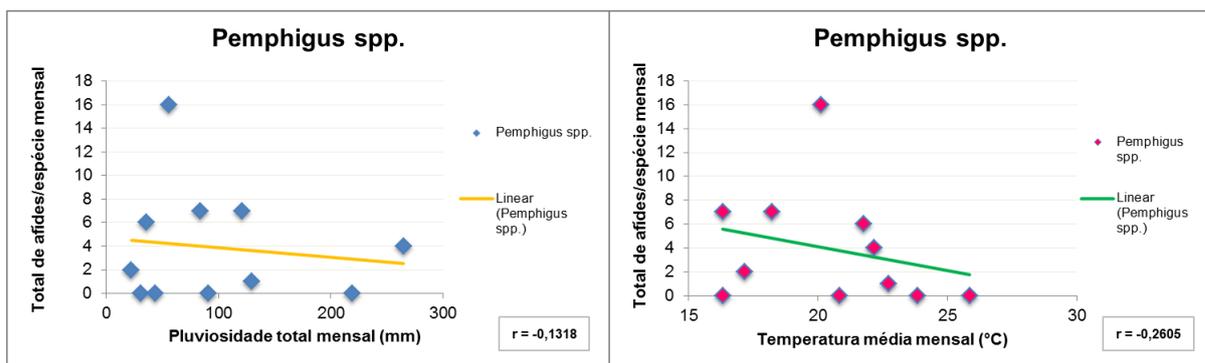
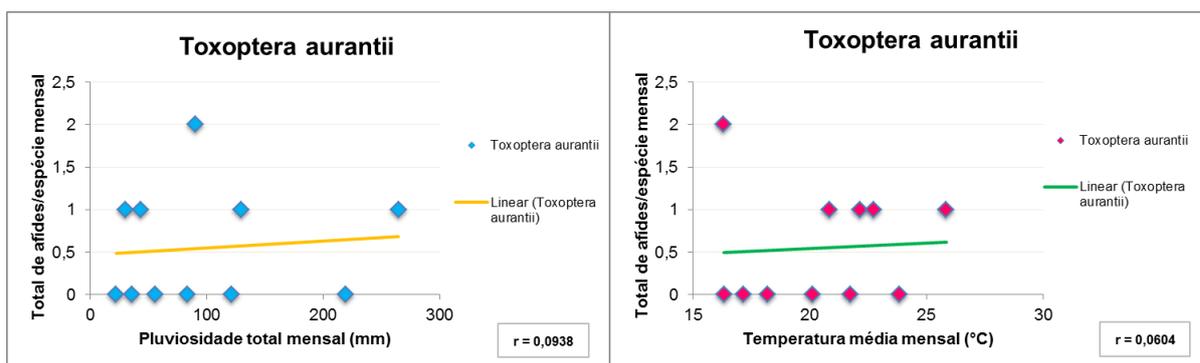
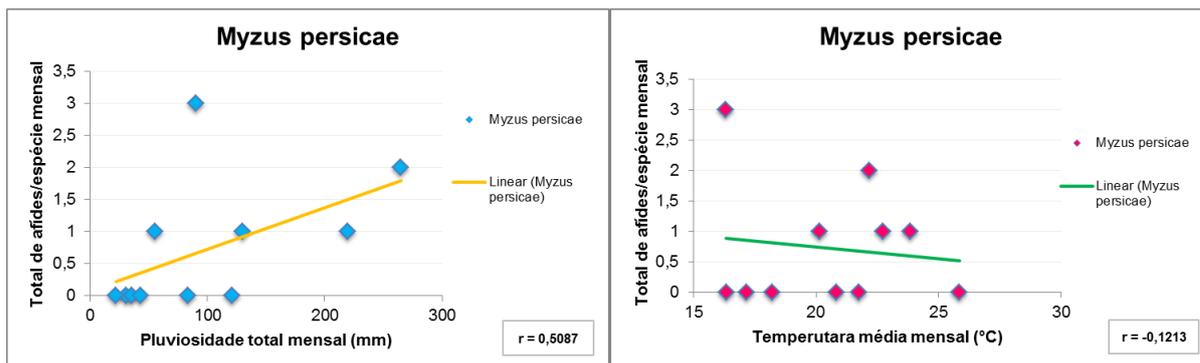
ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae* parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-50 1999.

