



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO E
MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A
ELIMINAÇÃO DO *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC
VIRUS* EM MARACUJAZEIRO-AZEDO**

LEONARDO MONTEIRO RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO/2006**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO E MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A
ELIMINAÇÃO DO *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS* EM
MARACUJAZEIRO-AZEDO

LEONARDO MONTEIRO RIBEIRO

ORIENTADOR: JOSÉ RICARDO PEIXOTO

CO-ORIENTADORA: SOLANGE ROCHA MONTEIRO DE ANDRADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: DM 228/2006

BRASÍLIA/DF
JUNHO/2006

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO E MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A
ELIMINAÇÃO DO *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS* EM
MARACUJAZEIRO-AZEDO**

LEONARDO MONTEIRO RIBEIRO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE
PRODUÇÃO VEGETAL.**

APROVADA POR:

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, doutor (Universidade de Brasília)
(ORIENTADOR) CPF: 354.356.236-34 - E-mail: peixoto@unb.br**

**SOLANGE ROCHA MONTEIRO DE ANDRADE, doutora (Embrapa Cerrados)
(CO-ORIENTADORA) CPF: 068.754.058-57 - E-mail: solange@cpac.embrapa.br**

**JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS, doutor (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 002.288.181-68
E-mail: kleber@unb.br**

**BERILDO DE MELO, doutor (Universidade Federal de Uberlândia)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 258.062.896-72
E-mail: berildo@umuarama.ufu.br**

BRASÍLIA/DF, 12 de junho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Leonardo Monteiro

Técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro visando a eliminação do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em maracujazeiro-azedo. / Leonardo Monteiro Ribeiro; orientação de José Ricardo Peixoto. – Brasília, 2006.

85 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

1. Micropropagação. 2. Eliminação de vírus. 3. CABMV. 4. Maracujazeiro-azedo. I. Peixoto, J. R. II. Doutor.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RIBEIRO, L. M. **Técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro visando a eliminação do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em maracujazeiro-azedo.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 85 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Leonardo Monteiro Ribeiro

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro visando a eliminação do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em maracujazeiro-azedo.

GRAU: Mestre ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Leonardo Monteiro Ribeiro

CPF: 432.256.848-49

Endereço: R. Renato Rabelo, 31 – Morada do Parque

49.401-364 – Montes Claros/MG - Brasil

Telefone: 38-3214-4581 - E-mail: leomrib@hotmail.com

**Este trabalho é dedicado à
Maria Olívia**

AGRADECIMENTOS

À Deus,

À minha família,

Aos professores Maria Neudes de Oliveira e Paulo Sérgio Lopes pelos inestimáveis ensinamentos e pela amizade,

Aos estagiários Lorena Vieira, Wilson Pereira, Silma Neves, Rúbia Fonseca e Gisele Menino do curso de Ciências Biológicas – Unimontes pela valiosa contribuição a este trabalho,

Ao professor José Ricardo Peixoto pelo talento para ensinar e valorizar as pessoas,

À doutora Solange Andrade pela generosa contribuição a este trabalho,

À Universidade de Brasília pela oportunidade,

Ao Departamento de Biologia Geral da Unimontes pelo apoio no desenvolvimento das pesquisas,

Ao professor Renato Resende pela orientação na indexação e pelo uso do Laboratório de Virologia da UnB,

Ao professor Augusto Franco pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Tecidos da UnB,

Aos professores Sergio Nobre e Fabiana Matrangolo da Unimontes pelo apoio, pela disponibilização de seus laboratórios, pelos ensinamentos e pela amizade,

A todos que contribuíram...

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	01
REVISÃO DE LITERATURA	03
O maracujazeiro-azedo e o <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> . . .	03
Cultura de Tecidos e eliminação de Vírus	04
Microenxertia	06
Meios de Cultivo	08
OBJETIVOS.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO I	18
ORGANOGENESE IN VITRO EM ACESSOS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO INFECTADOS PELO <i>COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS</i> ..	19
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ILUSTRAÇÕES	34
CAPÍTULO 2	39
MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A ELIMINAÇÃO DO <i>COWPEA APHID- BORNE MOSAIC VIRUS</i> EM MARACUJAZEIRO-AZEDO.....	40
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Experimento I - Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no hipocótilo	45
Experimento II - Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no epicótilo.....	48
Avaliação histológica da microenxertia.....	48
Eliminação do vírus CABMV.....	49

Página

RESULTADOS E DISCUSSÃO.	50
Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no hipocótilo	50
Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no epicótilo	51
Avaliação histológica da microenxertia.	55
Microenxertia ex vitro	57
Eliminação do vírus CABMV.	59
CONCLUSÕES.	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	62
ILUSTRAÇÕES	67
ANEXOS.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
CAPÍTULO 1	
1.1 - Organogênese em explantes de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo	34
1.2 - Organogênese em explante de nó de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo	35
1.3 - Organogênese em explante de ápice de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo	36
CAPÍTULO 2	
2.1 - Porta enxerto de maracujazeiro-azedo com 21 dias de idade	67
2.2 - Porta enxerto de maracujazeiro-azedo fixado com fita adesiva em recipiente tipo Gerbox para a realização da microenxertia..	67
2.3 - Incisão retangular com agulha de seringa hipodérmica em caule de maracujazeiro-azedo para a retirada da epiderme.	67
2.4 - Excisão de ápice caulinar de maracujazeiro-azedo com agulha de seringa hipodérmica.	67
2.5 - Ápice caulinar de maracujazeiro-azedo depositado na abertura do caule	68
2.6 - Decapitação do caule de maracujazeiro-azedo acima do ponto da microenxertia realizado com bisturi..	68
2.7 - Cobertura de planta de maracujazeiro-azedo microenxertada com saco plástico de polietileno..	68
2.8 - Cultivo de plantas microenxertadas de maracujazeiro-azedo em câmara de crescimento com iluminação artificial	68
2.9 - Fotomicrografias ilustrativas da escala de desenvolvimento da microenxertia em maracujazeiro-azedo utilizada na avaliação aos 15 dias	69
2.10 - Fotomicrografias ilustrativas da escala de desenvolvimento das brotações adventícias do porta-enxerto na microenxertia em maracujazeiro-azedo utilizada na avaliação aos 15 dias	69

Figura	Página
2.11 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo com cinco dias com ápice caulinar envolvido por intenso calejamento.	70
2.12 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo com sete dias com início do desenvolvimento do ápice caulinar soldado pelo calejamento . .	70
2.13 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Ápice com crescimento soldado pelo calejamento.	70
2.14 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Microenxerto apresentando desenvolvimento de folha	70
2.15 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Desenvolvimento do microenxerto concomitante às brotações adventícias apicais do porta-enxerto.	71
2.16 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 30 dias. Desenvolvimento do microenxerto com expansão foliar e desenvolvimento do ápice caulinar	71
2.17 - Plantas de maracujazeiro-azedo 30 dias após a microenxertia.	71
2.18 - Planta de maracujazeiro-azedo 90 dias após a microenxertia.	71
2.19 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos sete dias	72
2.20 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos sete dias. Detalhe da junção dos tecidos do ápice e porta-enxerto	72
2.21 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 15 dias.....	72
2.22 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 15 dias. Detalhe da vascularização do ápice . .	72
2.23 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 30 dias.	73
2.24 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 90 dias	73
2.25 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 90 dias. Detalhe da região de soldadura mostrando a conexão vascular.	73

Figura	Página
2.26 - Índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias	74
2.27 - Índice de brotações no porta-enxerto na microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias.....	74
2.28 Percentual de pegamento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias	75
2.29 - Número médio de folhas expandidas na microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias.....	75
2.30 - Índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias	76
2.31 - Índice de brotações no porta-enxerto na microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias.....	76
2.32 - Percentual de pegamento da microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias	77
2.33 - Número médio de folhas expandidas na microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
CAPÍTULO 1	
1.1 – Percentual de explantes vivos, organogênicos e com brotos em função da fonte aos 21 dias de cultivo	37
1.2 - Percentual de explantes vivos em função da fonte aos 42 dias de cultivo	37
1.3 - Percentual de explantes organogênicos em função da fonte aos 42 dias de cultivo	37
1.4 - Percentual de explantes com brotos em função da fonte aos 42 dias de cultivo	38
1.5 - Número médio de brotos por explante em função da fonte aos 42 dias de cultivo	38
CAPÍTULO 2	
2.1 - Correlações entre os parâmetros avaliados no experimento com a microenxertia realizada no hipocótilo em maracujazeiro-azedo	78
2.2 - Correlações entre os parâmetros avaliados no experimento com a microenxertia realizada no epicótilo em maracujazeiro-azedo	78
2.3 - Resumo dos resultados dos experimentos sobre a microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo e epicótilo	78
ANEXOS	
A.1.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes vivos aos 21 dias de cultivo	80
A.1.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes organogênicos aos 21 dias de cultivo	80
A.1.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes com brotos aos 21 dias de cultivo	80

Tabela**Página**

A.1.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo.	80
A.1.5 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2003	81
A.1.6 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2021	81
A.1.7 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2024	81
A.1.8 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2048	81
A.1.9 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo RG .	81
A.1.10 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes organogênicos aos 42 dias de cultivo	82
A.1.11 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes com brotos aos 42 dias de cultivo.	82
A.1.12 – Quadro resumo da análise de variância do número de brotos por explante aos 42 dias de cultivo.	82
B.1.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias.	83
B.1.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de brotações adventícias do porta-enxerto da microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias	83
B.1.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do pegamento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias.	83
B.1.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do número de folhas expandidas na microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias	83

Tabela**Página**

B.2.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias.	84
B.2.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de brotações adventícias do porta-enxerto da microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias	84
B.2.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do pegamento da microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias.	84
B.2.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do número de folhas expandidas na microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias	84
B.3 – Resultado do teste ELISA indireto para detecção do vírus CABMV a partir da leitura do espectrofotômetro com filtro de 405 nm em amostras de folha maracujazeiro-azedo microenxertados	85

