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

INFLUÊNCIA DO TÍTULO VIRAL NA SEVERIDADE DE SINTOMAS E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS de *Passiflora* PARA TOLERÂNCIA AO CABMV

Silmara dos Santos

CRUZ DAS ALMAS, BA

2025

INFLUÊNCIA DO TÍTULO VIRAL NA SEVERIDADE DE SINTOMAS E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS de *Passiflora* PARA TOLERÂNCIA AO CABMV

Silmara dos Santos
Engenheira agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2023

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Recursos Genéticos e Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus
Coorientador: Prof. Dr. Zanon Santana Gonçalves

CRUZ DAS ALMAS, BA

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

S237i

Santos, Silmara dos.

Influência do título viral na severidade de sintomas e identificação de acessos e híbridos interespecíficos de Passiflora para tolerância ao Cabmv / Silmara dos Santos._ Cruz das Almas, BA, 2025.

92f.; il.

(Dissertação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus.

Coorientador: Prof. Dr. Zanon Santana Gonçalves.

1.Maracujá – Doenças e pragas. 2.Maracujá – Melhoramento genético – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.425

Ficha elaborada pela Biblioteca Central da UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

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

INFLUÊNCIA DO TÍTULO VIRAL NA SEVERIDADE DE SINTOMAS E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora* PARA TOLERÂNCIA AO CABMV

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE

SILMARA DOS SANTOS

Aprovada em: 08 de setembro de 2025

gov.br Documento assinado digitalmente
ONILDO NUNES DE JESUS
Data: 10/11/2025 14:29:33-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)

gov.br Documento assinado digitalmente
HELLEN CRISTINA DA PAIXAO MOURA
Data: 04/11/2025 10:56:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura-
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Examinador interno)

gov.br Documento assinado digitalmente
IDALIA SOUZA DOS SANTOS
Data: 04/11/2025 11:07:17-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Idalia Souza dos Santos
Embrapa Mandioca e Fruticultura/CNPq
(Examinador externo)

Aos meus familiares, em especial a minha mãe (*in memoriam*), e ao Grupo de Pesquisa *Passiflora* por todo apoio fornecido nesta jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca ter me desamparado diante dos obstáculos e por permitir alcançar meus objetivos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para o desenvolvimento da pesquisa (Código de financiamento 001).

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), pela oportunidade de realizar este curso e ampliar meus conhecimentos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMF), por disponibilizar toda infraestrutura e apoio de equipe técnica necessária ao desenvolvimento desta pesquisa, principalmente por grande parte do suporte financeiro que permitiram a realização das etapas deste trabalho de pesquisa (Projeto da Embrapa – Processos SEG nº 20.23.02.004.00.04 e 20.23.02.004.00.04.001).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo nº 402359/2023-2) pelo apoio financeiro ao programa de melhoramento genético do maracujazeiro (PMGM) e pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida ao Dr. Onildo Nunes de Jesus (PQ-1D processo nº 311495/2021-4).

A todos os professores do programa, pelos ensinamentos; aos secretários, pela atenção e auxílio nos momentos de dúvida; e aos colegas, pelas conversas e pelas trocas de experiências.

Ao orientador, Dr. Onildo Nunes de Jesus, pela oportunidade de realizar esta pesquisa, pelas orientações, compreensão, empatia e, sobretudo, por ser um exemplo de profissional humano e respeitado.

Ao coorientador, Dr. Zanon Gonçalves, pelos ensinamentos teóricos e práticos, pela paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, e por demonstrar a importância de realizar um trabalho bem feito.

Ao grupo de pesquisa *Passiflora*, por tornar minha jornada no mestrado mais leve, renovando minhas energias e se transformando em uma verdadeira família. Agradeço, em especial, à Sidnara, por me acolher como amiga, pela preocupação e

pelo cuidado que transcendem o ambiente de pesquisa; a Idalia pela disponibilidade em contribuir no desenvolvimento do trabalho e por ser exemplo de esforço e dedicação; à Carla, pela parceria no desenvolvimento dos experimentos e pelo carinho; e ao Eliseu, que se tornou um amigo para além da vida acadêmica. Estendo ainda minha gratidão aos Pós-doutorandos, aos bolsistas de Iniciação Científica, e aos bolsistas de apoio Jr., pelo convívio e pelas contribuições ao longo desse percurso.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica da Universidade de São Paulo (Esalq-USP), representado na figura do professor Elliot Watanabe Kitajima pelo apoio no processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão.

Aos funcionários da Embrapa que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

Aos professores do PPG-RGV pelo conhecimento compartilhado, pela dedicação e pelo apoio durante minha formação.

À minha família, em especial à minha mãe, Ana Rita dos Santos (*in memoriam*), razão pela qual nunca desisti da vida acadêmica. Ao meu pai, Miguel Francisco, por todo carinho e apoio. À minha avó Tereza, por seu amparo e constantes orações. À minha irmã, Solange, meu porto seguro. Aos meus irmãos, Pedro, Sidney e Sandro, por todo carinho e preocupação. Aos meus tios, tias e primos, por se manterem sempre presentes, mesmo na distância.

Aos meus amigos Diana, Eliane, Leiliane, Raissa e Welder, pelo companheirismo e por tornarem esta jornada acadêmica mais leve, e aos demais amigos e colegas, aos quais sou muito grata por fazerem parte da minha vida.

À analista Andressa Priscila de Souza Ramos, do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, agradeço pela dedicação, empatia e constante auxílio ao longo desta pesquisa. A todos os demais colegas de laboratório pelos conhecimentos compartilhados.

À banca examinadora da defesa, Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura e a Dra. Idalia Souza dos Santos, pela disponibilidade, contribuições e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

INFLUÊNCIA DO TÍTULO VIRAL NA SEVERIDADE DE SINTOMAS E IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora* PARA TOLERÂNCIA AO CABMV

Resumo: A virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), ocasiona perdas expressivas na produtividade do maracujazeiro devido à falta de controle efetivo e, principalmente, pela inexistência de cultivares resistentes. Diante disso, a identificação de genótipos resistentes em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) é fundamental para o avanço do melhoramento genético da cultura. No entanto, a falta de padronização nos métodos de avaliação pode resultar em erros na seleção de genótipos resistentes. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: *i*) avaliar a influência de diferentes concentrações de CABMVinóculo (títulos virais) e número de flhas inoculadas na severidade dos sintomas foliares e no título viral nas folhas apicais de *Passiflora edulis* e, *ii*) identificar genótipos de *Passiflora* com tolerância ao CABMV. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em delineamente inteiramente casualizado. As plantas foram submetidas a inoculações mecânicas a partir de extrato foliar de planta com sintomas severos da virose. A variação na intensidade dos sintomas foliares foi avaliada por meio de escala de notas de 1 (sem sintomas foliares) a 4 (sintomas foliares severos). Posteriormente as notas foram transformadas em índice de doenças (ID%) para quantificar a severidade da virose. A detecção e quantificação do título viral nas plantas foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Houve relação direta entre a concentração inicial do inóculo de CABMV e número de folhas inoculadas com a severidade dos sintomas e título viral final nas plantas. As plantas inoculadas com 100% de (correspondente a 1,76 x 10^9 cópias.μL^{-1}) o título mais alto do inóculo apresentaram maior severidade (ID médio: 78,4%), com todas as plantas com sintomas e classificadas como suscetíveis. Por outro lado, as plantas inoculadas com baixos títulos podem apresentar plantas assintomáticas e com baixa severidade (ID médio: 5,37%), levando à classificação equivocada de genótipos como resistentes. Os genótipos BGP060, BGP081 e BGP083 (*P. setacea*), e BGP460 (*P. misera*), foram classificados com resistentes, com ID de 0,0%. Observou-se que o título viral em plantas assintomáticas foi 96,8% menor em comparação às plantas que apresentaram sintomas severos. Porém, nas plantas assintomáticas pertencentes aos acessos BGP408 (*P. coccinea*), BGP101 (*P. Junqueira*), BGP505 (*P. amethystina*), BGP035 (*P*. *edulis*), BGP083 (*P. setacea*), bem como PGBP-05 e PGBP-02 (*P. cincinnata*) não foi detectada infecção viral aos 40 dias após inoculação. Os híbridos interespecíficos apresentaram menor severidade dos sintomas e menor título viral em comparação a seus parentais suscetíveis, com frequência de plantas tolerantes de 0,8% a 22,7%. Os resultados desta pesquisa evidenciaram que o título viral do inóculo influencia a severidade dos sintomas e pode levar a erros na seleção de resistência. Além disso, foram identificados acessos e híbridos interespecíficos de *Passiflora* promissores para tolerância ao CABMV, contribuindo para o avanço do melhoramento genético da cultura do maracujá.

Palavras-chaves: Maracujazeiro, *Potyvirus*, Melhoramento genético, Resistência poligênica, *Screening*.

INFLUENCE OF VIRAL TITER ON SYMPTOM SEVERITY AND IDENTIFICATION OF INTERSPECIFIC ACCESSIONS AND HYBRIDS OF *Passiflora* FOR TOLERANCE TO CABMV

Abstract: The Passion fruit woodinees disease – PWD, caused by the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), causes significant losses in passion fruit productivity due to the lack of effective control and, mainly, the lack of resistant cultivars. Given this, the identification of resistant genotypes in Active Germplasm Banks (AGB) is fundamental for the advancement of genetic improvement of the crop. However, the lack of standardization in evaluation methods can result in errors in the selection of resistant genotypes. Given the above, this study had the following objectives: i) to evaluate the influence of different concentrations of CABMV inoculum (viral titers) and number of inoculated leaves on the severity of leaf symptoms and viral titer in the apical leaves of *Passiflora* edulis, and ii) to identify *Passiflora* genotypes tolerant to CABMV. The experiments were conducted in a greenhouse in a completely randomized design. The plants were subjected to mechanical inoculations using leaf extract from plants with severe virus symptoms. The variation in the intensity of leaf symptoms was assessed using a scale of 1 (no leaf symptoms) to 4 (severe leaf symptoms). The scores were then converted into a disease index (DI%) to quantify the severity of the virus. The detection and quantification of viral titers in plants was performed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). There was a direct relationship between the initial concentration of CABMV inoculum and the number of inoculated leaves with the severity of symptoms and final viral titer in plants. Plants inoculated with 100% (corresponding to 1.76×10^9 copies.μL^{-1}), the highest inoculum titer, showed greater severity (mean ID: 78.4%), with all plants showing symptoms and classified as susceptible. On the other hand, plants inoculated with low titers may present asymptomatic plants with low severity (mean ID: 5.37%), leading to the misclassification of genotypes as resistant. The genotypes BGP060, BGP081, and BGP083 (*P. setacea*), and BGP460 (*P. misera*) were classified as resistant, with an ID of 0.0%. It was observed that the viral titer in asymptomatic plants was 96.8% lower compared to plants that presented severe symptoms. However, in asymptomatic plants belonging to accessions BGP408 (*P. coccinea*), BGP101 (*P. Junqueira*), BGP505 (*P. amethystina*), BGP035 (*P. edulis*), BGP083 (*P. setacea*), as well as PGBP-05 and PGBP-02 (*P. cincinnata*), no viral infection was detected 40 days after inoculation. The interspecific hybrids showed less severe symptoms and lower viral titers compared to their susceptible parents, with a frequency of tolerant plants ranging from 0.8% to 22.7%. The results of this research showed that the viral titer of the inoculum influences the severity of symptoms and can lead to errors in resistance selection. In addition, promising *Passiflora* accessions and interspecific hybrids for CABMV tolerance were identified, contributing to the advancement of genetic improvement in passion fruit cultivation.

KEYWORDS: Passion fruit, *Potyvirus*, Genetic improvement, Polygenic resistance, Screening.

SUMÁRIO

1.**INTRODUÇÃO GERAL**.....11

2. **REVISÃO DE LITERATURA**.....14

2.1. Diversidade e importância do gênero *Passiflora* 14

2.2. Importância agrícola, comercial e social de *Passiflora* edulis Sims 15

2.3. Desafios fitossanitários enfrentados na produção de maracujá 16

2.4. Virose endurecimento dos frutos (CABMV).....17

2.5. Estratégias para mitigação do CABMV no maracujazeiro.....18

2.6. Identificação de fontes de resistência ao CABMV.....19

2.7. Métodos de avaliação dos sintomas e detecção do CABMV..... 21

Referências.....23

CAPÍTULO 1: Relação entre título de inóculo do cabmv na severidade dos sintomas e acúmulo viral em plantas de *Passiflora edulis* Sims.....33

CAPÍTULO 2: Identificação de fonte de resistência ao CABMV em acessos e progênies de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp.....63

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* é diversificado, com cerca de 500 espécies no mundo caracterizadas por trepadeiras, herbáceas e raramente árvores (Junghans *et al*., 2022; BernaccI *et al.,* 2023). As espécies que representam este gênero no Brasil, são comumente conhecidas como maracujá e possuem ampla distribuição geográfica no país (BernaccI *et al.,* 2023). Suas espécies possuem frutos comestíveis, característica que atribui a cultura um grande potencial na geração de emprego e renda (Faleiro *et al.*, 2017), flores com potencial ornamental e fitoconstituintes para fins medicinais (Junghans *et al*., 2022).

A principal espécie comercializada no Brasil é a *Passiflora edulis* Sims (maracujá-amarelo ou azedo), devido ao seu vigor e rendimento de suco (Preisigke *et al.,* 2020). Outras espécies, como a *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora setacea* DC. e *Passiflora cincinnata* Mast. também atingem escala comercial (Faleiro *et al*, 2017), mas significativamente menor em relação a *P. edulis* (Machado *et al*.,2017). A produção brasileira de maracujá-amarelo é destinada à comercialização de fruta fresca e processamento em agroindústrias (Galeano *et al.*, 2023). Em 2023 o Brasil produziu 711.278 toneladas, com rendimento médio de 15,5 t ha^{-1}, sendo a Bahia o maior produtor do país, com uma produtividade de 13,12 t ha^{-1} (IBGE, 2024). No entanto, este valor é considerado, uma vez que o potencial da cultura varia entre 40 a 50 t ha^{-1} (Cruz Neto *et al*., 2016; Jesus *et al.*, 2017a).

Entre os fatores que limitam a produtividade, destacam-se a utilização inadequada das técnicas de cultivo (Jesus *et al*., 2017a), o uso de variedades locais com origem genética desconhecida (Cruz Neto *et al*., 2016), e a falta de acesso a cultivares geneticamente melhoradas e adaptadas às condições edafoclimáticas específicas de cada região (Jesus *et al*., 2017a; Oliveira *et al*., 2022), além das doenças que acometem a cultura, incluindo doeças causadas por vírus, fungos, bactérias, insetos e nematoides, que afetam sua produção no Brasil e no mundo (Lima *et al*., 2018;Rocha *et al*., 2021; Silva *et al*., 2022; Bomfim Junior *et al*., 2023). Entre as principais doenças que afetam a cultura, a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo vírus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) é considerada a de maior impacto na produtividade e longevidade dos pomares

afentando o apecto econômico (Junqueira *et al*.,2003; Jesus *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021).

O CABMV afeta a qualidade e a quantidade dos frutos produzidos, podendo inviabilizar a produção devido à sua agressividade (Petry *et al.*, 2019; Mattar *et al*., 2021). Plantas infectadas pelo CABMV apresentam crescimento e folhas com área reduzida, além de exibirem padrões de mosaico, bolhas e deformações. Seus frutos apresentam deformações e endurecimento da casca, além de diminuição da caviade interna, o que leva ao menor rendimento de polpa (Carvalho *et al*., 2021; Gonçalves *et al*., 2021; Santos *et al*., 2024). O controle do vírus é considerado desafiador, embora as técnicas de manejo disponíveis ajudem a reduzir os danos, estas não eliminam completamente a doença nas plantações (Spadotti *et al*., 2019). Desse modo, o melhoramento genético associado às boas práticas culturais, é um importante recurso para o incremento da produtividade da cultura (Faleiro *et al*., 2011; Spadotti *et al*., 2019).

O desenvolvimento de variedades resistentes ao CABMV é considerado a melhor estratégia, pois não aumenta o custo de produção (Freitas *et al*., 2016; Gonçalves *et al.,* 2021; Santos *et al*., 2024). No entanto, ainda não existem variedades do maracujazeiro amarelo ou azedo (*P. edulis*) que apresentem resistência duradoura ao vírus (Santos *et al*., 2015; Jesus *et al*., 2021). A identificação de genótipos resistentes é possível, já que o gênero *Passiflora* tem ampla variabilidade genética tanto intra como interespecífica (Braga *et al*., 2017, Oliveira *et al*.,2018). De fato, várias espécies já foram identificadas como imunes ou com nível de resistência elevada ao CABMV (Gonçalves *et al*., 2018; Carvalho *et al*., 2019; Gonçalves *et al*., 2021), e essas espécies podem ser utilizadas para introgressão de alelos de resistência na espécie comercial (*P. edulis*) que é suscetível (Gonçalves *et al*., 2021; Santos *et al*., 2019; Santos *et al*., 2021, 2024). A estratégia de obtenção de híbridos interespecíficos com foco em resistência ao CABMV já foi utilizada de forma promissora no maracujazeiro, conforme demonstrado em estudos anteriores (Santos *et al*., 2015; Jesus *et al*., 2016, 2021; Santos *et al*., 2021, 2024).

Para que os resultados dessa natureza sejam coerentes, é essencial a padronização dos métodos de avaliação para a identificação de fontes de resistência ao CABMV (Cerqueira-Silva *et al*., 2008, 2012; Gonçalves *et al*., 2017). Diferenças nos critérios e métodos de avaliação podem levar a conclusões

divergentes sobre a resistência ou suscetibilidade de um genótipo (Resende *et al*., 2000; Cerqueira-Silva *et al*., 2012; Pompe-Novak *et al*., 2019). Existem diferentes métodos para monitorar o movimento do vírus na planta, entre eles a avaliação visual de sintomas, que, quando aliada à quantificação molecular do vírus, oferece maior precisão na detecção, principalmente em plantas tolerantes (Mehle *et al*., 2004; Gonçalves *et al*., 2025).

A avaliação de genótipos pode ser feita tanto em campo, por meio da infecção natural, quanto em condições controladas, por meio da inoculação artificial na fase mudas (Leão *et al*., 2006; Oliveira *et al*., 2013; Cerqueira-Silva *et al*., 2014; Santos *et al*., 2015; Jesus *et al*., 2016, 2021; Gonçalves *et al*., 2018;2021; Santos *et al*., 2024). A avaliação em campo é um método mais caro que exige maior controle experimental, com plantas testemunhas distribuídas na área e avaliação ao logo do ciclo da cultura (Oliveira *et al*., 2013, Santos *et al*., 2024), porém não evita o escape de infecção devido a distribuição desigual dos insetos vetores no pomar (Casaroto Filho *et al*., 2025). Por outro lado, a inoculação artificial do CABMV em mudas é um método rápido que permite avaliar a reação de suscetibilidade ou resistência plantas em tempo reduzido (Leão *et al*., 2006; Pinto *et al*., 2008; Viana *et al*., 2014; Gonçalves *et al*., 2017, 2018 e 2021). Porém, a variação dos sintomas e as respostas das plantas podem variar com o tipo de estirpe do vírus, do título viral utilizado na inoculação, (Leão *et al*., 2006; Cerqueira-Silva *et al*., 2008; Viana *et al*., 2014; Santos *et al*., 2015; Gonçalves *et al*., 2018, 2021; Costa *et al*., 2020) a fatores genéticos e fisiológicos do hospedeiro, bem como às condições ambientais (Bertolini *et al*., 2008; Freitas *et al*., 2016; Melero *et al*., 2023)

Assim, a avaliação em condições controladas é importante para padronizar os métodos de inoculação, bem como para verificar se há relação entre a concentração do inóculo viral (título viral inicial) e severidade dos sintomas nas plantas. Deste modo, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a infecção por CABMV em *P. edulis* submetidos a diferentes títulos de CABMV no inóculo e número de folhas inoculadas e, com base nos resultados, utilizar a metodologia para identificar acessos e híbridos interespecíficos resistentes ao CABMV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diversidade e importância do gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é o mais rico e abundante da família *Passiflora*ceae Juss. ex Roussel, compreendendo aproximadamente 500 espécies distribuídas em seis subgêneros, dos quais quatro ocorrem no Brasil: *Astrophea* (DC.) Mast., *Decaloba* (DC.) Rchb., *Deidamioides* (Harms) Killip e *Passiflora* (Ocampo; D'Eeckenbrugge, 2017; Bernacci, *et al*., 2023). A maior diversidade do gênero encontra-se na América tropical, com centros de origem e dispersão no Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia e Paraguai (Araújo *et al*., 2017; Faleiro *et al*., 2020a). O território brasileiro reúne cerca de 150 espécies, incluindo silvestres e domesticadas, o que consolida o país como um dos principais centros de diversidade genética e um reservatório estratégico da variabilidade intra e interespecífica existente (Faleiro *et al*., 2017; Fischer; Miranda, 2021; Bernacci *et al*., 2023).

Além do consumo *in natura* e da industrialização dos frutos, as passifloráceas são reconhecidas por seu valor ornamental em virtude da beleza de suas flores e pelos atributos medicinais e cosméticos (Faleiro *et al*., 2017; Jesus *et al*., 2017a; Castillo, *et al*., 2021; Fischer; Miranda, 2021; Mora *et al*., 2022). Destaca-se ainda os aspectos morfológicos e genéticos que refletem a variabilidade das *Passiflora* spp. e decorrem da ampla distribuição geográfica, de processos evolutivos, da alogamia e da autoincompatibilidade que caracterizam o gênero, além da compatibilidade interespecífica registrada em diferentes cruzamentos (Faleiro *et al*., 2015; Moreno *et al*., 2015; Nóbrega *et al*., 2017).

Mesmo diante desse panorama e do número expressivo de espécies, a *Passiflora edulis* é a mais comercializada em todo o mundo (Faleiro *et al*., 2019). Suas formas botânicas cultivadas são *P. edulis* Sims (maracujá-amarelo ou azedo) e *P. edulis* f. *edulis* Sims (maracujá-roxo ou gulupa) (Castillo *et al.,* 2021; Jesus *et al*., 2023). No Brasil, outras espécies como *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce), *Passiflora setacea* DC. (maracujá-do-cerrado) e *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-da-caatinga), também atingem escala comercial, entretanto representam apenas 5 a 10% da área plantada (Faleiro *et al*., 2017, 2022).

Para que outros materiais sejam indicados, é necessário o conhecimento aprofundado da variabilidade disponível; para tal, a caracterização constitui etapa

uma fundamental. Estratégias clássicas e modernas têm sido utilizadas, incluindo o uso de descritores morfológicos e agronômicos (Moreno *et al*., 2015; Jesus *et al*., 2017b; Jesus *et al.,* 2022); assim como de marcadores moleculares, que conferem maior precisão na distinção entre genótipos (Cerqueira-Silva *et al.,* 2014; Faleiro *et al*., 2011; Moreno *et al*., 2015; Santos *et al*., 2015; Castillo, *et al*., 2021). A quantificação da variabilidade existente é considerada essencial para identificar recursos genéticos superiores, que possam ser incorporados nos programas de melhoramento genético voltados ao desenvolvimento de cultivares mais produtivas, resistentes e alinhadas às demandas dos passicultores (Jesus *et al*., 2017a, b; Santos *et al*., 2024).

2.2. Importância agrícola, comercial e social de *Passiflora edulis* Sims

O Brasil se destaca como o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. Cerca de 90% dos pomares brasileiros de maracujazeiro são cultivados com a espécie *P. edulis*, conhecida por produzir frutos de casa amarela (maracujá-amarelo ou azedo), e que representa importante relevância social e econômica (Faleiro, 2022; IBGE, 2024).

Em 2023, a produção brasileira alcançou 15,54 t ha^{-1}, com a Bahia como principal estado produtor, responsável por 13,12 t ha^{-1} (IBGE, 2024). Apesar da expressividade, a produtividade ainda está abaixo do estimado como potencial para cultura, que varia entre 40 e 50 t ha^{-1} (Cruz Neto *et al*., 2016; Jesus *et al*., 2018). Essa limitação compromete a rentabilidade, especialmente a partir do segundo ano da safra, em razão da elevada suscetibilidade das cultivares às doenças (Santos *et al*., 2019).

A baixa eficiência produtiva deve-se a múltiplos fatores: falhas de manejo, controle inadequado de pragas e doenças e do uso de sementes e mudas de baixa qualidade genética e fitossanitária (Jesus *et al*., 2017a). Esses entraves afetam, sobretudo, pequenos e médios produtores, que concentram a maior parte da produção nacional e enfrentam limitações a tecnologias adequadas (Jesus *et al*., 2017a; Spadotti *et al*., 2019; Faleiro *et al*., 2020a, b).

O cultivo do maracujá exerce expressivo papel social, sobretudo pela geração de emprego e renda em pequenas propriedades rurais (Faleiro, 2022). A produção nacional é voltada tanto para comercialização de frutos frescos, quanto ao processamento agroindustrial, que resulta na fabricação de sucos, doces,

vinhos, licores e sorvetes (Junqueira *et al*., 2017). Além disso, resíduos da industrialização como cascas e sementes, podem ser aproveitados na alimentação humana e animal, bem como na indústria de cosméticos (Coelho *et al*., 2017; Landau; Silva, 2020; Galeano *et al*., 2023). O sucesso comercial do maracujá está associado à qualidade e sabor dos frutos, ao alto valor nutritivo e às propriedades medicinais (Faleiro *et al*., 2017). O fruto é uma excelente fonte de vitaminas A, B2 e C, carotenoides, polifenóis, proteínas e minerais essenciais, como potássio, fósforo, cálcio, ferro e magnésio (Costa, 2017; Thokchom; Mondal, 2017).

2.3. Desafios fitossanitários enfrentados na produção de maracujá

O cultivo do maracujazeiro no Brasil enfrenta desafios fitossanitários significativos, incluindo a ação de vírus, fungos, bactérias, insetos e nematoides, que afetam diretamente a produtividade e a longevidade dos pomares (Machado *et al*., 2017; Peruch *et al*., 2017; Santos Filho *et al*., 2017). Entre as principais doenças, destacam-se: a virose do endurecimento dos frutos, causado pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Spadotii *et al*., 2019; Gonçalves *et al*., 2021), a fusariose, provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* (*Fop*) (Pereira *et al*., 2019; Lima *et al*., 2018), a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Silva *et al*., 2022) e a verrugose, provocada por *Cladosporium herbarum* Pers. (Santos-Jiménez *et al*., 2022a; Bomfim Junior *et al*., 2023).

O manejo de doenças no maracujazeiro é realizado por meio de práticas culturais, químicas e biológicas (Machado *et al*., 2017). No entanto, a eficiência desses métodos é limitada, sobretudo pela escassez de informações sobre estratégias alternativas de controle e pelo número restrito de produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para uso na cultura (Peruch *et al*., 2017; Santos Filho *et al*., 2017). Nesse contexto, o desenvolvimento de variedades geneticamente resistentes é visto como a alternativa mais promissora e sustentável, principalmente quando se trata de doenças virais, cuja contenção por métodos convencionais é de difícil execução (Spadotii *et al*., 2019; Costa *et al*., 2020; Gonçalves *et al*., 2021; Santos-Jiménez *et al*., 2022b).

2.4 Virose do endurecimento dos frutos (CABMV)

Atualmente, mais de 13 gêneros e 40 espécies de vírus são relatadas como infectantes do maracujazeiro em diferentes regiões do mundo, sendo os gêneros *Potyvirus* e *Begomovirus* os mais prevalentes (Rodrigues et al., 2029; Wu *et al*., 2024). As viroses estão associadas a diferentes agentes etiológicos, como o passionfruit woodiness virus (PWV), south african *Passiflora* virus (SAPV), east asian *Passiflora* virus (EAPV) e cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Nascimento *et al.,* 2004; 2006; Barbosa *et al*., 2017 2017; Fu *et al*., 2021). Entre os principais agentes etiológicos associados a infecção viral, destaca-se o CABMV, que causa a virose do endurecimento dos frutos, considerada a principal doença responsável pelas maiores perdas produtivas da passicultura em escala global (Mbeyagala *et al*., 2018; Munguti *et al.*, 2019; Jesus *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021).

