

ANA VERÔNICA SILVA DO NASCIMENTO

**ESTUDO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE POTYVÍRUS CAUSADORES DE
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO MARACUJAZEIRO E ANÁLISE DA
RESISTÊNCIA À DOENÇA EM LINHAGENS TRANSGÊNICAS R1 DE
MARACUJÁ-AMARELO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

ANA VERÔNICA SILVA DO NASCIMENTO

**ESTUDO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE POTYVÍRUS CAUSADORES DE
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DO MARACUJAZEIRO E ANÁLISE DA
RESISTÊNCIA À DOENÇA EM LINHAGENS TRANSGÊNICAS R1 DE
MARACUJÁ-AMARELO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2006.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)

Prof. Gilvan Pio Ribeiro

Dr^a Poliane Ferreira Alfenas

Prof^a Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Ivanildo e Maria das Neves.

Ao meu esposo Romildo Nicolau.

A toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre os meus caminhos;

Ao meu esposo Romildo Nicolau, pelo amor e compreensão em todos os momentos;

A toda minha família por está sempre presente me transmitindo força para poder vencer os obstáculos da vida;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Ao professor Murilo Zerbini, pela orientação, amizade e conhecimentos transmitidos;

Aos professores Gilvan Pio Ribeiro, Wagner Campos Otoni e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pelas sugestões e atenção;

À Poliane Alfenas, pela ajuda prestada durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao professor Murilo Carvalho, pela amizade e dedicação, principalmente nas horas difíceis;

Ao professor Egberto Araújo, por ter me iniciado na pesquisa e pela amizade;

Aos amigos do laboratório e do departamento de Fitopatologia, pelo companheirismo, amizade, compreensão e motivação durante todo o Curso;

À todas as Atanas pelos bons momentos que passamos juntas;

As amigas Gloria (Glorita), Lidiane, Sônia, Leonarda pela maravilhosa convivência;

Aos funcionários da UFV, Fizinho e Joaquim, pela ajuda prestada durante a execução deste trabalho; e a todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Verônica Silva do Nascimento é natural de Itabaiana, PB, nascida a 09 de abril de 1977, filha de Ivanildo do Nascimento e Maria das Neves Silva do Nascimento. Concluiu o segundo grau no Colégio Técnico Comercial Dom Bôsko em 1994, em seu município natal.

Em 1995 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em agosto de 1999.

Em março de 2000 ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e desenvolveu parte do seu trabalho de tese do mestrado na Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 2002 ingressou no curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em agosto de 2006.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura	5
A família <i>Potyviridae</i>	5
O endurecimento dos frutos do maracujazeiro	9
Resistência derivada do patógeno	11
Literatura Citada.....	16
Capítulo 1. <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil, and causes passionfruit woodiness disease.....	24
Summary.....	26
Introduction	27
Material and Methods.....	28
Results	29
Discussion.....	32
Acknowledgements	35
References	35
Capítulo 2. Amplo espectro de resistência ao <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) em maracujá-amarelo transgênico expressando um RNA não-traduzível correspondente às regiões codificadoras da replicase viral e da proteína capsidial	44
Resumo	45

Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	51
Discussão.....	60
Literatura Citada.....	62
Conclusões gerais.....	64

RESUMO

NASCIMENTO, Ana Verônica Silva do, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Estudo de isolados brasileiros de potyvírus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e análise da resistência à doença em linhagens transgênicas R₁ de maracujá-amarelo.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Murilo Geraldo de Carvalho e Wagner Campos Otoni.

O endurecimento dos frutos é a doença mais importante da cultura do maracujazeiro. Essa doença pode ser causada pelos potyvírus *Passionfruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e East Asian Passiflora Virus (EAPV). Plantas infectadas apresentam mosaico e frutos com endurecimento do pericarpo. No Brasil, a doença está presente nos principais estados produtores, e o agente causal sempre foi identificado como PWV com base em características biológicas e sorológicas. Estratégias de controle baseadas no controle do inseto vetor com inseticida, em proteção cruzada e em resistência natural tem se mostrado ineficientes. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar em nível molecular isolados brasileiros de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro e avaliar a resistência ao vírus em plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressando um fragmento do genoma de um isolado brasileiro de potyvírus causador do endurecimento dos frutos. Amostras foliares de plantas de maracujá-amarelo com sintomas típicos de endurecimento dos frutos foram coletadas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Sergipe. A presença do vírus foi comprovada por meio de teste sorológico e gama de hospedeiros. Os isolados virais foram capazes de infectar plantas de feijoeiro e de feijão caupi, porém apresentando reações diferenciais quanto à intensidade dos sintomas induzidos nesses hospedeiros. ELISA indireto demonstrou que os isolados obtidos a partir de plantas de maracujá são

serologicamente relacionados entre si e com o potyvírus CABMV. As seqüências de aminoácidos da proteína capsial (CP) foram determinadas para todos os isolados. A comparação dessas seqüências com as de outros potyvírus indicou identidade de 85 a 94% com isolados de CABMV. A identidade com o isolado K de PWV foi de 54 a 70%. Análise filogenética realizada a partir das seqüências de aminoácidos da CP, agrupou os isolados em estudo junto aos isolados de CABMV e distante de isolados de PWV. Em conjunto, os resultados indicam que os isolados de maracujá analisados constituem na verdade uma estirpe do CABMV. Na busca de uma estratégia eficiente de controle do endurecimento dos frutos, foram produzidas plantas transgênicas de maracujá-amarelo expressando um RNA não-traduzível correspondente aos genes *nib* e *cp* de um isolado do CABMV de Minas Gerais (MG-Avr). Uma planta transgênica R₀ (TE5-10) mostrou-se resistente ao isolado MG-Avr por meio de silenciamento gênico pós-transcricional, sendo porém suscetível a um isolado de Pernambuco (PE-Bnt). Para estudar o efeito da dosagem gênica no espectro da resistência foram realizados cruzamentos entre a planta resistente TE5-10, uma planta R₀ suscetível (T2-5) e uma planta não-transformada. Além disso, foram realizadas autofecundações da planta TE5-10 com o objetivo de obter plantas com o transgene em homozigose. As plantas obtidas a partir desses cruzamentos foram inoculadas com três isolados do vírus (MG-Avr, PE-Bnt e SE-Nps). Uma planta R₁ (TE5-10-15J) obtida a partir da autofecundação de planta R₀ TE5-10 mostrou-se resistente aos três isolados. Essa planta foi desafiada com outros quatros isolados de CABMV (BA-Itb, PB-Alh, ES-Vni e PA-Iga), mostrando-se resistentes a todos eles. A análise do acúmulo de mRNA transgênico por meio de hibridização indicam que o mecanismo de silenciamento gênico é responsável pelo fenótipo de resistência na planta TE5-10-15J.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Ana Verônica Silva do, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august 2006. **Study of Brazilian potyvirus isolates causing passionfruit woodiness and analysis of resistance to the disease in R₁ transgenic lines of passionflower.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Murilo Geraldo de Carvalho and Wagner Campos Otoni.