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AIA: Ácido 3-indolacético

AIB: Ácido 3-indolbutírico

BAP: 6-Benzilaminopurina

CABMV: *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

CMV: *Cucumis mosaic virus*

CV: Coeficiente de Variação

ELISA: Enzyme Linked Imunosorbent Assay

GA₃: Ácido giberélico

M: Média

MS: Murashige e Skoog

PWV: *Passion fruit woodiness virus*

R²: Coeficiente de Determinação

SAS: Statistical Analysis System

√x: Raiz quadrada de x

RESUMO GERAL

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) é uma das principais frutíferas brasileiras e seu cultivo apresenta boas perspectivas de expansão. O desenvolvimento da cultura tem sido dificultado por doenças, especialmente a doença do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). A eliminação de vírus pela cultura de tecidos tem sido uma alternativa viável para muitas espécies e pode contribuir para a propagação vegetativa de genótipos superiores. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a organogênese in vitro em plantas de maracujazeiro amarelo infectadas com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e avaliar o efeito de meios de cultura utilizados sobre o ponto da enxertia na microenxertia ex vitro visando a eliminação do vírus CABMV. No estudo da organogênese foram avaliados cinco acessos: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) e quatro fontes de explantes: ápice caulinar, segmento internodal, segmento nodal e fragmento foliar. Foi utilizado para indução o meio MS suplementado por 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). O segmento nodal apresentou melhor desempenho no cultivo enquanto os piores resultados foram obtidos com o fragmento foliar. Os acessos apresentaram comportamento semelhante em relação ao percentual de explantes organogênicos e à produção de brotos. Foram observados em cortes histológicos meristemóides em explantes de nó e ápice. No trabalho envolvendo a eliminação de vírus por microenxertia ex vitro, ápices caulinares provenientes de plantas do acesso MAR-2050 infectadas foram microenxertados em plântulas obtidas pela germinação de sementes e cultivadas em substrato comercial em condição de laboratório. Foram conduzidos experimentos com a microenxertia realizada no hipocótilo e no epicótilo e testados cinco meios de cultura como adjuvantes, aplicados no ponto da enxertia. O índice de pegamento médio foi de 27,22 % quando a microenxertia foi realizada no hipocótilo e 32,22 % quando realizada no epicótilo. Na microenxertia realizada no hipocótilo não houve efeito da aplicação de meios de cultura ou reguladores de crescimento. Na microenxertia realizada no epicótilo o meio MS suplementado com 3% de sacarose, 10 mg.L⁻¹ de tiamina; 1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 2 g.L⁻¹ de Phytigel, (meio básico), acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ácido 3-indolbutírico (AIB) e 1 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) proporcionou 53,3% de pegamento e foi superior aos demais tratamentos, com exceção do tratamento meio básico suplementado com 2 mg L⁻¹

de BAP. O mesmo tratamento ocasionou maior desenvolvimento das brotações. O início da formação da conexão vascular entre o explante e o porta-enxerto foi observada aos 15 dias e estava estabelecida aos 30 dias. A indexação realizada pelo teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto aos 80 a 100 dias da microenxertia mostrou que 93 % das plantas testadas não apresentavam vírus detectável.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; microenxertia; eliminação de vírus; organogênese *in vitro*.

ABSTRACT

The sour passion fruit plant (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) is one of the most important Brazilian fruitbearings and its cultivation presents good perspectives of expansion. The culture development has been made more difficult by diseases, specially the fruit hardening disease, caused by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). The virus elimination by tissue culture has been a viable alternative for many species and can contribute to the superior genotypes vegetative propagation. This work was performed with the objective of studying the in vitro organogenesis in yellow passion fruit plants infected with the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and assessing the effect of the culture medium used over the grafting spot in ex vitro micrografting aiming at eliminating the CABMV virus. In the organogenesis study five accessions were evaluated: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) and four sources of explants: cauline apex, internodal segment, nodal segment and foliar fragment. It was used for induction the medium MS supplemented by 2 mg.L^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP). The nodal segment presented the best cultivation performance while the worst results were obtained with the foliar fragment. The accessions presented similar behavior in relation to the percentage of organogenic explants and to the production of shoots. It was observed in histological cuts meristemoids in nodal and apex explants. In the work involving the virus elimination through ex vitro micrografting, stem apexes originated from MAR 2050 accession infected plants were micrografted in seedlings obtained through the germination of seeds and cultivation in commercial substrate under laboratory conditions. Experiments were conducted with the micrografting performed on the hypocotyl and epicotyl. Five culture media were tested as adjuvant, applied at the grafting spot. The average rate of setting was 27.22 % when the micrografting was performed on the hypocotyl and 32.22 % when performed on the epicotyl. The micrografting performed on the hypocotyl showed no effects with the application of culture media or growth regulators. The micrografting performed on the epicotyl and the MS medium supplemented with 3% sucrose, 10 mg.L^{-1} thiamine; 1 mg.L^{-1} pyridoxine; 1 mg.L^{-1} nicotinic acid; 100 mg L^{-1} mio-inositol and 2 gL^{-1} Phytigel, (basic medium), in addition to 0.1 mg.L^{-1} 3-indolbutiric acid (AIB) and 1 mg.L^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP) provided 53.3% setting in the micrografting and was superior to

the other treatments, excepting the basic medium treatment supplemented with 2 mg L⁻¹ BAP. The same treatment provided larger shoots development. The beginning of the vascular connection formation between the participants was observed within 15 days and was established in 30 days. The indexation performed by the ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirect test within 80 to 100 days of the micrografting showed that 93 % of the plants tested did not present detectable virus.

Key words: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; micrografting; virus elimination; *in vitro* organogenesis.

INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia produtiva do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) tem participado de forma crescente no desenvolvimento do setor agrícola brasileiro, contribuindo para geração de empregos nos meios rural e urbano e produzindo divisas por meio das exportações de suco (AGUIAR; SANTOS, 2001). A produção brasileira que apresentava na década de 1990 produções abaixo de 200.000 toneladas, teve grande incremento nos últimos anos alcançando 485.400 toneladas em 2003 (FNP, 2006), o que representa um aumento de 44,7% em relação a 2000 e de 129,9 % em relação à 1992 (AGUIAR; SANTOS, 2001). A área plantada, que 2003 alcançou 34.900 ha, está concentrada principalmente na região nordeste, embora exista produção comercial em praticamente todos os estados do país (FNP, 2006).

O suco de maracujá tem-se mantido em terceiro lugar em produção, atrás apenas dos sucos de laranja e caju (AGUIAR; SANTOS, 2001). A situação mercadológica é considerada favorável, com crescimento da demanda por suco e fruta fresca (AGUIAR; SANTOS, 2001; SABAG et al., 2002; PIRES; MATA, 2004). O Brasil, que é o maior produtor e o maior consumidor mundial da fruta, ainda não produz excedentes exportáveis significativos, sendo inclusive eventual importador de países sul americanos (PIRES; MATA, 2004).

A melhoria do desempenho da cadeia produtiva de maracujá deverá passar pela ampliação e conquista de novos mercados, pela melhoria da produtividade e da qualidade dos produtos e pela redução do custo de produção (AGUIAR; SANTOS, 2001). Um fator que pode contribuir neste sentido é o aprimoramento dos processos de propagação das plantas com a utilização da propagação vegetativa em substituição à propagação por sementes, forma normalmente utilizada nos pomares brasileiros (LIMA; TRINDADE, 2004). A propagação vegetativa facilita a obtenção de plantas mais precoces e produtivas, com alta uniformidade e com frutos de qualidade, a partir da clonagem de matrizes selecionadas (SIQUEIRA; PEREIRA, 2001).

Dentre as limitações à propagação vegetativa por estaquia ou enxertia em maracujazeiro está a disseminação de doenças de etiologia viral (HANWEG, 1999), especialmente a doença do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e anteriormente atribuída ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (NASCIMENTO et al., 2004). A virose, que está disseminada por todo o país, causa sérios problemas à produtividade

e à qualidade dos frutos (KITAJIMA; REZENDE, 2001; ANJOS et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006).

Através da tecnologia da cultura de tecidos é possível, dentre outras, a propagação de clones em larga escala, a obtenção de plantas isentas de vírus, a preservação de germoplasmas e a produção de mudas durante períodos frios (DUVAL et al., 1998; SIQUEIRA; PEREIRA, 2001). Estas possibilidades são especialmente importantes para os programas de melhoramento genético nas fases de preservação e multiplicação de genótipos superiores (FERREIRA et al., 1998; CUNHA et al., 2004b).

A cultura *in vitro* de ápices caulinares e a microenxertia têm possibilitado a eliminação eficiente de vírus em inúmeras culturas (TORRES et al., 1998; PAZ; PASQUAL, 1998). A utilização eficaz destas técnicas em maracujazeiro, no entanto, ainda demanda estudos, uma vez que, alguns trabalhos têm relatado a dificuldade de regeneração de plantas de espécies do gênero *Passiflora* a partir de tecidos adultos (DREW, 1991; BIRICOLTI; CHIARI, 1994; BECERRA et al., 2004). Avaliações do potencial de organogênese de tecidos adultos infectados são importantes neste sentido, considerando a possibilidade de obtenção de plantas livres de vírus a partir do sucultivo de brotações de outros explantes além do ápice caulinar como proposto por Ayabe e Sumi (2001), com a eliminação de vírus pelo subcultivo de explantes caulinares de alho (*Allium sativum* L.).

A microenxertia foi proposta com o objetivo de superar a dificuldade de regeneração de plantas a partir de tecidos adultos de citrus visando a eliminação de viroses (MURASHIGE et al., 1972) e após seu desenvolvimento (NAVARRO et al., 1975) têm sido empregada com sucesso em muitas culturas (NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998). A microenxertia apresenta a significativa vantagem de poder ser adaptada de modo a empregar técnicas simples de assepsia e de cultivo o que favorece a execução e reduz o custo do processo (PAZ; PASQUAL, 1998; OLIVEIRA et al., 2002).

Apesar de muitos trabalhos realizados envolvendo a cultura de células e tecidos de maracujazeiro ainda não existem protocolos desenvolvidos que viabilizem a sua utilização corrente, sendo que, estudos sobre a eliminação de vírus são incipientes (JUNGHANS et al., 2004).

É necessário, o aprofundamento de estudos que venham a contribuir para a ampliação das perspectivas da utilização da tecnologia da cultura de tecidos em favor do desenvolvimento da passicultura.