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus* (família Potyviridae), cujas partículas virais apresentam formato filamentoso, com estrutura sinuosa e não envelopada (Wylie *et al.,* 2017). O vírus possui um genoma composto por RNA de fita simples com de polaridade positiva (ssRNA+), que codifica uma poliproteína processada em proteínas estruturais e não estruturais, envolvidas na replicação viral, movimentação célula a célula e de longa distância, encapsidação do genoma e transmissão mediada por afídeos (Fischer; Rezende, 2008; Medeiros *et al*., 2015; Pereira-Carvalho, 2015; Wylie *et al*., 2017; Santos *et al*., 2019).

No Brasil, os primeiros relatos de viroses do gênero *Potyvirus* em maracujazeiro, datam de 1977 no estado da Bahia, inicialmente atribuídas ao PWV (Novaes; Rezende, 2003; Barbosa; Santos Filho, 2017). Entretanto, estudos moleculares posteriores com isolados brasileiros confirmaram o CABMV como principal agente etiológico da doença do endurecimento dos frutos no país (Nascimento *et al*., 2006; Cerqueira-Silva *et al*., 2008; Nicolini *et al*., 2012; Rodrigues *et al*., 2015; Gonçalves *et al*., 2025). Sua transmissão ocorre de maneira não persistente por várias espécies de afídeos (pulgões), incluindo *Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli, *A. craccivora* Bock, *A*. *nerii* Boyer de Fonscolombe, *Myzus nicotianae* Blackman e *M*. *persicae* Sulzer (Di Piero *et al*., 2006; Garcêz *et al*., 2015; Preisigke *et al*., 2020) Além da disseminação natural dos vetores, a propagação mecânica contribui significativamente para a epidemiologia da doença, ocorrendo durante atividades como a poda e o manejo rotineiro das plantas (Machado *et al*., 2017; Spadotii *et al*., 2019; Santos-Jiménez *et al*., 2022).

Os sintomas característicos da infecção pelo CABMV nas plantas, incluem mosaico, bolhosidade e distorção foliar, redução no tamanho das plantas, deformação dos frutosendurecimento do pericarpo (casca), redução da cavidade interna e do tamanho dos frutos, comprometendo a qualidade e a aceitação comercial, além de diminuir a produtividade e a longevidade das plantas em campo (Nascimento et al., 2006; Jesus *et al*., 2016; 2017b; Carvalho *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021, 2024).

2.5. Estratégias para mitigação do CABMV no maracujazeiro

O controle do CABMV em campo representa um grande desafio na passicultura. Isso se deve à ausência de métodos curativos e à dificuldade de controlar seus insetos vetores, principalmente os pulgões (Fischer; Rezende, 2008; Santos *et al*., 2019). O controle químico por meio dos inseticidas, não é eficiente, pois a transmissão ocorre durante a picada de prova, de forma não persistente e em poucos segundos, antes que os produtos químicos tenham qualquer efeito sobre os vetores (Fischer; Rezende, 2008; Colariccio *et al*., 2020).

Diante dessa limitação, o manejo agrícola da doença deve ser baseado em práticas preventivas e integradas, visando reduzir a disseminação e os prejuízos econômicos aos produtores (Santos *et al*., 2019; Rezende *et al*., 2023). As estratégias recomendadas incluem: detecção precoce do CABMV, remoção de plantas sintomáticas, erradicação completa de restos culturais com adoção do vazio sanitário (30 dias), cultivo em ciclos anuais, produção de mudas em ambientes protegidos, utilização de mudas com mais de 80 cm de altura, eliminação de plantas daninhas hospedeiras, erradicação de pomares velhos e improdutivos e a desinfecção de ferramentas (Oliveira *et al*., 2018; Petry *et al*., 2018; Spadotti *et al*., 2019).

Diversos estudos vêm explorando estratégias inovadoras para reduzir a incidência do CABMV. Rezende *et al*. (2023) demonstraram que a eliminação sistemática de plantas doentes (*roguing*), realizada até os primeiros cinco meses após o transplante de mudas para o campo, retarda significativamente a disseminação do vírus no campo. Outra técnica promissora é a microenxertia *ex vitro*, avaliada por Ribeiro *et al*. (2008) que demonstrou eficiência tanto na eliminação do vírus para a multiplicação clonal de plantas de maracujá-amarelo.

Pesquisas também têm investigado substâncias inibidoras da infecção viral. Di Piero *et al.* (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos dos corpos de frutificação de cogumelos (*Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes*) na infecção da *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deneger, com o CABMV. Os resultados indicaram que os extratos forneceram proteção local contra o vírus nas plantas, embora não tenha sido observada uma proteção sistêmica significativa. Estudo realizado por Moritz (2020) revelaram que óleos vegetais podem reduzir a transmissão do vírus, no entanto, testes em condições de campo ainda são necessários, devido à influência de fatores climáticos e da pressão de afídeos.

No campo da indução de resistência nas plantas, Freitas *et al*. (2006) introduziram o gene *p35* de baculovírus em plantas de maracujá, o que, embora nenhuma das plantas geneticamente transformadas tenha demonstrado resistência ao CABMV, a modificação aumentou a tolerância a herbicidas e reduziu lesões bacterianas. Silva *et al*. (2016) observaram que aplicações exógenas de ácido salicílico (AS) estimularam a atividade de enzimas de defesa como peroxidase e polifenoloxidase, e proteínas relacionadas à patogênese, reduzindo a severidade dos sintomas.

Santos-Jimenez *et al*. (2022b) testaram o uso do peptídeo galactomanano (pGM), extraído do fungo *Cladosporium herbarum* para ativar os mecanismos de defesa de plantas de *P. edulis*. O tratamento com pGM suprime fortemente os efeitos negativos do CABMV no desenvolvimento de plantas de maracujá, ativando sistemas de defesa que permitiram às plantas infectadas manter crescimento semelhante ao de plantas saudáveis, embora falte a validação do produto em escala comercial em condições de campo. Apesar desses avanços, o desenvolvimento de cultivares resistentes permanece como a estratégia mais promissora e de longo prazo para o manejo da doença (Santos *et al*., 2015; Preisigke *et al*., 2021).

2.6. Identificação de fontes de resistência ao CABMV

As infecções por CABMV comprometem 100% dos pomares comerciais de maracujazeiro no Brasil, tornando urgente a identificação de fontes de resistência genética (Maciel *et al*., 2009; Santos *et al*., 2015; Gonçalves *et al*., 2018; Sacoman *et al*., 2018; Costa *et al*., 2020). Apesar da identificação da variabilidade quanto a tolerância ao CABMV em genótipos *P. edulis* (Cerqueira-Silva *et al*., 2008; Santos

et al., 2015; Gonçalves *et al*., 2018; 2021) até o momento não existem cultivares resistentes recomendadas desta espécie (Carvalho *et al*., 2021; Santos *et al*., 2024).

Diante deste cenário, os programas de melhoramento têm se concentrado em espécies silvestres de *Passiflora*, que apresentam imunidade ou alto nível de resistência ao vírus, como *P. malacophylla, P. cincinnata, P. gibertii, P. suberosa*, *P. setacea*, *P. pohlii*, *P. bahiensis* e *P. miersii* (Maciel *et al*., 2009; Santos *et al.,* 2015; Gonçalves *et al*., 2017, 2018, 2021; Sacoman *et al*., 2018). Essas espécies representam potenciais doadores de genes de resistência a serem introgredidos em espécies suscetíveis, como o *P. edulis* (Santos *et al*., 2024).

O Brasil apresenta uma ampla diversidade genética de *Passiflora* spp., conservada em bancos de germoplama que são fundamentais para programas de melhoramento genético e para a manutenção da variabilidade do gênero (Junqueira *et al*., 2005; Faleiro *et al*., 2011). Espécies silvestres, além de resistência às doenças, como a virose do endurecimento dos frutos, apresentam significativo potencial para fins ornamentais, agronômicos e medicinais (Abreu *et al*., 2009; Faleiro *et al*., 2011; Jesus *et al*., 2018; Sacoman *et al*., 2018).

No melhoramento do maracujazeiro, as hibridações interespecíficas têm sido utilizadas com o objetivo de transferir características favoráveis de espécies silvestres, como exemplo da rusticidade e resistência a fatores bióticos e abióticos,para a espécie comercial de *P. edulis* (suscetível), mantendo suas características comercias (Meletii *et al*., 2005; Sacoman *et al*., 2018; Santos *et al*., 2024). Dentre as espécies silvestres, *P. setacea* e *P. cincinnata* destacam-se por sua compatibilidade cromossômica com *P. edulis* (2n = 18) e já foram utilizadas com sucesso em hibridações e retrocruzametos por diferentes grupos de pesquisa (Santos *et al*., 2015*;* Freitas *et al*., 2015; Coelho *et al*., 2017; Jesus *et al.,* 2021; Santos *et al*., 2021, 2024).

Estudos realizados pelo programa de melhoramento do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, resultaram na obtenção de híbridos interespecíficos (*P. edulis* x *P. cincinnata*) resistentes ao CABMV. Com o objetivo de recuperar as características desejáveis parental recorrente (*P. edulis*), foram obtidas populações segregantes de retrocruzamento [(*P. edulis* x *P. cincinnata*) x *P. edulis*] (JESUS *et al*., 2016, 2021; SANTOS *et al*., 2021). Pesquisas por meio de hibridações interespecíficas entre *P. edulis* x *P. setácea*, também vem sendo

realizadas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde foram obtidos 25 híbridos resistentes e realizado ciclos de retrocruzamentos [(*P. edulis* x *P. setacea*) x *P. edulis*] para obtenção de progênies resistentes ao CABMV, onde foi possível constastar que a herança genética para resistência ao vírus é do tipo poligênica (SANTOS *et al*., 2015; FREITAS *et al*., 2016; SANTOS *et al*., 2019; PREISIGKE *et al*., 2021).

2.7. Métodos de avaliação dos sintomas e detecção do CABMV

A avaliação da resistência a estresses bióticos, como o CABMV, envolve análises de intensidade, severidade e incidência da doença, frequentemente conduzidas por meio de escalas visuais com diferentes graus e classes (Laranjeira, 2005; Cerqueira-Silva *et al*., 2012). Em condições controladas, experimentos em casa de vegetação utilizam a inoculação mecânica como método de triagem para identificar genótipos com potencial resistência (Gonçalves *et al*., 2018). No entanto, ainda não existe padronização quanto ao número de folhas inoculadas, e à concentração do inóculo, o que pode gerar variações nos resultados de classificação da resistência, como observado nos estudos de Viana *et al*. (2014), Gonçalves *et al*. (2018, 2021) e Costa *et al*. (2020).

Os métodos de inoculação mecânica são fundamentais para garantir uniformidade e confiabilidade nos experimentos, mas sua eficácia depende da concentração viral e à viabilidade para infectar sistemicamente a planta; além de fatores como a idade e condição fisiológica das plantas testadas (Lecoq *et al*., 2004; Ranabhat *et al*., 2022). Diferenças nesses critérios podem levar a conclusões divergentes sobre o nível de resistência ou suscetibilidade do genótipo (Resende *et al*., 2000; Pompe-Novak *et al*., 2019).

Embora a avaliação visual seja uma ferramenta prática para mensurar a resistência, levando em consideração a intensidade dos sintomas, o tempo de de surgimento dos sintomas, bem como a taxa de multiplicação do vírus, ela apresenta limitações (Jyoti *et al*., 2024). De acordo com Ranabhat *et al*., (2022) as escalas visuais são subjetivas e podem induzir à seleção de genótipos com alto título viral, mesmo com baixa severidade ou sem sintomas. Por isso, a integração de análises visuais associados com métodos moleculares de quantificação do título viral é fundamental para aumentar a precisão na seleção de genótipos resistentes (Gonçalves *et al*., 2018, 2021, 2025; Ranabhat *et al*., 2022).

Entre as metodologias moleculares, o PCR quantitativo em tempo real (*quantitative real-time* PCR - qPCR) se destaca como a principal ferramenta para confirmar e quantificar a o título viral em plantas infectadas por fitopatógenos (Carpino *et al*., 2019; Meng *et al*., 2019; Canale *et al*., 2020), incluindo *Passiflora* spp. (Riska *et al*., 2020; Gonçalves *et al*., 2021, 2025; Vidal *et al*., 2023). O qPCR é mais vantajoso em relação ao PCR convencional, sendo mais sensível e específico, além de possibilitar a quantificação precisa do título viral em tempo real (Schena *et al*., 2004; Mumford *et al*., 2006; Silva *et al*., 2018).

Além do qPCR, outras técnicas moleculares vêm sendo exploradas para o estudo dos vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus,* incluindo o CABMV, o RT-qPCR multiplex para identificação simultânea de diferentes vírus, e métodos de *high-throughput sequencing* (HTS), que possibilitam a caracterização completa do viroma associado ao maracujazeiro (Dai *et al*., 2013; Munguti *et al.,* 2025). Essas ferramentas são estratégicas não apenas para diagnósticos rápidos e precisos, mas também para a compreensão da variabilidade genética do vírus, o monitoramento da evolução de diferentes isolados e a identificação de possíveis recombinações virais (Santos *et al*., 2019; Vidal *et al*., 2023).

A aplicação de análises moleculares é, portanto, essencial em programas de melhoramento do maracujazeiro, pois auxilia na seleção precoce e confiável de genótipos resistentes, acelera a triagem de populações híbridas, e possibilita a detecção de infecções latentes que não seriam identificadas por sintomas visuais. Assim, a integração de avaliações fenotípicas tradicionais (escala de notas e índices de doenças) com diagnósticos moleculares de alta precisão (RT-qPCR) representa a abordagem promissora para o desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes ao CABMV.

Referências

ARAÚJO, L. S.; COSTA, E. M. R.; SOARES, T. L.; SANTOS, I. S.; JESUS, O. N. Effect of time and storage conditions on the physical and physico-chemical characteristics of the pulp of yellow and purple passion fruit. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, n. 3, p. 417–423, 2017.

BARBOSA, C. J.; SANTOS FILHO, H. P. Doenças do maracujazeiro causadas por vírus e fitoplasma. In: JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N. (editores técnicos), **Maracujá**: do cultivo à comercialização, Brasília, DF: Embrapa, 2017.

BERNACCI, L.C.; NUNES, T.S.; MEZZONATO, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; D.C. IMIG; CERVI, A.C. (*in memoriam*) ***Passiflora* in Flora e Funga do Brasil.** 2023. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12506>. Acesso em: 09 out. 2023.

BRAGA, C. dos S.; RODRIGUES, D. V.; BISPO, R. B.; GÖTTER, V.; MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M. Caracterização e diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com base em características físicas e químicas dos frutos. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 15, n. 2, p. 181-186, 2017.

CANALE, M. C.; KOMADA, K. M. A.; LOPES, J. R. S. Latency and incubation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus after vector inoculation. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 320-326, 2020.

CASAROTO FILHO, J. V.; SANTOS, K. S.; AQUINO, L. T.; KOTSUBO, R. Y.; SILVA, C. C. da. Fluctuation of insect vectors of Cowpea aphid-borne mosaic virus in yellow passion fruit orchards in the State of Paraná, Brazil / Flutuação populacional de insetos vetores do Cowpea aphid-borne mosaic virus em pomares de maracujá-amarelo no Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 55, n. 1, 2025.

CASTILLO, R. N.C.; WU, X.; CHACÓN, M. I.; MELGAREJO, L. M.; BLAIR, M. W. Genetic Diversity of Purple Passion Fruit, *Passiflora edulis* f. *edulis*, Based on Single-Nucleotide Polymorphism Markers Discovered through Genotyping by Sequencing. **Diversity**, 2021.

CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SILVA, F. A.; dos SANTOS, P. H. D.; EIRAS, M. How segregating populations of passion fruit react to CABMV infection? **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 855–866, 2021.

CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, P. H. D.; GENEROSO, A. L.; CORRÊA, C. C. G.; SILVEIRA, V.; EIRAS, M.; SANTOS, E. A. Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with cowpea aphid-borne mosaic virus reveals distinct responses to pathogenesis. **Euphytica**, v. 215, art. 167, 2019.

CARPINO, C.; ELVIRA-GONZÁLEZ, L.; RUBIO, L.; PERI, E.; DAVINO, S.; GALIPIENSO, L. A comparative study of viral infectivity, accumulation and symptoms induced by broad bean wilt virus 1 isolates. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 2, p. 275–281, 2019.

COLARICCIO, A.; RODRIGUES, L. K.; RAMOS, A. F.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; HARAKAVA, R.; PERUCH, L. A. M. Caracterização do Cowpea aphid-borne mosaic virus em *Passiflora edulis* cv. Catarina no litoral sul de Santa Catarina, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. 1-3, 2020.

COSTA, A. P.; NOGUEIRA, I.; PEIXOTO, J. R.; BLUM, L. E. B. Screening of sour passion fruit for reaction to bacterial spot and passion fruit woodiness disease. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 2, p. 130-138, 2020.

COSTA, A. M. Propriedades das *Passiflora*s como medicamento e alimento funcional. In: JUNGHANS, T.G.; JESUS, O. N. (editores técnicos), **Maracujá:** do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

COELHO, E. M.; GOMES, R. G.; MACHADO, B. A. S.; OLIVEIRA, R. S.; LIMA, M. S.; AZEVEDO, L. C.; GUEZ, M. A. U. Passion fruit peel flour: Technological properties and application in food products**. Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 158-164, 2017.

CRUZ NETO, A. J.; ROSA, R. C. C.; OLIVEIRA, E. J.; SAMPAIO, S. R.; SANTOS, I. S.; SOUZA, P. U.; PASSOS, A. R.; JESUS, O. N. Genetic parameters, adaptability and stability to selection of yellow passion fruit hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 321-329, 2016.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 2013.

Dai, J.; Peng H.; Chen, W.; Cheng; Wu, Y., Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants Get access Arrow **Journal of Applied Microbiology**, Volume 114, Issue 2, 1, 2013.

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 de Maracujazeiro pelo Vetor. **Neotropical Entomology** 35(1):139-140, 2006.

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, n. 2, p. 321-329, 2010.

FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F., OLIVEIRA, E. D., PEIXOTO, J. R., COSTA, A. M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro**: histórico e perspectivas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 36, 2011.
FALEIRO, F. G. Maracujá fruta nativa do Brasil para o mundo. **Campos & Negócios**: Anuário HF, p. 79-81, 2022.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JESUS, O. N.; COSTA, A. M.; MACHADO, C. F.; JUNQUEIRA, K. P.; ARAÚJO, F. P.; JUNGHANS, T. G. Espécies de

maracujazeiro no mercado internacional. In: JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. (eds.) **Maracujá:** do cultivo à comercialização**.** Brasília, DF: Embrapa, 2017.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JESUS, O. N.; CENCI, S. A.; MACHADO, C. F.; ROSA, R. C. C.; COSTA, A. M.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNGHANS, T. G. Maracuyá: *Passiflora edulis* Sims. In: RODRÍGUEZ CARLOSOMA, A.; FALEIRO, F. G.; MORERA, M. P.; COSTA, A. M. (eds.) ***Passiflora*s:** especies cultivadas en el mundo. Brasília, DF: ProImpress, 2020b.

FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. S.; TELES, B. M.; JUNQUEIRA, N. T. V. O gênero *Passiflora*: diversidade, conservação e uso. In: FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. S.; TELES, B. M.; JUNQUEIRA, N. T. V. (eds.) **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão':** caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização. Brasília, DF: ProImpress, 2020a.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A. M. **Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (*Passiflora* spp.)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2015.

FISCHER, G.; MIRANDA, D. Review on the ecophysiology of important Andean fruitsRev. **Fac. Nac. Agron. Medellin**, 2021.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Doenças da Flor da Paixão (*Passiflora* ssp.), **Global Science Books**, 2008.

FREITAS, D. S.; COELHO FILHO, M. C.; SOUZA J. R. M. T.; MARQUES, A.; RIBEIRO, E. B. M. Introduction of the anti-apoptotic baculovirus p35 gene in passion fruit induces herbicide tolerance, reduced bacterial lesions, but does not inhibit passion fruit woodiness disease progress induced by cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 79-87, 2006.

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

FU, X.; JIANG, J.; LUO, L.; DU, Q.; LI, X.; AFANDI, A.; FENG, W.; XIE, X. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and visual detection of Telosma mosaic virus (TeMV) in passion fruit. **Crop Protection,** v. 145, p. 105795, 2021.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. Leaf anatomical aspects of CABMV infection in *Passiflora* spp. by light and fluorescence microscopy**. Australasian Plant Pathology**, v. 50, p. 203-215, 2021.

GONÇALVES, Z. S.; JESUS, O. N.; CERQUEIRA-SILVA, C. B.; DINIZ, R. P.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J. Methodological approaches to assess passion fruit (*Passiflora* spp.) resistance to passionfruit woodiness disease. **Bioscience Journal**, vol. 33, no. 6, pp. 1441-1451, 2017.

GONÇALVES, Z. S.; JESUS, O. N.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORREA, R. X. Systemic infection of cowpea aphid-borne mosaic virus in *Passiflora* spp. occurs at the initial stage regardless of the species' resistance. **Archives of Virology,** v. 170, n. 2, p. 43, 2025.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agropecuária: Produção de Maracujá, Censo Brasileiro de 2023. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

JESUS, O. N.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; GIRARDI, E. A.; ROSA, R. C. C.; PETRY, H. B. Cultivares comerciais de maracujá-azedo (*Passiflora* edulis Sims) no Brasil. In: JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. (eds.) **Maracujá:** do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, 2017a.

JESUS, O. N.; OLIVEIRA, E. J.; FALEIRO, F. G.; SOARES. T. L.; GIRARDI. E. A. **Illustrated morpho-agronomic descriptors for *Passiflora* spp**. Embrapa, Brasília, DF, 2017b.

JESUS, C. A. S.; CARVALHO, E. V.; GIRARDI, E. A.; ROSA, R. C. C.; JESUS, O. N. Fruit quality and production of yellow and sweet Passion fruits in northern state of São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2018.

JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J.; SANTOS, T. C. P.; FARIAS, D. H.; BRUCKNER, C. H.; NOVAES, Q. S. Dissimilarity based on morphological characterization and evaluation of pollen viability and in vitro germination in *Passiflora* hybrids and backcrosses, **Acta Hortic**., 2016.

JESUS, O. N.; SANTOS, I. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J. Field assessment of a second generation backcross (BC1 × *Passiflora edulis*) of passion fruit for agronomic performance and resistance to CABMV. **Plant Breeding**, v. 140, p. 150-166, 2021.

JEGER, M. J., Tolerance of plant virus disease: Its genetic, physiological, and epidemiological significance, **Segurança Energéti,** 2022.

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

JUNQUEIRA, N. T. V.; RIBAMAR, T.; CHAVES, R. C.; et al. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujazeiro-azedo (*Passiflora* edulis f. flavicarpa) cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 1005-1010, ago. 2003.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, T. P.; GRISI, M. C. M. Outras espécies de maracujazeiro com potencial de uso para alimentação, ornamentação e artesanatos. In: JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N. (editores técnicos), **Maracujá:** do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. de; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; CAMPOS NETO, F. C.; OLIVEIRA, J. da S.; ARRUDA, L. M. **Espécies de maracujazeiro: uma riqueza do Brasil.** Embrapa, Brasília, DF : 2022.

JYOTI, S.; PRIYA, L.; YOGESH, K. Techniques for Detection and Diagnosis of Plant Viruses: A Review. **Agricultural Reviews**. 45(2): 274-281,2024.

LARANJEIRA, F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá:** germoplasma e melhoramento genético, Embrapa Cerrados, 2005.

LECOQ, H.; MOURY, B.; DESBIEZ, C.; PALLOIX, A.; PITRAT, M. Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. **Virus Research**, v. 100, n. 1, p. 31-39, mar. 2004.

LEÃO, R. M. K.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RESENDE, R. O.; MATTOS, J. K. A.; MELO, B. Reaction of sour passion fruit progenies to the passion fruit woodiness virus (Cowpea aphid-borne mosaic virus – CABMV) under greenhouse conditions**. Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 87-92, 2006.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A., Evolução da Produção de Maracujá (*Passiflora edulis*, *Passiflora*ceae). In: LANDAU, E. C. *et al*. (editores). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas,** Embrapa, Brasília, DF, 2020.

MACHADO, C. de F.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ARAÚJO, F. P. de; COSTA, A. M.; JUNGHANS, T. G. Espécies silvestres de maracujazeiro comercializadas em pequena escala no Brasil. In: JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. (eds.) Maracujá: do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

MACIEL, S. C.; NAKANO, D. H.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C. Screening of *Passiflora* species for reaction to Cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 414-418, 2009.

MEDEIROS R. B.; COSTA, L. C.; CARVALHO, R. C. P; RESENDE, R. O., Taxonomia, nomenclatura e classificação de vírus de plantas. In: MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P.; DIANESE, E. C.; COSTA, L.C.; SGRO, J. Y. **Virologia vegetal**: conceitos, fundamentos classificação e controle**,** Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MEHLE, N.; KOVAČ, M.; PETROVIČ, N.; POMPE NOVAK, M.; BAEBLER, Š.; KREČIČ STRES, H.; GRUDEN, K.; RAVNIKAR, M. Spread of potato virus YNTN in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 293-300, 2004.

MELERO, I.; GONZÁLEZ, R.; ELENA, S. F. Host developmental stages shape the evolution of a plant RNA virus. Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 378, n. 1873, p. 20220005, 27 mar. 2023.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S., Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F., **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético, Embrapa Cerrados, 2005.

MENG, X. L.; QI, X. H.; HAN, Z. Y.; GUO, Y. B.; WANG, Y. N.; HU, T. l.; WANG, L. M.; CAO, K. Q.; WANG, S. T. Latent Infection of Valsa mali in the Seeds, Seedlings and Twigs of Crabapple and Apple Trees is a Potential Inoculum Source of Valsa Canker. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7738, 2019.

MORA, F. O.; LÓPEZ-SANDOVAL, J. A.; CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, Á.; SÁNCHEZ-PALE, J. R. Diversity of genus *Passiflora* L. in Mexico and a particular study on *Passiflora biflora* Lam. fruit characteristics. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, p. 2565–2574, 2022.

MOURA, R. S.; COELHO FILHO, M. A.; GHEYI, H. R.; JESUS, O. N.; LIMA, L. K. S.; JUNGHANS, T. G. Overcoming dormancy in stored and recently harvested *Passiflora* cincinnata Mast. seeds. **Bioscience Journal,** Uberlândia, v. 34, n. 5, p. 1158-1166, 2018.

MORENO, C.; GELAPE, F.; NUNES, O.; LISBOA, E.; PEREIRA, A.; DE SOUZA, P. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora* spp.). In: Genetic Diversity and Erosion in Plants. **Springer: Cham, Switzerland**, 2015.

MORITZ, D. R**. Monitoramento de afídeos em pomares de maracujazeiro-azedo e interferência do óleo vegetal na transmissão do *Cowpea aphid-borne mosaic virus***. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

MUMFORD, R.; BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; BARKER, I. Advances in molecular phytodiagnostics: new solutions for old problems. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n. 1, p. 1-19, 2006.

MBEYAGALA, E. K.; TUKAMUHWBA, P.; BISIKWA, J.; HOLTON, T.; MUKASA, S. B. Next-Generation Sequencing Reveals the First Complete Genome Sequence of Cowpea aphid-borne mosaic virus from Uganda. **Genome Announcements**, v. 6, n. 3, e01491-17, 2018.

MUNGUTI, F.; MAINA, S.; NYABOGA, E. N.; KILALO, D.; KIMANI, E.; MACHARIA, M.; HOLTON, T. Transcriptome Sequencing Reveals a Complete Genome Sequence of Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus from Passion Fruit in Kenya. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 2, e01607-18, 2019.

MUNGUTI, F.; NYABOGA, E. N.; HOLTON, T.; KREUZE, J.; MAINA, S., Genomics insight on passion fruit viral disease complexity. **Microbiology Spectrum,** Volume 13, Issue 10, 9, 2025.

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, n. 9, 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. Phylogenetic analysis of potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 378-383, 2004.

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,** Piracicaba, Braz, 2003.

OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 485-492, 2013.