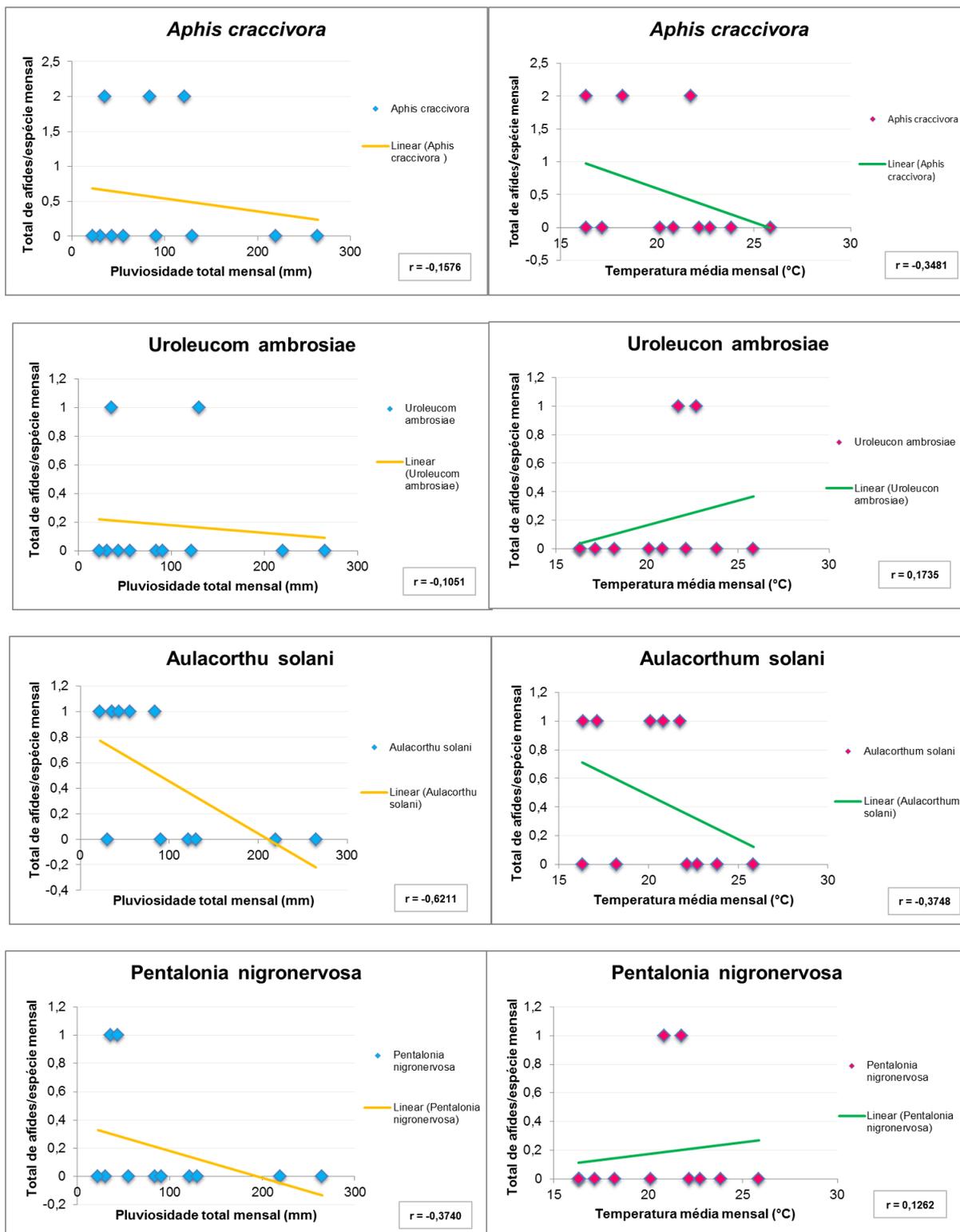
**A N E X O S**

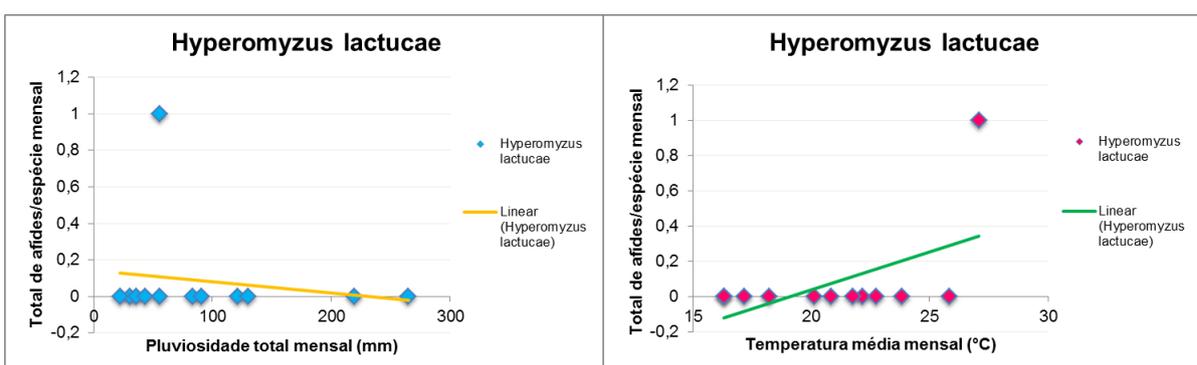