REVISÃO DE LITERATURA

O maracujazeiro-azedo e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) pertence a família *Passifloraceae* que possui 18 gêneros e cerca de 630 espécies, com ampla distribuição geográfica, sendo a América do Sul o local de origem de pelo menos 95% das espécies (CUNHA et al., 2004a). A planta é uma trepadeira perene, sub-lenhosa de caule cilíndrico e vigoroso. As folhas são trilobadas e as flores axilares, solitárias e hermafroditas, brancas com franja roxa, de aspecto atraente que alcançam até 7 cm de diâmetro (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; CUNHA et al., 2004a). O fruto é uma baga globosa, com 5 a 7,5 cm no maior diâmetro, amarelo quando maduro com pericarpo pouco espesso, contendo numerosas sementes ovais e polpa ácida e aromática, sendo utilizado principalmente para preparo de sucos (CUNHA et al., 2004a).

A Doença do Endurecimento dos Frutos, causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e antigamente atribuída ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (NASCIMENTO et al., 2004) é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro-azedo no Brasil e atualmente está disseminada na maioria das regiões produtoras (KITAJIMA; REZENDE, 2001; BUENO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006). Os sintomas da doença incluem a diminuição do tamanho e a deformação dos frutos associados à bolsas de goma no albedo que se torna espessado. As plantas afetadas têm a produtividade e a vida útil diminuídas (KITAJIMA; REZENDE, 2001; SANTOS FILHO et al., 2004). Kitajima e Rezende (2001) acrescentam entre os sintomas o embolhamento das folhas e reportam a variação dos sintomas dependendo do isolado do vírus.

Nascimento et al. (2006) realizaram trabalho sobre a etiologia da doença do endurecimento frutos em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* no Brasil. Amostras de folhas de maracujazeiro-azedo apresentando sintomas da doença do endurecimento dos frutos foram coletados em sete estados brasileiros e no Distrito Federal e os vírus foram isolados. Todos os isolados foram capazes de infectar várias leguminosas nativas, entretanto, diferenças na severidade dos sintomas foram observados. Sintomas de endurecimento dos frutos foram reproduzidos em maracujazeiro-azedo e sintomas de mosaico foram induzidos em feijoeiro. Todos os isolados infectaram caupi que é reportado como não hospedeiro de PWV e como hospedeiro de CABMV. O teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent Assay)

indicou que todos os isolados eram relacionados entre si e também com CABMV. As seqüências completas das proteínas dos capsídios foram determinadas e comparações indicaram alta relação com CABMV. A análise filogenética indicou que os isolados representam um grupo monofilético relacionado com CABMV e claramente distinto de PWV. Além disto, os testes comprovaram que outros isolados brasileiros previamente classificados como PWV devem ser reclassificados como CABMV, que é o patógeno primariamente responsável pela doença do endurecimento dos frutos no Brasil. Segundo os autores CABMV e PWV são típicos potyvirus transmitidos de forma não circular por várias espécies de afídeos. Suas partículas são flexíveis com 690 a 760 nm de comprimento e 11 a 16 nm de diâmetro e seus genomas são compostos por uma única molécula de fita simples positiva de RNA de aproximadamente 10.000 nucleotídeos.

Cultura de tecidos e eliminação de vírus

Um dos poucos meios para a eliminação de viroses e outros patógenos sistêmicos de plantas infectadas é através da utilização da cultura de tecidos que consiste em um conjunto de técnicas de cultivo asséptico de células, tecidos e órgãos, em meios nutritivos e condições ambientais controladas (TORRES et al., 1998; JUNGHANS et al., 2004). A eliminação de patógenos, especialmente vírus, é considerada uma das principais utilidades da cultura de tecidos (DUVAL et al., 1998; SIQUEIRA; PEREIRA, 2001; JUNGHANS et al., 2004).

Vários trabalhos têm sido realizados com o cultivo in vitro de espécies do gênero *Passiflora* com objetivos como conservação de germoplasma (JUNGHANS et al., 2002; GONÇALVES et al., 2004; VIDAL et al., 2004), estudos sobre a organogênese (DORNELAS; VIEIRA, 1993; BIASI et al., 2000; ALEXANDRE, 2002; LOMBARDI, 2003, BECERRA et al., 2004; FERNANDO, 2005), micropropagação (KANTHARAJAH; DODD, 1990; FARIA; SEGURA, 1997), hibridização somática (VAZ et al., 1993; DORNELAS; VIEIRA, 1993; DORNELAS et al., 1995; OTONI et al., 1995a; OTONI et al., 1995b) e transformação genética (MANDERS et al., 1994; ALFENAS et al., 2005).

Os métodos visando a eliminação de vírus em plantas diversas incluem cultura de ápices caulinares, microenxertia, termoterapia, quimioterapia, crioterapia ou a combinação desses, (HANWEG, 1999). A técnica de cultivo in vitro mais utilizada com esta finalidade é o cultivo de meristemas ou ápices caulinares (PARMESSUR et al., 2002), especialmente para espécies herbáceas (HANWEG, 1999). O meristema apical consiste na região meristemática apical ou domo meristemático, com no máximo 0,1 mm de comprimento, desprovida de primórdios

foliares e o ápice caulinar consiste no meristema apical com primórdios foliares subjacentes e, em algumas situações, com as folhas emergentes, sendo que seu tamanho pode variar de 0,3 a 20 mm (TORRES et al., 1998).

A adequação do cultivo da região apical para a eliminação de vírus é devido a menor distribuição dos patógenos em porções jovens e avascularizadas das plantas e sua dificuldade de multiplicação nestas regiões (NAVARRO et al., 1975; TORRES et al., 1998). Outras possibilidades para explicar a eliminação de vírus pela cultura de tecidos seriam alterações metabólicas desfavoráveis ao patógeno decorrentes da injúria dos tecidos excisados e efeitos deletérios de reguladores de crescimento utilizados como indutores da organogênese (TORRES et al., 1998). A tendência de distribuição desigual de vírus ao longo dos órgãos das plantas foi verificado em maracujazeiro por Gioria et al. (2002), que trabalhando com *Cucumis mosaic virus* (CMV) em *P. edulis* f. *flavicarpa* constataram que existe limitação da disseminação do vírus para as partes jovens da planta. Os autores constataram presença de vírus em folhas basais sintomáticas e ausência em folhas apicais assintomáticas em plantas estabelecidas no campo. Plantas com um ano de idade, obtidas por estaquia a partir plantas doentes, também apresentaram sintomas e vírus detectável em folhas basais e ausência de sintomas e vírus detectável em folhas apicais.

O sucesso da aplicação da técnica de eliminação de patógenos via cultura de ápices caulinares está condicionado à obtenção de explantes apicais pequenos e avascularizados, portanto previamente livres do patógeno, sendo recomendado a utilização de explantes entre 0,1 a 0,3 mm (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 1998) ou 0,2 a 1 mm (HANWEG, 1999). Normalmente a utilização de explantes maiores que 1 mm resultam em plantas contaminadas (PARMESSUR et al., 2002). A pequena dimensão e o desbalanço hormonal na região acarretam grande dificuldade de obtenção do explante e na regeneração das plantas, tendo sido estas apontadas como limitações da técnica (TORRES et al., 1998; PARMESSUR et al., 2002), especialmente para espécies lenhosas (NAVARRO, 1988; HANWEG, 1999). Normalmente os índices de sucesso são baixos e o processo é trabalhoso e lento (AYABE; SUMI, 2001). Em maracujazeiro, uma dificuldade adicional é a baixa propensão ao cultivo dos tecidos adultos, que é considerada por Drew (1991), um dos principais empecilhos à eliminação de vírus via cultivo de ápices caulinares. Alguns trabalhos têm relatado o sucesso na obtenção de plântulas a partir de tecidos apicais jovens de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Faria e Segura (1997) obtiveram regeneração a partir de ápices caulinares de plantas com 40 dias de idade, Junghans et al. (2002) de plantas com 13 dias e Vidal et al.

(2004) de plantas com 20 dias, porém regeneração a partir do cultivo in vitro de ápices caulinares de plantas adultas não tem sido relatado em espécies de *Passiflora*.

Biricolti e Chiari (1994), utilizando meristemas de 0,2 a 0,4 mm de comprimento, com no máximo quatro primórdios foliares, coletados de plantas com um ano de idade não obtiveram regeneração apesar da sobrevivência dos explantes por longo período. Esta situação é de ocorrência comum em espécies lenhosas e semi-lenhosas (MURASHIGE et al., 1972; NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998; MNENEY; MANTELL, 2001).

Torres et al. (1998) sugerem a utilização concomitante de técnicas como estiolamento das plantas matrizes, termoterapia ou quimioterapia como forma de otimizar a obtenção de plantas livres de vírus. Ayabe & Sumi (2001) comprovaram que o subcultivo de regiões meristemáticas não vascularizadas, obtidas da organogênese a partir de segmentos caulinares de alho (*Allium sativum* L.), resultaram em plantas livres de vírus e a técnica é proposta pelos autores como uma alternativa à cultura de meristemas apicais adultos.

Microenxertia

A microenxertia é considerada como a mais eficiente técnica na superação da dificuldade no cultivo de ápices caulinares de plantas adultas visando a eliminação de vírus (NAVARRO, 1988; HANWEG 1999; PAZ; PASQUAL, 1998). A técnica consiste em se enxertar ápices caulinares das plantas a serem propagadas em caules de porta-enxertos jovens, normalmente com duas a quatro semanas de idade, cultivados in vitro (PAZ; PASQUAL, 1998). A metodologia foi descrita por Murashige et al. (1972) visando a eliminação de viroses em citrus. Nos experimentos iniciais foram utilizados ápices caulinares com 4 a 6 primórdios foliares e a microenxertia foi realizada apicalmente no epicótilo de plântulas com três semanas de idade cultivadas no escuro. Foi utilizado vermiculita esterilizada como substrato para a germinação das sementes e meio líquido de Hoagland com ponte de papel para o cultivo das plantas microenxertadas. Foram realizados subcultivos mensais e as microenxertias viáveis foram transferidas aos cinco meses para o solo. A indexação foi realizada por meio de sintomatologia e plantas indicadoras e o nível de pegamento variou de 5% a 40%.