OLIVEIRA, J. da S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; VIEIRA, E. A.; VIANA, M. L. Diversidade genética de *Passiflora* spp baseada em descritores morfoagronômicos. **Revista da Faculdade de Agronomía,** v. 117, n. 2, p. 293-304, 2018.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; MACHADO, C. F.; ROSA, R. C. C. Manejo integrado de pragas e doenças do maracujazeiro. In: MORERA, M. P.; COSTA, A. M.; FALEIRO, F. G.; CARLOSAMA, A. R.; CARRANZA, C. (Org.). **Maracujá:** dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. Brasília: ProImpress, 2018.

PEREIRA, P. P. A.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; LARANJEIRA, F. F.; JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of Fusarium wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, v. 121, p. 195-203, 2019.

PAGÁN, I. e GARCÍA-ARENAL, F., Tolerance to Plant Pathogens: Theory and Experimental Evidence, **International Journal of Molecular Sciences** 19, no. 3: 810, 2018.

PEREIRA-CARVALHO, R. C. Movimento do vírus na planta. In: MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P.; DIANESE, E. C.; COSTA, L. C.; SGRO, J. Y. **Virologia vegetal**: conceitos, fundamentos classificação e controle**,** Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PETRY, H. B.; MARCHESI, D. R.; BACK, M. M.; DELLA BRUNA, E.; SCHÄFER, G.; MELETTI, L. M. M. Production of sour passion fruit seedlings in a protected environment: sizing and management of the production environment. **Agropecuária Catarinense,** v. 32, n. 3, p. 37-39, 2018.

PINTO, P.H.D., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., OLIVEIRA RESENDE, R., ABREU MATTOS, J.K., & MELO, B. Reaction of passionfruit genotypes to cowpea aphid-borne mosaic virus (cabmv). **Bioscience Journal**, 24(2), p. 19-26, 2008.

PREISIGKE, S. D. C.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SANTOS, P. R. D.; SANTOS, V. O. D.; AMBRÓSIO, M.; WALTER, F. H. D. B. Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. **Bragantia**, v. 79, n. 1, p. 47-61, 2020.

POMPE-NOVAK, M.; KRIŽNIK, M.; GRUDEN, K. The titre of the virus in the inoculum affects the titre of the viral RNA in the host plant and the occurrence of the disease symptoms. **Acta Chimica Slovaca,** v. 66, n. 1, p. 45-49, 2019.

RESENDE, L. V.; MALUF, W. R.; FIGUEIRA, A. R.; RESENDE, J. T. V. Correlations between symptoms and DAS-ELISA values in two sources of resistance against tomato spotted wilt virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 135-139, 2000.

REZENDE, J. A. M.; FAVARA, G. M.; OLIVEIRA, F. F.; LEITE, D.; BELLO, V. H.; QUAGLIATO, A. L.; VIEIRA, G. F.; PATERNIANI, R. S. Partial efficacy of early and temporary roguing to manage woodiness disease in pilot crops of passion fruit. **Plant Pathology**, v. 72, n. 6, p. 1081-1087, 2023.

RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M.; PEREIRA, W. V. S. Ex vitro micrografting aiming the CABMV virus elimination in passion fruit plant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 5, p. 589-594, 2008.

RISKA, A.; MASAYUKI, N.; HISASHI, I. Effects of coinfection with East Asian *Passiflora* virus and East Asian *Passiflora* distortion virus on *Passiflora foetida*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 86, p. 211-218, 2020.

ROCHA, L. S.; XAVIER, A. A.; RIBEIRO, R. C. F. Reação de genótipos de maracujazeiro ao complexo Meloidogyne incognita raça 3 e Fusarium solani. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 34, n. 3, p. 605-613, jul.–set. 2021.

RODRIGUES, G. B.; SOBRINHO, G. G. R.; MITUTI, T.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; NOVAES, Q. S. Etiology, occurrence and epidemiology of a begomovirus disease in passionflower in the southwest of Bahia. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 4, p. 337-343, 2019.

SACOMAN, N. N.; VIANA, A. P.; CARVALHO, V. S.; SANTOS, E. A.; RODRIGUES, R. Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus in in vitro germinated genotypes of *Passiflora setacea*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, p. e17607, 2018.

SANTOS, I. S.; LIMA, L. K. S.; SAMPAIO, S. R.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N. Genetic parameters and prediction of genotypic values in a segregating population of *Passiflora* BC3 [(*P. edulis* x *P. cincinnata*) x *P. edulis*] for fruit quality and resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus using REML/BLUP. **Scientia Horticulturae**, 330, 113023, 2024.

SANTOS, I. S.; LIMA, L. K. S.; SAMPAIO, S. R.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N. de. Phenological precocity and resistance to CABMV in passion fruit progenies of the third generation backcross [(*P. edulis* × *P. cincinnata*) × *P. edulis*]. **Euphytica**, v. 217, n. 6, p. 112, 2021.

SANTOS, E. A.; VIANA, A. P.; WALTER, F. H. de B.; FREITAS, J. C. O.; RAMOS, H. C. C.; BOECHAT, M. S. B. First report of a genetic map and evidence of QTL for resistance to CABMV in a segregating population of *Passiflora*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 903-915, 2019.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; HADDAD, F. Doenças do maracujazeiro causadas por fungos, omicetos e bactérias. In: JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N. (editores técnicos), **Maracujá:** do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

SANTOS, E. A.; VIANA, A. P.; DE OLIVEIRA FREITAS, J. C.; DE LIMA E SILVA, F. H.; RODRIGUES, R.; EIRAS, M. Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 1, p. 85-98, 2015.

SANTOS-JIMÉNEZ, J. L.; MONTEBIANCO, C. de B.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. G.; BARRETO-BERGTER, E.; VASLIN, M. F. S. A fungal glycoprotein mitigates passion fruit woodiness disease caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in *Passiflora edulis*. **BioControl**, v. 67, p. 75-87, 2022.

SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 893–908, 2004.

SILVA, J. L. da; COSTA, J. F. de O.; SILVA, M. J. dos S.; SANTOS, T. F. dos; LIMA, T. S.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P. Colletotrichum tropicale associated with anthracnose in passion fruit in Brazil. In: SILVA-MATOS, R. R. S.; MORAES, L. F.; SILVA, F. L. de S. (orgs.). **Desenvolvimento da pesquisa científica**, tecnologia e inovação na agronomia 3. Ponta Grossa: Atena Editora, 2022.

SILVA, M. S.; SILVA, R. P.; SOUZA, A. V. L.; XAVIER, Y. P. M.; OLIVEIRA, A. C.; COQUEIRO, D. S. O. Exogenous application of salicylic acid in yellow passion fruit for the control of fruit woodiness virus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

SILVA, G.; OYEKANMI, J.; NKERE, C. K.; BÖMER, M.; KUMAR, P. L.; SEAL, S. E. Rapid detection of potyviruses from crude plant extracts. **Analytical Biochemistry,** v. 546, p. 17-22, 2018.

SPADOTTI, D. M. A.; FAVARA, G. M.; NOVAES, Q. S.; MELLO, A. P. O. A.; FREITAS, D. M. S.; MOLINA, J. P. E.; REZENDE, J. A. M. Long-lasting systematic roguing for effective management of CABMV in passion flower orchards through maintenance of separated plants. **Plant Pathology**, v. 68, n. 7, p. 1259-1267, 2019.

THOKCHOM, R.; MONDAL, G. Production Preference and Importance of Passion Fruit (*Passiflora edulis*): A Review. **Journal of Agricultural Engineering and Food Technology,** Volume 4, 2017.

VIDAL, A. H.; FELIX, G. P.; ABREU, E. M.; LIMA, B. P. Occurrence of bean-associated cytorhabdovirus and cowpea mild mottle virus infecting cultivated and wild *Passiflora* spp. in Brazil. **Crop Protection**, v. 168, 2023.

WYLIE, S. J.; ADAMS, M.; CHALAM, C.; KREUZE, J.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; OHSHIMA, K.; PRAVEEN, S.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.; WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 98, n. 3, p. 352-354, 2017.

WU, W.; MA, F.; ZHANG, X.; TAN, Y.; HAN, T.; DING, J.; WU, J.; XING, W.; WU, B.; HUANG, D.; ZHANG, S.; XU, Y.; SONG, S. Research progress on viruses of *Passiflora edulis*. **Biology**, Basel, v. 13, n. 10, art. 839, 2024.

CAPITULO I

RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO DO CABMV NA SEVERIDADE DOS SINTOMAS FOLIARES E NO ACÚMULO VIRAL EM PLANTAS DE *Passiflora edulis* Sims

RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO DO CABMV NA SEVERIDADE DOS SINTOMAS FOLIARES E NO ACÚMULO VIRAL EM PLANTAS DE *Passiflora edulis* Sims

Resumo: No Brasil, o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) é o principal agente etiológico que causa a virose do endurecimento dos frutos no maracujazeiro. Ainda não existem métodos de controle eficientes da doença em campo, sendo o uso de cultivares resistentes a alternativa mais promissora. Para isso, a identificação de genótipos resistentes é essencial, mas os métodos de pesquisa para essa finalidade ainda não foram totalmente padronizados. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de inóculo do CABMV e número de folhas inoculadas na severidade dos sintomas foliares e no título viral nas plantas de *Passiflora edulis* Sims. O experimento foi conduzido em condições controladas de casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial de 9 x 3 x 5, sendo: nove concentrações de inóculo (100, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 e 0,5%), inoculação em uma, duas e três folhas por planta e avaliação dos sintomas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após inoculação (DAI). A quantificação do título de CABMV no inóculo, bem como nas folhas superiores não inoculadas foram realizadas por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Avaliação dos sintomas foliares foi realizado com atribuição de notas de 1 (ausência de sintomas) a 4 (mosaico grave, bolhas e distorção foliar), sendo transformadas em índice de doença (ID%) para quantificar a severidade da virose. Houve relação direta entre o título de CABMV no inóculo com a severidade dos sintomas, sendo que o aumento do título no inóculo promoveu aumento na severidade da virose, com ID% médio de 32,3 %, 38,8 % e 49,8 % em uma, duas e três folhas inoculadas. Observou-se elevada correlação (r = 0,94) entre o título viral no inóculo com o título viral nas folhas superiores não inoculadas. Foi observado que plantas inoculadas com maior título no inóculo (1,8 x 10^9 cópias.μL^{-1}, equivalente a 100% de extrato foliar), independentemente do número de folhas inoculadas, não apresentaram diferença significativa no valor médio de severidade. O número de plantas assintomáticas aumenta com redução do título viral no inóculo e número de folhas inoculadas, o que pode resultar em erro na seleção de genótipos resistentes ou tolerantes. Os resultados obtidos são importantes para orientar a correta avaliação e seleção de fontes de resistência ao CABMV em genótipos de *P. edulis* contidos nos bancos de germoplasma de *Passiflora*.

Palavras-chaves: Maracujá amarelo, Virose do endurecimento dos frutos, Título viral, inoculação foliar.

RELATIONSHIP BETWEEN CABMV INOCULUM TITER IN SEVERITY AND VIRAL ACCUMULATION IN *Passiflora edulis* sims **PLANTS**

Abstract: In Brazil, cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is the main etiological agent causing fruit hardening virus in passion fruit, representing one of the greatest challenges to the expansion and good productivity of the crop. There are still no efficient methods of controlling the disease in the field, with the use of resistant cultivars being the most promising alternative. For this, the identification of resistant genotypes is essential, but research methods for this purpose have not yet been fully standardized, which can lead to errors in genotype selection. The objective of this study was to evaluate the effect of different CABMV titers in the inoculum on the severity of leaf symptoms and viral titer in *Passiflora* edulis Sims plants. The experiment was conducted under controlled greenhouse conditions in a completely randomized design with a 9 x 3 x 5 factorial scheme, namely: nine inoculum concentrations (100, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, and 0.5%), inoculation on one, two, and three leaves per plant, and evaluation of symptoms at 7, 14, 21, 28, and 35 days after inoculation (DAI). Leaf symptoms were evaluated using a scale from 1 (no symptoms) to 4 (severe mosaic, blisters, and leaf distortion), which was then transformed into a disease index (DI%) to quantify the severity of the virus. The viral titer in the inoculum and in the upper uninoculated leaves was quantified using the RT-qPCR technique. There was a direct relationship between the CABMV titer in the inoculum and the severity of symptoms, with an increase in the titer in the inoculum promoting an increase in the severity of the virus, with a mean ID% of 32.3%, 38.8%, and 49.8% in one, two, and three inoculated leaves, respectively. A high correlation (r = 0.94) was observed between the viral titer in the inoculum and the viral titer in the upper uninoculated leaves. It was observed that plants inoculated with a higher titer in the inoculum (1.8×10^9 copies, 100% extract), regardless of the number of inoculated leaves, did not show a significant difference in the mean severity value. The number of asymptomatic plants increases with a reduction in viral titer in the inoculum and number of inoculated leaves, which may result in errors in the selection of resistant or tolerant genotypes. The results obtained are important for guiding the correct evaluation and selection of sources of resistance to CABMV in genotypes of *P. edulis* and other species contained in *Passiflora* germplasm banks.

Keywords: Yellow passion fruit, passion fruit woodiness disease, viral titer, foliar inoculation.

1.INTRODUÇÃO

No Brasil, o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) é o principal agente etiológico do vírus que causa o endurecimento dos frutos do maracujá (Nascimento *et al.,* 2006; Cerqueira-Silva *et al*., 2008; Spadotii *et al*., 2019), sendo considerado um dos principais entraves fitossanitários na cadeia produtiva do maracujazeiro (Santos *et al*., 2024; Mendes *et al*., 2024). O CABMV pertencente ao gênero *Potyvirus* (família Potyviridae) (Wylie *et al.,* 2017) e seu material genético é composto por uma única molécula de RNA linear (Fischer e Rezende, 2008; Wylie *et al.,* 2017).

Após infectar a planta pela epiderme, o vírus necessita realizar movimentos intercelulares para atingir o mesófilo, nervuras e, subsequentemente, o floema, permitindo o transporte sistêmico e consequentemente a disseminação do vírus na planta (Vuorinen *et al.,* 2011; Wu e Chen, 2020). Naturalmente, a transmissão do CABMV ocorre de maneira não persistente por espécies de pulgões (família *Aphididae*, ordem *Hemiptera*) durante a picada de prova, ou mecanicamente (Rodrigues *et al*., 2015; Santos-Jiménez *et al.,* 2022, 2025).

Quando infectado, o maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) apresenta folhas com mosaico e distorção, frutos endurecidos com tamanho reduzido e com perda de parte do pericarpo, dificultando sua comercialização (Nascimento *et al.,* 2006). Infecções virais podem levar à redução da fotossíntese (Bezerra *et al.,* 2025), alterações na estrutura do cloroplasto (Wu *et al.,* 2024) e anormalidades morfológicas nas folhas (Gonçalves *et al.,* 2018; Wu *et al.,* 2024) com modificações mais severas em *P. edulis*, em relação a espécies silvestres infectadas por CABMV (Gonçalves *et al.,* 2018).

A planta afetada apresenta limitações no desenvolvimento, queda de produtividade e diminuição da longevidade em campo (Carvalho *et al*., 2021). O controle químico dos vetores não é eficiente para conter a doença, devido a rápida transmissão do vírus para a planta (Fischer e Rezende, 2008; Colariccio *et al*., 2020). A partir do ponto inicial da infecção, o vírus se espalha pelos tecidos do hospedeiro através do sistema vascular. Quando as defesas locais não conseguem mais conter seu avanço, ele se estabelece nos principais sítios de replicação, caracterizando a infecção sistêmica (Lafforgue *et al*., 2012). Gonçalves *et al.* (2025)

detectaram que a infecção sistêmica do CABMV ocorre em questão de minutos após inoculação, evidenciando a rápida movimentação das partículas virais em plantas de *Passiflora* spp. com resposta diferencial ao vírus.

A inoculação mecânica é amplamente utilizada para triagem de genótipos quanto a severidade provocada pelo CABMV, por meio da fricção do inóculo no tecido foliar (Maciel *et al*., 2009; Gonçalves *et al*., 2018). No entanto, ainda não existe uma padronização quanto ao número de folhas inoculadas, e a concentração de inóculo viral, como observado nos estudos de Viana *et al.* (2014), Gonçalves *et al.* (2018, 2021) e Costa *et al.* (2020), os quais obtiveram diferentes classificações para genótipos de *P. edulis*, variando de resistente a altamente suscetível. Diferenças nos critérios e métodos de avaliação podem levar a conclusões divergentes, sobre a resistência ou suscetibilidade do genótipo avaliado (Resende *et al.,* 2000; Gonçalves *et al*., 2018; Pompe-Novak *et al.,* 2019).

As escalas visuais são importantes na seleção de genótipos, no entanto, podem ser subjetivas, selecionando genótipos com alto título viral, mesmo com baixa severidade ou sem sintomas (Ranabhat *et al.,* 2022). Desta forma, a validação das avaliações com a quantificação do título viral é fundamental nas seleções de genótipos resistentes (Ranabhat *et al.,* 2022; Gonçalves *et al.,* 2021). As infecções virais são detectadas e quantificadas de forma rápida e precisa através do RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*), em relação aos outros métodos como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional (Rubio *et al*., 2020; Kanapiya *et al.,* 2024). A técnica de RT-qPCR, é amplamente utilizada na cultura do maracujá na quantificação e detecção de infecções por *Potyvirus* (Riska *et al.,* 2019; Ribeiro *et al.,* 2024; Gonçalves *et al*., 2025).

No programa de melhoramento do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, essa técnica vem sendo utilizada na confirmação de infecções pelo CABMV em genótipos de *Passiflora* spp. (Gonçalves *et al.,* 2018), e na determinação do período de infecção sistêmica e quantificação viral ao longo do desenvolvimento da infecção (Gonçalves *et al.,* 2025). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de inóculo do CABMV, e o número de folhas inoculadas na severidade dos sintomas foliares e no título viral em plantas de *Passiflora edulis* Sims.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e material vegetal

O experimento foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40'39" S, 39°06'23" O, 226 m de altitude), em casa de vegetação e em condições controladas de temperatura (28 ± 2 ºC) e umidade relativa (UR) de 75 ± 5%. Foi utilizado como material vegetal o genótipo BGP418 (*Passiflora edulis* Sims) previamente classificado como suscetível por Gonçalves *et al*. (2018). Sementes desse genótipo foram imersas em solução de regulador de crescimento GA_4+_7 com N-(fenilmetil) -aminopurina (400 mg/L^{-1}) por 24 horas, conforme proposto por Moura *et al.* (2018). Após esse tempo, as sementes foram transferidas para caixas acrílicas transparentes (Gerbox) e acondicionadas em câmara de germinação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura alternada de 20 ºC durante 16 horas e 30 ºC por 8 horas no escuro (Brasil, 2009; Santos *et al.,* 2024).

Após a germinação, sementes com emissão da radícula de ≥ 2,0 mm (Santos *et al*., 2024) foram semeadas em bandejas de polipropileno (com 162 células), contendo uma mistura de fibra de coco e substrato para plantio de mudas (Vivatto®) na proporção de 3:1, acrescido de 50 g de fertilizante de liberação lenta (Osmocote®) para cada 10 L de substrato (Gonçalves *et al.,* 2021). Após 40 dias da semeadura (DAS), plantas com 5 a 6 folhas desenvolvidas e tamanho médio de 13 cm foram transplantadas para tubetes (Gonçalves *et al.,* 2021).

2.2. Preparação do inóculo, inoculações artificiais e avaliação dos sintomas foliares

Para a definição das concentrações de inóculo do CABMV, um ensaio 'piloto' foi realizado em casa de vegetação com concentrações de extrato foliar que variou de 100 a 10% do inóculo. Os dados resultados desse experimento revelaram não existir diferença na severidade dos sintomas foliares em *P. edulis* quando as plantas foram inoculadas com estas concentrações (dados não amostrados). Portanto, a concentração do extrato foliar foi ajustada para concentrações inferiores que melhor simule a ação dos vetores em campo.

As diferentes concentrações do inóculo foram obtidas a partir de discos foliares com 5,0 mm de diâmetro, com auxílio de perfurador de papel de único furo,

nas quantidades de 277, 20, 17, 14, 11, 9, 6, 3 e 2 discos (Figura 1A). A confirmação da infecção viral nos discos foliares, foi realizado por meio da qPCR e *primer* para o gene da capa proteica do CABMV de 100 pb (Figura 1B). Os discos foliares obtidos foram macerados em cadinho com 10 mL tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfito de sódio 0,1 M, pH 7,0), obtendo-se as concentrações de 100%; 7%; 6%; 5%; 4%; 3%; 2%; 1% e 0,5% de inóculo do CABMV (Figura 1A). Foram adicionados 0,2 g de Celite® (Sigma Aldrich® - 600 mesh) aos extratos obtidos, como agente abrasivo para causar microferimentos na superfície foliar visando a penetração das partículas virais (Leão *et al.,* 2006; Gonçalves *et al.,* 2018), quando as plantas foram inoculadas em uma, duas e três folhas de cada planta (n = 10) (Figura 1C).

As avaliações dos sintomas foram realizadas nas folhas apicais das plantas inoculadas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação (DAI) (Gonçalves *et al*., 2025). Para avaliação utilizou-se uma escala de notas que varia de 1 a 4, sendo: 1 = ausência de sintomas, 2 = mosaico leve, 3 = mosaico grave e bolhosidade, e 4 = mosaico grave, bolhas e distorção foliar, conforme a descrição de Novaes e Rezende (2003).

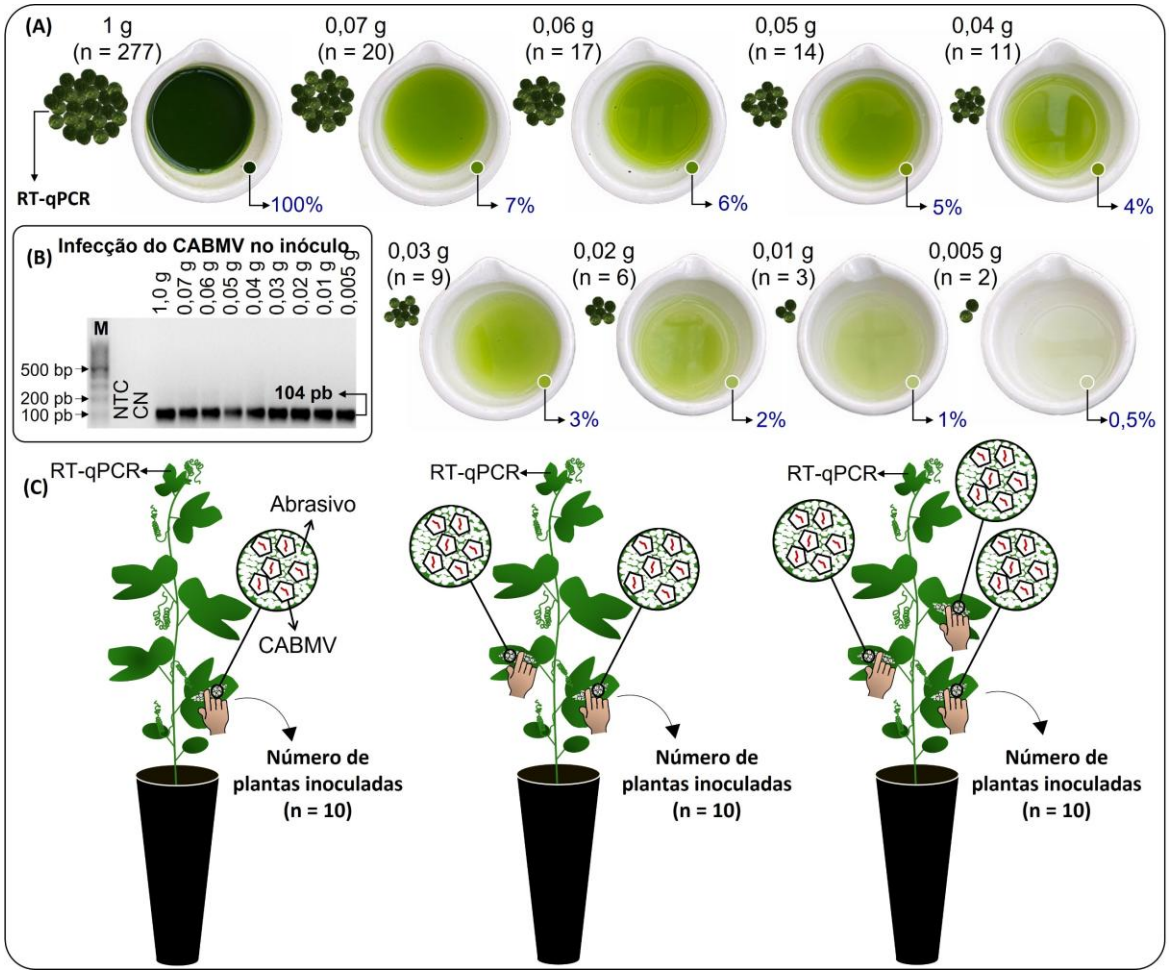


Figura 1. Esquema representativo do preparo das diferentes concentrações de inóculo do cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtidas a partir de discos foliares com sintomas severos da doença. A) Diferentes concentrações do inóculo de CABMV obtidas a partir de discos foliares e adição de tampão de inoculação; B) Produtos de amplificação (agarose 2%) por qPCR de parte do gene da capa proteica do CABMV de 100 pb em cada extrato foliar obtido;C) Procedimento esquemático das inoculações mecânicas em folhas basais de *Passiflora edulis* em função das diferentes concentrações de inóculo e do número de folhas inoculadas. M = Marcador molecular 100pb; NTC = *non template control* (sem cDNA como molde); CN = controle negativo (plantas não inoculadas com vírus); RT-qPCR = PCR quantitativo em tempo real utilizada para determinar o título de CABMV em cada concentração de extrato foliar obtido. Os números em azul ao lado direito dos cadinhos representam a concentração (%) do extrato foliar com o inóculo de CABMV.

2.4. Avaliação da severidade da doença

A severidade da virose foi estabelecida utilizando o Índice de doenças das plantas (ID) proposto por Mckinney (1923). O ID foi calculado com base na ponderação da escala de notas aplicando-se a seguinte fórmula: ID = Σ (GS x L) /

(TNL x HGS) x 100 (quando fornecido em valores percentuais), em que *GS* = grau da escala determinada para cada folha; *L* = número de folhas com cada grau de infecção (notas); *TNL* = número total de folhas avaliadas; e *HGS* = grau máximo da infecção.

2.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Ao final das avaliações (35 DAI) foi realizado a confirmação preliminar da infecção do CABMV nas plantas sintomáticas e assintomáticas inoculadas com concentrações intermediárias d (100, 4 e 0,5%), por meio da técnica de *leaf-dip* e visualização das partículas virais por microscopia eletrônica de transmissão. As observações microscópicas eletrônicas iniciais foram feitas em preparações de extrato bruto coradas negativamente com ácido fosfotúngstico a 1% ou acetato de uranila (Kitajima 1965; Kitajima *et al.* 2008).

2.6. Quantificação do título de CABMV por RT-qPCR

2.6.1. *Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)*

Foi realizado a extração do RNA das diferentes concentrações do inóculo a partir dos discos foliares com sintomas de virose, e de plantas assintomáticas e sintomáticas aso tempos 7 e 21 DAI, correspondente respectivamente, ao momento do início dos sintomas e o momento de estabilização na severidade da virose. Os tecidos foliares (aproximadamente 500 mg) foram macerados na presença de nitrogênio líquido (N_2), e as moléculas de RNA total foram obtidas seguindo o protocolo de extração do Trizol™ Reagent (Invitrogen®). A integridade do RNA total (3,0 µL) foi avaliada por meio da eletroforese (40 minutos a 60 V) em gel de agarose 1% (TAE 1X, pH 8,0), no qual foi observado a qualidade do RNAs ribossomais 28S e 18S.