Passionfruit woodiness is the most important disease of passion flower. The disease can be caused by the potyviruses *Passionfruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and East Asian Passiflora virus (EAPV). Infected plants display mosaic and woodiness of the fruit. In Brazil, the disease occurs in all states where passion flower is grown, and the causal agent has always been identified as PWV based on biological and serological properties. Management strategies based on vector control with insecticides, cross-protection and natural resistance are inefficient. The objectives of this work were to characterize at the molecular level a number of Brazilian isolates of potyvirus causing passionfruit woodiness and to evaluate the resistance of transgenic yellow passion flower (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) plants expressing a genomic fragment from a woodiness-inducing potyvirus isolate from Brazil. Foliar samples of yellow passion flower showing typical symptoms of the disease were collected collected in the states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco and Sergipe. The presence of the virus was confirmed by serology and host range. The viral isolates were capable of infecting plants of common bean and cowpea, although differing in the intensity of symptoms induced in these hosts. Serological relationship between the potyvirus isolates from passion flower *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) was demonstrated by indirect ELISA. The sequence of the capsid protein coding region was determined for all isolates. Sequence comparisons with other potyviruses indicated a level of identify from 85 to 94% with CABMV isolates. Identity

with PWV isolate K ranged from 54 to 70%. Phylogenetic analysis based on the deduced capsid protein amino acid sequences clustered the Brazilian isolates together with CABMV isolates, distant from PWV isolates. Together, these results indicated that the potyvirus isolates from passion flower represent a strain of CABMV. In an attempt to effectively control passionfruit woodiness, transgenic yellow passionfruit plants (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) were generated which express an untranslatable RNA corresponding to the replicase and capsid protein coding regions of a CABMV isolate from Minas Gerais (MG-Avr). One R₀ plant (TE5-10) was resistant to the MG-Avr isolate due to RNA silencing. However, this plant was susceptible to a second isolate of the virus (PE-Bnt). In order to verify the effect of gene dosage in the spectrum of resistance, several crosses were carried out between the TE5-10 plant, a susceptible R₀ plant (T2-5) and a non-transformed plant. Also, self-pollination of the TE5-10 plant was carried out in order to generate transgene-homozygous R₁ plants. The plants obtained from these crosses were challenged with three CABMV isolates (MG-Avr, PE-Bnt and SE-Nps). One R₁ plant obtained from self-pollination (named TE5-10-15J) was resistant to the three isolates. This plant was challenged with an additional four CABMV isolates (PB-Alh, BA-Itb, ES-Vni and PA-Iga), being resistant to all of them based on symptom development. Northern analysis demonstrated the lack of transgenic mRNA accumulation in these plants, indicating that resistance is due to RNA silencing.

INTRODUÇÃO GERAL

O maracujazeiro pertence à ordem Passiflorales, tribo Passiflorae e família Passifloraceae, que contém 18 gêneros e 630 espécies (Bruckner *et al.*, 2002). Apesar da grande variedade de espécies dentro do gênero *Passiflora*, poucas são cultivadas em função de suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais. O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes da passiflorina, um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (Souza & Meletti, 1997). O maracujazeiro encontra-se distribuído pelos trópicos, com seu principal centro de diversidade genética localizado no centro-oeste brasileiro (Souza & Meletti, 1997). A América do Sul é o centro de origem de 95% das espécies de maracujazeiro (Lima & Cunha, 2004).

Entre as espécies de *Passiflorae* mais difundidas e cultivadas comercialmente estão *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), *P. edulis* f. *edulis* Sims (maracujá roxo), *P. alata* Dryand (maracujá doce), *P. ligularis* Juss. e *P. quadrangularis* L. (Bruckner, 1997; Silva & São José, 1994; Souza & Meletti, 1997). O maracujá-roxo é largamente cultivado em diversos países do mundo. O maracujá-amarelo é o mais cultivado no Brasil, ocupando cerca de 95% dos pomares comerciais (Meletti & Maia, 1999).

A propagação do maracujazeiro pode ser realizada por sementes ou vegetativamente, por meio de enxertia e estaquia. A semeadura tem preferência em relação aos métodos vegetativos devido à facilidade do processo e ao menor tempo de formação de mudas (Ferreira, 2000).

Os maiores produtores mundiais de maracujá são Brasil, Colômbia, Peru e Equador. Os três últimos são os maiores exportadores de suco concentrado e polpa de maracujá. Os países africanos (Quênia, Zimbábue e África do Sul) são grandes produtores de frutos de cor roxa, enquanto os países sul-americanos (Brasil, Colômbia, Peru e Equador) são produtores

de frutos de cor amarela (Lima, 2002). A cultura encontra-se em plena expansão no Brasil; o crescimento médio da área plantada situa-se ao redor de 5% ao ano. O cultivo do maracujazeiro está difundido em quase todo o país, destacando-se como principais estados produtores Pará, Bahia, São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Ceará e Minas Gerais (Aguiar & Santos, 2001). Estes estados são responsáveis por cerca de 97% da produção nacional de maracujá.

O maracujazeiro é hoje a décima quinta espécie frutífera mais cultivada no Brasil (FNP Consultoria & Comércio, 2005). Com a expansão da área cultivada, um dos fatores que se mostrou frequentemente limitante para o desenvolvimento da cultura foi a doença denominada endurecimento dos frutos.

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a virose mais importante da cultura em todo mundo. Foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1901 por Allen, citado por Cobb (1901) e Noble (1928). Até pouco tempo acreditava-se que era causado somente pelo *Passionfruit woodiness virus* (PWV), porém o seqüenciamento do gene da proteína capsidial demonstrou que a estirpe da África do Sul do PWV constituía na verdade outra espécie do gênero *Potyvirus*, originalmente denominada *South African passiflora virus* (SAPV) (McKern *et al.*, 1994). Análises posteriores determinaram que o SAPV consistia na verdade em uma estirpe do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Sithole-Niang *et al.*, 1996). Recentemente, uma outra espécie de potyvírus designada East Asian Passiflora virus (EAPV) foi identificada no Japão causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro (Iwai *et al.*, 2006), indicando que pelos menos três espécies de potyvírus podem causar a doença.

No Brasil, isolados virais causando endurecimento dos frutos em maracujazeiro têm sido identificados com base em características biológicas e sorológicas, e em todos os casos o PWV tem sido relatado como agente causal (Costa, 1996; Inoue *et al.*, 1995). Entretanto, a análise molecular da proteína capsidial de alguns isolados demonstrou que o CABMV também está associado à doença (Braz, 1999; Nascimento *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 1999).

As três espécies virais relatadas como causadoras do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV, CABMV e EAPV) pertencem ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*, possuindo partículas alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 715×13 nm e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico possui uma única fase de leitura aberta (*open reading frame*, ORF) cuja tradução gera uma proteína que sofre autoproteólise, gerando de 8 a 10 produtos finais (Berger *et al.*, 2005). A transmissão natural dos potyvírus se dá por meio de afídeos, com uma relação vírus-vetor do tipo não-circulativa (Berger *et al.*, 2005). O PWV e CABMV são facilmente transmitidos via extrato foliar tamponado e por

enxertia (Chagas *et al.*, 1981; Costa *et al.*, 1995; McKern *et al.*, 1994). Até o momento não se têm relatos de transmissão desses vírus por sementes em espécies de *Passiflora*. Além do maracujazeiro, esses vírus são capazes de infectar naturalmente espécies de leguminosas, e artificialmente alguns membros das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae e Cucurbitaceae (Teakle & Widermuth, 1967; Taylor & Greber, 1973).

Maracujazeiros infectados apresentam sintomas generalizados de mosaico, com intensidade variável, por vezes acompanhado de bolhosidade, rugosidade e deformação do limbo foliar. As plantas afetadas podem apresentar ainda um crescimento fortemente reduzido. Os frutos podem ficar deformados e menores do que os produzidos por plantas sadias e o pericarpo fica com uma espessura irregular e consistência endurecida, com grande redução na cavidade da polpa (Kitajima *et al.*, 1986; Pio-Ribeiro & Mariano, 1997).

No Brasil, o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro tem sido insatisfatório, principalmente devido à natureza não-circulativa da transmissão do vírus pelos afídeos, o que torna ineficiente o controle químico do inseto vetor como método de controle da doença (Costa, 1996). A proteção cruzada poderia ser um método viável para o controle dessa virose, entretanto, tentativas de proteção cruzada com seis isolados brasileiros atenuados do vírus não foram promissoras, pois não foi observada a resistência contra a reinfecção por isolados fortes (Novaes & Rezende, 2003). Uma alternativa interessante para o controle do endurecimento dos frutos é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, variedades resistentes a esta doença não estão disponíveis. Existem poucas fontes de resistência, e essas se encontram em espécies não-comerciais de *Passiflora*, o que acarreta em tempo demasiado longo para o desenvolvimento de variedades resistentes com características agrônomicas adequadas (Costa, 1996).