Navarro et al. (1975), trabalhando com citrus, estabeleceram a metodologia clássica da microenxertia visando a eliminação de patógenos sistêmicos. Segundo esta metodologia o porta-enxerto é obtido através da germinação de sementes e manutenção das plântulas in vitro, em meio líquido, na ausência de luz. Os ápices são retirados a partir de plantas

preferencialmente desenvolvidas em casa de vegetação. A microenxertia é realizada com a retirada do porta-enxerto do tubo de ensaio seguido da decapitação do mesmo e da excisão dos cotilédones. É feita uma incisão em forma de “T” invertido no caule do porta enxerto onde é colocado o ápice em contato com o córtex. O ápice deve possuir 0,15 a 0,2 mm de comprimento e dois a três primórdios foliares. Em seguida o porta enxerto é reconduzido à condição in vitro, em meio líquido, com iluminação. Após o desenvolvimento de 2 a 3 folhas expandidas as plantas são transferidas para o solo. Os autores conseguiram índices próximos à 50% de pegamento em citrus. Estes procedimentos, com algumas variações, passaram a ser amplamente utilizados, tendo se mostrado eficiente para a eliminação de viroses em várias culturas (NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998).

Seguindo esta metodologia e utilizando ápices com 0,2 a 0,4 mm com, no máximo, quatro primórdios foliares, Biricolti e Chiari (1994) obtiveram 50% de pegamento nas microenxertias realizadas em plantas de *P. edulis* f. *edulis*. Os autores descrevem aparecimento de calejamento em todas as plantas cinco dias após a microenxertia e uma pequena folha se desenvolveu em duas semanas. Trinta dias após a microenxertia brotos bem desenvolvidos se originaram e as plantas foram retiradas do meio de cultura e transferidas para solo em casa de vegetação, inicialmente em condição de alta umidade e depois para o ar aberto.

Com o desenvolvimento, adaptação e disseminação da técnica a microenxertia tem sido usada também com finalidades diversas como rejuvenescimento de clones de plantas adultas (NAVARRO, 1988; MNENEY; MANTELL, 2001; DANTHU et al., 2002), eliminação de patógenos sistêmicos diversos (NAVARRO, 1988; LESSA, 1998; SUAREZ et al. 2005), diagnose de infecções virais (PATHIRANA; MCKENZIE, 2005), regeneração de plantas a partir de embriogênese somática (RAHARJO; LITZ, 2005), regeneração de plantas a partir da transformação genética (DE PASQUALE et al., 1999; RAHARJO; LITZ, 2005), estudo de compatibilidade genética (ESTRADA-LUNA et al., 2002; RAHARJO; LITZ, 2005), estudos anatômicos da junção dos tecidos e vascularização (ESTRADA-LUNA et al.; 2002).

Visando contornar a dificuldade de enraizamento de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), Luo e Gould (1999) adaptaram a técnica de microenxertia com o uso de explantes microenxertados em plântulas oriundas de semente germinadas in vitro. Enquanto o enraizamento in vitro apresentou níveis de 30 a 80% de sucesso a microenxertia proporcionou até 100% de pegamento, sendo mais eficiente que a indução hormonal.

Oliveira et al. (2002) utilizaram em citrus a metodologia básica da microenxertia adaptada de modo a empregar procedimentos simples de assepsia e de cultivo o que favorece

a execução e reduz o custo do processo. Neste caso é eliminado o uso de meios de cultura para a obtenção dos porta-enxertos, utilizando-se para tal substratos destinados à produção de mudas, previamente esterilizados. Os autores, utilizando este processo, conseguiram índices de pegamento de 34 a 79% dependendo da combinação de genótipos doadores de ápices e porta-enxertos em citrus. A metodologia da microenxertia *ex vitro* têm sido usada com sucesso em culturas como abacateiro (*Persea americana*) (RAHARJO; LITZ, 2005) e citrus (OLIVEIRA et al., 2002) e foi considerada por Navarro (1988) como alternativa para a obtenção de plantas livres de vírus em locais onde a cultura de tecidos não seja viável.

Como forma de aperfeiçoamento da técnica de microenxertia *ex vitro*, Paz e Pasqual (1998) relatam que a utilização de adjuvantes, que consistem em meios de cultura e incluindo fitorreguladores, usados previamente ou aplicados na região da enxertia, podem melhorar os índices de pegamento. Estudos realizados em citrus por Jeffrey e Yeoman (1983) demonstraram o efeito da utilização no ponto da enxertia de meios de cultura contendo o regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP). Starrantino e Caruso (1988) constataram que a deposição prévia de ápices caulinares em solução do fitorregulador BAP aumentou o potencial regenerativo dos tecidos contribuindo para o incremento do índice de pegamento da microenxertia em citrus. Nunes et al. (2005) realizaram trabalho com objetivo de avaliar o efeito dos fitorreguladores ácido 3-indolbutírico (AIB) e BAP, em combinações de variedades copa e porta-enxerto na microenxertia a partir de explantes obtidos por micropropagação em macieira (*Malus spp*). Os autores constataram que o fitoregulador AIB utilizado no meio de cultivo ou aplicado no ponto de enxertia promoveram maior desenvolvimento dos microenxertos.

Meios de Cultivo

O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é universalmente empregado no cultivo de grande quantidade de espécies (CALDAS et al., 1998), é o meio básico normalmente utilizado para as espécies do gênero *Passiflora* (JUNGHANS et al., 2002). Em estudos com protoplastos de *P. edulis f. flavicarpa*, Vaz et al., (1993) concluíram que o meio B5 com várias combinações de reguladores de crescimento e vitaminas não possibilitaram a regeneração que foi obtida no meio MS, acrescido de reguladores de crescimento e vitaminas. Para estudos sobre a regeneração de sete espécies do gênero *Passiflora*, Drew (1991) não obteve crescimento com a utilização do meio H e obteve plântulas de todas as espécies no meio MS acrescido de reguladores de crescimento. Guzzo et al. (2004) utilizaram o meio MS

com reguladores de crescimento como meio inicial e o meio B5 com reguladores de crescimento em seqüência visando o desenvolvimento de brotos em 29 espécies de *Passiflora* e concluiu que o meio MS possibilitou o desenvolvimento de brotos em todas as espécies, porém a regeneração completa só ocorreu em 13 espécies.

Alguns trabalhos têm relatado o efeito da sacarose ao meio de cultivo. Dornelas e Vieira (1993) sugerem a utilização de 3% de sacarose no meio para a indução de calejamento em *P. edulis var. flavicarpa*; *P. amethystina* e *P. cincinnata*, com a redução para 1,5% no meio de enraizamento. Para a regeneração de protoplastos de *Passiflora spp.*, Dornelas et al. (1995), sugerem a utilização de 3% de sacarose no meio inicial e supressão de sacarose no meio de enraizamento. Esta conduta tem sido adotada em trabalhos com *P. edulis var. flavicarpa* (OTONI et al., 1995a; FARIA; SEGURA, 1997; BECERRA et al., 2004). Alexandre (2002) testou 4 níveis de sacarose (0, 1%, 2% e 3%) e obteve o melhor resultado para o cultivo de ápices caulinares de *P. edulis f. flavicarpa* com a utilização de 3% de sacarose no meio.

Existem relatos de casos de dependência de reguladores de crescimento para a regeneração de plantas do gênero *Passiflora*. Para a regeneração de discos foliares de *P. suberosa*, Monteiro et al. (2000), constataram a dependência do fitorregulador BAP para a organogênese que não ocorreu em sua ausência. Mesmo resultado foi obtido por Lombardi (2003) trabalhando com *P. cincinnata*. Para *P. edulis var. flavicarpa*, Junghans et al (2002), Gonçalves et al. (2004) e Vidal et al. (2004) em trabalhos sobre a conservação in vitro demonstraram ser possível a organogênese e cultivo em meios sem reguladores de crescimento.

Faria e Segura (1997) comprovaram a efetividade do regulador BAP no meio inicial para cultivo de gemas axilares de *P. edulis var. flavicarpa* sem contudo encontrarem efeitos das doses entre 2, 5 e 20 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Outra conclusão foi que o regulador ácido 3-indolacético (AIA) não foi efetivo na indução do enraizamento. Para a mesma espécie, Biase et al. (2000), utilizando segmentos internodais concluíram que os melhores níveis de BAP foram: 1,3 mg.L^{-1} para o meio inicial (98% de explantes com brotos); 2,1 mg.L^{-1} para desenvolvimento dos brotos; 1,0 mg.L^{-1} para a expansão foliar, sendo que, houve inibição com o uso de concentrações maiores. O enraizamento e o alongamento das raízes foi conseguido em meios sem reguladores de crescimento. Também em estudo com *P. edulis f. flavicarpa* e utilizando tecidos cotiledonares como explantes, Ribas et al. (2002) constataram a superioridade do efeito da dose de 2,0 mg.L^{-1} sobre 1,0 mg.L^{-1} de BAP no meio inicial.

Vários trabalhos têm contribuído para a proposição da formulação de meios de cultura para espécies de *Passiflora* em relação ao uso de vitaminas e aminoácidos adicionados ao

meio de cultivo. Em trabalho com regeneração a partir de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Vaz et al., obtiveram resultados favoráveis com a adição ao meio MS de cisteína (50 mg.L⁻¹); glutamina (50 mg.L⁻¹); ácido glutâmico (50 mg.L⁻¹); biotina (0,5 mg.L⁻¹) e ácido fólico (0,5 mg.L⁻¹). Para a regeneração a partir de protoplastos de *P. coccínea*, Otoni et al. (1995) utilizaram com sucesso o meio MS suplementado com tiamina.HCl (0,2 mg.L⁻¹); piridoxina (1,0 mg.L⁻¹); ácido nicotínico (1,0 mg.L⁻¹); cisteína (50 mg.L⁻¹); glutamina (50 mg.L⁻¹); biotina (0,5 mg.L⁻¹) e ácido fólico (0,5 mg.L⁻¹).