Para o tratamento das amostras de RNA total (15 µL) utilizou-se 1,0 µL da enzima *Dnase* (TURBO DNA-*free*™, 2 $U.\mu L^{-1}$) seguindo o protocolo da Ambion® (1,0 µL de água DNAse *free*; 1,0 de µL RNAse *out*e 2,0 µL de buffer 10X Turbo DNAse;), incubadas no termociclador a 37°C por 25 minutos. A inativação da enzima ocorreu com adição de 2,0 µL de *DNAse Inactivation Reagente* (2 $U.\mu L^{-1}$), de acordo com o fabricante (Invitrogen®). Alíquotas de 1,0 µL do RNA tratado foi quantificado em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop™ One (*Thermo Scientific*™), as concentrações foram ajustada para 100 $ng.\mu L^{-1}$ em um volume final de 20 µL.

A síntese de cDNA foi realizada com 5,0 µL de RNA tratado (100 ng.µL^{-1}), 1,0 µL de 20 X Enzyme Mix, 10 µL de tampão (2X RT Buffer) e 4,0 µL de água *nuclease-free* (Ambion®), de acordo com as recomendações de síntese a partir do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*™). As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 60 minutos, e inativação da enzima M-MLV a 95°C durante 5 minutos.

2.6.2. Obtenção da curva padrão no ensaio de RT-qPCR

O par de *primer* usado na RT-qPCR da curva padrão foram desenhados para amplificar uma porção do gene da capa proteica (CP) do CABMV [qCABMV03_F (ATC GTC GAG AAT GCA AAA CCC ACA) e qCABMV03_R (GGC ATG TAG AAC CCT TCA GAA TTT CT)] de 104 pb. O *primer* em questão foi padronizado em trabalhos anteriores para o mesmo patossistema, com valores de eficiência de amplificação acima de 91% (Freitas, 2013; Gonçalves, 2020). A eficiência foi calculada automaticamente pelo *software* 7500 Fast v2.0.6 utilizando o declive da reta obtida na regressão linear determinada pela seguinte fórmula: Eficiência (*E*) = [10$^{(-1/\text{inclinação da curva padrão})}$ – 1] x 100% (Bustin *et al.,* 2009).

A obtenção da curva padrão partiu de uma amostra positiva para o CABMV com contração de 10 ng.µL^{-1}. A partir dessa amostra, realizou-se reações de PCR convencional para aumentar a concentração do produto gênico do vírus (Gonçalves *et al.,* 2021). Os produtos da PCR foram purificados com o Kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™), sendo a quantificação da amostra realizada em espectrofotômetro NanoDrop™ One (*Thermo Scientific*™), obtendo-se uma segunda concentração de 55 ng.µL^{-1}. Essa amostra padrão foi diluída em fatores de dez vezes (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 e 1:1000000), resultando em concentrações de 5,5 a 0,000055 ng.µL^{-1}, com intervalo da curva padrão de seis pontos de diluição (10^{-1} a 10^{-6} cópias µL^{-1}). A curva padrão foi obtida pela amplificação do gene CP do CABMV em cada diluição no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System, no modo de corrida “Standard Curve”. Foi aplicado o cálculo de regressão linear entre as variáveis do *Cycle threshold* (Ct) e a concentração do produto gênico (ng.µL^{-1}) para determinar a correlação (R^2) entre os pontos de cada diluição e a inclinação (*slope*) da curva padrão (Bustin *et al.,* 2009).

2.6.3. RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas 'MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate' (0,1 mL; Applied Biosystems™), contendo 1,0 µL de cDNA (2,5 ng.µL^{-1}), 0,5 µL de cada *primer* (2 pmol), 5,0 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®), 0,2 µL de CXR Reference Dye e 2.8 µL de água livre de nucleases. As amostras usadas como controle negativo (cDNA de plantas não inoculadas com o CABMV) também foram submetidas a qPCR, para confirmar a ausência de infecção viral. Como controle de reação, foi incluído amostra se DNA como molde (*non-template control* - NTC), para garantir que não houvesse contaminação no preparo das amostras ou amplificações inespecíficas do gene alvo. Em cada placa de reação foi realizada a curva padrão, conforme item 2.5.2.

As reações para cada amostra foram realizadas em triplicata técnica no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*™), programado para análise de "Quantitation - Standard Curve". O programa de amplificação do gene CP do CABMV usado foi o padrão do equipamento no modo "Standard", seguindo as seguintes variações de reação: incubação inicial a 50 ºC por 2 minutos, ativação da Taq DNA polimerase a 95 ºC durante 10 minutos., seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 15 seg., anelamento dos primers e extensão a 60 ºC por 1 minutos. As amostras também foram submetidas a análise da curva de dissociação a 95 ºC durante 15 seg., 60 ºC por 20 seg. e 95 ºC durante 15 seg., para verificar o ponto de fusão médio dos *amplicons*, bem como a ocorrência de dímeros de *primers* e especificidade para gerar amplicons únicos.

2.7. Delineamento experimental e análises dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 3 x 5, sendo: nove concentrações de inóculo do CABMV (100%; 7%; 6%; 5%; 4%; 3%; 2%; 1% e 0,5%), onde cada concentração do extrato foi utilizada para inocular uma, duas e três folhas por planta que foram avaliadas aos 7, 14, 21, 28e 35 DAI.

Foi obtido heatmap em função das diferentes concentrações do inóculo (3,0 x 10^8 a 1,8 x 10^9 cópias µL^{-1}), número de folhas inoculadas e dos períodos de avaliação da severidade da doença (ID%). A análise foi realizada utilizando o Software R com o pacote 'Superheat' (R Development Core Team, 2020). Os dados de severidade da doença foram submetidos à análise de variância, quando

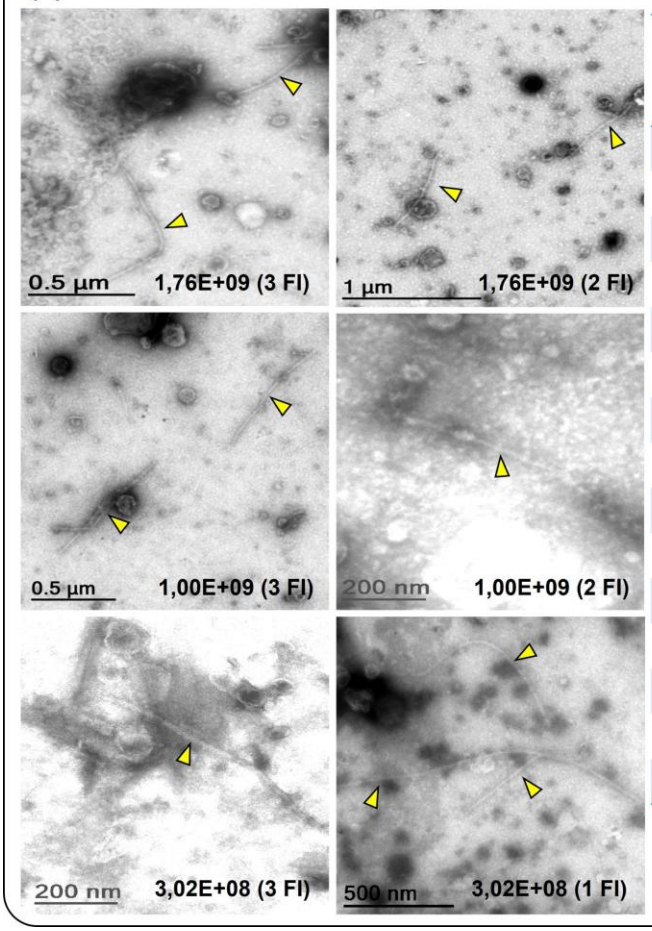
significativo às médias dos fatores referentes às inoculações em uma, duas ou três folhas foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) e para os títulos de CABMV no inóculo pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Para os dados quantitativos foi realizada análise de regressão linear. Os dados de severidade (ID%) no período de estabilização da doença (DAI) foram submetidos à análise multivariada utilizando a distância Euclidiana e método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean).* Com a severidade de cada grupo da análise de *Cluster* foram gerados gráficos Boxplot e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A quantificação do título de CABMV nas amostras foi determinado com aplicação da seguinte fórmula: Número de moléculas (cópias.μL^{-1}) = (Concentração da amostra [ng.μL^{-1}] x 6,022 x 10^{23}) / tamanho do *amplicon* [pb] x 1 x 10^9 x 660 g/mol) (Wang *et al.,* 2017). Considerando a quantificação por qPCR e aplicação da fórmula acima, foram obtidos os seguintes títulos de CABMV nas diferentes concentrações de inóculo: 1,76 x 10^9 (100% de extrato foliar), 1,48 x 10^9 (7% de extrato), 1,34 x 10^9 (6% de extrato), 1,13 x 10^9 (5% de extrato), 1,00 x 10^9 (4% de extrato), 9,98 x 10^8 (3% de extrato), 8,24 x 10^8 (2% de extrato), 5,60 x 10^8 (1% de extrato) e 3,02 x 10^8 cópias.μL^{-1} (0,5% de extrato). Os valores de título viral nos gráficos foram expressos em notação cientifica. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R (R develop).

3. Resultados

A avaliação preliminar das 15 amostras por análise de *Leaf-dip* e MET confirmou a presença de partículas virais típicas de *potyvirus* nos tecidos foliares sintomáticos inoculados com 100, 4 e 0,5% de inóculo em três, duas e uma folha inoculada (Figura 2A). Por outro lado, não foi confirmado a infecção viral nas plantas com sintomas que foram inoculadas com 100, 4 e 0,5% de inóculo em uma ou duas folhas. Não foi confirmado partículas virais nas plantas assintomáticas por esse método (Figura 2B).

(A)



(B)

	Título viral no inóculo (cópias.µL^{-1}) e número de folhas inoculadas	Infecção (35 Dai)
1	1,76E+09 (3 Fl) – Sint *	Poty (+)
2	1,76E+09 (2 Fl) – Sint	Poty (+)
3	1,76E+09 (1 Fl) – Sint	Poty (-)
4	1,00E+09 (3 Fl) – Sint	Poty (+)
5	1,00E+09 (2 Fl) – Sint	Poty (+)
6	1,00E+09 (1 Fl) – Sint	Poty (-)
7	1,00E+09 (3 Fl) – Assint #	Poty (-)
8	1,00E+09 (2 Fl) – Assint	Poty (-)
9	1,00E+09 (1 Fl) – Assint	Poty (-)
10	3,02E+08 (3 Fl) – Sint	Poty (+)
11	3,02E+08 (2 Fl) – Sint	Poty (-)
12	3,02E+08 (1 Fl) – Sint	Poty (+)
13	3,02E+08 (3 Fl) – Assint	Poty (-)
14	3,02E+08 (2 Fl) – Assint	Poty (-)
15	3,02E+08 (1 Fl) – Assint	Poty (-)

- 1,76E+09 = 100% de extrato foliar
- 1,00E+09 = 4% de extrato foliar
- 3,02E+08 = 0,5% de extrato foliar

Figura 2. Detecção da infecção viral (*Potyvirus*) por imersão foliar (*leaf-dip*) em tecido foliar de *P. edulis* infectado com diferentes concentrações de inóculo do cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). A) Micrografias eletrônicas de transmissão a partir de preparações de imersão foliar de folhas de *P. edulis* inoculadas com diferentes concentrações de inóculo do CABMV e número de folhas; B) Descrição dos tratamentos que foram submetidos à análise de *leaf-dip* para a confirmação da infecção viral [presença (+) / ausência (-)] nos tecidos inoculados com diferentes concentrações de inóculo viral aos 35 dias após inoculação (DAI). As setas em amarelo indicam as partículas virais características de Potyvirus. *Sint = Plantas inoculadas com manifestação de sintomas de virose aos 35 DAI; #Assint = Plantas inoculadas assintomáticas aos 35 DAI.

Os valores obtidos na RT-qPCR para a quantificação do título de CABMV no inóculo e nas folhas apicais das plantas avaliadas foram obtidos de forma precisa, com inclinação da curva (*slope*) de -3,74; R^2 de 0,99 e eficiência de 85,39% (Figura 3 A-C). A quantificação do número de cópias de parte do gene da capa proteica do CABMV em cada ponto de diluição seriada da curva padrão variou de 4,83 x 10^{10} a 4,83 x 10^5 cópias.µL^{-1} (Figura 3 A).

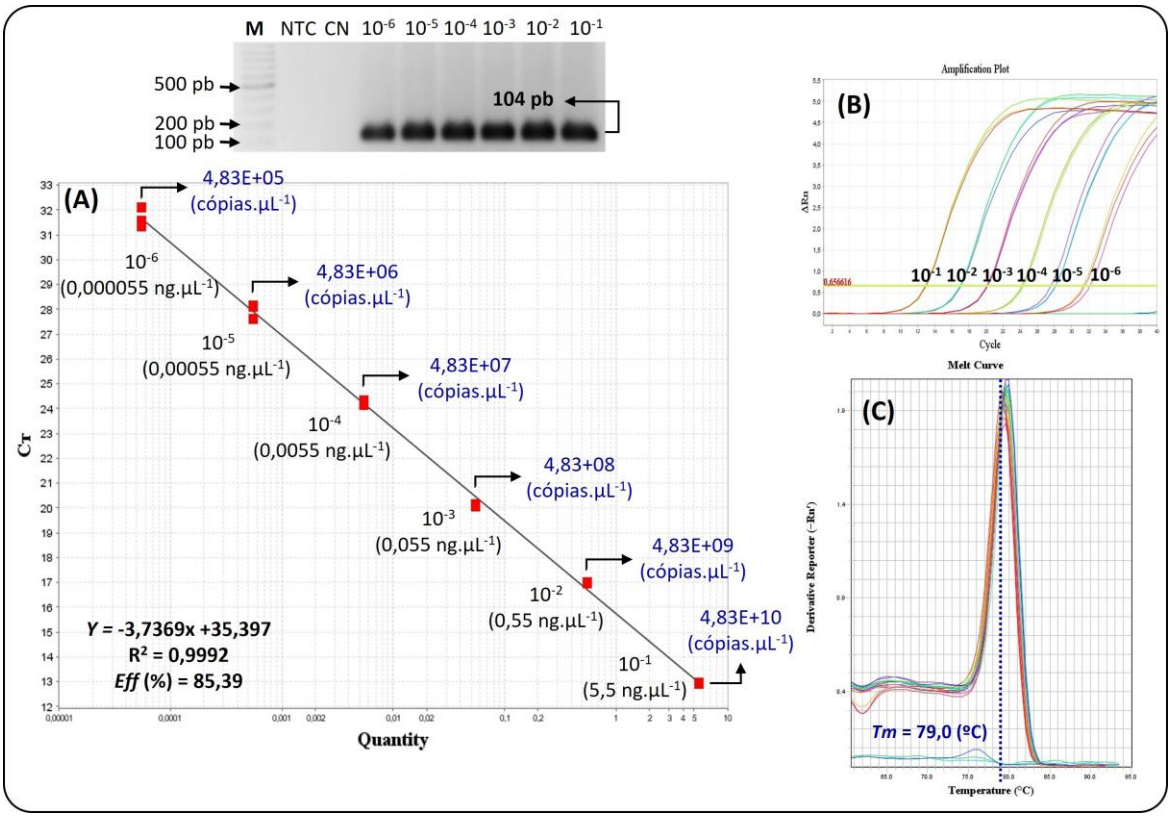


Figura 3. Curva padrão obtida por RT-qPCR para detecção e quantificação do cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) no inóculo e nas folhas apicais das plantas de *P. edulis* avaliadas. A) Gráfico de regressão linear em relação ao *Cycle threshold* (Ct) e ao cDNA (ng.µL^{-1}) obtidos a partir de seis diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em uma amostra padrão com concentração inicial de 5,5 ng.µL^{-1}; B) Gráfico de amplificação das diluições seriadas; C) Curva de dissociação (*melt curve*) com único pico específico em T_m = 79,0 °C. No topo: gel de eletroforese em agarose 2% mostrando o produto amplificado de 104 pb (*primer* qCABMV03) para as diluições testadas; CN = controle negativo (plantas não inoculadas); NTC = *non template control* (sem cDNA molde); Tm = *Temperature melting*

Com base no gráfico *heatmap* foi possível observar a formação de quatro grupos distintos, em função do título viral no inóculo, do número de folhas inoculadas e do tempo de avaliação dos sintomas foliares (Figura 3A). As plantas do grupo 1 (G1) obteve maior severidade média (ID de 67,2%) e foi composto pelos maiores títulos de CABMV no inóculo (1,5 x 10^9 a 1,8 x 10^9 cópias µL^{-1}, correspondente a 7 a 100% de extrato) inoculado em uma, duas e três folhas inoculadas. O grupo 2 (G2), com severidade média de 46,6%, agrupou os tratamentos com títulos intermediários de CABMV no inóculo (9,9 x 10^8 a 1,3 x 10^9

cópias μL^{-1}, equivalente a 3 a 6% de extrato) inoculado em uma, duas e três folhas. O grupo 3 (G3) obteve severidade média de 25,7%, representado por 8,2 x 10^8 a 1,0 x 10^9 cópias μL^{-1} (equivalente a 2 a 4% de extrato) de CABMV em uma e duas folhas inoculadas. O grupo 4 (G4) apresentou a menor severidade (ID médio de 4,6%), representado pelos menores títulos de CABMV no inóculo (3,0 x 10^8 a 8,2 x 10^8 cópias μL^{-1}, 0,5 a 2% de extrato), quando o vírus foi inoculado em uma e duas folhas por planta (Figura 3A).

Houve relação direta entre o título viral no inóculo e número de folhas inoculadas com a severidade dos sintomas foliares (Figura 3B). Observou-se que à medida que aumentou o título de CABMV no inóculo e o tempo de infecção e número de folhas inoculadas, há um aumento progressivo na severidade da doença. O ID médio observados aos 35 dias após a inoculação (DAI) foi 42,9%; 52,7% e 61,9% para uma, duas e três folhas, respectivamente (Figura 3B). De maneira geral, as curvas de severidade dos sintomas tendem a variar pouco entre as avaliações de 21; 28 e 35 DAI, que também podem ser corroboradas com aumento R^2 a partir do 21 DAI (Figura 3B).

Independentemente da folha inoculada, a severidade da doença foi reduzida de forma linear com o decréscimo do título viral no inóculo, com ID médio que variou de 70,0 a 3,5% nas inoculações realizadas com 1,8 x 10^9 (100% de extrato) a 3,0 x 10^8 (0,5% de extrato) cópias.μL^{-1} de CABMV no inóculo, respectivamente (Figura 3C). Em relação ao número de folhas inoculadas, independentemente dos títulos de CABMV no inóculo, foi observado aumento na severidade da doença com o aumento no número de folhas inoculadas com ID médio de 32,3, 38,8 e 49,8% em uma, duas e três folhas inoculadas por planta, respectivamente (Figura 3D). Considerando o progresso da doença nos cinco períodos de avaliação dos sintomas, houve estabilização na severidade da virose a partir dos 21 DAI, com ID médio de 48,05%, independentemente dos títulos de CABMV no inóculo e do número de folhas avaliadas (Figura 3E).

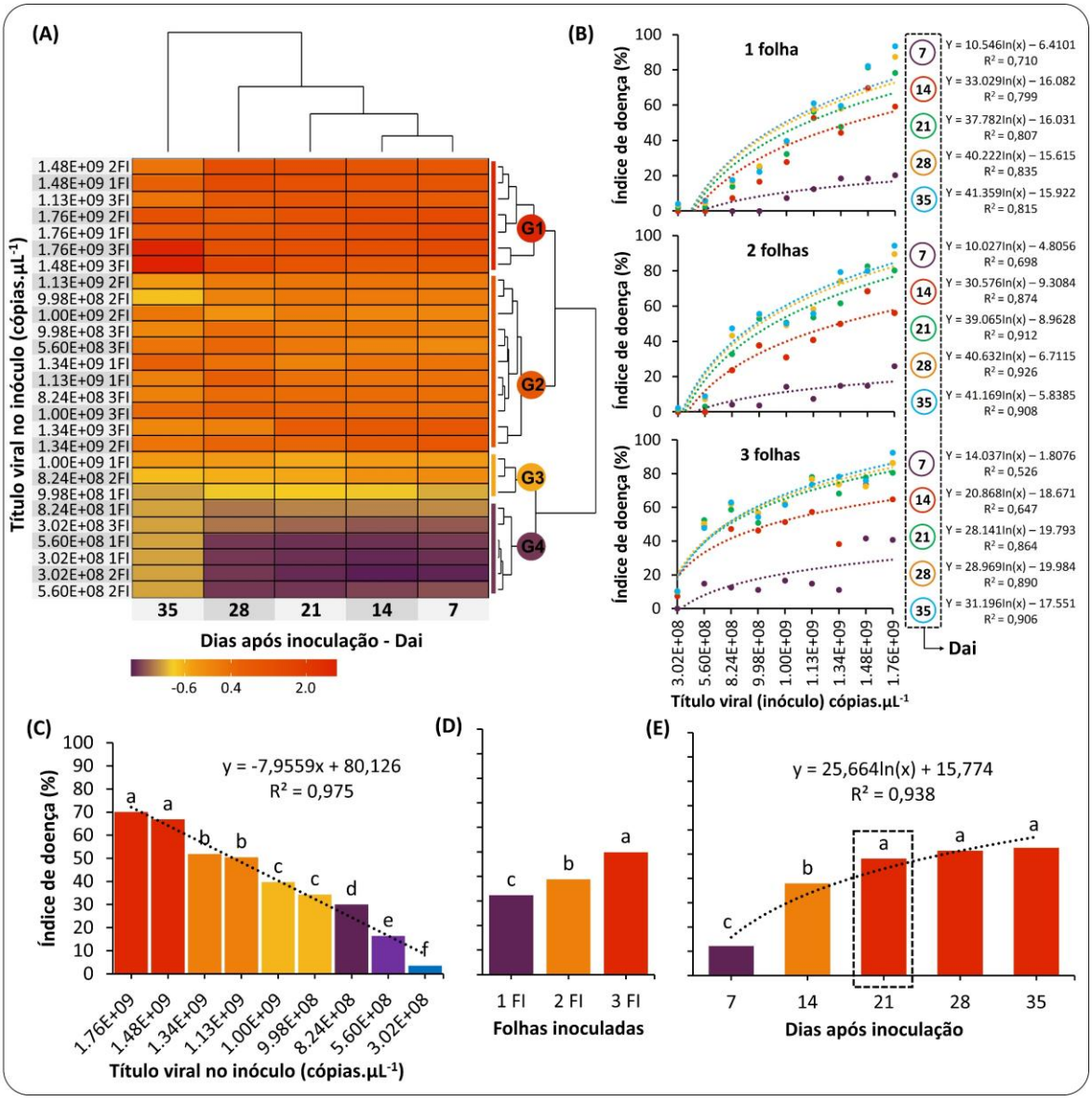


Figura 4. Agrupamento hierárquico e severidade (ID%) da virose do endurecimento dos frutos causado por cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) em plantas de *Passiflora edulis* Sims. inoculadas com diferentes títulos de CABMV no inóculo (1,76 x 10^9 a 3,02 x 10^8 cópias.µL^{-1}; equivalente a 100 a 0,5% de extrato foliar), número de folhas (1, 2 e 3 folhas) e avaliadas em cinco tempos após a inoculação (7 a 35 DAI). A) *Heatmap* em função dos diferentes títulos de CABMV inóculo, número de folhas inoculadas por planta e dos períodos de avaliação da severidade da virose (7, 14, 21, 28 e 35 DAI); B) Índice de doença em plantas inoculadas em 1, 2 ou 3 folhas com diferentes títulos de CABMV no inóculo, e avaliadas em cinco períodos (7, 14, 21, 28 e 35 DAI), sendo as equações das curvas de progresso da doença ajustadas ao modelo logarítmico; C) Índice médio de doença em função dos diferentes títulos de CABMV no inóculo independente da folha inoculada; D) Índice médio de doença em função do número de folhas inoculadas independente dos títulos de CABMV no inóculo; E) Índice médio de doença nos cinco períodos de avaliação

com ajuste de equação ao modelo de regressão logarítmica independente dos títulos do inóculo e das folhas. Cada retângulo no *heatmap* representa a contribuição de cada característica para a severidade da doença em cada tratamento e período de avaliação. As tonalidades de cores na escala correspondem as variáveis de baixa (cor em lilás; menor severidade da doença) à alta contribuição (cor em vermelho; maior severidade da doença). G1 = grupo 1; G2 = grupo 2; G3 = grupo 3; G4 = grupo 4. Letras minúsculas iguais nos gráficos de barras das figuras C e E não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas no gráfico de barras da figura D não difere estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O retângulo pontilhado na cor preta no gráfico de barras representa o tempo de estabilização da severidade da virose nas plantas de *P. edulis* Sims.

Considerando o titulo de CABMV nas plantas avaliadas, foi possível observar que o aumento do título de CABMV no inóculo promoveu aumento do título viral nas folhas apicais de *P. edulis* (r = 0,94) (Figura 4A). Este aumento é dependente do número de folhas inoculadas que variou de uma folha (5,5 x 10^{10} cópias.µL^{-1}) para três folhas (1,8 x 10^{11} cópias.µL^{-1}) com aumento de 232,8% (Figura 4B) e também dos dias após a inoculação (DAI) que de 7,04 x 10^{10} cópias.µL^{-1} aos 7 DAI passou para 1,37 x 10^{11} cópias.µL^{-1}, evidenciando um aumento de 94,3% aos 21 DAI (Figura 4C). Aos 21 DAI aparentemente não há uma relação tão marcante entre o títulode CABMV no inóculo e a severidade da virose nas folhas (1 a 3 folhas), isso pode ser verificado pelo redução do coeficiente de determinação (R^2 de 0,389 a 0,218) nas folhas avaliadas quando comparado às avaliações de 7 DAI (R^2 de 0,675 a 0,687), embora há aumento do título quando se compara uma folha inoculada com três folhas inoculadas (Figura 4D-E).

Considerando o título viral em cada período de avaliação, notou-se que aos 7 DAI o título viral aumentou em função do número de folhas inoculadas, com título médio de 4,6 x 10^{10} em uma folha, 5,6 x 10^{10} em duas folhas e 1,3 x 10^{11} cópias.µL^{-1} em três folhas inoculadas (Figura 4D). A mesma tendência de aumento foi observada aos 21 DAI, onde o título viral médio nas folhas apicais foi de 7,6 x 10^{10} cópias.µL^{-1} em plantas inoculadas em uma folha,1,0 x 10^{11} cópias.µL^{-1} em duas folhas e de 2,8 x10^{11} cópias.µL^{-1} em três folhas inoculadas (Figura 4E).