Uma alternativa atraente para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro seria a obtenção de plantas transgênicas de maracujá expressando porções do genoma viral, a chamada resistência derivada do patógeno. A obtenção de plantas de maracujazeiro contendo parte do genoma do vírus que causa o endurecimento dos frutos foi relatada por Alfenas *et al.* (2005) e por Trevisan *et al.* (2006). Esses autores demonstraram que o uso de plantas transgênicas R₀ pode ser um método eficiente para o controle dessa virose. Entretanto, Alfenas *et al.* (2005) relataram que as plantas transgênicas R₀ (hemizigotas) eram resistentes apenas ao isolado utilizado para a transformação, sendo suscetíveis aos demais isolados testados.

O presente trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar molecularmente vários isolados de potyvírus causadores do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, coletados em diferentes estados produtores no Brasil, a fim de determinar seu posicionamento taxonômico e

verificar qual a espécie de potyvirus é causadora da doença no Brasil e (ii) analisar a herança e espectro da resistência ao endurecimento dos frutos em plantas transgênicas derivadas das plantas R₀ obtidas por Alfenas *et al.* (2005).

REVISÃO DE LITERATURA

A família *Potyviridae*

Potyviridae está organizada em seis gêneros, de acordo com o agente vetor e a organização do genoma viral (Berger *et al.*, 2005). Todos os membros da família são transmitidos por vetores e possuem genoma composto por RNA de fita simples (ssRNA) (Hull, 2002). Os gêneros *Rymovirus* e *Tritimovirus* incluem os vírus com um componente genômico e transmitidos por ácaros (Arachnida: Acarina: Eriophyidae). Um componente genômico também é observado para os gêneros *Ipomovirus* e *Macluravirus*, porém o vetor é a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aphididae). *Bymovirus* é o único gênero que agrupa vírus transmitidos por fungos e que possuem dois componentes genômicos. Por fim, o gênero *Potyvirus* inclui os vírus transmitidos por afídeos (Homoptera: Aphididae) e com um componente genômico. Uma propriedade intrínseca dos vírus pertencentes a essa família é a indução de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (*cylindrical inclusions*, CI), também denominadas “cata-ventos”, no citoplasma das células infectadas (Fenner, 1976). *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, com cerca de 20% dos vírus descritos (Fauquet *et al.*, 2005). Infectam uma grande variedade de culturas agrícolas incluindo leguminosas, solanáceas, gramíneas entre outras (Zerbini & Zambolim, 1999).

As espécies virais classificadas no gênero *Potyvirus*, ao qual pertencem os vírus que causam o endurecimento dos frutos do maracujazeiro, apresentam como material genético uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos, com uma proteína viral, denominada VPg (*viral protein, genome-linked*), ligada covalentemente à extremidade 5' e uma cauda poli-A ligada à extremidade 3' do RNA

(Berger *et al.*, 2005). O genoma é envolvido pelo capsídeo, de formato alongado e flexuoso, constituído por aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsidial com massa molecular em torno de 34 kDa. A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma extremidade amínica altamente variável em tamanho e seqüência, uma região central altamente conservada, contendo de 215 a 227, aminoácidos e uma extremidade carboxílica de 18 a 20 aminoácidos. As duas extremidades, amino- e carboxi-terminal, estão expostas para o exterior da partícula viral e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (Shukla *et al.*, 1991).

O genoma viral possui uma única fase de leitura aberta (ORF) que dá origem a uma poliproteína com aproximadamente 350 kDa. A partir da poliproteína, pelo menos 8 proteínas (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, NIa, NIB e CP) (Figura 1) são produzidas através da atividade enzimáticas de 3 proteinases contidas na própria poliproteína (P1, HC-Pro e NIa). Essas proteínas incluem a replicase viral, proteínas de movimento célula-a-célula e a longa distância, proteínas responsáveis pela transmissão por afídeos e a proteína capsidial (Pruss *et al.*, 1997; Shukla *et al.*, 1994; Verchot & Carrington, 1995b).

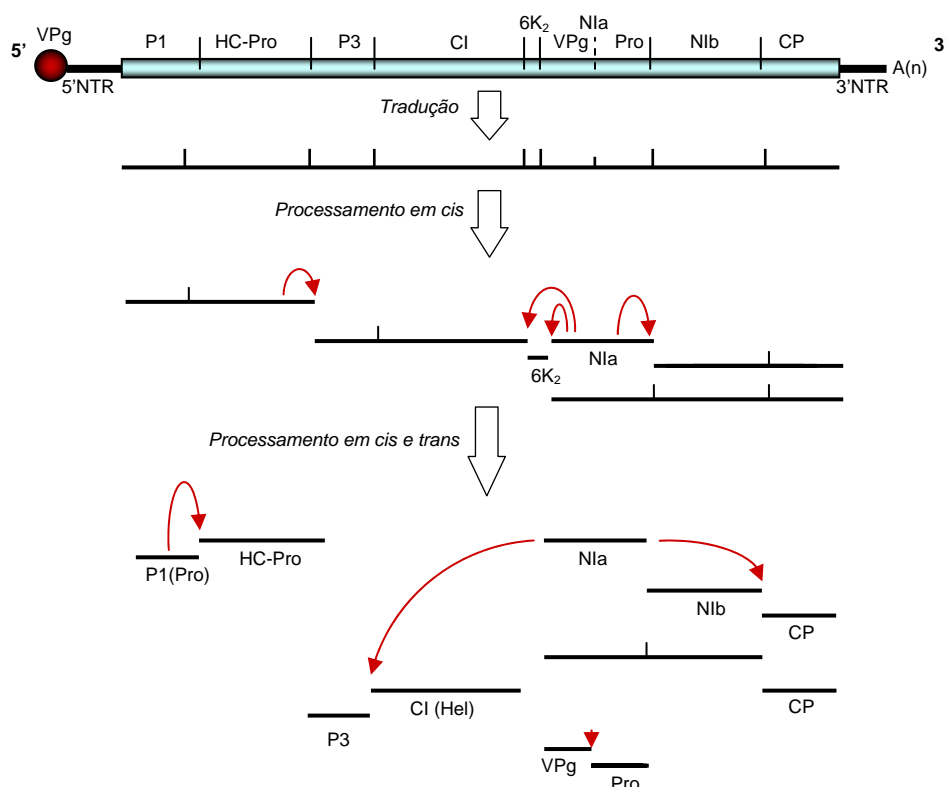


Figura 1. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvírus. O RNA viral possui uma proteína viral (VPg) ligada à sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. A única fase aberta de leitura dá origem a uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando diferentes intermediários e, finalmente, 8 proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, NIa, NIB e CP). A proteína NIa pode sofrer uma clivagem adicional gerando VPg e Pro, dependendo da espécie viral. Adaptado de Shukla *et al.* (1994).

A maioria das proteínas dos potyvírus possui mais de uma função (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). A proteína HC-Pro (*helper component proteinase*) tem sido bastante estudada, devido a sua função de supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau & Carrington, 1998). Esta proteína também tem função de proteinase do tipo cisteína, clivando seu próprio terminal carboxílico e separando HC-Pro de P3 (Oh & Carrington, 1989). Possui ainda função de fator auxiliar de transmissão por afídeos, de movimento célula-a-célula e possivelmente a longa distância (Cronin *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997). Uma outra proteína com atividade de proteinase é P1, responsável pela proteólise da junção P1/HC-Pro (Verchot *et al.*, 1991). P1 é uma proteinase do tipo serina, e o sítio ativo, Gli-x-Ser-Gli, é conservado em todos potyvírus cuja seqüência de P1 já foi determinada (Shukla *et al.*, 1994). A proteinase P1 também atua como fator de amplificação do genoma (Verchot & Carrington, 1995a) e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral (Rajamaki *et al.*, 2005).