Utilizando explantes cotiledonares de *P. edulis* var. *flavicarpa*, Ribas et al. (2002), concluíram sobre a efetividade da suplementação do meio MS com vitaminas. Os autores obtiveram maiores índices de explantes com brotos (78,4% contra 51,7%) e maior enraizamento dos explantes (93% de explantes com raízes contra 80%) com a substituição das vitaminas do meio MS pelas vitaminas do meio B5, que possui concentração de tiamina 100 vezes maior e de piridoxina 2 vezes maior. Alfenas et al. (2005), optaram pela suplementação do meio MS com 100 mg.L⁻¹ do conjunto das vitaminas do meio B5 em trabalho visando a obtenção de plantas transgênicas de *Passiflora* spp. .

As pesquisas realizadas com maracujazeiro até o presente ainda não permitiram a utilização corrente das técnicas da cultura de tecidos na micropropagação e na eliminação de vírus (JUNGHANS et al., 2004). Neste sentido novos estudos são necessários e poderão contribuir para o desenvolvimento da passicultura .

OBJETIVO GERAL

Estudar a micropropagação de plantas de maracujazeiro-azedo infectadas pelo CABMV através da utilização das técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro considerando aspectos relacionados à eliminação do vírus.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes órgãos como fontes de explantes e de diferentes acessos na organogênese in vitro a partir de tecidos de maracujazeiro-azedo amarelo infectados pelo vírus CABMV.

Desenvolver protocolo básico para a microenxertia ex vitro em maracujazeiro-azedo envolvendo o teste do efeito da aplicação do meio de cultura MS e dos reguladores de crescimento AIB e BAP como adjuvantes na microenxertia e a avaliação da eficiência do método na eliminação do vírus CABMV de plantas infectadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. R. D.; SANTOS, C. C. F. Importância econômica e mercado. In: BRUCNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 9-49.

ALEXANDRE, R. S. **Germinação in vitro e organogênese em explantes do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S. do; CARVALHO, M. G de; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 33-38, 2005.

ANJOS, J. R. dos; JUNQUEIRA, N. T.; CHARCHAR, M. J. A. Levantamento do *passion fruit woodiness virus* em maracujazeiro-azedo no cerrado do Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém:SBF, 2002. 1 CD-ROM.

AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 20, p. 503-507, 2001.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 79, p. 87-90, 2004.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, Viale delle Idee, v.8, n. 3, 171-175, 1994.

BUENO, P. A. de O.; MIRANDA, H. A.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SOUZA, M. A. de F.; PIRES, M de C. Incidência e severidade de *passionfruit woodiness virus* (PWV) em 50 genótipos de maracujazeiro azedo, sob condições de campo do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBF, 2004. 1 CD-ROM.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARVALHO-OKANO, R. M. de; VIEIRA, M. F. Morfologia externa e taxonomia. In: BRUCNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 33-49.

CUNHA, M. A. P. da; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Botânica. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004a. p.15-35.

CUNHA, M. A. P. da; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Melhoramento Genético. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004b. p.69-93.

DANTHU, P.; HANE, B.; SAGNA, P.; GASSAMA, Y.K. Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree, through serial root sucker micrografting. **New Forests**, Netherlands, v. 24, p. 239-244, 2002.

DE PASQUALE, F.; GIUFFRIDA, S.; CARIMI, F. Minigrafting of shoots, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of in vitro citrus regenerants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 152-157, 1999.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. Amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 103-106, 1993.

DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; OLIVIERA, J. C. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 106-110, 1995.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explant of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 26, p. 23-27, 1991.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ; CBAB, 1998. v. 1, p. 45-68.

ESTRADA-LUNA, A.A.; LÓPEZ-PERALTA, C. CÁRDENAS-SORIANO, E. In vitro micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 92, p. 317-327, 2002.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, p. 1276-1277, 1997.

FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** 2005. 106 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ; CBAB, 1998. v. 1, p. 21-43.

FNP. **Agrianual 2006-Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP - Consultorias & Agroinformativos, 2006. p. 394-395.

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

GONÇALVES, K. S.; JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da S. **Efeito residual do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* do maracujazeiro amarelo**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBF, 2004. 1 CD-ROM.

GRATTAPAGLIA D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.

HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. **Neltropica Bulletin**, Nelspruit, n. 304, p. 7-8, 1999.

JEFFRE, C.E.; YEOMAN, M.M. Development of intercellular connections between opposing cells in graft unions. **New Phytologist**, Sheffield, v. 93, p. 491-509, 1983.

JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A da S. **Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém:SBF, 2002. 1 CD-ROM.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; KOBAYASHI, A. K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 97-106.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, p. 337-339, 1990.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: BRUCNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 85-137.

LESSA A. O. **Utilização de microenxertia para obtenção de plantas de *Malus domestica* Borkh livres do vírus da mancha clorótica das folhas da macieira**. 1998. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas, 1998.

LIMA, A. de A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p.109-116.

LOMBARDI, S. P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

LUO, J.; GOULD, J. H. In vitro shot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, V. 57, p. 211-213, 1999.

MANDERS, G.; OTONI, W. C.; d'UTRA VAZ, F. B.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13. p. 697-702, 1994.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. In vitro micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, V. 66, p. 49-58, 2001.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 571-573, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting an its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **Hortscience**, Alexandria, v.7, p. 118-119, 1972.

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

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. MURILO. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Viena, v. 161, p. 21-34, 2006.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, p. 471-479, 1975.

NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody espécies. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227, p. 43-55, 1988.

NUNES, J. C. O.; ABREU, M. F.de, DANTAS, A. C. de M. Morphologic characterization in apple micrografts. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas,v. 27, p.80-83. 2005.

OLIVEIRA, I. V. M, DAMIÃO FILHO, C. F., CARVALHO, S. A. de. Enxertia em citrus por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 744-747, 2002.

OTONI, W. C.; BLACKHALL, F. B.; d'UTRA VAZ, F. B.; Casali, V. W.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. flavicarpa Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 777-785, 1995a.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, p. 461-468, 1995b.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUMTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 561-566. 2002.

PATHIRANA R.; MCKENZIE M. J. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using in vitro micrografting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 81, p.11-18, 2005.

PAZ, O. P. da; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 147-159.

PIRES, M. de M.; MATA, H. T. da C. Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 325-343.

RAHARJO S. H.T.; LITZ R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 82, p.1-9, 2005.

RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 237-241, 2002.

SABBAG, O. J.; TARSITANO, M. A. A.; CORRÊA, L. de S. **Análise da produção e comercialização do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) no mercado brasileiro**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém:SBF, 2002. 1 CD-ROM.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. dos; BARBOSA, C. de J. Doenças do maracujazeiro . In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-280.

SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, W. E. Propagação . In: BRUCNER, C. H.; PIKANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 85-137.

STARRANTINO, A.; CARUSO, A. The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227, p. 101-103, 1988.

SUAREZ, I. E.; SCHNELL, R. A.; KUHN, D. N.; LITZ, R. E. Micrografting of ASBDD-infected Avocado (*Persea americana*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 80, p. 179-185, 2005.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 133-145.

VAZ, F. B. d'U; SANTOS, A. V. P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, p. 220-225, 1993.

VIDAL, A. M.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. **Estabelecimento *in vitro* de maracujazeiro amarelo, acesso BGM 39**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBF, 2004. 1 CD-ROM.

CAPÍTULO I

ORGANOGENESE IN VITRO EM ACESSOS DE MARACUJAZEIRO-
AZEDO INFECTADOS PELO *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC*
VIRUS

ORGANOGÊNESE *IN VITRO* EM ACESSOS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO INFECTADOS PELO *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS*

RESUMO: O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a organogênese *in vitro* de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) infectadas com o vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Foram avaliados cinco acessos: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) e quatro fontes de explantes: ápice caulinar, segmento internodal, segmento nodal e fragmento foliar. Foi utilizado para indução o meio MS suplementado por 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições, em esquema fatorial 5x4, totalizando 20 tratamentos, com cada parcela constituída por um frasco com quatro explantes. Os acessos apresentaram comportamento semelhante em relação ao percentual de explantes organogênicos e à produção de brotos. O segmento nodal apresentou melhor desempenho no cultivo, com produção de maior número de brotações, enquanto os piores resultados foram obtidos o fragmento foliar, que não produziu brotações. O segmento nodal apresentou organogênese pelas vias direta e indireta enquanto que explantes apicais apresentaram organogênese direta e explantes caulinares apresentaram organogênese indireta. Foram observadas em cortes histológicos meristemóides em explantes de nó e ápice.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; organogênese *in vitro*; CABMV.

IN VITRO* ORGANOGENESIS IN SOUR PASSION FRUIT ACCESSIONS INFECTED BY *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS

ABSTRACT: The present work was performed with objective to determinate in vitro organogenesis from yellow passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) infected by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Five accessions were evaluated: MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048, Rubi Gigante (RG) and four sources of explants: cauline apex, internodal segment, nodal segment and foliar fragment. It was used for the induction the medium MS supplemented with 2 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). The experiment was carried out in a completely randomized design (CRD), with 5x4 factorial layout, in all 20 treatments, with each plot consisting of one bottle with four explants. The accession presented same behavior in relation to percentage of organogenic explants and shoot production. The nodal segmented presented better cultivation performance, with a greater number of shoots production and the worst results were obtained with the foliar fragment what didn't produce shoots. The nodal segment presented direct and indirect organogenesis, the cauline apex presented direct organogenesis and internodal segment presented indirect organogenesis. Meristemoids were observed in histological cuts in nodal and cauline apex explants.

Key words: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; in vitro organogenesis, CABMV.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg, é uma das principais frutíferas brasileiras e a cadeia produtiva tem sido importante na criação de empregos nos meios rural e urbano e na geração de divisas por meio das exportações de suco (PIRES; MATA, 2004). A cultura ocupou no Brasil a área de 34.900 ha em 2003 havendo produção comercial em praticamente todos os estados (FNP, 2006).

Um dos principais problemas enfrentados pelos passicultores são as doenças de etiologia viral (HANWEG, 1999), especialmente a doença do endurecimento dos frutos, causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (KITAJIMA; REZENDE, 2001; BUENO et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2006). Esta virose está disseminada por todo o país e causa sérias limitações à produtividade e à qualidade dos frutos além de inviabilizar a utilização da propagação vegetativa (KITAJIMA; REZENDE, 2001; ANJOS et al., 2002).