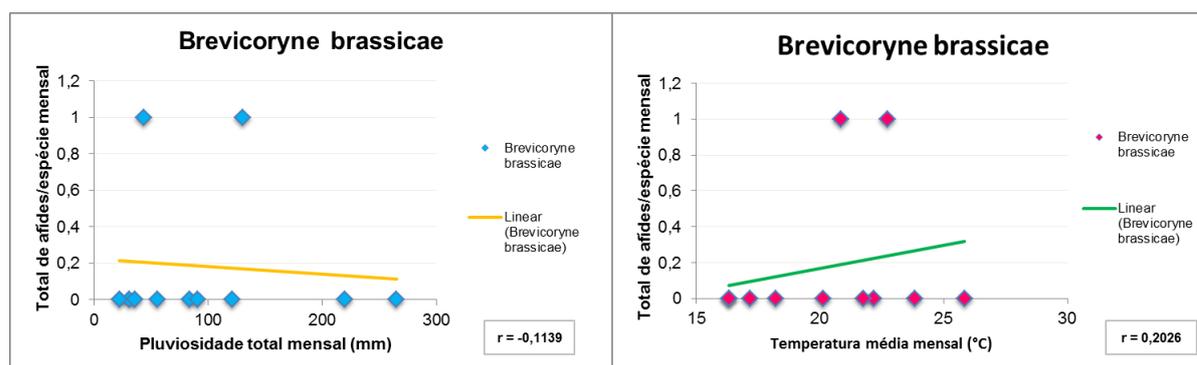
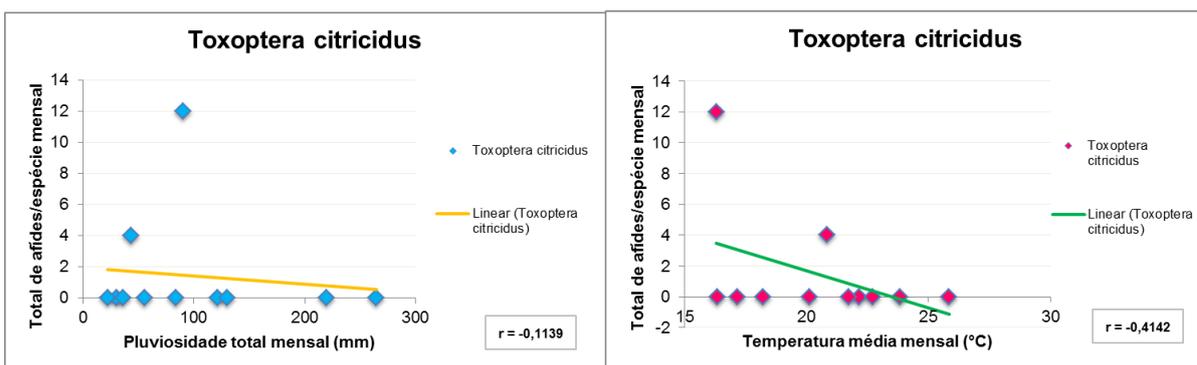
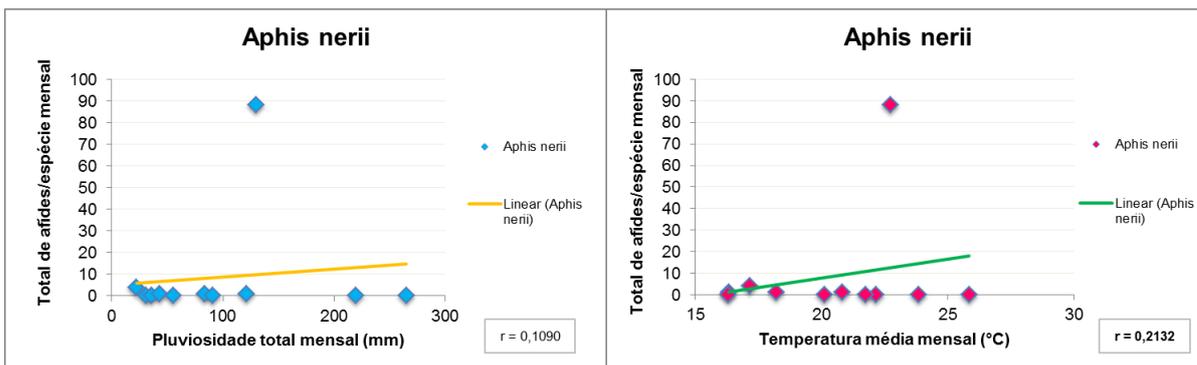
## Anexo A