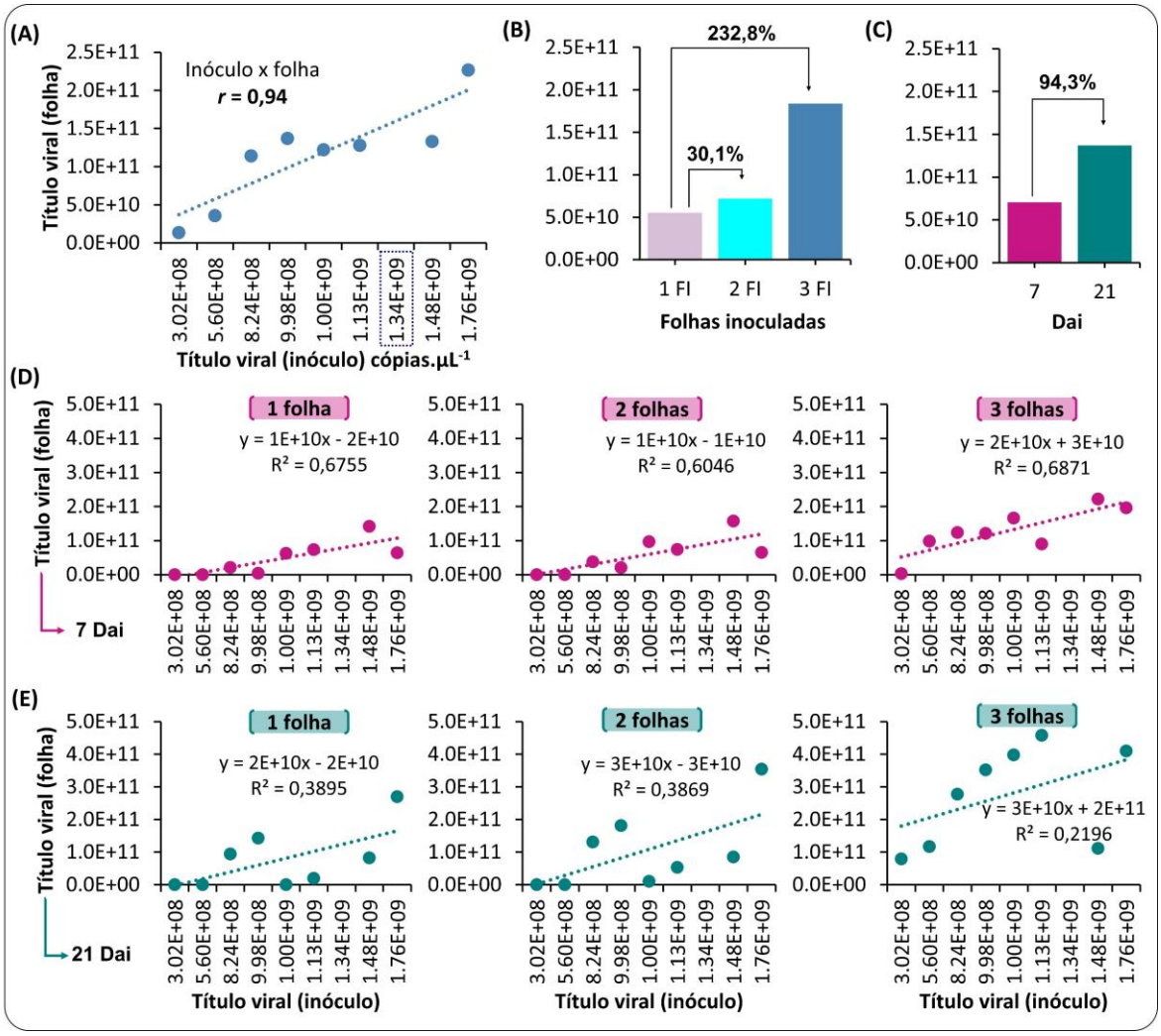


Figura 5. Relação do título de CABMV no inóculo com o título de CABMV nas folhas superiores de plantas de *P. edulis* inoculadas em função do número de folhas (1, 2 e 3 folhas) e avaliadas aos 7 e 21 DAI. A) Correlação (*r)* entre o título de CABMV no inóculo com o título de CABMV nas folhas superiores de *P. edulis*, com ajuste de equação ao modelo linear; B) Título viral em folhas superiores de *P. edulis* em função do número de folhas basais inoculadas; C) Título viral em folhas superiores de *P. edulis* aos 7 DAI (início dos sintomas de virose) e aos 21 DAI (estabilização dos sintomas de virose); D) Título viral em folhas superiores de *P. edulis* a partir de plantas inoculadas com diferentes títulos de CABMV em uma, duas e três folhas por planta aos 7 DAI, com ajuste de equação ao modelo linear; E) Título viral em folhas superiores de *P. edulis* a partir de plantas inoculadas com diferentes títulos de CABMV em uma, duas e três folhas por planta aos 21 DAI, com ajuste de equação ao modelo linear. DAI = Dias após inoculação. O retângulo pontilhado em azul

no gráfico de correlação representa o valor de título viral (1,34 x 10^9 cópias.μL^{-1}) que foi suprimido da análise por apresentar divergência nos dados.

A partir da análise dos dados de severidade da doença aos 21 DAI com todos os títulos de CABMV no inóculo de 3,02 x 10^5 (0,5% de extrato) a 1,76 x 10^9 cópias.μL^{-1} (100% de extrato) foi observado formação de quatro grupos (Figura 5A, B). O grupo 1 (G1) alocou os tratamentos com os maiores títulos de CABMV no inóculo (1,13 x 10^9 a 1,76 x 10^9 cópias.μL^{-1}, correspondente a 5 a 100 % de extrato) aplicado em uma, duas e três folhas, sendo os tratamentos que promoveram a maior severidade dos sintomas foliares, com ID médio de 78,4%.

O grupo 2 (G2) alocou 37% dos tratamentos com ID médio de 54,6% quando as inoculações foram feitas em duas e três folhas por planta com título viral no inóculo que variam de 8,2 x 10^8 a 1,3 x 10^9 cópias.μL^{-1}, equivalente a 2 a 6 % de extrato foliar. O terceiro grupo (G3) agrupou os títulos de CABMV que variaram de 8,2 x 10^8 a 1,0 x 10^9 cópias.μL^{-1} (2 a 4 % de extrato) associado a uma e duas folhas inoculadas, com ID médio de 29,9%. O quarto grupo (G4) foi representado pelos menores títulos de CABMV de 3,0 x 10^8 a 8,2 x 10^8 cópias.μL^{-1} (0,5 a 2 % de extrato) com uma e duas folhas inoculadas, resultando na menor severidade da virose (ID médio de 5,3%) (Figura 5A). Os *boxplots* gerados de acordo com cada grupo formado no dendograma validaram a variação na gravidade da doença e demonstraram a classificação de resistência de cada grupo formado por meio da análise de *cluster* (Figura 5B).

Não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na severidade da doença ao dentro dos períodos avaliados (7 a 35 DAI) quando as plantas foram inoculadas com o maior título de CABMV no inóculo (1,76 x 109^9 cópias μL^{-1} (correspondente a 100% de extrato foliar), com severidade média de 67,8; 69,3 e 72,9% em uma, duas e três folhas inoculadas por planta, respectivamente (Figura 5C).

Aos 21 DAI é mais evidente, a semelhança da severidade entre o número de folhas inoculadas, com ID médio de 78,4; 80,3 e 80,5% em uma, duas e três folhas inoculadas, respectivamente (Figura 5C). Considerando o título de CABMV nas folhas apicais de *P. edulis*, quando as plantas foram inoculadas com maior título viral inóculo (1,76 x 10^9 cópias.μL^{-1}, 100% de extrato foliar). Observou-se que aos 7 DAI o título viral não houve variação entre uma e duas folhas (1,53% de aumento), sendo que o aumento foi mais pronunciado quando as plantas foram inoculadas em

três folhas (2,0 x 10^{11} cópias.µL^{-1}). Por outro lado, aos 21 DAI o título viral foi progressivo a medida em que aumentou o número de folhas inoculadas, com título viral acumulado de 2,7 x 10^{11}, 3,5 x 10^{11} e 4,1 x 10^{11} cópias.µL^{-1} em uma, duas e três folhas inoculadas, respectivamente (Figura 5D).

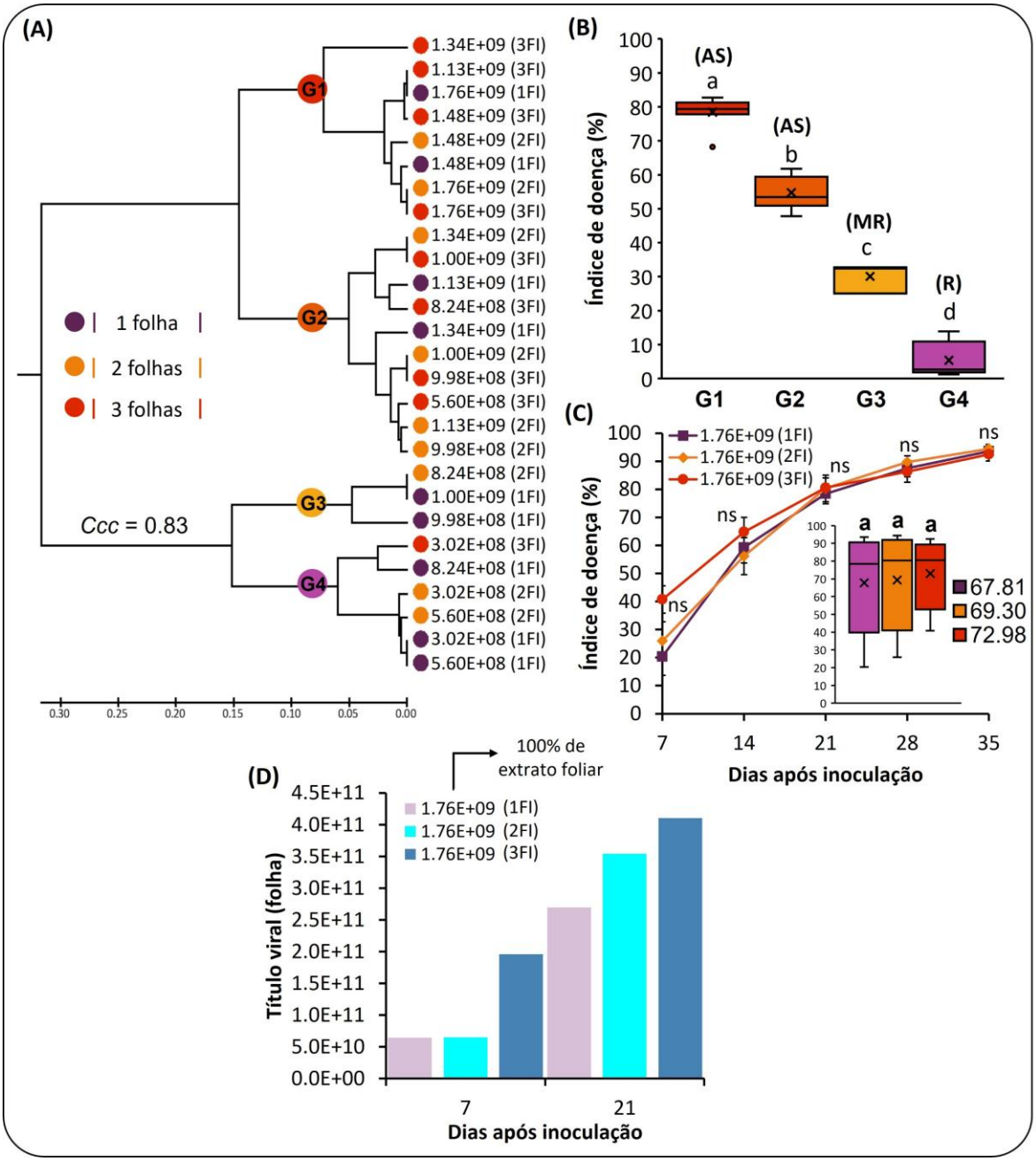


Figura 6. Agrupamento hierárquico e severidade da virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro causada por cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) em plantas de *Passiflora edulis* Sims inoculadas com diferentes títulos de CABMV no inóculo e números de folhas inoculadas. A) Dendrograma gerado pelo método de UPGMA (*unweighted pair goup method with arithmetic mean*) com base na severidade média da doença registrada

aos 21 DAI; B) *Boxplot* em função da severidade média doença gerado com base nos grupos formados na análise de *cluster*; C) Severidade da doença a partir do maior título de CABMV no inóculo (1,8 x 10^9 cópias.µL^{-1}; 100% de extrato foliar) em plantas inoculadas em uma, duas ou três folhas e avaliadas ao longo do tempo (7 a 35 DAI); D) Título viral nas folhas superiores de *P. edulis* em plantas inoculadas com título de CABMV de 1,8 x 10^9 cópias.µL^{-1} (100% de extrato foliar) em uma, duas e três folhas por planta aos 7 e 21 DAI. Letras minúsculas comparam as médias entre os grupos de resistência formado no *boxplot*. G1 (grupo 1) = Altamente suscetível (AS); G2 (grupo 2) = Altamente suscetível (AS); G3 (grupo 3) = Moderadamente resistente (MR); G4 (grupo 4) = Resistente (R). *ccc*= coeficiente de correlação cofenética. ns = não significativo pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Considerando a severidade média da doença aos 21 DAI em todas as concentrações de inóculo testadas, observou-se que não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na severidade quando as inoculações foram realizadas em uma, duas ou três folhas por planta, nas concentrações de 3,02 x 10^8; 1,13 x 10^9; 1,34 x 10^9; 1,48 x 10^9 e 1,76 x 10^9 cópias.µL-^{1} de CABMV no inóculo. Por outro lado, houve diferença ($p \leq 0,05$) na severidade média nas plantas inoculadas em apenas uma folha com 5,60 x 10^8; 8,24 x 10^8; 1,0 x 10^9 e 1,0 x 10^9 cópias.µL^{-1} de CABMV no inóculo, mas não houve diferença nas plantas inoculadas em duas e três folhas nesses mesmos valores de títulos de CABMV no inóculo (Figura 6A). Verificou-se que a medida em que diminuiu o título de CABMV no inóculo, houve aumento substancial de plantas sem sintomas - SS (49,6%), principalmente nas inoculações realizadas abaixo de 1,13 x 10^9 cópias.µL^{-1} (5 % do extrato) (Figura 6B). Embora sem sintomas visíveis, as plantas assintomáticas (SS) apresentaram infecção sistêmica, porém com menor título viral em relação as plantas sintomáticas - CS (Figura 6C).

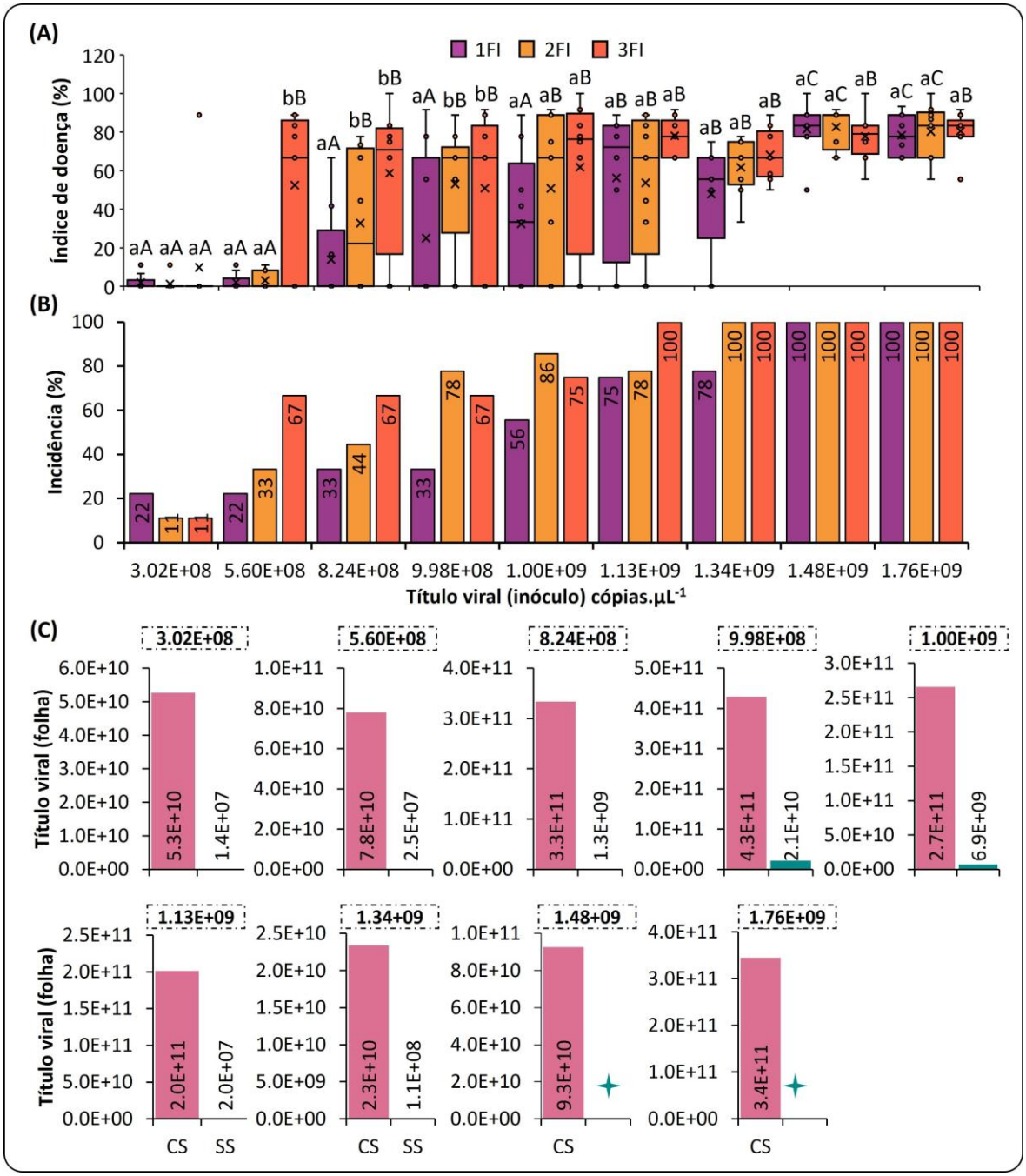


Figura 7. Severidade e incidência da virose do endurecimento dos frutos (CABMV) em plantas de *Passiflora edulis* Sims. inoculadas com diferentes títulos de CABMV no inóculo e números de folhas inoculadas. A) Severidade média da virose aos 21 DAI em função do título viral no inóculo e do número de folhas inoculadas; B) Incidência da doença aos 21 DAI em função do título viral no inóculo e do número de folhas inoculadas por planta; C) Título viral em plantas sintomáticas e assintomáticas inoculadas com diferentes títulos de CABMV no inóculo (3,0 x 10^8 a 1,8 x 10^9 cópias.µL^{-1}) aos 21 DAI. Letras minúsculas comparam as médias em cada título de CABMV no inóculo, e letras maiúsculas comparam as médias entre cada título de CABMV em plantas inoculadas com uma, duas e três folhas. CS = plantas com sintomas; SS = plantas sem sintomas. A estrela verde de quatro pontas

representa ausência de plantas sem sintomas quando inoculadas com os maiores valores de título de CABMV no inóculo (1,5 x 10^9 a 1,8 x 10^9 cópias μL^{-1}, 100 e 7% de extrato foliar). Os valores dentro dos retângulos pontilhados em preto acima dos gráficos de barras representam os títulos de CABMV no inóculo usados nas inoculações em folhas basais de *P. edulis*.

4. Discussão

As curvas de dissociação das amplificações demonstraram alta especificidade e uniformidade nas reações de RT-qPCR, e as curvas de dissociação (*melting curve*) mostraram ausência de dímeros de primers ou picos inespecíficos. O tamanho previsto do produto da RT-qPCR (104 pb) foi confirmado em gel de agarose com padrão de bandas únicas (Figura 3).

O genótipo BGP418 (*P. edulis*) utilizado neste estudo foi previamente avaliado como suscetível ao CABMV (Gonçalves *et al*., 2018). Genótipos suscetíveis apresentam severidade da virose diretamente relacionada ao título viral, de modo que a medida em que aumenta o título do CABMV ao longo do tempo de infecção, a severidade dos sintomas também evoluiu progressivamente (Gonçalves *et al*., 2025). Isso se deve pelo fato de espécies suscetíveis não possuírem mecanismos de resistência. A espécie *P. edulis* mesmo respondendo a infecção, não sintetizam proteínas como ligadas à regulação do proteassoma e às proteínas de choque térmico (HSPs) que são fundamentais contra a infecção do CABMV (Carvalho *et al*., 2019), levando o vírus a se multiplicar rapidamente nos tecidos foliares e se disseminar sistemicamente de forma eficiente.

As plantas de *P. edulis* inoculadas mecanicamente, apresentaram maior severidade quando inoculadas com maior título viral no inóculo (1,76 x10^9 cópias μL^{-1}). O que pode estar relacionado como aumento do número de focos primários de infecção na folha inoculada, proporcionando um número maior de células infectadas, e rápida translocação através do floema para as folhas superiores não inoculadas estabelecendo a infecção sistêmica e a ocorrência mais rápida de sintomas, em comparação a inoculação com títulos menores (Rodrigo *et al*., 2014; Wart *et al.*, 2012; Lafforgue *et al.,* 2012). A relação entre a severidade e o título viral em plantas foram observadas por Mehle *et al*. (2004), Ammara *et al*. (2017), Taninaka *et al*. (2019), Bin *et al*. (2022), Gonçalves *et al*. (2025) utilizando diferentes culturas.

Em alguns estudos a avaliação do título viral é feito na mesma folha inoculada (Lafforgue *et al.,* 2012; Rodrigo *et al.,* 2014; Pompe-Novak *et al*., 2019). Neste estudo, as avaliações foram feitas nas folhas apicais das plantas, enquanto a inoculação foi realizada nas folhas basais (uma a três folhas). Assim, houve aumento do título viral nas folhas superiores não inoculadas, em função do título de CABMV no inóculo, número de folhas inoculadas e tempo de infecção (Figura 4). Trabalhos como de Zwart *et al.* (2011, 2012), e Pompe-Novak *et al.* (2019), observaram que maiores concentrações do inóculo proporciona maiores focos de infecção e título viral na folha inoculada, e a ocorrência mais rápida da infecção sistêmica.

No entanto, é importante destacar que a relação título do inóculo e título nas folhas apicais é mais evidente aos 7 DAI que nas avaliações aos 21 DAI (Figura 4D-E). Certamente isso está associado a rápida infecção pelo CABMV que resultou em certa estabilização dos diferentes títulos aos 21 DAI (Figura 3E). Assim, não foi evidenciado claramente essa relação (Figuras 4D-E). De fato, o CABMV no maracujá foi detetacado em 30 minutos por qPCR nas folhas apicais de mudas *P. edulis* após a inoculação de duas folhas basais (Gonçalves *et al*., 2025). Além disso, a acumulação viral na folha inoculada pode contribuir para o acúmulo do título viral na planta (Zwart *et al.*, 2012).

As concentrações do inóculo de 1,13 x 10^9 (5% do extrato bruto) a 1,76 x 10^9 cópias.µL^{-1} (100% do extrato bruto), classificou o genótipo de *P. edulis* como altamente suscetível (grupo G1; Figura 5A), principalmente quando as plantas foram inoculadas com três folhas, sendo compatível com a classificação atribuída nos estudos de Leão *et al*. (2006), Cerqueira-Silva *et al*. (2008), Oliveira *et al*. (2013), Viana *et al*. (2014) e Gonçalves *et al.* (2018). Os títulos virais intermediários (8,24 x10^8 a 1,34 x 10^9 cópias.µL^{-1}) foram alocadas no grupo G2 (Figura 4A) apesar de também classificar as plantas como suscetíveis, possui variabilidade no índice de severidade entre os títulos do inóculo e entre os números de folhas inoculadas, apresentando plantas assintomáticas e sintomáticas (Figura 5B). Por outro lado, a concentração viral pode variar entre plantas, mesmo quando a mesma quantidade de inóculo é aplicada, pois a probabilidade de infecção por partículas virais difere entre células, onde células infectadas mais próximas do floema contribui para uma infecção sistêmica mais rápida (Zwart *et al*., 2012). Além disso, o próprio processo de inoculação pode ser uma fonte de variação (Pompe-Novak *et al*., 2019), pois é

difícil padronizar a quantidade de inóculo nas folhas basais em função da inoculação mecânica. Já os menores títulos virais de 3,02 x 10^8 a 9,98 x 10^8 cópias.μL^{-1}; (0,5% a 3% do extrato bruto, repectivamente) foram alocados nos grupos G3 e G4, além de apresentar menor taxa de incidência da doença, atribuindo a classificação de moderadamente resistente (MR) e resistente (R) para plantas avaliadas, podendo induzir a seleção errônea de genótipos.

As plantas assintomáticas resultantes da inoculação com os menores títulos do inóculo, apresentaram menor título viral em relação a plantas com sintomas aos 21 DAI. O movimento das partículas virais é mais lento para a parte áreas das plantas quando inoculadas com menor título do inóculo (Pompe-Novak *et al*., 2019). O que pode favorecer a resposta das plantas, visto que espécie *P. edulis* apesar de ser considerada suscetível, conseguem responder ativamente a um estresse biótico, porém não respondem dentro de um intervalo de tempo apropriado para conter de forma efetiva o avanço da doença (Carvalho *et al*., 2019).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que plantas inoculadas com altos títulos do inóculo (1,48 x 10^9 a 1,76 x 10^9 cópias.μL^{-1}), não apresentaram plantas assintomáticas entre as repetições, indicando que os efeitos de variação na inoculação podem ser reduzidos com aumento da concentração do inóculo viral. Reforçando a importância da padronização na concentração do inóculo e no número de folhas inoculadas na seleção de genótipos quanto a suscetibilidade e resistência ao CABMV.

5. Conclusão

- Baixo título viral na fonte de inóculo, independente no número de folhas avaliadas, resulta em maior incidência de plantas assintomáticas e com menor severidade de sintomas.

- Existe relação direta, aos 7 dias após inoculação, entre o título viral no inóculo e o número de folhas basais inoculadas com a serveridade dos sintomas e com o título viral estimado por qPCR nas folhas apicais não inoculadas.

- Para a seleção mais assertiva de genótipos de *P. edulis*, quanto o grau de resistência ou suscetibilidade à virose, recomenda-se utilizar 100% de extrato com elevado título de CABMV (1,76 x 10^9 cópias μL^{-1}) inoculando uma, duas ou três folhas basais por planta.

- Para a espécie de *P. edulis* o tempo de estabilização dos sintomas ocorreu aos 21 DAI, no entanto para as demais espécies do gênero *Passiflora* o tempo de estabilização pode ser aumentado, variando o tempo de avaliação dos sintomas.

Referências

AMMARA, U.; AL-SADI, A. M.; AL-SHIHI, A.; AMIN, I. Real-time qPCR assay for the TYLCV titer in relation to symptoms-based disease severity scales. **International Journal of Agriculture & Biology**, Islamabad, v. 19, n. 1, p. 145–151, 2017.

BEZERRA, L. B. da S.; VIANA, A. P.; BERNADO, W. de P.; MENDES, D. S.; CAMPOSTRINI, E.; DA SILVA, F. A. *et al.* Viral infection by CABMV-cowpea aphid-borne mosaic virus reduces gas exchange in passion fruit leaves. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 172, p. 105–121, maio 2025.

BIN, Y.; XU, J.; DUAN, Y.; MA, Z.; ZHANG, Q.; WANG, C.; SU, Y.; JIANG, Q.; SONG, Z.; ZHOU, C. The titer of Citrus Yellow Vein Clearing Virus is positively associated with the severity of symptoms in infected citrus seedlings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 106, n. 3, p. 828–834, mar. 2022.

CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SILVA, F. A.; DOS SANTOS, P. H. D.; EIRAS, M.; SANTOS, E. A. How segregating populations of passion fruit react to CABMV infection? **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 855–866, 2021.

COLARICCIO, A.; RODRIGUES, L. K.; RAMOS, A. F.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; HARAKAVA, R.; PERUCH, L. A. M. Caracterização do Cowpea aphid-borne mosaic virus em *Passiflora edulis* cv. Catarina no litoral sul de Santa Catarina, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, 2020.

COSTA, A.P., NOGUEIRA, I., PEIXOTO, J.R., & BLUM, L.E.B. Screening of sour passion fruit for reaction to bacterial spot and passion fruit woodiness disease. **Journal of Agricultural Science**, 12(2), p. 130-137, 2020.

CHEN, X; YAO, R.; HUA, X.; DU, K.; LIU, B.; YUAN, Y.; WANG, P.; YAN, Q.; DONG, L.; GROEN, S. C.; JIANG, S.; ZHOU, T. Identification of maize genes that condition early systemic infection of sugarcane mosaic virus through single-cell transcriptomics. **Plant Communications**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 101297, 2025.

FISCHER, I. H.; REZENDE, J. AM, Doenças da Flor da Paixão (*Passiflora* ssp.), **Global Science Books**, 2008.

GONÇALVES, M. C.; REZENDE, J. A. M.; RIBEIRO, S. G.; GIORDANO, L. B. Aphid transmission of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) to different *Passiflora* species. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2017.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; ABREU, E. M.; JESUS, O. N.; BARBOSA, C. J.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; OLIVEIRA, E. J. Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to Cowpea aphid-borne mosaic virus and leaf anatomical response under controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p. 166–178, 2018.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H. de; JESUS, O. N. de. Leaf anatomical aspects of CABMV infection in *Passiflora* spp. by light and fluorescence microscopy. **Australasian Plant Pathology**, v. 50, n. 2, p. 203–215, 2021.

GONÇALVES, Z. S.; JESUS, O. N. de; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORREA, R. X. Systemic infection of cowpea aphid-borne mosaic virus in *Passiflora* spp. occurs at the initial stage regardless of the species' resistance**. Archives of Virology**, v. 170, n. 2, p. 43, 29 jan. 2025.