A principal alternativa para a eliminação de vírus de plantas é a utilização de técnicas de cultura de tecidos, por meio do cultivo ou sub-cultivo in vitro de tecidos meristemáticos e não vascularizados devido a menor distribuição do patógeno e sua dificuldade de multiplicação nestas regiões (TORRES et al., 1998; AYABE; SUMI, 2001). A pequena dimensão e o desbalanço hormonal na região de cultivo acarretam, normalmente, grande dificuldade de obtenção do explante e na regeneração das plantas, (TORRES et al., 1998; PARMESSUR et al., 2002), sendo necessários estudos para viabilizar a utilização da técnica para cada espécie ou variedade (TORRES et al., 1998).

Vários trabalhos têm sido realizados com a cultura de tecidos de espécies do gênero *Passiflora* com objetivos como conservação de germoplasma (JUNGHANS et al., 2002, 2004; VIDAL et al., 2004), estudos sobre a organogênese (DORNELAS; VIEIRA, 1993; BIASI et al., 2000; LOMBARDI, 2003; BECERRA, 2004; FERNANDO, 2005), micropropagação (KANTHARAJAH; DODD, 1990; FARIA; SEGURA, 1997), hibridização somática (VAZ et al., 1993; DORNELAS; VIEIRA, 1993; DORNELAS et al., 1995) e transformação genética (MANDERS et al., 1994; ALFENAS et al., 2005).

Segundo Torres et al. (1998), entre os fatores que afetam a obtenção de plantas a partir do cultivo in vitro destacam-se a natureza genética do material e o órgão utilizado como fonte de material de cultivo. Foram encontradas diferenças significativas no desenvolvimento *in vitro* entre várias espécies de *Passiflora* (DREW, 1991; DORNELAS; VIEIRA, 1993). Não

existem relatos de estudos que avaliem o efeito genético na organogênese dentro da espécie *P. edulis*.

Diferentes tecidos têm sido usados como explantes, em espécies do gênero *Passiflora*: discos foliares (VAZ et al., 1993; MANDERS et al., 1994); segmentos nodais (KANTHARAJAH; DODD, 1990); gemas axilares (FARIA; SEGURA, 1997); ápices caulinares (JUNGHANS et al, 2002; VIDAL et al., 2004); tecidos cotiledonares, tecidos foliares e tecidos hipocotiledonares (DORNELAS; VIEIRA, 1994); segmentos radiculares, discos foliares e plântula inteira (LOMBARDI, 2003) e entrenós e segmentos de gavinha (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O tecido mais adequado para a utilização visando a eliminação de vírus, o ápice caulinar, se mostrou refratário à regeneração a partir de plantas adultas em *P. edulis* f. *edulis* (BIRICOLTI; CHIARI, 1994) o que sugere a necessidade da busca alternativas como a proposta por Ayabe e Sumi (2001) que conseguiram a eliminação de vírus em alho (*Allium sativum* L.) através do subcultivo de regiões meristemáticas anteriores ao estágio de gema, ou meristemóides, obtidos de explantes caulinares. Neste sentido é relevante o estudo da produção de meristemóides em maracujazeiro a partir de diferentes fontes de explantes.

A sanidade da planta é também um fator determinante na capacidade de organogênese (TORRES et al., 1998) bem como a ação diferenciada do patógeno nos diferentes órgãos da planta (GIORIA et al. 2002) tornando-se importante a avaliação do potencial organogenético de diferentes fontes de explantes sob infecção.

Apesar da existência de vários trabalhos envolvendo a cultura de células e tecidos de maracujazeiro ainda não existem protocolos desenvolvidos que viabilizem a sua utilização corrente (JUNGHANS et al., 2004) sendo que, estudos sobre a eliminação de vírus são ainda incipientes (HANWEG, 1999; JUNGHANS et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar histologicamente a organogênese in vitro de plantas infectadas pelo vírus CABMV e avaliar o efeito da utilização de diferentes órgãos e acessos como fonte de material de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) de cinco acessos, MAR-2003, MAR-2021, MAR-2024, MAR-2048 e Rubi Gigante (RG), foram utilizadas como material de cultivo. Os acessos foram obtidos a partir de seleções em populações utilizadas comercialmente no Triângulo Mineiro e Distrito Federal e encontravam-se estabelecidas em casa de vegetação na Estação Biológica da Universidade de Brasília, em Brasília-DF. As mudas, com dois meses de idade, foram inoculadas com o vírus CABMV e dois meses após, foram avaliadas por sintomatologia, sendo constatados 100% de incidência e nível de 2,6 de severidade (TEMPESTA JUNIOR et al., 2002; BUENO et al., 2004; ALFENAS et al., 2005). Foi realizado o teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto (ALMEIDA, 2001) e as plantas foram diagnosticadas como positivas para o vírus CABMV.

Quando as plantas estavam com sete meses de idade, foram retirados ramos apicais com aproximadamente três segmentos nodais que foram conduzidos ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de Brasília, onde foram submetidos ao processo de desinfestação, utilizando-se imersão em álcool 70% por 40 segundos, seguida de lavagem com água destilada e autoclavada e posterior imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos e seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por cinco minutos cada (VIDAL et al., 2004).

Com auxílio de um bisturi, foram retirados dos ramos quatro diferentes tipos de explantes: ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento); segmento internodal adjacente ao ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento); segmento nodal adjacente ao ápice caulinar (aproximadamente 2 mm de comprimento); tecido foliar da menor folha apical que permitiu a obtenção de um quadrado de aproximadamente 3 mm de lado da lâmina foliar, excluindo-se a nervura central.

Os explantes foram transferidos, em câmara de fluxo laminar e condições assépticas, para frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 50 ml de meio de cultura composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de 3% de sacarose; 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); 10 mg.L⁻¹ de tiamina; 1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico (RIBAS et al., 2002), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 2,7 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma), com pH ajustado para 5,8. Cada frasco recebeu quatro explantes do mesmo tipo quanto ao órgão de origem e oriundos do mesmo acesso. O material foi encaminhado para

incubação em câmara de crescimento sob temperatura de 25° C e fotoperíodo de 16 horas de luz com nível de irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 21 dias de cultivo os explantes viáveis foram transferidos, nas mesmas condições citadas, para outro meio de cultura, contendo sais MS adicionado de 2% de sacarose; 10 mg.L^{-1} de tiamina; 1 mg.L^{-1} de piridoxina; 1 mg.L^{-1} de ácido nicotínico; 100 mg.L^{-1} de mio-inositol; 2,7 g.L^{-1} de Phytigel (Sigma), com pH ajustado para 5,8. Foram realizadas as seguintes avaliações: número de explantes vivos, explantes organogênicos e explantes com brotos aos 21 dias de cultivo; e estas mesmas avaliações acrescentadas de número de brotos por explante aos 42 dias de cultivo. Foram considerados organogênicos os explantes que apresentassem formação de calo e ou tecidos meristemáticos e brotos ou desenvolvimento das regiões meristemáticas que apresentassem expansão foliar.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 4, totalizando 20 tratamentos, cada um representado por um acesso e um órgão fonte do explante. Foram utilizadas 10 repetições e cada parcela foi constituída por um frasco com quatro explantes, totalizando 200 frascos e 800 explantes. Os dados coletados foram transformados em percentuais, com exceção do número de brotos por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando constatada a significância pelo teste F, por meio do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1990), o efeito dos tratamentos foi submetido ao teste Tukey, utilizando a transformação dos dados no modelo \sqrt{x} para as comparações.

Paralelamente foi constituída uma repetição adicional de cada um dos tratamentos sendo os explantes retirados do cultivo aos 15 e aos 30 dias para realização de cortes e análise histológica. As amostras foram fixadas em FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940) durante 72 horas e preservadas em álcool etílico 50%. Foram realizados cortes longitudinais em micrótomo de mesa. As secções foram coradas com safranina e azul de astra e confeccionadas lâminas semi-permanentes em glicerina 50 (KRAUS; ARDUIM, 1997). Utilizando-se microscópio ótico foram realizadas observações e descrição das estruturas anatômicas relacionadas à organogênese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada contaminação microbiana no material de cultivo. A partir do terceiro dia, ocorreu progressivo intumescimento da maioria dos explantes de todos os tratamentos, acompanhado pelo clareamento da coloração verde original. O intumescimento ocorreu de forma predominante em regiões distintas de acordo com a fonte do explante. Nos ápices caulinares, ocorreu principalmente nos primórdios foliares; no nó, concentrou-se na gema lateral; no caule, principalmente nas regiões de abscisão e nos segmentos foliares, em todo o explante. A partir de uma semana de cultivo já era possível observar, a olho nu, em muitos explantes o desenvolvimento das regiões que sofreram o intumescimento inicial. A maioria dos explantes de ápice apresentou crescimento dos primórdios foliares seguido da expansão foliar e pequeno calejamento na região da excisão (Fig. 1.1.a). Nos explantes de nó foi observado desenvolvimento da gema lateral concomitante a um intenso calejamento nas regiões apical e basal de abscisão (Fig. 1.1.b), enquanto que, em explantes de caule houve formação de calos nas regiões apical e ou basal de excisão (Fig. 1.1.c). Poucos explantes de folha desenvolveram calos visíveis a olho nu, apesar de, a maioria ter apresentado intumescimento dos tecidos (Fig. 1.1.d). A partir da primeira semana de cultivo, alguns explantes, em todos os tratamentos, apresentaram clorose que, na maioria dos casos, evoluiu para necrose progressiva dos tecidos os quais passaram a apresentar partes com coloração palha ou amarronzada resultando em morte dos explantes.

Não houve interação entre os efeitos do acesso e da fonte de explante para o parâmetro sobrevivência dos explantes aos 21 dias. Não houve efeito significativo dos acessos. Foi observada diferença estatística para o efeito da fonte de explante. Explantes originados do nó e do ápice, apresentaram maior sobrevivência que explantes de folha. A média de sobrevivência dos explantes entre os acessos foi de 89,9 % (Tab. 1.1).

Os acessos apresentaram média de 69,4 % de explantes organogênicos e não diferiram estatisticamente. As fontes provenientes do ápice e do nó apresentaram mesmo nível de explantes organogênicos. O caule apresentou nível intermediário e os explantes de folha, pior desempenho (Tab. 1.1).