Gráficos de temperatura e pluviosidade de cada espécie de afídeo quando submetidas ao coeficiente de *Pearson*.









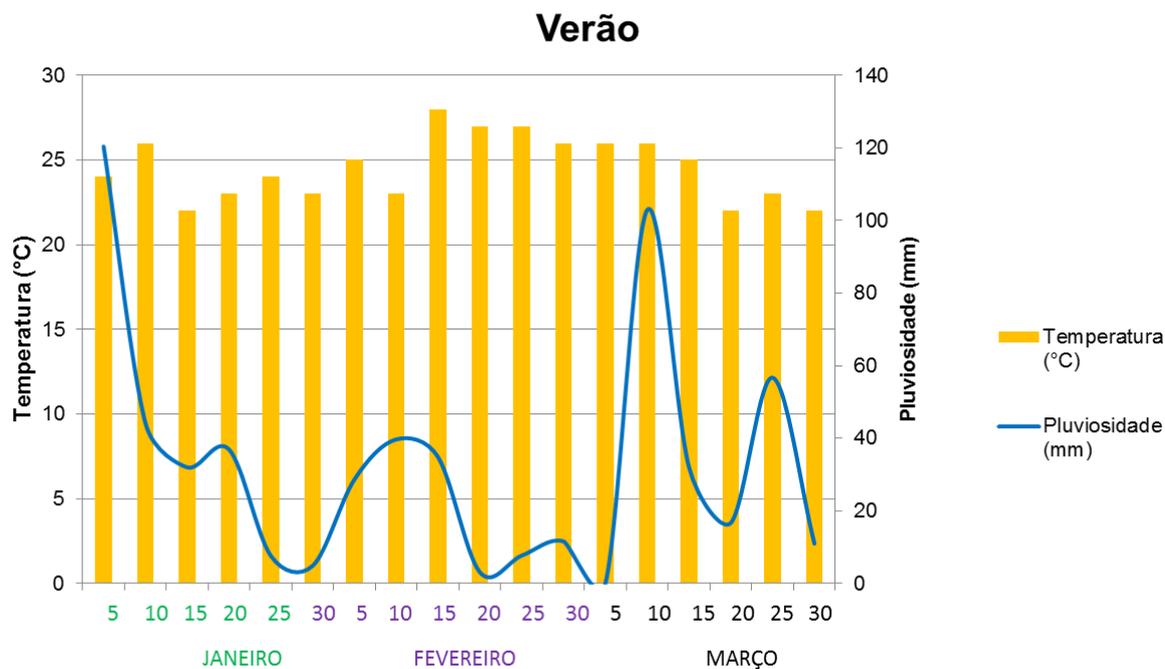
## ANEXO B

Índice de Jaccard utilizando o programa R e matriz desenhada para utilização no cálculo, onde o número 1 corresponde à espécie presente e 0 corresponde à espécie ausente no campo.