A terceira proteinase dos potyvírus é a proteína NIa (*nuclear inclusion a*), do tipo cisteína, e que atua em *cis* e *trans*. Todos os cinco sítios de clivagem da proteína NIa apresentam a seqüência conservada Glu-x-x-Try-Gln/Ser,Gly,Ala,Val, com o local de clivagem localizado após o resíduo de glutamina. As posições X são ocupadas por aminoácidos neutros ou hidrofóbicos (Dougherty *et al.*, 1988). Esta proteína consiste de dois polipeptídeos com funções distintas, VPg e Pro (proteinase). A VPg atua como iniciadora da síntese de fitas de RNA negativo, por meio do grupamento hidroxil presente em um resíduo conservado de tirosina (Murphy *et al.*, 1996). Além disso, essa proteína é capaz de se associar ao fator de iniciação de tradução eIF4E, de forma a tornar possível a tradução do genoma viral (Nicaise *et al.*, 2003; Ruffel *et al.*, 2002). O RNA genômico dos potyvírus não possui uma estrutura “capeada” em seu terminal 5’ (um nucleotídeo modificado, quase sempre m⁷GpppN), estrutura presente em todos os mRNAs celulares eucarióticos e essencial para que ocorra a tradução e para a manutenção da integridade do mRNA (Niepel & Gallie, 1999). A tradução do RNA genômico dos potyvírus é independente de sua presença, e ocorre devido à interação entre a VPg e o eIF4E (Leonard *et al.*, 2004).

As infecções por membros da família *Potyviridae* induzem inclusões citoplasmáticas do tipo “cata-vento”, resultado do acúmulo da proteína CI (Murphy *et al.*, 1991). Esta proteína é a helicase dos potyvírus, responsável pela separação da fita dupla de RNA produzida durante a replicação. A CI, juntamente com a NIa e NIB, forma o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A CI desempenha também papel no movimento célula-a-célula dos potyvírus (Calder & Ingerfeld, 1990).

Um dos produtos gênicos mais conservados entre os potyvírus é a proteína Nlb (*nuclear inclusion b*). Trata-se da polimerase (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp) dos potyvírus, cuja função principal é a síntese de novas cópias do RNA viral (Domier *et al.*, 1987; Laín *et al.*, 1989; Robaglia *et al.*, 1989). A replicação é catalisada pela RdRp viral em conjunto com proteínas do hospedeiro. O processo de replicação é iniciado com a síntese de uma fita complementar (negativa) a partir da fita de RNA positiva. As novas fitas positivas são em seguida sintetizadas utilizando-se as fitas negativas como molde. A especificidade do complexo replicativo é assegurada pelo reconhecimento de sinais em *cis* em ambas as fitas (Simón-Buela *et al.*, 1997a).

A proteína P3 é a proteína menos estudada dos potyvírus. Ela é detectada em células infectadas, isoladamente (Rodríguez-Cerezo & Shaw, 1991) ou em conjunto com as proteínas CI (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993) ou Nlb (Langenberg & Zhang, 1997). Como essas duas proteínas estão envolvidas diretamente na replicação viral, sugere-se que P3, à semelhança de P1, seja um fator acessório de amplificação do genoma (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

A proteína 6K₂ possui um domínio central hidrofóbico de 19 aminoácidos que lhe confere a propriedade de associação a membranas, sugerindo que pode ser responsável pela associação do complexo replicativo a membranas (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad *et al.*, 1997).

A proteína capsidial (CP) está envolvida em várias funções, como encapsidação do RNA viral, transmissão pelo vetor (Atreya *et al.*, 1990), movimento célula-a-célula (Dolja *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997) e movimento a longa distância (Dolja *et al.*, 1995).

A região 3' não-traduzida (3'NTR) do genoma dos potyvírus apresenta uma cauda poli-A, codificada pelo próprio vírus. Essa cauda está envolvida na proteção do RNA, evitando ou atenuando os efeitos da degradação exonucleotídica. A seqüência da 3'NTR é importante para o reconhecimento do RNA genômico viral pelo complexo replicativo, contendo *cis*-elementos essenciais para que esse processo ocorra (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998; Mahajan *et al.*, 1996). A região 5' não-traduzida (5'NTR) apresenta-se altamente conservada em diversos potyvírus (Simón-Buela *et al.*, 1997b). Na 5'NTR estão localizadas seqüências regulatórias da tradução do genoma.

Características como gama de hospedeiros, sintomatologia, morfologia de inclusões citoplasmáticas e sorologia constituíram durante vários anos os principais critérios para a classificação de espécies e estirpes de potyvírus. Apesar destas características terem desempenhado papel significativo na determinação do relacionamento taxonômico entre muitos potyvírus, elas por si só não fornecem uma solução adequada para a identificação de espécies e estirpes no gênero como um todo, devido à intensa variação biológica e antigênica

observada entre membros do gênero (Shukla *et al.*, 1994). Atualmente, um dos principais critérios adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para a designação de novas espécies para o gênero *Potyvirus* é a comparação da seqüência de aminoácidos da poliproteína e da proteína capsidial (Berger *et al.*, 2005). A seqüência de nucleotídeos da 3’NTR também pode ser utilizada na classificação (Adams *et al.*, 2005). De um modo geral, espécies distintas apresentam identidade de até 53% para as seqüências de aminoácidos da CP, enquanto estirpes de um mesmo vírus apresentam de 83 a 99 % de identidade.

Comparações em nível de identidade de nucleotídeos e aminoácidos das seqüências do genoma completo de espécies da família *Potyviridae* foram realizados por Adams *et al.* (2005). Foi demonstrado através da análise de 187 seqüências de genomas da família que a maioria das espécies em um mesmo gênero possui de 50 a 55% de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF completa. O nível de identidade para demarcação de espécies foi proposto em 76% para seqüências de nucleotídeos, e 82% para seqüências de aminoácidos. A análise com base na seqüência de nucleotídeos da região codificadora da proteína capsidial indicou um valor de 76-77% de identidade para demarcação de espécies.

Vários trabalhos têm demonstrado que a análise comparativa das seqüências de aminoácidos da CP de diversos potyvírus reflete adequadamente o relacionamento entre espécies. A aplicação desse modelo levou à determinação do posicionamento taxonômico do *Passionfruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *South African passiflora virus* (SAPV) e *sesame mosaic virus* (SeMV) (Berger *et al.*, 1997; McKern *et al.*, 1994; Pappu *et al.*, 1997; Sithole-Niang *et al.*, 1996). A porcentagem de identidade de aminoácidos da proteína capsidial entre isolados de PWV e de CABMV é inferior a 70%, indicando claramente que esses vírus constituem espécies distintas. Entretanto, isolados de CABMV, SAPV e SeMV apresentaram identidade em torno de 85%, indicando tratar-se de estirpes do mesmo potyvírus. Como o CABMV foi o primeiro desses vírus a ser descrito, foi recomendado que o SAPV e SeMV passassem a ser considerados estirpes do CABMV (Sithole-Niang *et al.*, 1996).

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) no Brasil apresenta características semelhantes às da doença descrita na Austrália, onde foi primeiramente relatado, em 1901, por Allen, citado por Cobb (1901) e Noble (1928).