Não foi constatada diferença significativa entre o efeito dos acessos na produção de brotos, com média de 40,5 % de explantes com brotos em cada acesso. Na comparação entre as fontes de explantes verificou-se que o ápice proporcionou maior percentual de explantes

com brotos, enquanto os explantes originados de tecidos foliares não apresentaram brotação (Tab. 1.1).

Houve interação entre os efeitos do acesso e da fonte de explante para o parâmetro explantes vivos aos 42 dias. Todos os acessos, com exceção de RG apresentaram o mesmo comportamento (Tab. 1.2), com equivalência nos níveis de sobrevivência dos explantes originados de nó, ápice e caule, sendo que todos os explantes originados de folha não sobreviveram. O acesso RG, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre ápice e nó e apresentou diferença destes com caule, também sem sobrevivência dos explantes de folha (Tab. 1.2).

A avaliação dos percentuais de explantes organogênicos e de explantes com brotos foi realizada considerando explantes de ápice, nó e caule. Não houve diferença significativa entre o efeito dos acessos no percentual de explantes com brotos e no número de brotos por explante aos 42 dias.

O nó e o ápice apresentaram percentuais equivalentes de explantes organogênicos com 79,5% e 75%, respectivamente e o caule, nível inferior com 61% (Tab. 1.3). Em relação ao percentual de explantes com brotos, ápice e nó também não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram 70,5 % e 69,0% de explantes com brotos, respectivamente. O segmento internodal proporcionou menor percentual de explantes com brotos com 13% (Tab. 1.4). Explantes originados do nó apresentaram maior número de brotos por explante, com média de 4,7 brotos, o ápice, proporcionou média de 2,9 e o internódio 0,6 brotos por explantes (Tab. 1.5). Foi observado também maior desenvolvimento dos explantes originados do nó em relação aos originados do ápice que apresentaram maior tendência à clorose e à vitrificação.

A observação direta dos explantes mostrou a existência de grande quantidade de tecidos meristemáticos em forma de domo, ou meristemóides, anteriores ao estágio de gema, que ocorreram concomitantemente ao desenvolvimento das brotações e a expansão foliar tanto em explantes provenientes de nó (Fig. 1.2.a) quanto nos provenientes de ápice (Fig. 1.3.a). A avaliação microscópica dos cortes histológicos mostrou que os meristemóides originaram-se na periferia dos explantes em regiões que não apresentavam vascularização (Fig. 1.2.c, 1.3.b e 1.3.c). Nos explantes de ápice foi evidenciada a organogênese direta com aparecimento dos meristemóides diretamente dos tecidos preexistentes. Nos explantes de caule a organogênese ocorreu indiretamente, com as regiões meristemáticas originadas a partir da formação de calo. Nos explantes nodais ocorreram concomitantemente os dois processos.

Apesar da grande variabilidade genética do maracujazeiro (CUNHA et al., 2004) não houve efeito pronunciado dos acessos na organogênese, sendo observado apenas a interação acesso-fonte em relação ao parâmetro explantes vivos aos 42 dias. Apesar de não ter havido influência dos acessos na produção de brotos é possível que haja influência genética no seu desenvolvimento. Tal efeito tem sido observado em comparações interespecíficas no gênero *Passiflora* (DREW, 1991; DORNELAS; VIEIRA, 1993) e sugere a necessidade de aprofundamento dos estudos envolvendo a utilização da diversidade genotípica em experimentos sobre o comportamento in vitro.

O insucesso no cultivo de explantes originados de folhas pode ser atribuída à fatores como o baixo potencial de organogênese do órgão, idade da planta, baixa sanidade, e inadequação do meio. Segundo Becerra et al. (2004) a idade da fonte de explante é o mais importante fator para a regeneração eficiente de *P. edulis* f. *flavicarpa* a partir de explantes foliares. Os autores testaram matrizes com idade de 1 a 6 meses provenientes de sementes, plantas cultivadas in vitro e plantas com um ano podadas severamente. Foi utilizado o meio MS adicionado de 30 g sacarose, 4,44 μ M de BAP e 2,32 μ M de cinetina e para o enraizamento meio MS sem reguladores de crescimento. Os melhores resultados foram obtidos com explantes oriundos de plantas com 2 meses de idade, com 5,12 brotos e 1,65 raiz por explante. Baixos níveis de produção de brotos e enraizamento foram obtidos com plantas com um ano de idade, 0,60 e 0,03 por explante, respectivamente, apesar de tratamento de poda severa com objetivo de promover o rejuvenescimento. As plantas utilizadas no presente trabalho apresentavam 7 meses de idade e o efeito adverso da idade pode ter se expressado de maneira mais intensa no tecido foliar, mais diferenciado.

A sanidade do material de cultivo também é outro fator determinante para o sucesso da regeneração (TORRES et al., 1998). A presença do vírus e os efeitos da infecção podem ocorrer de forma diferencial entre os órgãos da planta, conforme relatam Gioria et al. (2002), em trabalho com *Cucumis mosaic virus* (CMV) em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Neste caso pode ter havido efeito prejudicial à organogênese causado pela infecção viral na folha de forma mais intensa que nos outros órgãos.

A concentração do fitoregulador BAP também pode ter contribuído para o insucesso do cultivo dos explantes foliares. Monteiro et al. (2000) trabalhando com explantes foliares de plantas jovens de *Passiflora suberosa* obtiveram 100% de calejamento em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ ou 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, embora a formação de gemas e a regeneração tenham sido pequenas. Lombardi (2003) em *P. cincinnata*, utilizando 0,5 a 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e Dornelas

e Vieira (1994) em *P. edulis f. flavicarpa* utilizando 1,0 mg.L⁻¹ de BAP também obtiveram explantes organogênicos a partir de tecidos foliares jovens.

A concentração e o tempo de exposição ao BAP utilizados mostraram-se eficientes para a indução da organogênese especialmente nos explantes originados do ápice caulinar e do segmento nodal. Estes parâmetros podem ter influenciado diferencialmente os tecidos cultivados, uma vez que os explantes de ápice apresentaram maior nível de indução, com maior percentual de explantes organogênicos aos 21 dias, enquanto que, aos 42 dias, explantes de ápice e nó apresentaram o mesmo nível de indução. Segundo Kerbauy (1998) a competência para absorção e reação aos estímulos na organogênese varia de acordo com a condição morfo-fisiológica dos tecidos sendo necessários indutores específicos. Estudos sobre as condições de cultivo, incluindo variações no meio de cultura, poderão contribuir para o incremento dos resultados na organogênese dos diferentes tecidos utilizados neste trabalho.

A formação de tecidos meristemáticos sem desenvolvimento de gemas, ou meristemóides (FERNANDO, 2005), em diferentes estádios de desenvolvimento, concomitante às brotações principais, foi também relatada por Kantharajah e Dodd (1990); Dornelas et al. (1995), Ribas et al. (2002) e Lombardi (2003) em cultivo de espécies do gênero *Passiflora*. Fernando (2005) demonstrou que explantes hipocotiledonares de *P. edulis f. flavicarpa* apresentaram simultaneamente meristemóides oriundos de organogênese direta e indireta enquanto que explantes foliares apresentaram apenas organogênese direta. No presente trabalho observou-se que a maior produção de brotações oriundos do segmento nodal foi favorecida pela capacidade organogenética direta e indireta.

A formação de grande número de meristemóides em regiões sem o sistema vascular ligado à vascularização do explante pode ser importante na utilização da técnica de subcultivo de brotações visando a eliminação de vírus proposta por Ayabe e Sumi (2001) como uma alternativa à cultura de meristemas apicais adultos que tem se apresentado inviável para o maracujazeiro (BIRICOLTI; CHIARI, 1994). Segundo Ayabe e Sumi (2001) o cultivo de regiões meristemáticas obtidas da organogênese em segmentos caulinares de alho (*Allium sativum* L.) resultaram em plantas livres de vírus. São necessários, no entanto, estudos para a verificação do efeito residual do fitorregulador BAP no desenvolvimento dos tecidos meristemáticos, uma vez que Biasi et al. (2000) em *P. edulis f. flavicarpa* e Dornelas e Vieira (1994) em *Passiflora spp.* relatam efeito favorável na indução, mas prejudicial na alongação das brotações da dosagem de 2 mg.L⁻¹ de BAP.

CONCLUSÕES

Os acessos apresentaram comportamento semelhante em relação à sobrevivência de explantes, explantes organogênicos, explantes com brotos aos 21 dias e à explantes organogênicos, explantes com brotos e número de brotos por explante aos 42 dias.

O meio de cultivo utilizado, com suplementação hormonal de 2 mg.L^{-1} de BAP foi eficiente na indução da organogênese nos explantes originados de ápice, nó e caule.

Explantes originados de folha não sobreviveram ao cultivo. O segmento internodal proporcionou menores níveis de explantes com brotos (13%) e brotações por explantes (0,64 brotos por explante) que os segmentos nodal e apical. O segmento nodal proporcionou mesmo nível de explantes com brotos (69 %) e maior número de brotações por explante (4,66 brotos por explante) em relação ao ápice que proporcionou 70,5% de explantes com brotos e 2,88 brotos por explante.

O segmento nodal apresentou organogênese pelas vias direta e indireta enquanto que explantes apicais apresentaram organogênese direta e explantes caulinares apresentaram organogênese indireta. Houve formação de grande número de meristemóides na periferia dos explantes de ápice e nó.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S. do; CARVALHO, M. G de; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 33-38, 2005.

ALMEIDA, A. M. R. de. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A. M. R. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001.

ANJOS, J.R. dos; JUNQUEIRA, N.T.; CHARCHAR, M.J. A. Levantamento do *passion fruit woodiness virus* em maracujazeiro-azedo no cerrado do Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. Belém, 2002. **Anais...** Belém: SBF, 2002, CD-ROM.

AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 20, p. 503-507, 2001.

BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 79, p. 87-90, 2004.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, Viale delle Idee, v.8, n. 3, 171-175, 1994.

BUENO, P.A. de O.; MIRANDA, H.A.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUZA, M.A. de F.; PIRES, M de C. Incidência e severidade de *passionfruit woodiness virus* (PWV) em 50 genótipos de maracujazeiro azedo, sob condições de campo do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. **Anais...** Fortaleza: CBF, 2004, 1 CD-ROM.