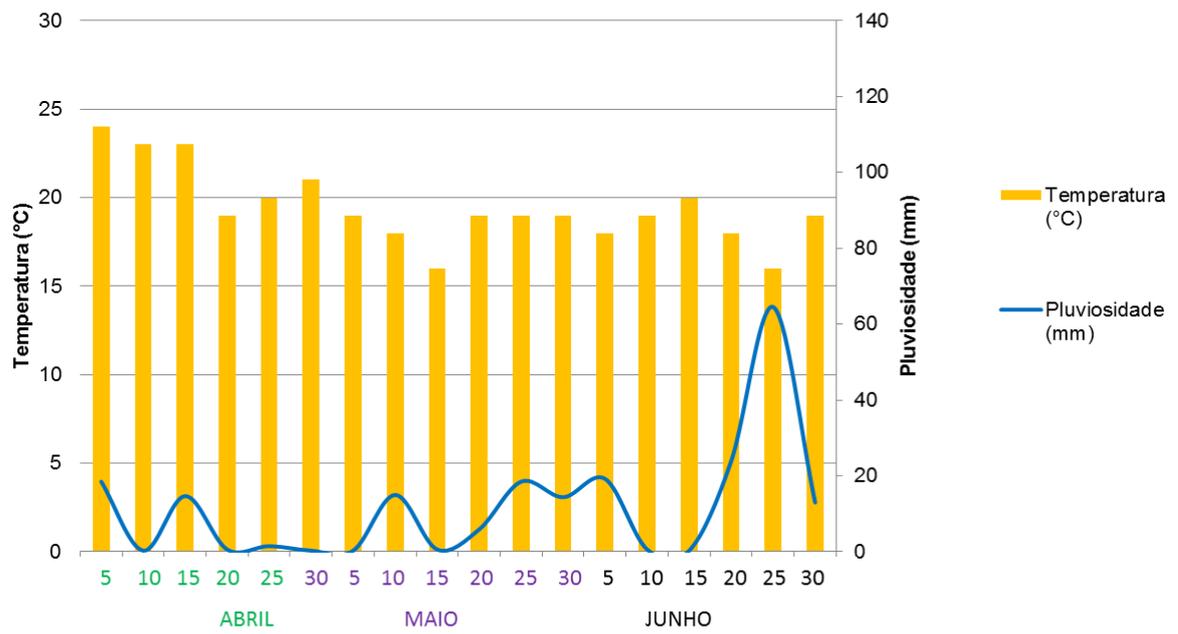
ESPÉCIES	Coletas											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<i>Aphis gossypii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aphis nasturtii</i>	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>Aphis fabae</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
<i>Aphis craccivora</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Aphis spiraecola</i>	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
<i>Aphis nerii</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
<i>Myzus persicae</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>Toxoptera aurantii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Toxoptera citricidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Uroleucon ambrosiae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Aulacorthum solani</i>	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
<i>Pentalonia nigronervosa</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Pemphigus spp.</i>	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