No Brasil, a doença foi observada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e maracujá-doce (*P. alata*), no estado da Bahia, no

final da década de 70 (Chagas *et al.*, 1981; Yamashiro & Chagas, 1979), e posteriormente nos estados de Pernambuco (Loreto & Vital, 1983), Sergipe e Ceará (Kitajima & Chagas, 1984), São Paulo (Chagas *et al.*, 1992), Distrito Federal (Inoue *et al.*, 1995) e Pará (Trindade *et al.*, 1999). Atualmente, a doença encontra-se disseminada em todos os estados produtores de maracujazeiro. Em todos esses casos, a identidade do agente patogênico foi atribuída ao PWV com base em propriedades biológicas (morfologia das partículas, sintomatologia e gama de hospedeiros) e sorológicas. Entretanto, estudos de sequenciamento da região codificadora da proteína capsidial de diferentes isolados brasileiros que causam o endurecimento dos frutos mostraram que estes isolados apresentavam uma alta identidade de seqüência entre si, e maior identidade com o CABMV do que com o PWV (Nascimento *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 1999), indicando que a espécie associada ao endurecimento dos frutos no Brasil é o CABMV.

Além do PWV e CABMV, foi identificada no Japão uma terceira espécie de potyvírus causando o endurecimento dos frutos, sendo proposta a denominação East Asian Passiflora virus (EAPV). A análise filogenética com base na região codificadora da proteína capsidial demonstrou um agrupamento distante entre o PWV, o CABMV e o EAPV (Iwai *et al.*, 2006).

Esses três vírus pertencem à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, possuindo partículas alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 715×13 nm. São transmitidos por afídeos de maneira não-circulativa e também facilmente por enxertia e via extrato vegetal tamponado. Não ocorre transmissão pelas sementes de maracujazeiro (McKern *et al.*, 1994; Ruggiero & Nogueira Filho, 1994). Suas gamas de hospedeiros incluem essencialmente espécies das famílias Passifloraceae e Fabaceae, além de alguns membros das famílias Amarantaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae e Cucurbitaceae (McKern *et al.*, 1994; Teakle & Widermuth, 1967).

Nas folhas de maracujazeiro, o vírus induz sintomas de mosaico de intensidade variada, bolhosidade e distorção foliar. Os frutos são freqüentemente deformados, de tamanho reduzido e o pericarpo torna-se endurecido e espesso quando comparado com um fruto de planta sadia (Bruckner *et al.*, 2002; Pio-Ribeiro & Mariano, 1997; Rezende, 1994). A diminuição do ciclo produtivo das plantas, aliada à deformação dos frutos e à redução na produção da polpa, provoca queda da produtividade, produção de frutos sem valor comercial e, conseqüentemente, redução na vida econômica do pomar (Bruckner *et al.*, 2002; Gioria *et al.*, 2000; Pares *et al.*, 1985; Rezende, 1994).

Várias medidas de controle já foram adotadas, porém sem sucesso. A utilização de inseticidas no controle dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus não é eficiente, devido ao tipo de transmissão não-circulativa (Costa, 1996). A proteção cruzada poderia ser um método viável para o controle desta doença. Entretanto, a proteção cruzada exige um

tempo considerável para obtenção, seleção e testes de proteção e estabilidade dos isolados fracos (Novaes & Rezende, 2003). Além disso, podem ocorrer problemas como uma possível mutação que induziria a reversão do isolado atenuado para um isolado forte, a quebra da resistência induzida pelo isolado atenuado, e principalmente a possibilidade de efeito sinérgico do isolado atenuado com outras espécies de vírus, o que poderia resultar numa doença ainda mais grave, conforme relatado por Pares *et al.*, (1985), que descreveu um sintoma de necrose do ponteiro causado pela infecção mista do PWV com o CMV. Taylor & Kimble, (1964) também obtiveram sintomas semelhantes inoculando artificialmente esses dois vírus em plantas de maracujazeiro.

O desenvolvimento de cultivares resistentes é uma das estratégias mais práticas e econômicas para a redução das perdas causadas por potyvírus. A exploração da variabilidade genética de espécies de *Passiflora* poderia contribuir para o estabelecimento de cultivares resistentes. No entanto, variedades resistentes ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro não estão disponíveis (Bruckner *et al.*, 2002). Plantas de maracujazeiro possuem auto-incompatibilidade e também problemas de incompatibilidade interespecífica, o que dificulta o sucesso da autofecundação e do retrocruzamento (Costa, 1996). A maioria das espécies horticulturamente mais importantes, como *P. edulis*, possui número de cromossomo $2n=18$ cromossomos, podendo ser observado entre essas espécies um certo grau de compatibilidade interespecífica (Meletti & Bruckner, 2001). Conseqüentemente, a obtenção de híbridos interespecíficos é possível, porém esses híbridos nem sempre são férteis e viáveis.

Com base nessas considerações, uma alternativa atraente para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro seria a obtenção de plantas transgênicas de maracujá expressando porções do genoma viral, a chamada resistência derivada do patógeno (RDP). A transformação de plantas com porções do genoma viral freqüentemente dá origem a linhagens de plantas que exibem resistência ao vírus do qual a seqüência foi derivada (Fuchs *et al.*, 1997). Atualmente, a maioria dos trabalhos visando à produção de plantas transgênicas resistentes a vírus explora o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) (Baulcombe, 2004; Beachy, 1997; Waterhouse *et al.*, 2001; Zerbini *et al.*, 2005).

Resistência derivada do patógeno

Sanford & Johnston (1985) propuseram o termo “resistência derivada do patógeno” (RDP), ao sugerir que a expressão de certos genes de um patógeno em um hospedeiro levaria a uma alteração no equilíbrio entre os componentes do patógeno, resultando numa interferência no ciclo de infecção. Diversos trabalhos foram realizados tendo como base o

conceito de resistência derivada do patógeno. O primeiro fragmento de um genoma viral a ser empregado foi o gene que codifica a proteína capsidial do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Powell-Abel *et al.*, 1986). Nesse trabalho, linhagens transgênicas expressando a proteína capsidial apresentaram um atraso no desenvolvimento dos sintomas após inoculação com o TMV. A resistência foi considerada de amplo espectro, pois era efetiva contra diversas estirpes do vírus.

A resistência derivada do patógeno pode ser obtida por meio de diversas estratégias e diferir consideravelmente em termos de espectro, implicando na presença de diversos mecanismos moleculares que expliquem os vários casos de RDP. Evidências sugerem a existência de dois tipos de resistência: a que necessita da produção de proteína a partir do transgene, e a que necessita somente da expressão do mRNA transgênico, denominada proteção mediada por RNA. Enquanto a proteção mediada pela proteína confere resistência moderada a uma série de estirpes virais, a resistência mediada pelo RNA se mostra estirpe-específica, porém o nível de resistência verificado nessas plantas é muito maior, podendo chegar à imunidade (Beachy, 1997).

Estudos extensos sobre a proteção mediada pela proteína do capsídeo do TMV foram realizados, concluindo que esta ocorria por meio da inibição da desencapsidação viral nas primeiras células infectadas, e que era quebrada pelo emprego de RNAs virais como fonte de inóculo (Clark *et al.*, 1995; Register & Beachy, 1988). Para potyvírus, a RDP mediada pela proteína já foi relatada para a expressão da proteína capsidial e de proteínas não estruturais, incluindo P1 (Tavert Roudet *et al.*, 1998), CI (Wittner *et al.*, 1995) NIa (Maiti *et al.*, 1993) e NIb (Audy *et al.*, 1994).

Diversas estratégias de RDP envolvem a expressão de forma não-traduzível de genes do patógeno. A estratégia mais promissora envolve a transformação de plantas com seqüências não-traduzíveis derivadas do genoma do vírus, em um mecanismo conhecido como resistência dependente de homologia (Baulcombe, 1996), que atua via silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Baulcombe, 2004).