KANAPIYA, A.; AMANBAYEVA, U.; TEULENOVA, Z.; ABASH, A.; ZHANGAZIN, S.; DYUSSEMBAYEV, K.; MUKIYANOVA, G. Recent advances and challenges in plant viral diagnostics. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 13 ago. 2024.

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

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. Microscopy, 14(2), 119-121,1965.

LAFFORGUE, G.; TROMAS, N.; ELENA, S. F.; ZWART, M. P. Dynamics of the establishment of systemic Potyvirus infection: independent yet cumulative action of primary infection sites. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 12912-12922, 2012.

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

MACIEL, S. da C.; NAKANO, D. H.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C. Screening of *Passiflora* species for reaction to Cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 414–418, 2009.

MEHLE, N.; TRDAN, S.; VAJC, J.; RAVNIKAR, M.; DERMAN, E. Spread of Potato virus YNTN in potato cultivars (Solanum tuberosum L.) with different levels of

sensitivity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 200–208, 2004.

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

PEREIRA-CARVALHO, Movimento do vírus na planta, In:MEDEIROS *et al.,* **Virologia vegetal: conceitos, fundamentos classificação e controle,** Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PREISIGKE, S. C.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SANTOS, P. R.; SANTOS, V. O.; AMBRÓSIO, M.; SILVA, F. A. da. Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. **Bragantia,** Campinas, v. 79, n. 1, p. 47–61, 2020.

POMPE-NOVAK, M.; KRIŽNIK, M.; GRUDEN, K. The titre of the virus in the inoculum affects the titre of the viral RNA in the host plant and the occurrence of the disease symptoms. **Acta Chimica Slovaca,** v. 66, n. 1, p. 45–49, 2019.

POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, K.; BAEBLER, Š.; KREČIČ-STRES, H.; RAVNIKAR, M.; JONGSMA, M. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (Solanum tuberosum L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 67, n. 3-5, p. 237-247, 2006.

RANABHAT, N. B.; BRUCE, M. A.; FELLERS, J. P.; SHOUP RUPP, J. L. A reproducible methodology for absolute viral quantification and determination of probability in mechanical inoculations of Wheat streak mosaic virus. **Tropical Plant Pathology,** v. 47, p. 553–561, 2022.

RISKA, A.; AJITOMI, A.; NAKAZONO-NAGAOKA, E.; KISHI, S.; IWAI, H. Effects of co-infection with East Asian *Passiflora* virus and East Asian *Passiflora* distortion virus in *Passiflora foetida*. **Tropical Plant Pathology,** v. 45, p. 659–670, 2020.

RESENDE, L. V.; MALUF, W. R.; FIGUEIRA, A. R.; RESENDE, J. T. V. Correlations between symptoms and DAS-ELISA values in two sources of resistance against tomato spotted wilt virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 135–139, 2000.

RIBEIRO, E. da C.; ABREU, E. F. M.; SILVA-CARDOSO, I. M. de A.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. da G.; DE SOUZA, A. L. X.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Viral diagnosis and effectiveness of shoot tip culture for virus eradication in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) matrices used for hybrid seed production. **Biotechnology Research and Innovation**, [S. l.], v. 8, n. 1, e2024003, 2024.

RODRIGO, G.; ZWART, M. P.; ELENA, S. F. Onset of virus systemic infection in plants is determined by speed of cell-to-cell movement and number of primary

infection foci. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 98, p. 20140555, 2014.

RUBIO, L.; GALIPIENSO, L.; FERRIOL, I. Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, art. 1092, 17 jul. 2020.

SANTOS-JIMÉNEZ, J. L.; DE BARROS MONTEBIANCO, C.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. G.; BARRETO-BERGTER, E.; VASLIN, M. F. S. A fungal glycoprotein mitigates passion fruit woodiness disease caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in *Passiflora edulis*. **BioControl**, v. 67, p. 75-87, 2022.

SANTOS-JIMÉNEZ, J. L.; MONTEBIANCO, C. d. B.; BERNARDINO, M. C.; BARRETO-BERGTER, E.; ROSA, R. C. C.; VASLIN, M. F. S. Enhancing Passion Fruit Resilience: The Role of Hariman in Mitigating Viral Damage and Boosting Productivity in Organic Farming Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 26, n. 5, art. 2177, 2025.

SHAFIQ, M.; TAHIR, M. N.; MANSOOR, S.; BRIDDON, R. W. Real-time quantitative PCR assay for the quantification of virus and satellites causing leaf curl disease in cotton in Pakistan. **Journal of Virological Methods**, v. 248, p. 54-60, 2017.

TANINAKA, Y.; ARIMURA, S.; TSUDA, S.; YOSHIMURA, K.; ISHIKAWA, K.; YOSHIMURA, S.; YOSHIKAWA, N. The plasma membrane cation binding protein 1 affects accumulation of Potato virus Y in pepper both at the systemic level and in protoplasts. Virus Research, v. 280, 197899, 2020.

VUORINEN, A. L.; KELLONIEMI, J.; VALKONEN , JARI, P.T. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? **Plant Science**, [S. l.], v. 181, n. 4, p. 331–335, out. 2011.

VIANA, C.D.S.; PIRES, M.D.C.; PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., & BLUM, L.E.B. Partial resistance of passion fruit genotypes to the virose of the woodiness of the fruit (Cowpea aphid-borne mosaic virus - CABMV). **Bioscience Journal**, 30 (Supplement), p. 338-345, 2014.

WU, X.; CHEN, X. F. Intercellular movement of plant RNA viruses: Targeting replication complexes to the plasmodesma for both accuracy and efficiency, **Traffic**, 2020.

WU, W.; MA, F.; ZHANG, X.; TAN, Y.; HAN, T.; DING, J.; WU, J.; XING, W.; WU, B.; HUANG, D.; ZHANG, S.; XU, Y.; SONG, S. Research Progress on Viruses of *Passiflora edulis*. **Biology, Base**l, v. 13, n. 10, p. 839, 19 out. 2024

WYLIE, S. J.; ADAMS, M.; CHALAM, C.; KREUZE, J.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; OHSHIMA, K.; PRAVEEN, S.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.; WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 3, p. 352-354, 2017.

YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J. M.; FAN, J-B.; WHITHAM, S. A. Spatial Analysis of Arabidopsis thaliana Gene Expression in Response to Turnip mosaic virus Infection**. Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 358-370, 2007.

ZWART, M. P.; DARÒS, J.-A.; ELENA, S. F. One is enough: In vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 7, e1002122, 2011.

ZWART, M. P.; DARÒS, J.-A.; ELENA, S. F. Effects of potyvirus effective population size in inoculated leaves on viral accumulation and the onset of symptoms. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 12912

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA AO CABMV EM ACESSOS E PROGÊNIES DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora* spp.[1]

[1]Artigo a ser traduzido e preparado para o comitê editorial do periódico Tropical Plant Pathology.

Identificação de fonte de resistência ao CABMV em acessos e progênies de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp**.**

Resumo: O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, entretanto, o sistema produtivo enfrenta desafios fitossanitários, destacando-se a virose do endurecimento dos frutos (cowpea aphid-borne mosaic virus - CABMV), que ocasiona perdas significativas na produção. Devido às dificuldades envolvidas em seu controle e ausência de cultivares resistentes, a identificação de genótipos resistentes contidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-*Passiflora*) é uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao CABMV. Este estudo objetivou identificar genótipos resistente ao CABMV, a partir da avaliação de sintomas da virose em acessos e progênies de híbridos interespecíficos do BAG-*Passiflora*. A pesquisa foi conduzida em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliados 72 genótipos de *Passiflora* spp. e três híbridos interespecíficos. A inoculação com o CABMV ocorreu de forma artificial a partir da fricção de extrato foliar na concentração de 100% do inóculo de CABMV (extrato bruto) em duas folhas basais das plantas. As avaliações dos sintomas foram realizadas visualmente a partir de uma escala de notas que varia de 1 (ausência de sintomas) a 4 (sintomas graves com bolhas e distorção foliar), com início aos 12 dias após inoculação (DAI) e término aos 40 DAI. As notas atribuídas foram convertidas em um Índice de doenças (ID%) para medir a severidade da virose. A detecção e quantificação do título viral nas plantas assintomáticas dentro dos acessos e nos híbridos interespecíficos foi realizada por meio da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Aproximadamente 8% (n = 6) dos genótipos foram classificados como resistentes, com destaque para o BGP060, BGP081 e BGP083 (pertencentes a *P. setacea*), e BGP460 (*P. misera*) que obtiveram ID de 0,0%. Dentro do grupo de genótipos resistentes, o BGP497 (*P. porophylla*) constitui o primeiro relato de resistência (ID = 2,59%) presente na literatura. Observou-se que o título viral em plantas assintomáticas foi 96,8% menor em relação a plantas com sintomas severos de virose. Por outro lado, a infecção por CABMV não foi confirmada por qPCR nas plantas assintomáticas dentro dos acessos BGP408 (*P. coccinea*), BGP101 (*P. Junqueira*), BGP505 (*P. amethystina*), BGP035 (*P. edulis*), BGP083 (*P. setacea*), PGBP-05 (*P. cincinnata*) e PGBP-02 (*P. cincinnata*). Os híbridos avaliados apresentaram severidade e título viral intermediários em relação aos seus parentais, mesmo quando o parental se manteve assintomático. Esses resultados reforçam que a resistência ao CABMV é uma herança quantitativa (poligênica) e ação gênica para sintomas da virose do tipo aditiva, e evidenciam a dificuldade de obter plantas imunes nos cruzamentos, embora este evento possa aparecer em populações maiores, porém em baixa frequência.

Palavras-chaves: Maracujazeiro, *Potyvirus*, vírus de RNA, resistência poligênica, melhoramento genético.

Identification of sources of resistance to CABMV in accessions and progenies of interspecific hybrids of *Passiflora* spp**.**

Abstract: Brazil is the world's largest producer of yellow passion fruit, however, the production system faces phytosanitary challenges, notably the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), which causes significant losses in production. Due to the difficulties involved in controlling it and the lack of resistant cultivars, the identification of resistant genotypes contained in the Active Germplasm Bank (BAG-*Passiflora*) is an alternative for the development of CABMV-tolerant cultivars. This study aimed to identify genotypes resistant to CABMV by evaluating virus symptoms in accessions and progenies of interspecific hybrids of BAG-*Passiflora*. The research was conducted in a greenhouse in a completely randomized design, evaluating 72 genotypes of *Passiflora* spp. and three interspecific hybrids. Inoculation with CABMV was performed artificially by rubbing leaf extract at a concentration of 100% of the CABMV inoculum (crude extract) on two basal leaves of the plants. Symptom evaluations were performed visually using a scale ranging from 1 (no symptoms) to 4 (severe symptoms with blisters and leaf distortion), beginning 12 days after inoculation (DAI) and ending at 40 DAI. The scores assigned were converted into a Disease Index (DI%) to measure the severity of the virus. The detection and quantification of viral titers in asymptomatic plants within accessions and in interspecific hybrids was performed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Approximately 8% (n = 6) of the genotypes were classified as resistant, notably BGP060, BGP081, and BGP083 (belonging to *P. setacea*), and BGP460 (*P. misera*), which obtained an ID of 0.0%. Within the group of resistant genotypes, BGP497 (P. porophylla) constitutes the first report of resistance (DI = 2.59%) present in the literature. It was observed that the viral titer in asymptomatic plants was 96.8% lower than in plants with severe virus symptoms. On the other hand, CABMV infection was not confirmed by qPCR in asymptomatic plants within accessions BGP408 (*P. coccinea*), BGP101 (*P. Junqueira*), BGP505 (*P. amethystina*), BGP035 (*P. edulis*), BGP083 (*P. setacea*), PGBP-05 (*P. cincinnata*), and PGBP-02 (*P. cincinnata*). The hybrids evaluated showed intermediate severity and viral titer in relation to their parents, even when the parent remained asymptomatic. These results reinforce that resistance to CABMV is a quantitative (polygenic) inheritance and gene action for virus symptoms of the additive type, and highlight the difficulty of obtaining immune plants in crosses, although this event may appear in larger populations, but at a low frequency.

Keywords: Passion fruit, Potyvirus, RNA virus, polygenic resistance, genetic improvement.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá amarelo ou azedo (*Passiflora edulis* Sims.) no mundo (Rodrigues *et al.,* 2023; Mesquita *et al.,* 2022; Bernacci*,* 2008). No ano de 2023, a produção nacional alcançou 711.278 toneladas, tendo a Bahia como principal produtor, com 13,1 t/ha (IBGE, 2024). Entretanto, o sistema produtivo enfrenta desafios fitossanitários, destacando-se a elevada incidência da virose do endurecimento dos frutos causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Rodrigues *et al*., 2015; Spadotti *et al*., 2019; Santos *et al*., 2024). Plantas de maracujá-amarelo (*P. edulis*) infectadas com CABMV apresenta folhas com sintomas de mosaico leve ou severos (bolhosidade e deformações foliares), frutos pequenos, deformados e com endurecimento do pericarpo. Na planta, observa-se redução de tamanho, diminuição da produtividade dos frutos e longevidade das plantas em campo (Nascimento *et al*., 2006; Santos *et al*., 2015; Carvalho *et al*., 2021; Preisigke *et al*., 2020).

As medidas de controle do CABMV em campo envolvem remoção de plantas sintomáticas, erradicação de restos culturais, cultivo em ciclos anuais e a produção de mudas em ambientes protegidos (Colariccio *et al*., 2020; Petry *et al*., 2018; Santos *et al*., 2015), mas, essas medidas apenas retardam a doença sem erradicá-las completamente devido a presença de vetores e de plantas hospedeiras (Spadotii *et al*., 2019). A estratégia mais eficaz é o desenvolvimento de cultivares resistentes, mas até o momento não há cultivares comerciais do maracujá-amarelo (*P. edulis*) que apresente essa característica (Freitas *et al*., 2016; Carvalho *et al*., 2021; Jesus *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021; Mendes *et al*., 2024).

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes, é indispensável a exploração da variabilidade genética presente em bancos de germoplasma para identificar espécies resistentes ao CABMV (Maciel *et al*., 2009; Oliveira *et al*., 2013; Gonçalves *et al*., 2018, 2021; Sacoman *et al*., 2018; Santos *et al*., 2021). Estudos sobre a gama de hospedeiros identificaram diferentes espécies com resistência ao CABMV, dentre as quais destacaram-se a *Passiflora suberosa*, *P. malacophylla*, *P. cincinnata*, *P. setacea*, *P. gibertii* e *P. pohlii* (Maciel *et al*., 2009; Oliveira *et al*., 2013; Carvalho *et al*., 2019; Gonçalves *et al*., 2018, 2021). A identificação de fontes de resistência nessas espécies, possibilita cruzamentos interespecíficos com intuito de introgressão de alelos de resistência em espécies comerciais, como o *P. edulis* (Freitas *et al*., 2015; Jesus *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021, 2024).

O programa de melhoramento genético do maracujazeiro (PMGM) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, obteve híbridos entre *P. edulis* e *P. cincinnata* tolerantes ao vírus (Jesus *et al*., 2016). Para recuperar características desejáveis de *P. edulis*, foi gerado populações segregantes por retrocruzamento [(*P. edulis* x *P. cincinnata*) x *P. edulis*], identificando indivíduos com resistência e produtivos (Jesus *et al.*, 2021; Santos *et al*., 2021, 2024). Com base na seleção de genótipos imunes ou com baixa severidade ao CABMV (Gonçalves *et al*., 2018) foram gerados híbridos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura com foco na introgressão de resistência das espécies identificadas no maracujazeiro comercial (*P. edulis*).

A identificação de genótipos tolerantes ao CABMV, geralmente é realizada por meio de escalas diagramáticas de notas, que apesar da sua importância, pode ser subjetiva (Cerqueira-Silva *et al*., 2012), levando a seleção de genótipos com baixa severidade, mas com alto título viral. Desta forma, a validação das avaliações com a quantificação do título viral é fundamental nas seleções de genótipos resistentes (Ranabhat *et al*., 2022; Gonçalves *et al*., 2021a). Para essa finalidade, o uso de técnicas moleculares como a RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é essencial devido a sua alta precisão e capacidade em detectar e quantificar partículas virais mesmo em baixos níveis (Rubio *et al*., 2020; Kanapiya *et al*., 2024). No patossistema *Passiflora* vs. CABMV a RT-qPCR já foi validada em em ensaios de identificação de genótipos resistentes ao CABMV nos bancos de germoplamas (Gonçalves *et al*., 2021a; Gonçalves *et al*., 2025). Este estudo objetivou identificar genótipos resistente ao CABMV, por meio da avaliação de acessos e progênies de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. em condições de avaliação em casa de vegetação.

2. METODOLOGIA

2.1. Local e material vegetal

A pesquisa foi realizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12°40’39” S, 39°06’23” O, 226 m de altitude). O experimento foi conduzido em casa de vegetação com condições controladas de temperatura (28 ± 2 ºC) e umidade relativa (UR) de 75 ± 5% ao longo do ensaio.

Foram avaliados 71 genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG-Maracujá), pertencentes a 24 espécies de *Passiflora* spp., sendo 22 de *Passiflora edulis* Sims., oito *de P. alata* Curtis., 14 de *P. cincinnata* Mast., três de *P. setacea* DC., dois *de P. foetida* L., dois de *P. kermesina* Link *&* Otto., um de *P. Junqueirae* Imig *&* Cervi., um de *P. amethystina* J.C. Mikan., três de *Passiflora* sp., um de *P. actinia* Hook., um de *P. caerulea* L., um de *P. Junqueirae* Imig *&* Cervi., um de *P. coccinea* Aubl., um de *P. edmundoi* Sacco., um de *P. galbana* Mast., um de *P. misera* Kunth., um de *P. morifolia* Mast., um de *P. nitida* Kunth., um de *P. porophylla* Vell., um *de P. riparia* Mast., um de *P. rubra* L., um de *P. mucronata* Lam.., um de *P. tenuifila* Killip. e um de *P. watsoniana* Mast. (Tabela 1).

Também foram avaliadas três populações de híbridos interespecíficos de primeira geração (F1), sendo as progênies OTH-168 [*P. mucronata* (BGP114) x *P. edulis* (BGP418)], OTH-177 [(*P. gibertii* (BGP414) x *P. edulis* (BGP424)] e OTH-176 [(*P. setacea* (BRS pérola do Cerrado) x *P. edulis* (H09-122)] obtidas por meio de polinização controlada. As espécies utilizadas como parentais foram selecionadas com base no perfil de resistência ao CABMV (Gonçalves *et al*., 2018) (Tabela 1).

As sementes de cada acesso (n = 30) e dos híbridos interespecíficos (n = 100) foram imersas em solução de regulador de crescimento GA_4+_7 com N-(fenilmetil)-aminopurina (400 $mg.L^{-1}$) por 24 horas, conforme proposto por Moura *et al*. (2018). Após esse tempo, as sementes foram transferidas para caixas acrílicas transparentes (Gerbox) contendo três folhas de papel germitest umidificados com água destilada (previamente esterilizadas em estufa a 105 ºC por 24 horas) e acondicionadas em câmara de germinação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) com temperatura alternada de 20 ºC durante 16 horas e 30 ºC por 8 horas no escuro (Brasil, 2009; Santos *et al*., 2024).

Após a germinação, sementes com emissão da radícula de ≥ 2,0 mm (Santos *et al*., 2024) foram semeadas em bandejas de polipropileno (com 162 células), contendo uma mistura de fibra de coco e substrato para plantio de mudas (Vivatto®) na proporção de 3:1, acrescido de 50 g de fertilizante de liberação lenta (Osmocote®) para cada 10 L de substrato. Após 40 dias da semeadura (DAS), plantas com uniformidade de 5-6 folhas desenvolvidas e tamanho médio de 13 cm foram transplantadas para tubetes de polietileno (12,0 x 1,4 cm com capacidade de

280 cm^3) contendo a mesma mistura de substrato descrito anteriormente (Gonçalves *et al*., 2021a).

Tabela 1. Lista dos genótipos e híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. utilizados no presente estudo.

Código*	Espécie	Código*	Espécie
BGP011	*P. edulis*	#PGBP-07	*P. cincinnata*
BGP012	*P. edulis*	#PGBP-08	*P. cincinnata*
BGP026	*P. edulis*	#PGBP-03	*P. cincinnata*
BGP124	*P. edulis*	#PGBP-05	*P. cincinnata*
BGP337	*P. edulis*	#PGBP-02	*P. cincinnata*
BGP399	*P. edulis*	#PGBP-06	*P. cincinnata*
BGP485	*P. edulis*	BGP060	*P. setacea*
BGP378	*P. edulis*	BGP081	*P. setacea*
BGP102	*P. edulis*	BGP083	*P. setacea*
#PGBP-09	*P. edulis*	BGP489	*P. foetida*
#PGBP-10	*P. edulis*	BGP090	*P. foetida*
BGP115	*P. edulis*	BGP452	*P. kermesina*
BGP110	*P. edulis*	BGP502	*P. kermesina*
BGP132	*P. edulis*	BGP101	*P. junqueira*
BGP113	*P. edulis*	BGP505	*P. amethystina*
BGP035	*P. edulis*	BGP496	*Passiflora* sp.
BGP130	*P. edulis*	BGP086	*Passiflora* sp.
BGP119	*P. edulis*	BGP087	*Passiflora* sp.
BGP106	*P. edulis*	BGP466	*P. actinea*
BGP127	*P. edulis*	BGP484	*P. caerulea*
BGP118	*P. edulis*	BGP501	*P. cervi*
H09-167	*Hibrido intraespecífico*	BGP408	*P. coccinea*
BGP015	*P. alata*	BGP046	*P. edmundoi*
BGP024	*P. alata*	BGP109	*P. galbana*
BGP027	*P. alata*	BGP460	*P. misera*
BGP050	*P. alata*	BGP318	*P. morifolia*
BGP108	*P. alata*	BGP488	*P. nitida*
BGP099	*P. alata*	BGP497	*P. porophylla*
BGP100	*P. alata*	BGP103	*P. riparia*
BGP220	*P. alata*	BGP125	*P. rubra*
BGP274	*P. cincinnata*	BGP478	*P. mucronata*
BGP276	*P. cincinnata*	BGP105	*P. tenuifila*
BGP471	*P. cincinnata*	BGP463	*P. watsoniana*
#PGBP-04	*P. cincinnata*	OTH-168	Híbrido interespecífico
BGP097	*P. cincinnata*	OTH-176	Híbrido interespecífico
BGP088	*P. cincinnata*	OTH-177	Híbrido interespecífico
BGP095	*P. cincinnata*		
#PGBP-01	*P. cincinnata*		

*Código de registro dos acessos no Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Embrapa Mandioca e Fruticultura. #PGBP = *Passiflora Genetic Breeding Program* (Programa de Melhoramento Genético de *Passiflora*).

2.2. Inoculações artificiais e avaliação dos sintomas da doença nas plantas

As inoculações nas plantas foram realizadas 65 dias após emergência das plântulas. Para as inoculações foram coletados tecidos foliares com sintomas severos da virose (nota 4) de plantas matrizes de *P. edulis* Sims mantida em casa de vegetação como fonte constante de inóculo do CABMV. O isolado de CABMV utilizado nas inoculações foi previamente caracterizado por meio de testes biológicos e de sequenciamento em estudos anteriores do grupo de pesquisa (Mesquita *et al*., 2022; Gonçalves *et al*., 2025), confirmando que o vírus isolado neste estudo se trata da espécie de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Inicialmente, as inoculações foram realizadas nas plantas utilizadas como controles negativos, utilizando apenas tampão de inoculação e Celite®; afim de evitar contaminações nas plantas (Figura 1A). Em seguida, com suporte de um almofariz, preparou-se um extrato foliar a partir da maceração de 1,0 g de folhas da planta matriz com sintomas severos da doença em 10 mL de solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfito de sódio 0,1 M, pH 7,0) (Figura 1B). Esse extrato obtido, corresponde a concentração de 100% do inóculo de CABMV, conforme definido a partir dos resultados do Capítulo 1. Foram adicionados aos extratos obtidos 0,2 g de Celite® (Sigma Aldrich® - 600 mesh) como agente abrasivo para causar microferimentos na superfície foliar visando a penetração completa das partículas virais (Leão *et al*., 2006; Gonçalves *et al*., 2018).

As partículas virais foram inoculadas no primeiro par de folhas basais de cada planta, realizando uma fricção na parte adaxial das folhas com o dedo umedecido no extrato uma única vez, a fim de padronizar a pressão de inóculo (Gonçalves *et al*., 2021a; Figura 1B). Esse procedimento, tanto nas plantas controles quantos nas plantas-testes, foi repetido quatro dias após a primeira inoculação (Dapi) no segundo par de folhas das plantas, para evitar escapes de inoculação (Gonçalves *et al*., 2018, 2021a). Após 10 minutos das inoculações, as folhas inoculadas foram lavadas com água corrente para remover o excesso do extrato e abrasivo.

As avaliações dos sintomas ocasionados pela infecção do CABMV foram realizadas de forma visual com base na variação dos sintomas foliares da virose (Figura 1C). A primeira avaliação foi realizada aos 12 dias após a inoculação (DAI),

sendo que as demais ocorreram semanalmente até completar 40 DAI (Gonçalves *et al*., 2021a). As avaliações foram realizadas a partir da primeira folha apical expandida (com ou sem sintomas), totalizando dez folhas apicais avaliadas por planta. A variação dos sintomas foi realizado a partir de uma escala de notas que varia de 1 a 4, sendo: 1 = ausência de sintomas, 2 = mosaico leve, 3 = mosaico grave e bolhosidade, e 4 = mosaico grave, bolhas e distorção foliar, conforme descrito por Novaes e Rezende (2003), e observado na Figura 1C. A prevalência da doença foi calculada considerando o percentual (%) de plantas com sintomas típicos da virose.

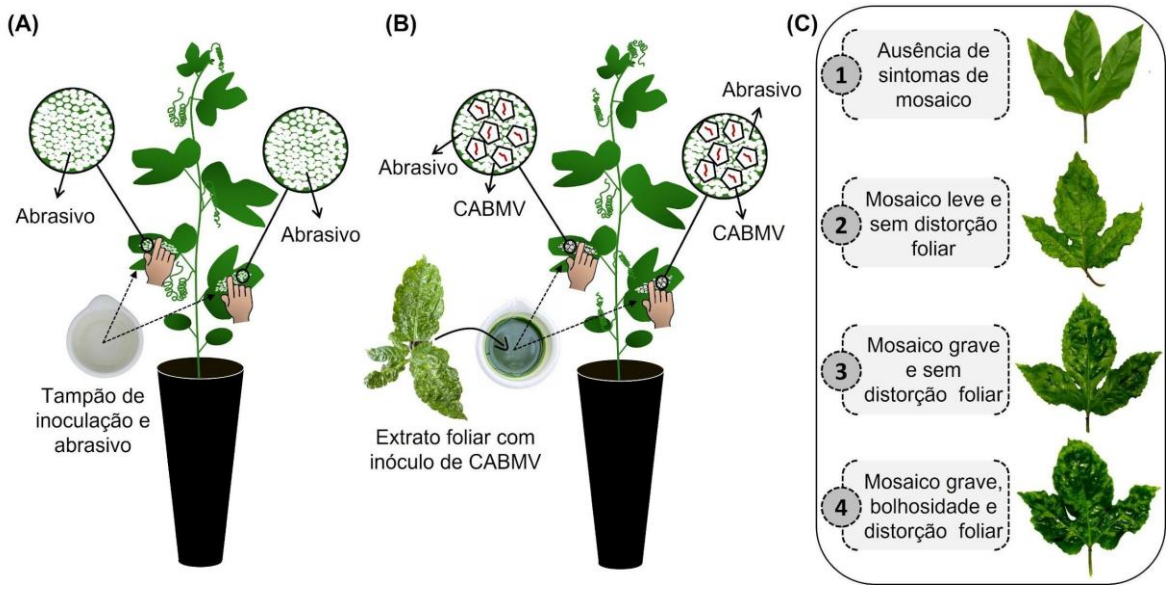


Figura 1. Esquema representativo das inoculações mecânica do CABMV e escala de notas para avaliação dos sintomas da virose nos genótipos de *Passiflora* spp. A) Inoculação mecânica nas plantas utilizadas como controles (apenas tampão de inoculação e abrasivo); B) Inoculação nas plantas com extrato foliar contendo o inóculo de cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV); C) Escalas de notas utilizada para avaliação visual dos sintomas da virose do endurecimento dos frutos em folhas de *Passiflora edulis* Sims.