**ANEXO C**

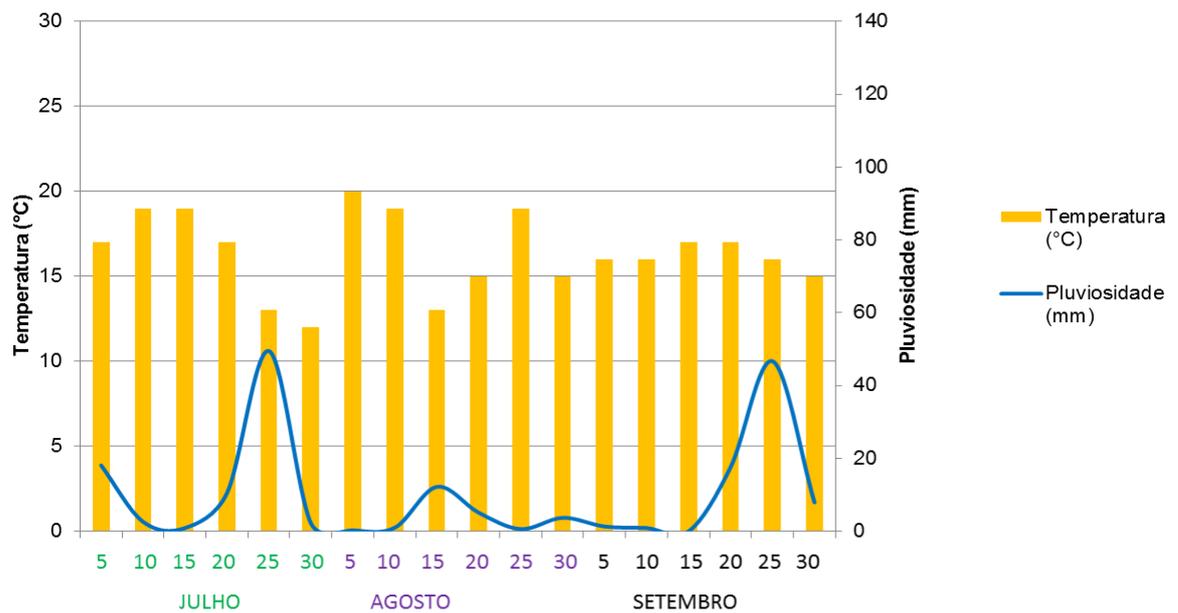
Dados de temperatura (média de cada 5 dias) e pluviosidade (média de cada cinco dias) das quatro estações do ano de 2013, obtidos na estação meteorológica da APTA-Pariquera Açu, Vale do Ribeira, SP.

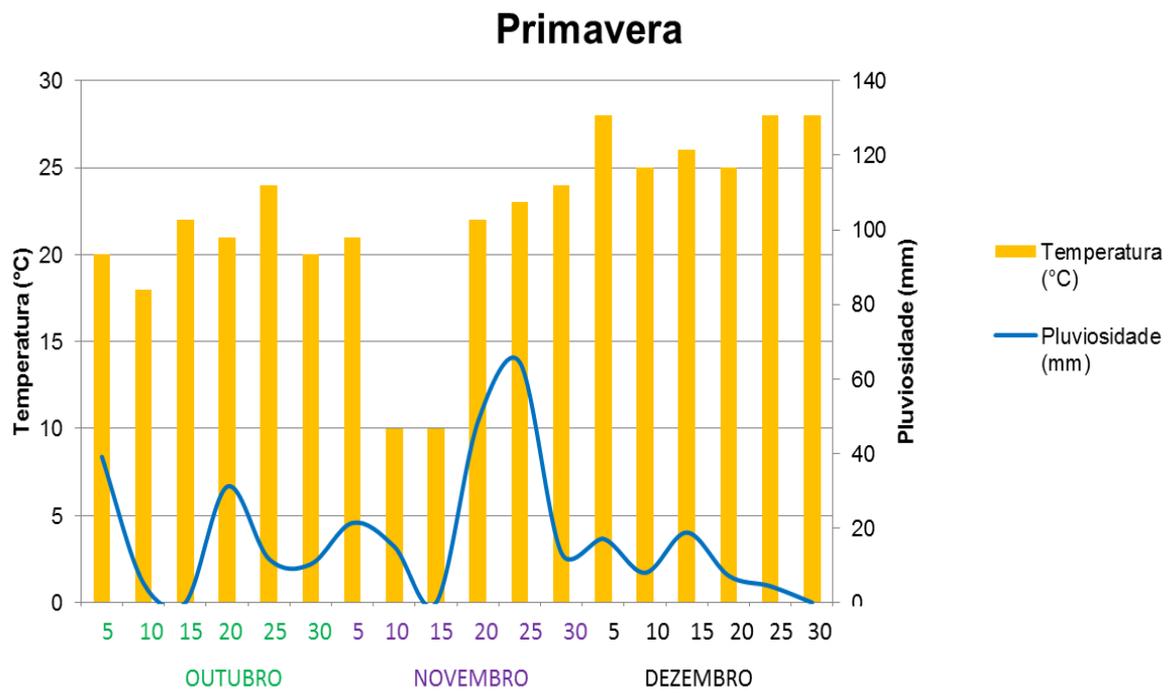


## Outono



## Inverno







SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