Um grande número de fenômenos de silenciamento gênico que ocorrem em nível pós-transcricional já foram descritos em plantas (nas quais é denominado PTGS), fungos (nos quais é denominado “quelling”) e em animais (nos quais é denominado “RNA interference”, RNAi) (Baulcombe, 2004; Baulcombe, 2005; Meister *et al.*, 2004). O fenômeno foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas, quando a introdução de um transgene levou à inativação (silenciamento) do próprio transgene e do gene endógeno homólogo, e foi denominada co-supressão (Napoli *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990).

O silenciamento de RNA engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos (Baulcombe, 2004). O silenciamento de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Xie & Guo, 2006). O mecanismo é ativado pela presença de um RNA de fita dupla (dsRNA) que pode ser originado de diversas maneiras: i) transcrição de um transgene em repetição invertida; ii) transcrição de um transgene na orientação anti-senso e, iii) transcrição de um transgene na orientação senso. Uma das hipóteses para a formação de dsRNA pela transcrição de um transgene na orientação senso propõe que o organismo detecta um alto nível de expressão do transgene e conseqüente acúmulo de transcrito (RNA de fita simples) no citoplasma, o que leva a ativação de uma RdRp endógena que sintetiza a fita complementar ao transcrito, gerando o dsRNA. A outra hipótese propõe que a transcrição do transgene senso induz a formação de um RNA aberrante, que é utilizado como molde pela RdRp para a síntese do dsRNA (Baulcombe, 2004). Entretanto, esse possível RNA aberrante nunca foi detectado. A replicação de vírus com genoma de RNA também pode disparar eficientemente o mecanismo de silenciamento, uma vez que dsRNA é produzido como um intermediário durante a replicação viral. O mecanismo de indução de silenciamento por meio da replicação de vírus é denominado silenciamento gênico induzido por vírus (*virus induced gene silencing*, VIGS) (Kjemtrup *et al.*, 1998; Kumagai *et al.*, 1995; Ratcliff *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 1998).

O silenciamento de RNA é um processo com pelo menos quatro etapas: iniciação, amplificação, sinalização sistêmica e manutenção. Na etapa de iniciação, o dsRNA é processado em siRNAs com aproximadamente 21-24 nts. Esta clivagem requer ATP e é mediada por DICER, uma ribonuclease do tipo RNase III (endonuclease com afinidade por dsRNA) (Hammond *et al.*, 2000). O siRNA de fita dupla derivado do processamento de dsRNA por Dicer se associa à proteína R2D2, que discrimina qual das duas fitas do siRNA será incorporada ao RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Tomari *et al.*, 2004). O RISC é um complexo multi-protéico que direciona a clivagem seqüência-específica de RNAs complementares ao siRNA (Hutvagner & Zamore, 2002). Esse complexo possui atividade catalítica que cliva especificamente o RNA alvo sem afetar o siRNA guia. A subunidade catalítica é denominada Slicer e, em mamíferos, foi demonstrado que mutações na proteína AGO2, um membro da família Argonata que faz parte do complexo RISC, inibem a capacidade de clivagem do RISC, indicando que AGO2 é a própria proteína Slicer que media a clivagem do mRNA alvo após sua associação ao siRNA no complexo RISC (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004).

Uma característica marcante do silenciamento de RNA é o seu caráter sistêmico. O mecanismo pelo qual o silenciamento é propagado a partir da célula inicialmente silenciada ainda não é totalmente compreendido. Em plantas, acredita-se que o sinal sistêmico seja capaz de se mover célula-a-célula via plasmodesmas (Himber *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002) e a longa distância via floema (Klahre *et al.*, 2002; Mallory *et al.*, 2003). Entretanto, não se sabe de que forma (ativa ou passiva) o transporte ocorre.

Estudos genéticos demonstraram a existência de pelo menos três vias de silenciamento de RNA (Figura 2) (Xie *et al.*, 2004). A primeira via é de silenciamento citoplasmático via siRNAs, que está envolvida na degradação de RNA viral interferindo ou mesmo bloqueando o ciclo de infecção. A segunda via é a de silenciamento de mRNAs endógenos via miRNAs. Os miRNAs regulam a expressão gênica negativamente por meio do pareamento de bases específicos a mRNAs alvo, resultando na clivagem do mRNA ou na repressão de sua tradução. A terceira via é nuclear e está associada à metilação de DNA e formação de heterocromatina (Baulcombe, 2004).

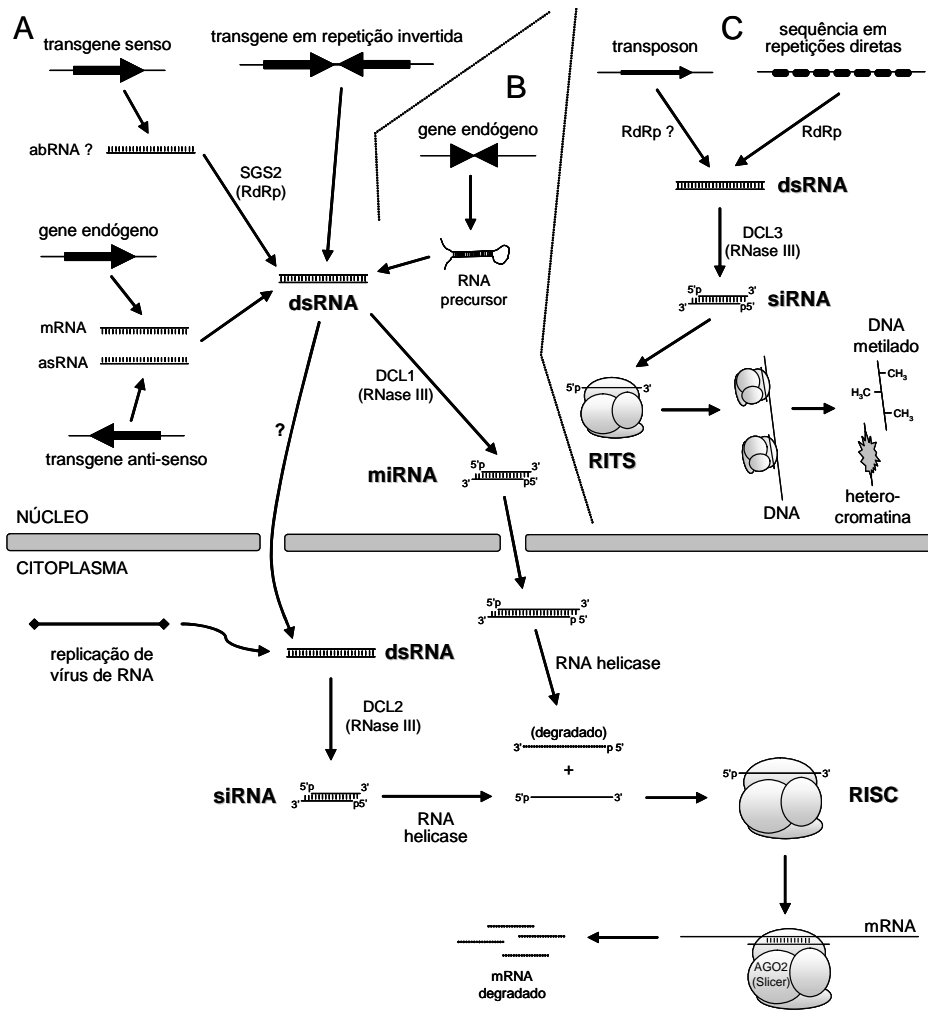


Figura 2. Modelo para o silenciamento de RNA em plantas, indicando as três vias atualmente conhecidas. **A.** Silenciamento pós-transcricional de genes endógenos ou transgenes via siRNAs. Uma molécula de dsRNA pode ser gerada a partir da transcrição de um transgene senso, de um transgene anti-senso ou de um transgene em repetição invertida. O dsRNA é transportado para o citoplasma, onde é degradado pela enzima DCL-2, gerando os siRNAs. Os siRNAs são incorporados ao complexo RISC, que irá degradar os mRNAs citoplasmáticos que possuam identidade de seqüência com o siRNA. Os vírus ativam essa via produzindo dsRNA durante sua replicação. **B.** Silenciamento pós-transcricional de genes endógenos via miRNAs. Os miRNAs são transcritos a partir de genes que produzem um RNA precursor com estrutura secundária em forma de grampo. A enzima DCL-1 processa o precursor no núcleo, gerando o miRNA. O miRNA é transportado para o citoplasma e incorporado ao complexo RISC. **C.** Silenciamento transcricional via siRNAs. Essa via é ativada por meio de dsRNA produzido após a transcrição de transposons ou de seqüências endógenas arranjadas na forma de repetição diretas. O dsRNA é processado pela enzima DCL-3, e os siRNAs resultantes são incorporados ao complexo RITS (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*). Esse complexo atua no DNA genômico, resultando na metilação de seqüências homólogas ao siRNA ou na formação de heterocromatina. Reproduzido de Zerbini *et al.* (2005).

LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, v. 150, p. 459-479, 2005.
- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. pp.9-31 In: BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. (Eds.) Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001.
- ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; SANTANA, E.N.; NASCIMENTO, A.V.S.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Transgenic passionfruit expressing an RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* are resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 33-38, 2005.
- ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G.J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A.C.; SMITH, T.H.; VANCE, V.B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ATREYA, C.D.; RACCAH, B.; PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, v. 178, p. 161-165, 1990.
- AUDY, P.; PALUKAITIS, P.; SLACK, S.A.; ZAITLIN, M. Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 7, p. 15-22, 1994.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, p. 356-363, 2004.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 30, p. 290-293, 2005.
- BAULCOMBE, D. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, v. 8, p. 1833-1844, 1996.
- BEACHY, R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, p. 215-220, 1997.
- BERGER, P.H.; ADAMS, M.J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A.A.; HAMMOND, J.; HILL, J.H.; JORDAN, R.L.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E.P.; SPENCE, N.; STENGER, D.C.; OHKI, S.T.; UYEDA, I.; VAN ZAAYEN, A.; VALKONEN, J.P.; VETTEN, H.J. Family *Potyviridae*. pp.819-841 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the*

- International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- BERGER, P.H.; WYATT, S.D.; SHIEL, P.J.; SILBERNAGEL, M.J.; DRUFFEL, K.; MINK, G.I. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Archives of Virology*, v. 142, p. 1979-1999, 1997.
- BRAZ, A.S.K. Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes. Tese M.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 101p. 1999.
- BRIGNETI, G.; VOINNET, O.; LI, W.X.; JI, L.H.; DING, S.W.; BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, v. 17, p. 6739-6746, 1998.
- BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. pp.7-24 In: SÃO JOSÉ, A.R.; BRUCKNER, C.H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. (Eds.) Maracujá: temas selecionados - Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia. Porto Alegre: Cinco Continentes. 1997.
- BRUCKNER, C.H.; MELLETTI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Maracujazeiro. pp.373-409 In: BRUCKNER, C.H. (Ed.) Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, MG: Editora UFV. 2002.
- CALDER, V.L.; INGERFELD, M. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *Journal of Structural Biology*, v. 105, p. 62-66, 1990.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 259-268, 1981.
- CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 14, p. 187-290, 1992.
- CLARK, W.G.; FITCHEN, J.M.; BEACHY, R.N. Studies of coat protein mediated resistance to TMV. *Virology*, v. 208, p. 485-491, 1995.
- COBB, N.A. Woodiness of passionfruit. *Agricultural Gazette of New South Wales*, v. 12, p. 407-418, 1901.
- COSTA, A.F. Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tese de Doutorado, Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 129 p. 1996.
- COSTA, A.F.; BRAZ, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro por afídeos (Hemiptera-Aphididae). *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 376, 1995.
- CRONIN, S.; VERCHOT, J.; HALDEMAN-CAHILL, R.; SCHAAD, M.C.; CARRINGTON, J.C. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, v. 7, p. 549-559, 1995.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN CAHILL, R.; MONTGOMERY, A.E.; VANDENBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

- DOMIER, L.L.; SHAW, J.G.; RHODES, R.E. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulomoviral proteins. *Virology*, v. 158, p. 20-27, 1987.
- DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C.; CARY, S.M.; PARKS, T.W. Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. *EMBO Journal*, v. 7, p. 1281-1287, 1988.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 1259 p. 2005.
- FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, v. 7, p. 1-116, 1976.
- FERREIRA, G. Propagação do maracujazeiro. *Informe Agropecuário*, v. 21, p. 18-24, 2000.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO Agrícola: Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação. 520 p. 2005.
- FUCHS, M.; FERREIRA, S.; GONSALVES, D. Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology*, v. 111, p. 1997.
- GIORIA, R., BOSQUÊ, G.G., REZENDE, J.A.M., AMORIM, L. & KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro em Alta Paulista-SP e danos causados pelo Passion fruit woodiness virus. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 182-189, 2000.
- HALDEMAN-CAHILL, R.; DAROS, J.A.; CARRINGTON, J.C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology*, v. 72, p. 4072-4079, 1998.
- HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v. 404, p. 293-296, 2000.
- HIMBER, C.; DUNOYER, P.; MOISSIARD, G.; RITZENTHALER, C.; VOINNET, O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, v. 22, p. 4523-4533, 2003.
- HULL, R. *Matthew's Plant Virology* (4a ed.). Londres, Inglaterra: Academic Press. 1001p. 2002.
- HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, v. 297, p. 2056-2060, 2002.
- INOUE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of passionfruit woodiness virus isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 479-487, 1995.
- IWAI, H.; YAMASHITA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, M. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan, is the third strain of the proposed new species East Asian *Passiflora* virus (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. *Archives of Virology*, v. 151, p. 811-818, 2006.
- KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, v. 95, p. 461-470, 1998.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M. Problemas de viroses ou de etiologia micoplasmática na cultura do maracujazeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, p. 393, 1984.

- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, p. 409-432, 1986.
- KJEMTRUP, S.; SAMPSON, K.S.; PEELE, C.; NGUYEN, L.; CONKLING, M.; THOMPSON, W.; ROBERSON, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100, 1998.
- KLAHRE, U.; CRETE, P.; LEUENBERGER, S.A.; IGLESIAS, V.A.; MEINS, F., JR. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 99, p. 11981-11986, 2002.
- KUMAGAI, M.H.; DONSON, J.; DELLA-CIOPPA, G.; HARVEY, D.; HANLEY, K.; GRILL, L.K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 1679-1683, 1995.
- LAÍN, S.; RIECHMANN, J.L.; MARTIN, M.T.; GARCIA, J.A. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene*, v. 82, p. 357-362, 1989.
- LANGENBERG, W.G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, v. 118, p. 243-247, 1997.
- LEONARD, S.; VIEL, C.; BEAUCHEMIN, C.; DAIGNEAULT, N.; FORTIN, M.G.; LALIBERTE, J.F. Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein *in planta*. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 1055-1063, 2004.
- LIMA, A.A. Maracujá: Produção e aspectos técnicos. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. 104 p. 2002.
- LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: Produção e qualidade na Passicultura. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 396 p. 2004.
- LIU, C.M.; LIU, D.P.; DONG, W.J.; LIANG, C.C. Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, p. 716-720, 2004.
- LORETO, T.J.G.; VITAL, A. Viroses e micoplasmas do maracujá em Pernambuco. *Inf. SERDV*. 23 p. 1983.
- LUCAS, W.J.; YOO, B.C.; KRAGLER, F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, v. 2, p. 849-857, 2001.
- MAHAJAN, S.; DOLJA, V.V.; CARRINGTON, J.C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*, v. 70, p. 4370-4379, 1996.
- MAITI, I.B.; MURPHY, J.F.; SHAW, J.G.; HUNT, A.G. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 90, p. 6110-6114, 1993.
- MALLORY, A.C.; MLOTSHWA, S.; BOWMAN, L.H.; VANCE, V.B. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant Journal*, v. 35, p. 82-92, 2003.

- MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Cowpea aphid borne mosaic virus-Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, v. 136, p. 207-217, 1994.
- MEISTER, G.; LANDTHALER, M.; PATKANIOWSKA, A.; DORSETT, Y.; TENG, G.; TUSCHL, T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, v. 15, p. 185-197, 2004.
- MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. pp. 345-383 In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Eds.) Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco continentes. 2001.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. Maracujá: produção e comercialização. Campinas: IAC (Boletim Técnico no. 181). 64 p. 1999.
- MLOTSHWA, S.; VOINNET, O.; METTE, M.F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S.W.; PRUSS, G.; VANCE, V.B. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, v. 14, p. S289-301, 2002.
- MURPHY, J.F.; JARLFORS, U.; SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in potyvirus-infected protoplasts. *Phytopathology*, v. 81, p. 371-374, 1991.
- MURPHY, J.F.; KLEIN, P.G.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, v. 220, p. 535-538, 1996.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.
- NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 378-383, 2004.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUAN, R.; DUBRANA, M.P.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LE GALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1272-1282, 2003.
- NIEPEL, M.; GALLIE, D.R. Identification and characterization of the functional elements within the *Tobacco etch virus* 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology*, v. 73, p. 9080-9088, 1999.
- NOBLE, J.R. Some observations on the woodiness or bullet disease of passionfruit. *Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, v. 62, p. 79-98, 1928.
- NOVAES, Q.S.D.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 60, p. 699-708, 2003.
- OH, C.S.; CARRINGTON, J.C. Identification of essential residues in the potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology*, v. 173, p. 692-699, 1989.
- OKAMURA, K.; ISHIZUKA, A.; SIOMI, H.; SIOMI, M.C. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, v. 18, p. 1655-1666, 2004.

- PAPPU, H.R.; PAPPU, S.S.; SREENIVASULU, P. Molecular characterization and intervirial homologies of a potyvirus infecting sesame (*Sesamum indicum*) in Georgia. *Archives of Virology*, v. 142, p. 1919-1927, 1997.
- PARES, R.D.; MARTIN, A.B.; FITZELL, R.D. Virus-induced tip necrosis of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.). *Australian Plant Pathology*, v. 14, p. 76-78, 1985.
- PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro. pp. 525-534 In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. 3 ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 1997.
- POWELL-ABEL, P.; NELSON, R.S.; DE, B.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, v. 232, p. 738-743, 1986.
- PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X.M.; CARRINGTON, J.C.; VANCE, V.B.; GE, X.; SHI, X.M. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, v. 9, p. 859-868, 1997.
- RAJAMAKI, M.L.; KELLONIEMI, J.; ALMINAITE, A.; KEKARAINEN, T.; RABENSTEIN, F.; VALKONEN, R.P.T. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous protein and suggest some P1 functions. *Virology*, v. 342, p. 88-101, 2005.
- RATCLIFF, F.; HERNANDEZ MARTIN, A.; BAULCOMBE, D. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, v. 25, p. 237-245, 2001.
- REGISTER, J.C.; BEACHY, R.N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology*, v. 166, p. 524-532, 1988.
- RESTREPO-HARTWIG, M.A.; CARRINGTON, J.C. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology*, v. 68, p. 2388-2397, 1994.
- REZENDE, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. pp. 116-125 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) *Maracujá: Produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- ROBAGLIA, C.; DURAND-TARDIF, M.; TRONCET, M.; BOUDAZIN, G.; ASTIER-MANIFACIER, S.; CASSE-DELBART, F. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 935-947, 1989.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E.D.; PIRONE, T.P.; SHAW, J.G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1945-1949, 1993.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; SHAW, J.G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. *Virology*, v. 185, p. 572-579, 1991.
- ROJAS, M.R.; ZERBINI, F.M.; ALLISON, R.F.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, v. 237, p. 283-295, 1997.
- RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.H.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHMANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, v. 32, p. 1067-1075, 2002.

- RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G.C. Evolução da cultura do maracujá no Brasil. pp. 197-204 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) Maracujá, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, v. 10, p. 937-946, 1998.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, v. 113, p. 395-405, 1985.
- SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 153, 1999.
- SCHAAD, M.C.; JENSEN, P.E.; CARRINGTON, J.C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal*, v. 16, p. 4049-4059, 1997.
- SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 13, p. 178-191, 1991.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. *The Potyviridae*. Wallingford, UK: CAB International. 516p. 1994.
- SILVA, A.C.; SÃO JOSÉ, A.R. Classificação botânica do maracujazeiro. pp.1-5 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) Maracujá produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- SIMÓN-BUELA, L.; GUO, H.S.; GARCÍA, J.A. Cap-independent *leaky scanning* as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 2691-2699, 1997a.
- SIMÓN-BUELA, L.; GUO, H.S.; GARCÍA, J.A. Long sequence in the 5' noncoding region of plum pox virus is not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology*, v. 233, p. 157-162, 1997b.
- SITHOLE-NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'-terminal region of a Zimbabwe isolate of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Archives of Virology*, v. 141, p. 935-943, 1996.
- SMITH, C.J.S.; WATSON, C.F.; BIRD, C.R.; RAY, J.; SCHUCH, W.; GRIERSON, D. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics*, v. 224, p. 477-481, 1990.
- SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. Maracujá: Espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ: 179p. 1997.
- TAVERT ROUDET, G.; RAVELONANDRO, M.; BACHELIER, J.C.; DUNEZ, J. Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of plum pox virus are resistant to virus challenge. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, p. 103-107, 1998.
- TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. Passionfruit woodiness virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, v. 122, p. 1973.
- TAYLOR, R.H.; KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses which cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 24, p. 173-186, 1964.

- TEAKLE, D.S.; WIDERMUTH, G.B. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 24, p. 173-186, 1967.
- TOMARI, Y.; DU, T.; HALEY, B.; SCHWARZ, D.S.; BENNETT, R.; COOK, H.A.; KOPPETSCH, B.S.; THEURKAUF, W.E.; ZAMORE, P.D. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*. *Cell*, v. 116, p. 831-841, 2004.
- TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.A.; REZENDE, J.A.M. Resistance to Passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. *Plant Disease*, v. 90, p. 1026-1030, 2006.
- TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.S.D.; KIMATI, H. Ocorrência do "*Passion fruit woodiness virus*" (PWV) em maracujazais no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p. 76-79, 1999.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.
- VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, v. 2, p. 291-299, 1990.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology*, v. 69, p. 1582-1590, 1995a.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, v. 69, p. 3668-3674, 1995b.
- VERCHOT, J.; KOONIN, E.V.; CARRINGTON, J.C. The 35 kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. *Virology*, v. 190, p. 527-535, 1991.
- WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, v. 411, p. 834-842, 2001.
- WITTNER, A.; PALKOVICS, L.; BALAZS, E. Expression of cylindrical inclusion body protein gene of plum pox virus in transgenic plants. *Novenyvedelem*, v. 31, p. 301-306, 1995.
- XIE, Q.; GUO, H.S. Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Research*, v. 118, p. 1-6, 2006.
- XIE, Z.; JOHANSEN, L.K.; GUSTAFSON, A.M.; KASSCHAU, K.D.; LELLIS, A.D.; ZILBERMAN, D.; JACOBSEN, S.E.; CARRINGTON, J.C. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, v. 2, p. E104, 2004.
- YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave moléstia virótica em maracujá-amarelo no estado da Bahia. In: 5º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Pelotas. Anais. p. 915-917, 1979.
- ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 13, p. 191-246, 2005.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M. A família Potyviridae. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 7, p. 1-66, 1999.