2.4. Avaliação da severidade da doença

A severidade da virose foi quantificada com aplicação do Índice de doenças das plantas (ID) proposto por Mckinney (1923). O ID foi calculado com base na ponderação da escala de notas aplicando-se a seguinte fórmula: ID = Σ (GS x L) / (TNL x HGS) x 100 (quando fornecido em valores percentuais), em que, *GS* = grau da escala determinada para cada folha; *L* = número de folhas com cada grau de

infecção (notas); *TNL* = número total de folhas avaliadas; e *HGS* = grau máximo da infecção (nota 4).

2.5. Detecção e quantificação do título de CABMV por RT-qPCR

2.5.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

As coletas dos tecidos foliares foram realizadas aos 40 DAI; período final de avaliação dos sintomas. Foram coletados tecidos foliares apicais em *pool* (n = 5 folhas), sendo que no caso dos acessos, priorizou-se a coleta apenas das plantas assintomáticas para a infecção viral dentro dos acessos avaliados. Para as populações dos híbridos OTH-168 e OTH-177, as coletas foram realizadas em *pool* (n=10) priorizando as plantas com ou sem sintomas da doença. As progênies do hibrido OTH-176 foram coletadas de acordo com as classes de resistência das progênies, obtido pelo ID% aos 40 DAI. Em todos os casos, também foram coletados tecidos foliares apicais (n = 5) das plantas do grupo controle (sem inoculação viral). Após as coletas, as amostras foram armazenadas em ultra-freezer -80 ºC.

Os tecidos foliares (aproximadamente 500 mg) foram macerados na presença de nitrogênio líquido (N_2), e as moléculas de RNA total foram obtidas seguindo o protocolo de extração do Trizol™ Reagent (Invitrogen®). As moléculas de RNA obtidas foram ressuspendidas com 50 µL de água livre de nucleases (Ambion®), em seguida, armazenadas em ultra-freezer -80 ºC. A integridade do RNA total (3,0 µL) foi avaliada em por meio da eletroforese (40 minutos a 60 V) em gel de agarose 1% (TAE 1X, pH 8,0), no qual foi observado a qualidade do RNAs ribossomais 28S e 18S.

As amostras de RNA total (15 µL) foram tratadas com 1,0 µL da enzima *Dnase* (TURBO DNA-*free*™, 2 $U.\mu L^{-1}$) seguindo o protocolo da Ambion® (1,0 µL de água DNAse *free*; 1,0 µL de RNAse *out* e 2,0 µL de buffer 10X Turbo DNAse), em seguida, foram incubadas no termociclador a 37°C por 25 minutos. A inativação da enzima ocorreu com adição de 2,0 µL de *DNAse Inactivation Reagente* (2 $U.\mu L^{-1}$), de acordo com o fabricante (Invitrogen®). Alíquotas de 1,0 µL do RNA tratado foi quantificado em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop™ One (*Thermo Scientific*™), tendo sua concentração ajustada para 100 $ng.\mu L^{-1}$ em um volume final de 20 µL.

A síntese de cDNA foi realizada com 5,0 µL de RNA tratado (100 ng.µL^{-1}), 1,0 µL de 20X Enzyme Mix, 10 µL de tampão (2X RT Buffer) e 4,0 µL de água *nuclease-free* (Ambion®), de acordo com as recomendações de síntese a partir do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*™). As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 60 minutos, e a inativação da enzima M-MLV ocorreu a 95°C durante 5 minutos.

2.5.2 Obtenção da curva padrão no ensaio de RT-qPCR

O par de *primer* usado na RT-qPCR da curva padrão foram desenhados para amplificar parte do gene da capa proteica (CP) do CABMV [qCABMV05_F (TCAAGCCCATCGTGGAGAAT) e qCABMV05_R (CCCTTCAGAATTTCTCAT CTCAATG)] de 100 pb. Esse par de *primer* foi padronizado em trabalhos anteriores para o mesmo patossistema, com valores de eficiência (Eff%) de amplificação acima de 84% (Freitas, 2013; Gonçalves, 2020). A eficiência foi calculada automaticamente pelo *software* 7500 Fast v2.0.6 utilizando o declive da reta obtida na regressão linear determinada pela seguinte fórmula: Eficiência (*E*) = [10$^{(-1/slope\ \text{da curva padrão})}$ – 1] x 100% (Bustin *et al*., 2009).

A partir de uma amostra positiva para o CABMV (*P. edulis* com sintomas aos 40 DAI) numa concentração de 10 ng.µL^{-1} realizou-se reações de PCR convencional para aumentar a concentração do produto gênico do vírus (Gonçalves, 2020; Gonçalves *et al*., 2021a). Os produtos da PCR foram purificados com o Kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™), sendo a quantificação da amostra realizada em espectrofotômetro NanoDrop™ One (*Thermo Scientific*™), obtendo-se uma concentração final de 55 ng.µL^{-1}. Essa amostra padrão foi diluída em fatores de dez vezes (1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 e 1:1,000,000), resultando em concentrações de 5,5 a 0,000055 ng.µL^{-1}, sendo o intervalo da curva padrão com seis pontos de diluição; 10^{-1} a 10^{-6}.

A curva padrão foi obtida pela amplificação do gene CP do CABMV em cada diluição no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*™), no modo de corrida “Standard Curve”. Em seguida, aplicou-se o cálculo de regressão linear entre as variáveis do *Cycle threshold* (Ct) e a concentração do produto gênico (ng.µL^{-1}) para determinar a correlação (R^2) entre os pontos de cada diluição e a inclinação da curva padrão (Bustin *et al*., 2009).

2.5.3. *RT-qPCR*

A detecção do CABMV por qPCR foi realizada nas amostras de plantas assintomáticas dentro dos acessos avaliados, dos parentais resistentes e suscetíveis (com ou sem sintomas) e dos híbridos interespecíficos, bem como das plantas usadas como controles negativo.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas 'MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate' (0,1 mL; *Applied Biosystems*™), contendo 1,0 µL de cDNA (2,5 ng.µL^{-1}), 0,5 µL de cada *primer* (2 pmol), 5,0 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®), 0,2 µL de CXR Reference Dye e 2,8 µL de água livre de nucleases. Para fins de comparação do título viral nas amostras sem sintomas com amostra sintomática, foi usado como controle positivo uma amostra de *P. edulis* inoculada com 100% do inóculo de CABMV (cDNA 200 ng.µL^{-1}).

As amostras usadas como controle negativo (cDNA de plantas não inoculadas com o CABMV) também foram submetidas a qPCR, para confirmar a ausência ou presença da infecção viral nas plantas assintomáticas. Como controles de reação, foram incluídos amostra de cDNA de planta não inoculada (controle negativo) e NTC (*non-template control* - NTC) para garantir que não houve contaminação no preparo das amostras ou amplificações inespecíficas do gene alvo. Em cada placa de reação, seja para quantificação do CABMV em plantas sem sintomas ou para quantificação nos híbridos interespecíficos, foi realizada a curva padrão, conforme item 2.5.2.

As reações para cada amostra foram realizadas em triplicata técnica no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*™), programado para análise de "Quantitation - Standard Curve". O programa de amplificação do gene CP do CABMV foi o padrão do equipamento no modo "Standard", seguindo as seguintes variações de reação: incubação inicial a 50 ºC por 2 minutos, ativação da Taq DNA polimerase a 95 ºC durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 15 seg., anelamento dos *primers* e extensão a 60 ºC por 1 minutos. As amostras também foram submetidas a análise da curva de dissociação a 95 ºC durante 15 seg., 60 ºC por 20 seg. e 95 ºC durante 15 seg., para verificar o ponto de fusão médio dos *amplicons*, bem como a ocorrência de dímeros de *primers* e especificidade para gerar *amplicons* únicos.

Amostras que não apresentaram amplificação em nenhuma das triplicatas técnicas, foram submetidas a novas reações de qPCR com seis réplicas técnicas, visando à confirmação dos resultados. Os produtos finais da qPCR foram avaliados em gel de agarose 2% (80 volts por 1h:30 min.) sob exposição de luz ultravioleta para visualizar a presença ou ausência de *amplicons* do gene CP do CABMV. O tamanho dos *amplicons* foi determinado a partir do marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig™).

2.6. Delineamento experimental e análises dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), considerando cada planta como uma repetição, das quais cinco plantas de cada genótipo foram utilizadas como controle negativo (plantas não inoculadas com vírus), e, em média, outras 15 plantas foram inoculadas com CABMV. Os dados médios do ID% aos 40 DAI foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de *Scott-Knott* ($p \leq 0,05$). A partir do ID médio aos 40 DAI, os genótipos foram classificados como resistente (R: ID = 0,0 - 15,9%), moderadamente resistente (MR: ID = 16,0 - 31,9%), suscetível (S: ID = 32,0 – 50,9%) e altamente suscetível (AS: ID ≥ 51, 0%), conforme estabelecido por Jesus *et al*. (2021). Os valores médios do ID% foi usado para elaborar uma matriz de dissimilaridade pelo índice de Gower utilizando o programa Genes (Cruz, 2013), e a partir da matriz foi gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Tamura *et al*., 2011). Com a severidade média de cada grupo de resistência da análise de *Cluster* foram gerados gráficos *Boxplot* e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A quantificação do título de CABMV nas amostras foi determinado com aplicação da seguinte fórmula: Número de moléculas (cópias.μL^{-1}) = (Concentração da amostra [ng.µL] x 6,022 x 10^{23}) / tamanho do *amplicon* [pb] x 1 x 10^{9} x 660 g/mol) (Wang *et al* ., 2017), sendo os valores do título de CABMV expressos em escala de Log10 ou em notação científica.

3. RESULTADOS

3.1. Identificação de genótipos de *Passifora* spp. resistentes

As estimativas do ID% nos 71 genótipos de *Passiflora* spp. avaliados variaram de 0,0 a 86,9%. Aproximadamente 8% (n = 6) dos genótipos foram classificados como resistente (R), com destaque para BGP060, BGP081 e BGP083 (*P. setacea*), , BGP497 (*P. porophylla*), PGBP-01 (*P. cincinnata*) e BGP460 (*P. misera*), com ID médio de 0,00 a 14,17%, com destaque para os genótipos BGP060, BGP081 e BGP083 (*P. setacea*), e BGP460 (*P. misera*) que se mantiveram assintomáticas ao longo das avaliações (ID = 0,0%) (Figura 2D). Outros 21% (n = 15) foram classificados como moderadamente resistente (MR), 35% (n = 25) como suscetível (S), e 35% (n = 25) foram classificados como altamente suscetível ao CABMV (Figura 2a; Tabela suplementar 1).

Considerando as 24 espécies avaliadas, independente do acesso, três foram classificadas como resistentes (R) ao CABMV, com ID de 0,0% (*P. setacea* e *P. misera*) a 2,59% (*P. porophylla*). Outras sete espécies foram classificadas como moderadamente resistente (MR), com ID de 16,46% a 31,58%, enquanto que dez foram classificadas como suscetíveis (S) com ID de 32,30% a 50,12%. Apenas quatro espécies foram altamente suscetíveis (AS) a virose, destacando-se a *P. edulis* com a maior severidade média (ID = 64,91%) (Figura 2D).

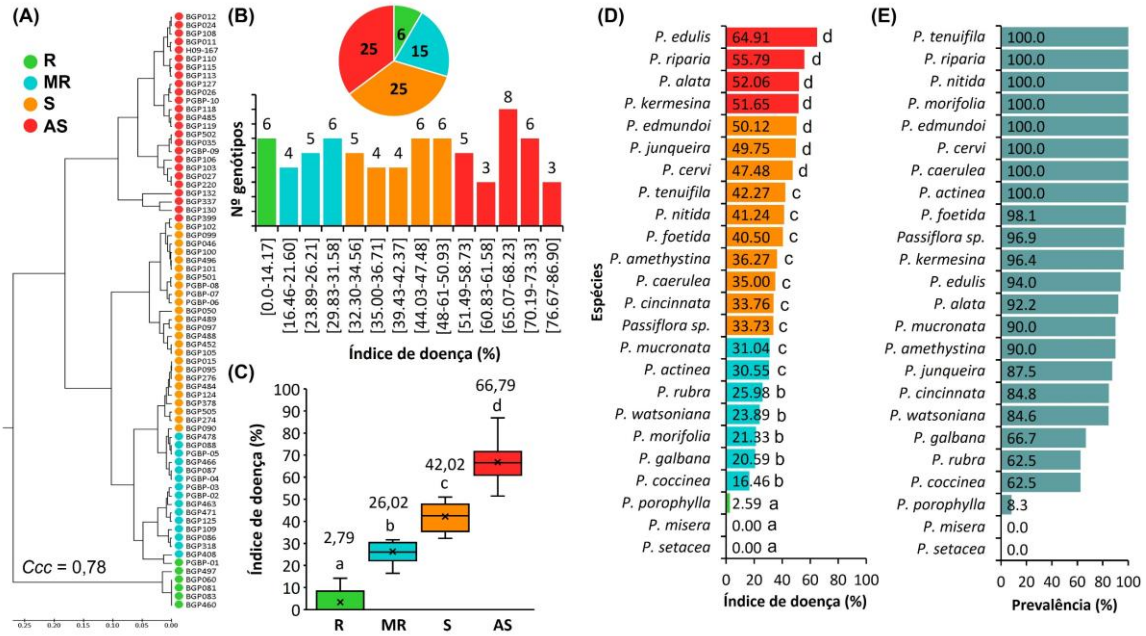


Figura 2. Agrupamento hierárquico e severidade da virose do endurecimento dos frutos causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) nos genótipos e espécies de *Passiflora* avaliadas. A) Agrupamento hierárquico com base no índice de doença (%) e agrupamento por UPGMA dos 71 genótipos de *Passiflora* spp. com base na severidade do vírus do endurecimento dos frutos (CABMV) aos 40 dias após inoculação viral; B) Valores médios da severidade e sua distribuição nas classes Resistente (R), Moderadamente resistente (MR), Suscetível (S) e Altamente Suscetível (AS); C) Distribuição do índice de severidade do CABMV entre as classes R, MR, S e AS; D) Distribuição do índice médio da doença entre as 24 espécies de *Passiflora* avaliadas; E) Prevalência da virose nas espécies de *Passiflora* avaliadas. Ccc = Coeficiente de correlação cofenética. Letras diferentes nas figuras C e D indicam variação pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em relação ao comportamento das progênies advinda dos cruzamentos interespecíficos OTH-168 [*P*. *mucronata* - BGP114 x *P. edulis*- BGP418], OTH-177 [*P. gibertii* - BGP414 x *P. edulis* - BGP424] e OTH-176 [*P. setacea* - BRS pérola do Cerrado x *P. edulis* - H09-122] visando introgressão de alelos de resistência ao CABMV em *P. edulis*, revelou severidade intermediária do híbrido em relação aos seus parentais, mesmo quando o parental se manteve assintomático (Figura 3C, F). Os híbridos avaliados apresentaram progênies com maior tolerância, com ID médio de 20,7 a 25,0%, sendo a frequência para o híbrido OTH-177 de 0,8 %, para o híbrido OTH-168 de 6,5%, e para o híbrido OTH-176 com a frequência de 22,7% de progênies tolerantes (Figura 3A).

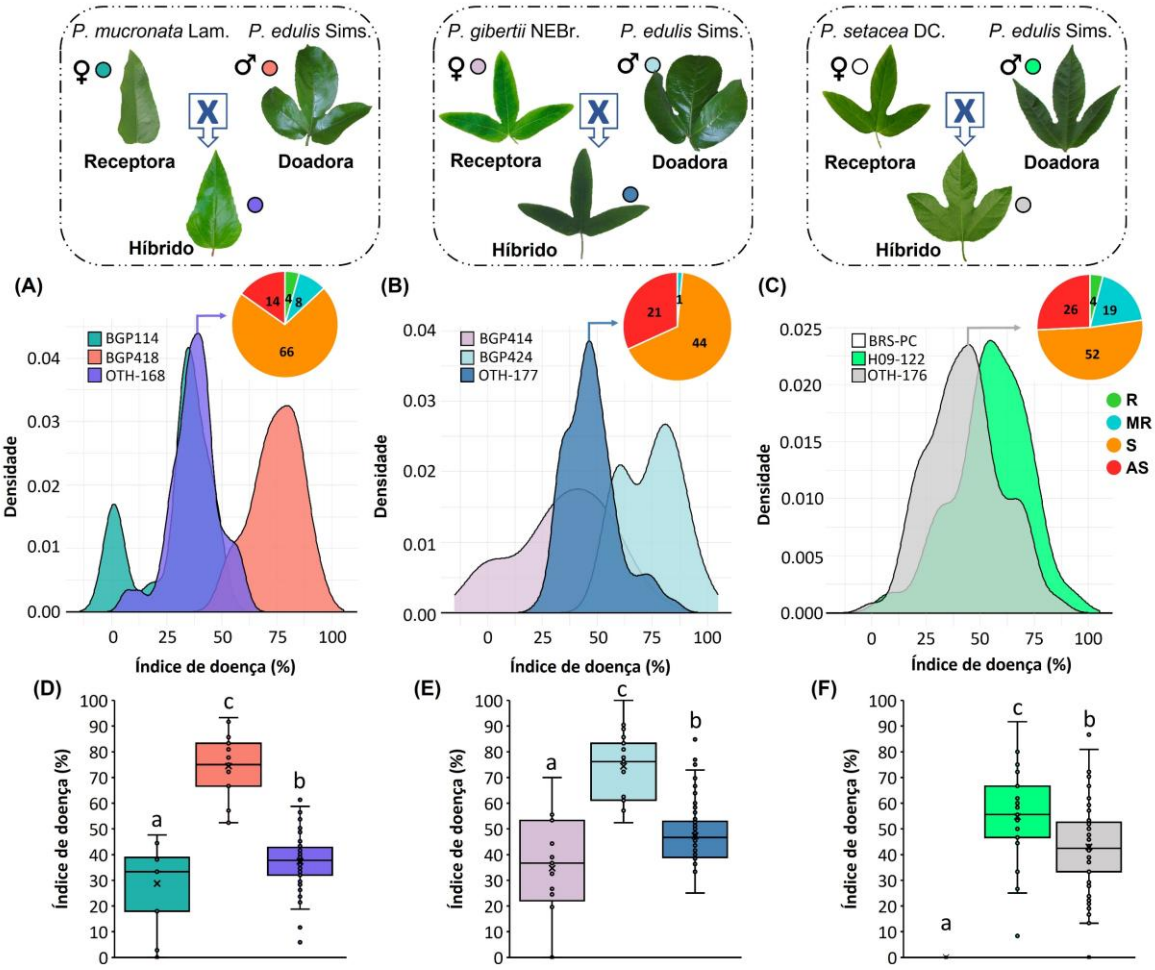


Figura 3. Severidade da virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaico virus (CABMV) em parentais e híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. A) Distribuição do índice de doença por meio da densidade entre as progênies do híbrido interespecífico OTH-168 e os seus parentais (BGP114 e BGP418); B) Distribuição do índice de doença por meio da densidade entre as progênies do híbrido interespecífico OTH-177 e os seus parentais (BGP414 e BGP424); C) Distribuição da do índice de doença por meio da densidade das progênies do híbrido interespecífico OTH-176 e os seus parentais (BRS Pérola do Cerrado e H09-122); D) *Boxplot* com a severidade média da virose no parental resistente (BGP114, caixa em verde), suscetível (BGP418, caixa em laranja) e no híbrido interespecífico (OTH-168, caixa em violeta); E) *Boxplot* com a severidade média da virose no parental resistente (BGP414, caixa rosa claro), suscetível (BGP424, caixa em azul claro) e no híbrido interespecífico (OTH-177, caixa em azul escuro); F) *Boxplot* com a severidade média da virose no parental resistente (BRS-PC, índice doença nulo), suscetível (H09-122, caixa em verde claro) e no híbrido interespecífico (OTH-176, caixa em cinza). Letras nos *boxplots* comparam as médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os gráficos de pizza acima dos gráficos de densidade representam as frequências de progênies dentro de cada classe de resistência ou suscetibilidade. R = resistente; MR = moderadamente resistente; S =

suscetível; AS = altamente suscetível. (♀) = genitor feminino (espécie receptora de polén); (♂) = genitor masculino (espécie doadora de polén).

3.2. Detecção e quantificação do CABMV em plantas assintomáticas e híbridos interespecíficos

Observou-se que mesmo sem a manifestação de sintomas, parte das plantas assintomáticas dentro dos acessos apresentaram título viral de 96,8% menor em relação a plantas com sintomas severos de virose (controle positivo de *P. edulis*). Em outros casos, plantas assintomáticas dentro dos acessos de BGP408 (*P. coccinea*), BGP101 (*P. Junqueira*), BGP505 (*P. amethystina*), BGP035 (*P. edulis*), BGP083 (*P. setacea*), PGBP-05 (*P. cincinnata*) e PGBP-02 (*P. cincinnata*) não foi detectada amplificação do gene CP do CABMV (Figura 4A).

Por outro lado, *P. misera* e *P. setacea* com ID de 0,00% apresentaram título viral de 7,60 x 10^7 e 2,6 x 10^5 cópias μL^{-1}, respectivamente. A especificidade das amplificações foi confirmada em gel de agarose, com *amplicons* únicos do gene alvo com tamanho espero de 100pb, confirmando a infecção viral no conjunto de plantas assintomáticas dentro de cada espécie (Figura 4B).

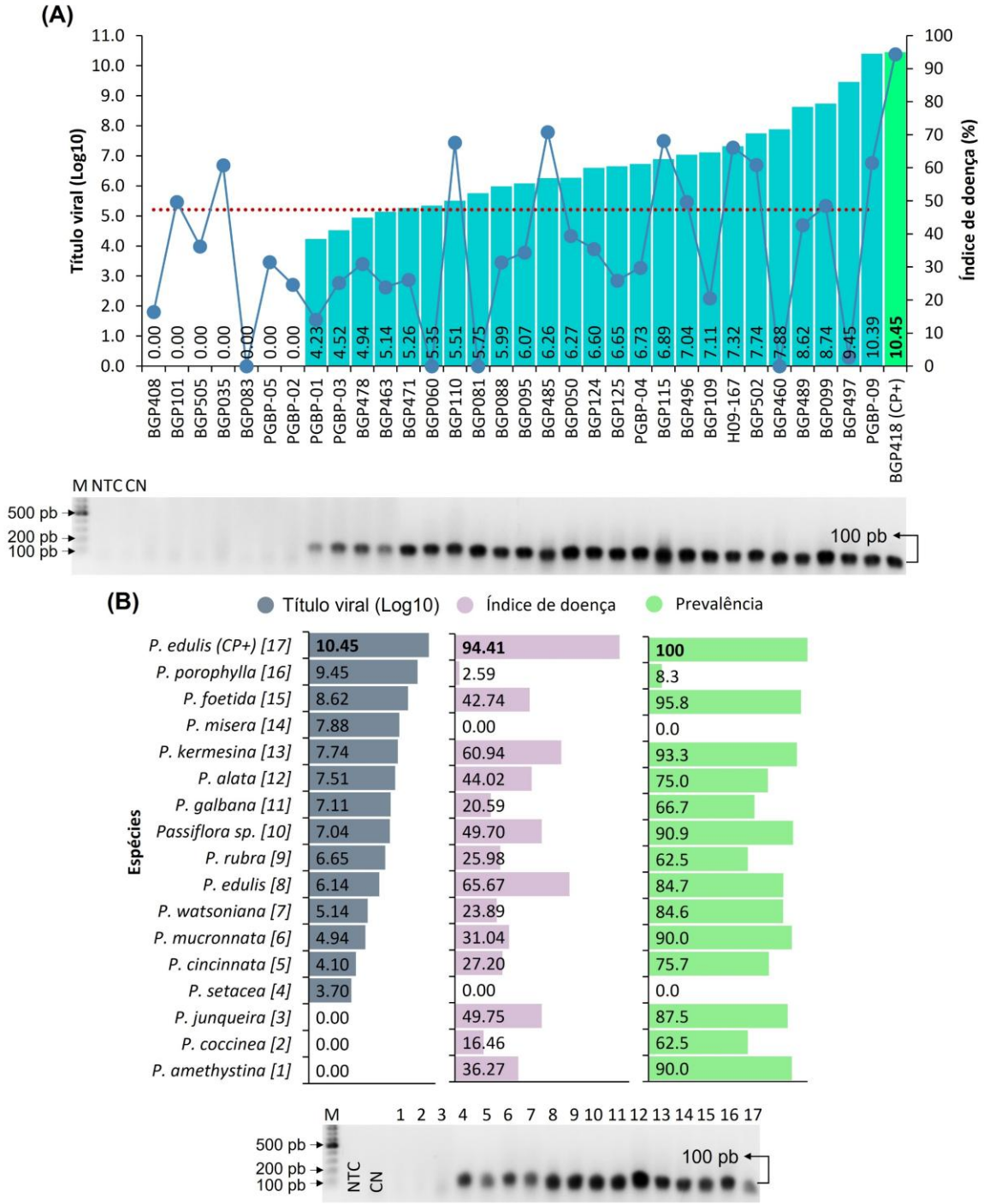


Figura 4. Detecção e quantificação do cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) em plantas assintomáticas de *Passiflora* por meio da RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). A) Valores do título viral (Log10) em plantas sem sintomas dentro dos acessos avaliados; B) Comparação entre espécies de *Passiflora* quanto ao título viral (barras cinzas), índice de doença (barras lilás) e prevalência de plantas infectadas (barras verdes). Os painéis abaixo da figura A e B representa géis de agarose 2% com os produtos de amplificação por meio da qPCR de parte do gene da capa proteica do CABMV de 100 pb em plantas assintomáticas dentro das espécies. M = marcador molecular de DNA *ladder*

de 100 pb; NTC = *non template control* (sem DNA como molde); CN = controle negativo (plantas não inoculadas com o CABMV). Os círculos com preenchimento em azul no gráfico de barras representa o valor médio de severidade da virose dentro do acessso. A linha pontilhada em vermelho acima das barras indica o valor médio do título viral (Log10) nas plantas assintomáticas.

Em relação ao título viral dos parentais e híbridos interespecíficos (Figura 5), foi observado que as progênies do OTH-168 obtiveram título viral de 5,34 x 10^9 cópias.μL^{-1}, sendo 85,37% vezes maior em ralação ao parental tolerante – BGP114 (1,6 x 19^9 cópias.μL^{-1}) e 25,83% vezes menor em relação ao parental suscetível – BGP418 (7,20 x 10^9 cópias.μL^{-1}). Já para o híbrido OTH-177, o título viral final foi de 8,39 x10^9 cópias.μL^{-1}, sendo 62,51% vezes maior em relação ao parental tolerante – BGP414 (6,26 x 10^9 cópias.μL^{-1}) e 66,54% vezes menor em relação ao parental suscetível – BGP424 (2,51 x 10^{10} cópias.μL^{-1}).

As progênies do híbrido OTH-176 apresentaram aumento do título viral de acordo com a classe de resistência das progênies (Figura 5). A progênies tolerantes (R e MR) apresentaram título viral de 99,16% maior (9,9 x 10^8 cópias.μL^{-1}) em relação ao parental resistente – BRS-PC (8,4 x 10^6 cópias.μL^{-1}) e 94,66% menor em relação ao parental suscetível – H09122 (1,9 x 10^{10} cópias.μL^{-1}) (Figura 5C), embora o parental tolerante deste cruzamento foi o que apresentou menor título (8,4 x 10^6 cópias.μL^{-1}) quando comparado aos valores médios (CS e SS) do BGP114, com 7,82 x 10^8 cópias.μL^{-1} e BGP414, com 3,13 x 10^9 cópias.μL^{-1} (Figura 5A-C).

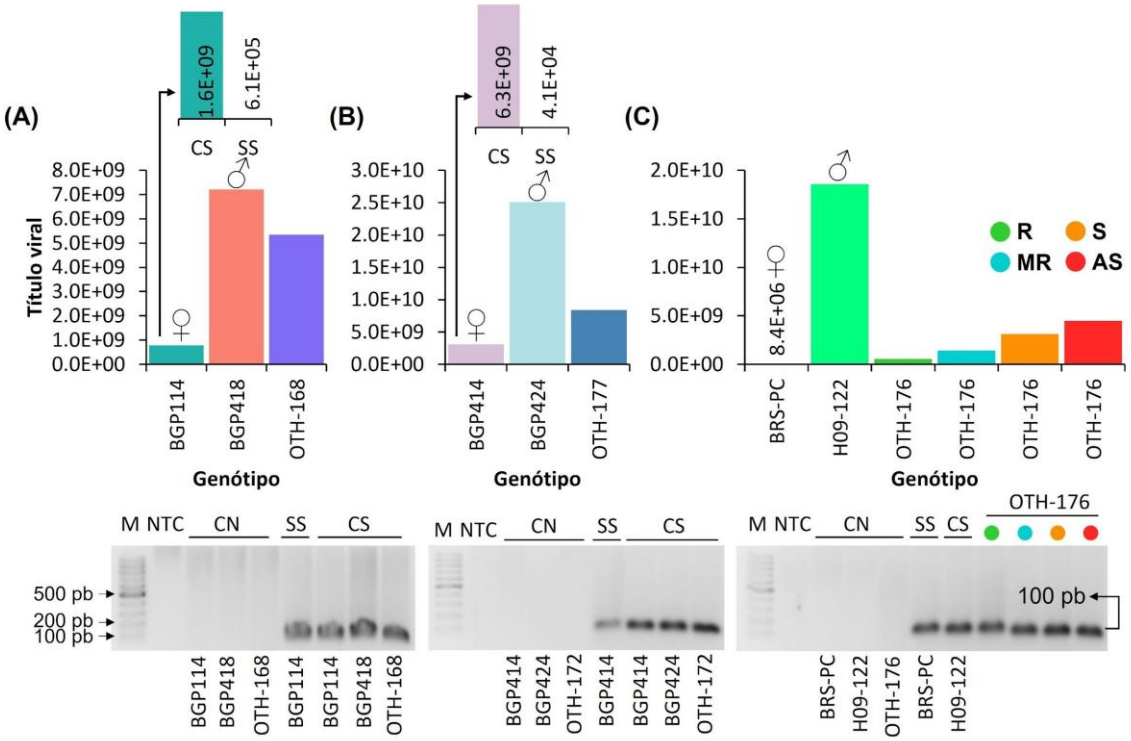


Figura 5. Título viral (cópias μL^{-1}) em genótipos parentais e progênies de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. aos 40 dias após inoculação com o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). A) Comparação do título viral entre os genótipos BGP114 (parental resistente), BGP418 (parental suscetível) e o híbrido interespecífico OTH-168; B) Comparação do título viral entre os genótipos BGP414 (parental resistente), BGP424 (parental suscetível) e o híbrido interespecífico OTH-177;C) Comparação do título viral entre os genótipos BRS-PC (BRS Pérola do Cerrado; parental resistente), H09-122 (parental suscetível) e em progênies do híbrido OTH-176, classificadas em diferentes grupos de resistência: resistente (R), moderadamente resistente (MR), suscetível (S) e altamente suscetível (AS). Os gráficos de barras nas figuraa A e B representam o valor de título viral de plantas sintomáticas e assintomáticas dos parentais resistentes (BGP114 e BGP414). Os géis de eletroforese (agarose 2%) abaixo de cada painel representa os produtos de amplificação da qPCR de parte do gene da capa proteica do CABMV de 100 pb. M = marcador molecular de DNA *ladder* de 100pb; NTC = *non template control* (sem DNA molde); CN = controle negativo (plantas não inoculadas com o CABMV); SS = plantas sem sintomas; CS = plantas com sintomas. (♀) = parental utilizado como genitor feminino; (♂) = parental utilizado com genitor masculino.

4. Discussão

A resposta dos genótipos à infecção ao CABMV demonstrou diferenças no grau de severidade com base no índice de doença aos 40 DAI, com ID que variou de 0,0% a 86,9%, evidenciando a variabilidade entre e dentro das espécies do gênero *Passiflora* quanto a resistência e suscetibilidade à doença do endurecimento dos frutos. A variabilidade na severidade de sintomas também foi observada nos estudos de Maciel *et al*. (2009), Oliveira *et al*. (2013), Sacoman *et al*. (2018) e Gonçalves *et al.* (2017, 2018 e 2021).

Diante do impacto do CABMV na cultura do maracujá, a falta de controle efetivo e cultivares resistentes, o uso da variabilidade genética presente em bancos de germoplasma se torna indispensável na seleção de genótipos resistentes (Gonçalves *et al*., 2018, Sacoman *et al*., 2018; Santos *et al*., 2021). Após a triagem de genótipos de *Passiflora* spp., foram identificados acessos resistentes ao CABMV pertencentes a espécies silvestres *P. setacea*, *P. porophylla*, *P. cincinnata* e *P. misera*, com ausência de sintomas ou sintomas leves da doença. Gonçalves *et al*. (2019, 2021) e Oliveira *et al*. (2013) também identificaram acessos de *P. setacea* e *P. cincinnata* como resistentes, enquanto para *P. porophylla* este estudo é o primeiro relato de resistência presente na literatura.

As espécies classificadas como modernamente resistentes são todas silvestres tais como, *P. coccinea*, *P. galbana*, *P. morifolia*, *P. watsoniana*, *P. rubra, P. actinea* e *P. mucronata* (Figura 2D). A tolerância das espécies silvestres pode estar associada à presença de genes de resistência e as atividades dinâmicas dos microRNAs (miRNAs) (Felippes *et al*., 2012; Malavika *et al*., 2023).

Embora plantas de maracujazeiro possam não exibir sintomas típicos de virose ou apresentar sintomas leves, não estão ausentes da infecção viral (Gonçalves *et al*., 2021, 2025). De fato, pelas reações de RT-qPCR, observou-se que, embora as plantas tenham permanecido assintomáticas, parte delas apresentava confirmação para infecção do CABMV, enquanto em outras não foi detectada amplificação do alvo (Figura 4A). Plantas assintomáticas de *P. pohlii*, *P. suberosa* e *P. bahiensis* mesmo após duas inoculações com CABMV não manifestaram sintomas da doença, indicando que tais espécies possivelmente são imunes ao vírus (Gonçalves *et al*., 2021a). O acúmulo elevado de vírus e viróides em plantas sem a manifestação de sintomas, é comum devido a interações moleculares entre o hospedeiro e o vírus (Flores *et al*., 2016; Ranabhat *et al*., 2022).

Em espécies resistentes, o vírus pode ser acumulativo até determinado nível, se mantendo estável, sem comprometer de forma significativa o crescimento e produção de frutos, sem sintomas da doença ou sintomas leves (Doumayrou *et al*., 2013; Gonçalves *et al*., 2021a).

Os acessos silvestres assintomáticos ou com baixa severidade da doença, são recursos valiosos para programas de melhoramento genético para obtenção de cruzamentos (Gonçalves *et al*., 2021a). No entanto, para obtenção de cruzamentos interespecíficos bem-sucedidos, é fundamental que haja compatibilidade entre as espécies, o que geralmente requer homologia cromossômica (Pereira *et al*., 2005; Soares *et al*., 2020), a exemplo temos espécies resistentes ao CABMV, *P. suberosa* (Gonçalves *et al*., 2021a) *P. miseria* e *P. porophylla* (identificadas como resistente neste estudo), ambas pertencem ao subgênero Decaloba, com número cromossômico 2*n* = 12; 24 e 36, respectivamente (Soares *et al*., 2018; Souza *et al* ., 2008) sendo, portanto, incompatíveis com *P. edulis*, que pertence ao subgênero *Passiflora* (2*n*=18) (Soares *et al*., 2018).

Por outro lado, espécies como *P. cincinnata* e *P. setacea* pertencem ao mesmo subgênero da espécie comercial (Soares *et al*.,2018), o que favorece a compatibilidade genética, e introgressão de genes de resistência ao CABMV como já demostrado em *Passiflora* (Jesus *et al*., 2016, 2020; Santos *et al*., 2015; Santos *et al*., 2021). O cruzamento interespecífico entre genótipos contrastantes resultou em progênies segregantes que apresentaram ampla variabilidade na resposta ao CABMV, com a ocorrência de plantas (progênies) tolerantes e suscetíveis nos três híbridos avaliados. Os híbridos OTH-176, OTH-168 e OTH-177 exibiram respectivamente 22,7%; 6,5% e 0,8%, de plantas tolerantes ao CABMV (Figura 3).

A baixa porcentagem de progênies tolerantes, pode estar relacionado ao baixo número de plantas avaliadas (Freitas *et al*., 2015). As três populações dos cruzamentos apresentaram valores de título viral intermediário entre os parentais tolerantes e suscetíveis, com menor título viral em progênies tolerantes (Figura 5), demostrando a ocorrência da ação dos mecanismos de resistência associado a introgressão de alelos pelos parentais silvestres (Santos *et al*., 2015; Carvalho *et al*., 2019).

Vale ressaltar que a espécie de *P. setacea*, parental resistente das progênies do híbrido OTH-176, apresenta resistência ao vírus em diversos estudos, não manifestando sintomas típicos da doença (Gonçalves *et al*., 2017; 2018;

Gonçalves *et al*., 2021ª; Oliveira *et al*., 2013; Sacoman *et al*., 2018). Além disso, diferentes estudos utilizaram as espécies (*P. setacea* x *P. edulis*) para obtenção de híbridos e retrocruzamentos com diferentes níveis de resistência ao CABMV (Freitas *et al*., 2015; Santos *et al*., 2015, 2019; Preisigke *et al*., 2020, 2021; Carvalho *et al*., 2021; Gonçalves *et al*., 2021b).

Os mecanismos de defesa da espécie ao CABMV, podem estar associados a proteínas ligadas à regulação do proteassoma e as proteínas de choque térmico (HSPs), identificadas por Carvalho *et al*. (2019) em *P. setacea* e híbridos interespecíficos (*P. setacea* x *P. edulis)*. Através do retrocruzamento entre o híbrido interespecífico H5-14 (*P. setacea* x *P. edulis*) x *P. edulis*, Santos *et al*. (2019) obteve populações segregantes e identificou sete QTL de pequeno efeito associados à resistência ao CABMV.

Esses estudos reforçam que a resistência ao CABMV é uma herança quantitativa (poligênica) e ação gênica para sintomas da virose do tipo aditiva (Jesus *et al*., 2021; Santos *et al*., 2021, 2024) corroborando com os resultados das três populações segregantes avaliadas. Esses resultados reforçam que há dificuldade de obter plantas imunes nos cruzamentos, embora este evento possa aparecer em populações maiores, porém em baixa frequência. Assim, há a necessidade também de utilizar acessos de *P. edulis* que tenha certo nível de tolerância a virose para aumentar a frequência de alelos de resistência nas progênies selecionadas.

O programa de melhoramento do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, utilizou a espécie *P. cincinnata* para introgressão de genes de resistência através de cruzamentos e retrocruzamentos com *P. edulis*, com seleção plantas resistentes ao CABMV e com boa produtividade (Jesus *et al*., 2016, 2021; Gonçalves *et al*., 2018; Santos *et al*., 2021; Santos *et al*., 2024). Nesse estudo novos híbridos foram avaliados, sendo observada resposta intermediária entre os parentais, e com ampla variação de respostas ao CABMV. Esta variação confirma a herança poligênica da resistência ao vírus, controlado por vários genes, desta forma, sendo necessário avaliar um número grande de indivíduos, visto que a seleção é baseada em desempenho individual das progênies (Freitas *et al*., 2015).

Resultados obtidos neste estudo evidenciam a ampla variabilidade na resposta das espécies de *Passiflora* à infecção pelo CABMV do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora*. Essa variabilidade permite a seleção de genótipos

para cruzamentos interespecíficos e introgressão de genes de resistência. Além disso, evidencia que por meio de cruzamentos é possível selecionar plantas resistentes, que poderão ser utilizadas em futuros retrocruzamentos com espécie comercial, para obtenção de progênies estáveis, e com características de interesse agronômico.

5. Conclusões

- Os genótipos BGP060, BGP497, BGP081, BGP083, BGP-460 e PGBP-01, pertencente às *Passiflora setacea*, *P. porophylla*, *P. misera* e *P. cincinnata*, apresentaram resistência ao CABMV com potencial para uso no melhoramento genético.

- A título viral das plantas assintomáticas foi menor ou indetectável em ralação a planta sintomática de espécie suscetível *Passiflora edulis*, indicando atuação dos mecanismos de defesa ao CABMV.

- Os híbridos interespecíficos foram promissores quanto a seleção de matérias tolerantes. A título viral das progênies foi menor em ralação aos parentais suscetíveis.

- Nos híbridos interespecíficos há uma tendência de aumento em função do grau de severidade, esse comportamento sugere a ação dos mecanismos de defesa provenientes dos parentais resistentes.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras, 2009. Analise Sementes. https://l1nk.dev/jTjO3/. acessado em 27 de agosto de 2025

CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SILVA, F. A.; SANTOS, P. H. D.; EIRAS, M.; SANTOS, E. A. How segregating populations of passion fruit react to CABMV infection? **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 855–866, 2021.

CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, P. H. D.; GENEROSO, A. L.; CORRÊA, C. C.; SILVEIRA, V.; EIRAS, M.; SANTOS, E. A. Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with cowpea aphid-borne mosaic virus reveals distinct responses to pathogenesis. **Euphytica**, v. 215, p. 167, 2019.

COLARICCIO, A.; RODRIGUES, L. K.; RAMOS, A. F.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; HARAKAVA, R.; PERUCH, L. A. M. Caracterização do Cowpea aphid-borne mosaic virus em *Passiflora* edulis cv. Catarina no litoral sul de Santa Catarina, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, 2020.

CRUZ C.D., Genes: um pacote de software para análise em estatística experimental e genética quantitativa. **Acta Scientiarum. Agronomy**,2013.

DAI, J.; PENG, H.; CHEN, W.; CHENG, J.; WU, Y. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. **Journal of Applied Microbiology,** v. 114, n. 2, p. 502–508, 2013.

DOUMAYROU, J.; LEBLAYE, S.; FROISSART, R.; MICHALAKIS, Y. Reduction of leaf area and symptom severity as proxies of disease-induced plant mortality: the example of the Cauliflower mosaic virus infecting two Brassicaceae hosts. **Virus Research**, [S.l.], v. 176, n. 1-2, p. 91–100, 2013.

FELIPPES, F. F. de; WANG, J.-W.; WEIGEL, D. MIGS: miRNA-induced gene silencing. **The Plant Journal**, v. 70, n. 3, p. 541–547, 2012.

FREITAS, M.S. Patossistema Cowpea aphid-borne mosaic vírus CABMV) /maracujazeiro: titulação 'real time' do patógeno, sistema de classificação de reação genética diferencial de genótipos do hospedeiro e indução de resistência genética. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Jequié – BA, 2013.

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

FERREIRA, E. B.; OLIVEIRA, M. S. *Introdução à Estatística com R*. Universidade Federal de Alfenas, 2020.

GONÇALVES, D. H.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; PREISIGKE, S. C.; VIDAL, R. F.; CAVALCANTE, N. R. Prospecting on *Passiflora* backcross families: implications for breeding aiming at CABMV resistance**. Euphytica**, v. 217, p. 63, 2021b.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. Leaf anatomical aspects of CABMV infection in *Passiflora* spp. by light and fluorescence microscopy**. Australasian Plant Pathology**, v. 50, p. 203–215, 2021a.

GONÇALVES, Z. S.; JESUS, O. N.; CERQUEIRA-SILVA, C. B.; DINIZ, R. P.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J. Methodological approaches to assess passion fruit (*Passiflora* spp.) resistance to passionfruit woodiness disease. **Bioscience Journal**, vol. 33, no. 6, pp. 1441–1451, 2017.

GONÇALVES, Z. S.; JESUS, O. N. de; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CORREA, R. X. Systemic infection of cowpea aphid-borne mosaic virus in *Passiflora* spp. occurs at the initial stage regardless of the species' resistance. **Archives of Virology,** v. 170, n. 2, p. 43, 29,2025.

JESUS, O. N.; SANTOS, I. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J. Field assessment of a second generation backcross (BC1 × *Passiflora* edulis) of passion fruit for agronomic performance and resistance to CABMV. **Plant Breeding**, v. 140, n. 1, p. 150–166, 2021.

LEÃO, R. M. K.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RESENDE, R. de O.; MATTOS, J. K. de A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic virus - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 87–92, 2006.

MACIEL, S. da C.; NAKANO, D. H.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C. Selection of *Passiflora* species inoculated with cowpea mosaic virus reveals the immunity of a wild species. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 414–418, 2009

MALAVIKA, M.; PRAKASH, V.; CHAKRABORTY, S. Recovery from virus infection: plant's armory in action. **Planta**, v. 257, p. 103, 2023.

MCKINNEY H.H., Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Sciences Research**, 1923.

MOVAHEDI, A., AGHAEI-DARGIRI, S., BARATI, B., KADKHODAEI, S., WEI, H., SANGARI, S., YANG, L., XU, D. Plant Immunity Is Regulated by Biological, Genetic, and Epigenetic Factors, **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2790-2823, 2022.

MESQUITA, P. R. R.; BARBOSA, N. C. S.; DOS SANTOS, F. N.; RODRIGUES, F. M.; ABREU, E. F. M.; LEITE, K. R. B. Metabolomic and histological response of *Passiflora* cincinnata infected with cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) reveals changes in asymptomatic and symptomatic phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 12, p. 1456–1468, 2022.

MOURA, R. dos S.; COELHO FILHO, M. A.; GHEYI, H.; JUNGHANS, T. G. Overcoming dormancy in stored and recently harvested *Passiflora* cincinnata Mast. seeds. **Bioscience Journal,** Uberlândia, v. 34, n. 5, p. 1247–1255, 2018.

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.

NOVAES Q. S., REZENDE J. A. M., Selected mild strains of Passion fruit woodiness virus (PWV) fail to protect preimmunized vines in Brazil. **Scientia Agricola,** v. 60, n. 4, p. 699–708, 2003.

OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de

resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 485–492, 2013.

PETRY, H. B.; MARCHESI, D. R.; MARTINELLO BACK, M.; DELLA BRUNA, E.; SCHÄFER, G.; MOLINA MELETTI, L. M. Produção de mudas de maracujazeiro-azedo em ambiente protegido: dimensionamento e manejo do ambiente de produção. **Agropecuária Catarinense**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 37–39, 2019

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

PREISIGKE, S. da C.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SANTOS, P. R. dos; SANTOS, V. O. dos; AMBRÓSIO, M.; SILVA, F. A. da; WALTER, BARROS, F. H. de. Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. ***Bragantia***, Campinas, v. 79, n. 1, p. 47–61, jan./mar. 2020.

RODRIGUES, C. A.; VIEIRA, H. D.; DE SOUZA, R.; MENDES, D. S.; VIANA, A. P. Genetic gain in *Passiflora* seed traits from recurrent selection among full-sib families. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 23, n. 1, 2023.

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

SANTOS, E. A.; VIANA, A. P.; DE BARROS WALTER, F. H.; OLIVEIRA FREITAS, J. C.; RAMOS, H. C. C.; BOECHAT, M. S. B. First report of a genetic map and evidence of QTL for resistance to CABMV in a segregating population of *Passiflora*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 903–915, nov. 2019.

SANTOS, I. S. dos; LIMA, L. K. S.; SAMPAIO, S. R.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N. de. Phenological precocity and resistance to CABMV in passion fruit progenies of the third generation backcross [(*P. edulis* × *P. cincinnata*) × *P. edulis*]. **Euphytica**, v. 217, n. 6, p. 112, 2021.

SANTOS-JIMÉNEZ, J. L.; MONTEBIANCO, C. B.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. G.; BARRETO-BERGTER, E.; VASLIN, M. F. S. A fungal glycoprotein mitigates passion fruit woodiness disease caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in *Passiflora* edulis. **BioControl**, v. 67, p. 75–87, 2022.

SANTOS, I. S. dos; LIMA, L. K. S.; SAMPAIO, S. R.; SOARES, T. L.; JESUS, O. N. Genetic parameters and prediction of genotypic values in a segregating population of *Passiflora* BC3 [(P. edulis × P. cincinnata) × P. edulis] for fruit quality and resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus using REML/BLUP. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 328, 113023, 2024.

SOARES, W. S., BRUCKNER, C. H.B., OTONI, W. C. OLIVEIRA, S. P. DE, SANTOS, CARLOS E. M.; KOEHLER, A. D., Compatibility in pollen-pistil interaction of interspecifi c crossings with Passifl ora spp., **Agrarian Sciences**, 2020.

SOARES, T. L., JESUS, O. N., SOUZA, E. H., ROSSI, M. L., OLIVEIRA, E. J., Comparative pollen morphological analysis in the subgenera *Passiflora* and Decaloba, **Agrarian Sciences**, 2018.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (*Passiflora*ceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 2008.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S., MEGA 5: análise genética evolutiva molecular usando métodos de máxima verossimilhança, distância evolutiva e máxima parcimônia. **Molecular Biology and Evolution,** v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

WANG, J., ZHANG, Y., WANG, J., LIU, L., PANG, X., & YUAN, W. Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection of porcine circovirus 3. **Journal of Virological Methods**, v. 248, p. 177–180, 2017.

WU, W.; MA, F.; ZHANG, X.; TAN, Y.; HAN, T.; DING, J.; WU, J.; XING, W.; WU, B.; HUANG, D.; ZHANG, S.; XU, Y.; SONG, S. Research progress on viruses of *Passiflora* edulis. **Biology**, v. 13, n. 10, p. 839, 2024.

Tabela suplementar 1. Incidência, severidade mínima, máxima e média da virose e classificação da resistência dos 72 genótipos de *Passiflora* spp. inoculados com o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV).

Genótipo	Espécie	Prev. (%)	ID (%) - 40 DAI			Classe
			Mín.	Máx.	Med.	
BGP060	*P. setacea*	0.0	0.0	0.0	0.00	R
BGP081	*P. setacea*	0.0	0.0	0.0	0.00	R
BGP083	*P. setacea*	0.0	0.0	0.0	0.00	R
BGP460	*P. misera*	0.0	0.0	0.0	0.0	R
BGP497	*P. porophylla*	8.3	0.0	31.1	2.59	R
PGBP-01	*P. cincinnata*	27.8	0.0	76.7	14.17	R
BGP408	*P. coccinea*	62.5	0.0	50.0	16.46	MR
BGP109	*P. galbana*	66.7	0.0	50.0	20.59	MR
BGP318	*P. morifolia*	100.0	10.0	33.3	21.33	MR
BGP086	*Passiflora* sp.	100.0	13.3	28.9	21.60	MR
BGP463	*P. watsoniana*	84.6	0.0	38.9	23.89	MR
PGBP-02	*P. cincinnata*	81.0	0.0	66.7	24.67	MR
PGBP-03	*P. cincinnata*	92.6	0.0	70.4	25.28	MR
BGP125	*P. rubra*	62.5	0.0	66.7	25.98	MR
BGP471	*P. cincinnata*	91.7	0.0	53.3	26.21	MR
BGP309	*P. cincinnata*	62.5	0.0	69.2	29.83	MR
BGP087	*Passiflora* sp.	100.0	22.2	38.9	29.90	MR
BGP466	*P. actinea*	100.0	23.3	36.7	30.55	MR
BGP478	*P. mucronata*	90.0	0.0	40.0	31.04	MR
BGP088	*P. cincinnata*	66.7	0.0	61.9	31.45	MR
PGBP-05	*P. cincinnata*	94.4	0.0	55.6	31.58	MR
BGP090	*P. foetida*	100.0	28.6	38.1	32.30	S
BGP378	*P. edulis*	100.0	25.0	41.7	33.33	S
BGP015	*P. alata*	100.0	30.0	40.0	34.44	S
BGP095	*P. cincinnata*	58.3	0.0	100.0	34.44	S
BGP276	*P. cincinnata*	100.0	28.6	58.3	36.71	S
BGP484	*P. caerulea*	100.0	33.3	36.7	35.00	S
BGP124	*P. edulis*	58.3	0.0	83.3	35.53	S
BGP505	*P. amethystina*	90.0	0.0	46.7	36.27	S
BGP274	*P. cincinnata*	100.0	28.6	58.3	36.71	S
BGP050	*P. alata*	56.3	0.0	88.9	39.43	S
BGP488	*P. nitida*	100.0	13.3	61.1	41.24	S
BGP105	*P. tenuifila*	100.0	33.3	58.3	42.27	S
BGP452	*P. kermesina*	100.0	11.1	74.5	42.37	S
BGP097	*P. cincinnata*	100.0	15.2	73.8	44.03	S
BGP489	*P. foetida*	95.8	0.0	71.4	44.60	S
PGBP-06	*P. cincinnata*	100.0	20.0	66.7	45.88	S

Genótipo	Espécie	Prev. (%)	ID (%) - 40 DAI			Classe
			Mín.	Máx.	Med.	
PGBP-07	*P. cincinnata*	100.0	33.3	66.7	46.48	S
PGBP-08	*P. cincinnata*	100.0	16.7	66.7	47.30	S
BGP501	*P. cervi*	100.0	16.7	62.5	47.48	S
BGP099	*P. alata*	93.8	0.0	80.0	48.61	S
BGP100	*P. alata*	100.0	33.3	66.7	49.51	S
BGP496	*Passiflora* sp.	90.9	0.0	83.3	49.70	S
BGP101	*P. junqueira*	87.5	0.0	100.0	49.75	S
BGP046	*P. edmundoi*	100.0	27.8	83.3	50.12	S
BGP102	*P. edulis*	100.0	44.4	58.3	50.93	S
BGP399	*P. edulis*	100.0	37.5	61.1	51.49	AS
BGP103	*P. riparia*	100.0	33.3	80.0	55.79	AS
BGP220	*P. alata*	100.0	33.3	83.3	56.89	AS
BGP027	*P. alata*	100.0	33.3	73.3	56.94	AS
BGP106	*P. edulis*	100.0	33.3	75.0	58.73	AS
BGP035	*P. edulis*	90.5	0.0	90.5	60.83	AS
BGP502	*P. kermesina*	93.3	0.0	82.2	60.94	AS
PGBP-09	*P. edulis*	84.6	0.0	100.0	61.58	AS
BGP024	*P. alata*	100.0	33.3	88.9	65.07	AS
BGP012	*P. edulis*	100.0	33.3	91.7	65.17	AS
BGP108	*P. alata*	100.0	33.3	93.3	65.62	AS
H09-167	*P. edulis*	80.8	0.0	100.0	66.21	AS
BGP011	*P. edulis*	100.0	33.3	94.4	66.53	AS
BGP110	*P. edulis*	93.3	0.0	94.4	67.73	AS
BGP113	*P. edulis*	100.0	46.7	83.3	67.98	AS
BGP115	*P. edulis*	89.3	0.0	100.0	68.23	AS
BGP118	*P. edulis*	100.0	16.7	94.4	70.19	AS
BGP119	*P. edulis*	100.0	53.3	87.5	70.71	AS
BGP485	*P. edulis*	87.5	0.0	100.0	70.85	AS
BGP026	*P. edulis*	100.0	46.7	86.7	72.36	AS
BGP127	*P. edulis*	100.0	66.7	77.8	72.78	AS
PGBP-10	*P. edulis*	100.0	61.1	91.7	73.33	AS
BGP130	*P. edulis*	100.0	58.3	93.3	76.67	AS
BGP337	*P. edulis*	100.0	41.7	91.7	80.13	AS
BGP132	*P. edulis*	100.0	73.3	95.2	86.90	AS

Prev. (%) = Prevalência da virose; ID (%) – 40 DAI = Índice de doença aos 40 dias após inoculação; Min. = Índice de doença mínimo; Máx. = Índice de doença máximo; Méd. = Índice de doença médio; R = resistente; MR = Moderadamente resistente; S = suscetível; AS = Altamente suscetível.