CUNHA, M.A.P. da; BARBOSA, L.V.; FARIA, G.A. Melhoramento Genético. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M.A.P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, p.69-93, 2004.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. Amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 103-106, 1993.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, v. 36, p. 211-217, 1994.

- DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVIERA, J.C. de; VIEIRA, M.L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 106-110, 1995.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explant of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 26, p. 23-27, 1991.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, p. 1276-1277, 1997.
- FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** 2005. 106 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- FNP. **Agrianual 2006 - anuário estatístico da agricultura brasileira.** São Paulo, 2006. p. 394-395.
- GIORIA, R.; ESPINHA, L.M.; REZENDE, J.A.M.; GASPAR, J.O.; KITAJIMA, E.W. Limited movement of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 127-133, 2002.
- GRATTAPAGLIA D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 183-260, 1998.
- HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. **Neltropica Bulletin**, Nelspruit, n. 304, p. 7-8, 1999.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** New York: Mac Graw Book Company Inc., 1940. 523p.
- JUNGHANS, T.G.; VIDAL, A.M.; SOUZA, A da S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. Belém, 2002. **Anais...** Belém: CBF, 2002, 1 CD-ROM.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S.; KOBAYASHI, A.K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura.** Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, p. 97-106. 2004.
- KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, p. 337-339. 1990.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 183-260, 1998.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A. M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: BRUCNER, C. H., PICANÇO, M. C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 85-137. 2001.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 1997.198p.

LOMBARDI, S. P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; d'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. 1994. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13. p. 697-702.

MONTEIRO, A.C.B. de A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 571-573. 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497. 1962.

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. MURILO. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Viena, v. 161, p. 21-34, 2006.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUMTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 561-566. 2002.

PIRES, M. de M.; MATA, H.T. da C. Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M.A.P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, p. 325-343. 2004.

RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 237-241. 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS User's guide: statistics version**. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1990. 846p.

TEMPESTA JUNIOR, R.; PEIXOTO, J.R.; MEDEIROS, F.M.B.; SOUSA, M.A. de F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; QUADROS, M. Desenvolvimento vegetativo e severidade do vírus do endurecimento do fruto (passionfruit woodiness vírus - PWV) em 17 genótipos de maracujazeiro azedo, cultivados no Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. **Anais...** Fortaleza: CBF, 2004, 1 CD-ROM.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 133-145. 1998.

VAZ, F. B. d'U; SANTOS, A. V. P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, p. 220-225, 1993.

VIDAL, A.M.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S. Estabelecimento *in vitro* de maracujazeiro amarelo, acesso BGM 39. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. **Anais...** Fortaleza: CBF, 2004, CD-ROM.

ILUSTRAÇÕES

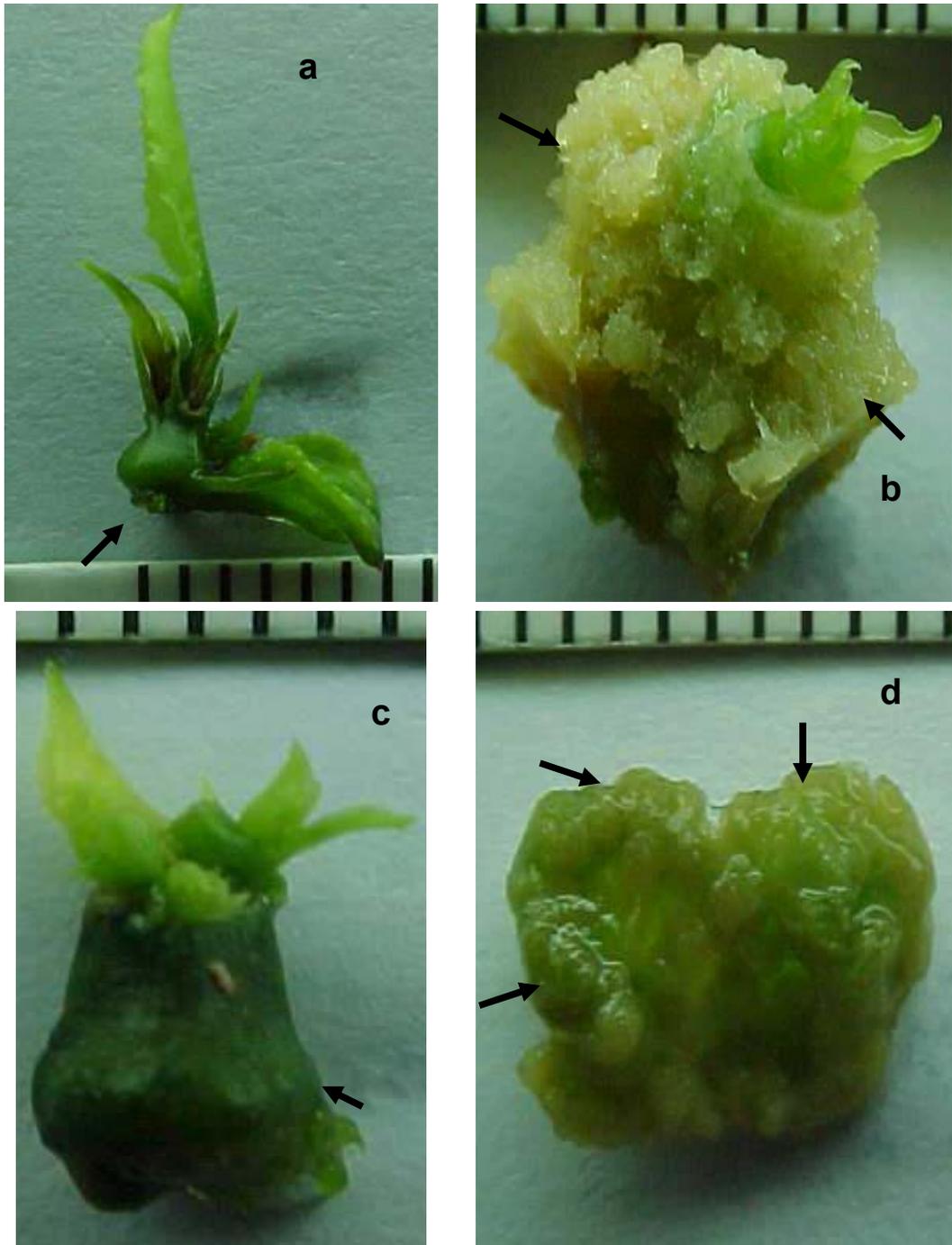


Figura 1.1 Organogênese em explantes de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo: a. explante de ápice apresentando expansão foliar e pequeno calejamento na região da excisão (seta); b. explante de nó com brotação envolvida por calejamento abundante (setas) ; c. explante de caule apresentando brotação com expansão foliar e intumescimento da parte basal (seta) ; d. explante de folha com regiões de calejamento (setas). Escala de 1mm. Brasília-DF, 2005.

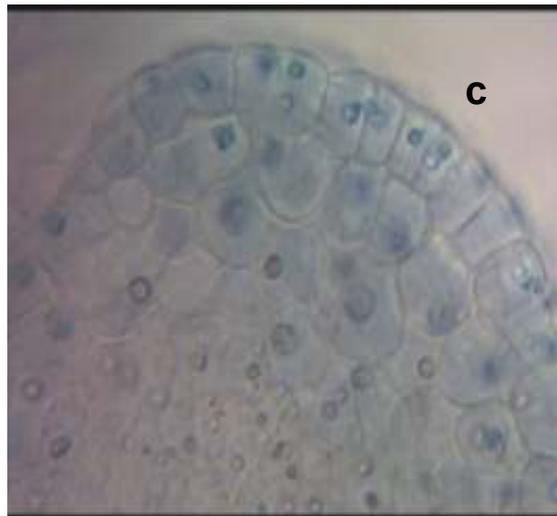
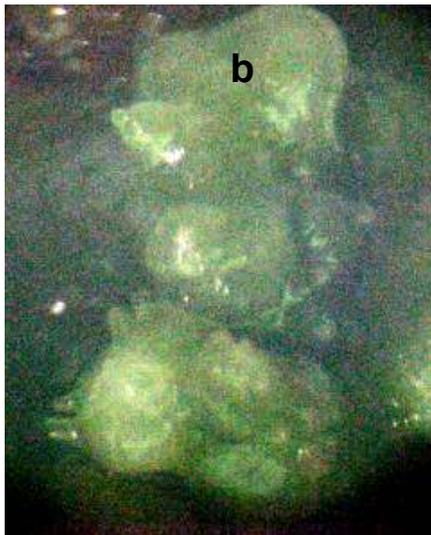
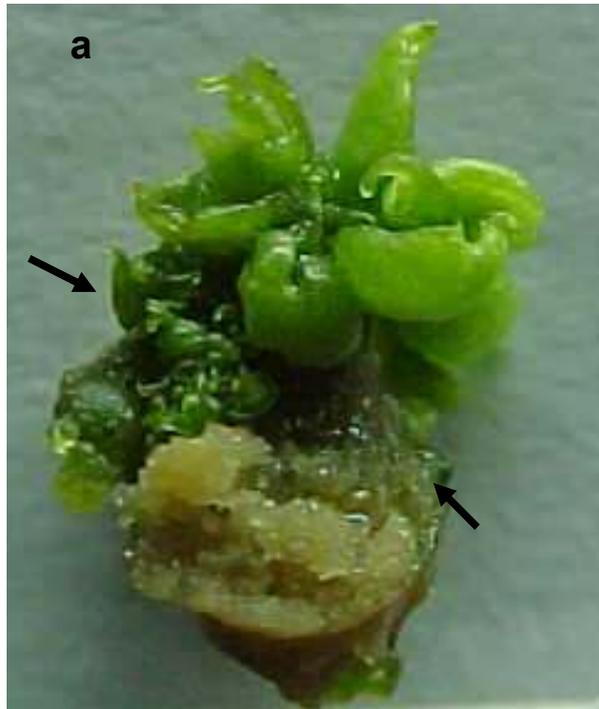


Figura 1.2 Organogênese em explante de nó de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo. a. desenvolvimento de brotação com expansão foliar e numerosos meristemóides de origem direta (seta da esquerda) e indireta (seta da direita); b. detalhe dos meristemóides; c. corte anatômico de meristemóide evidenciando ausência de vascularização desenvolvida. Brasília-DF, 2005.

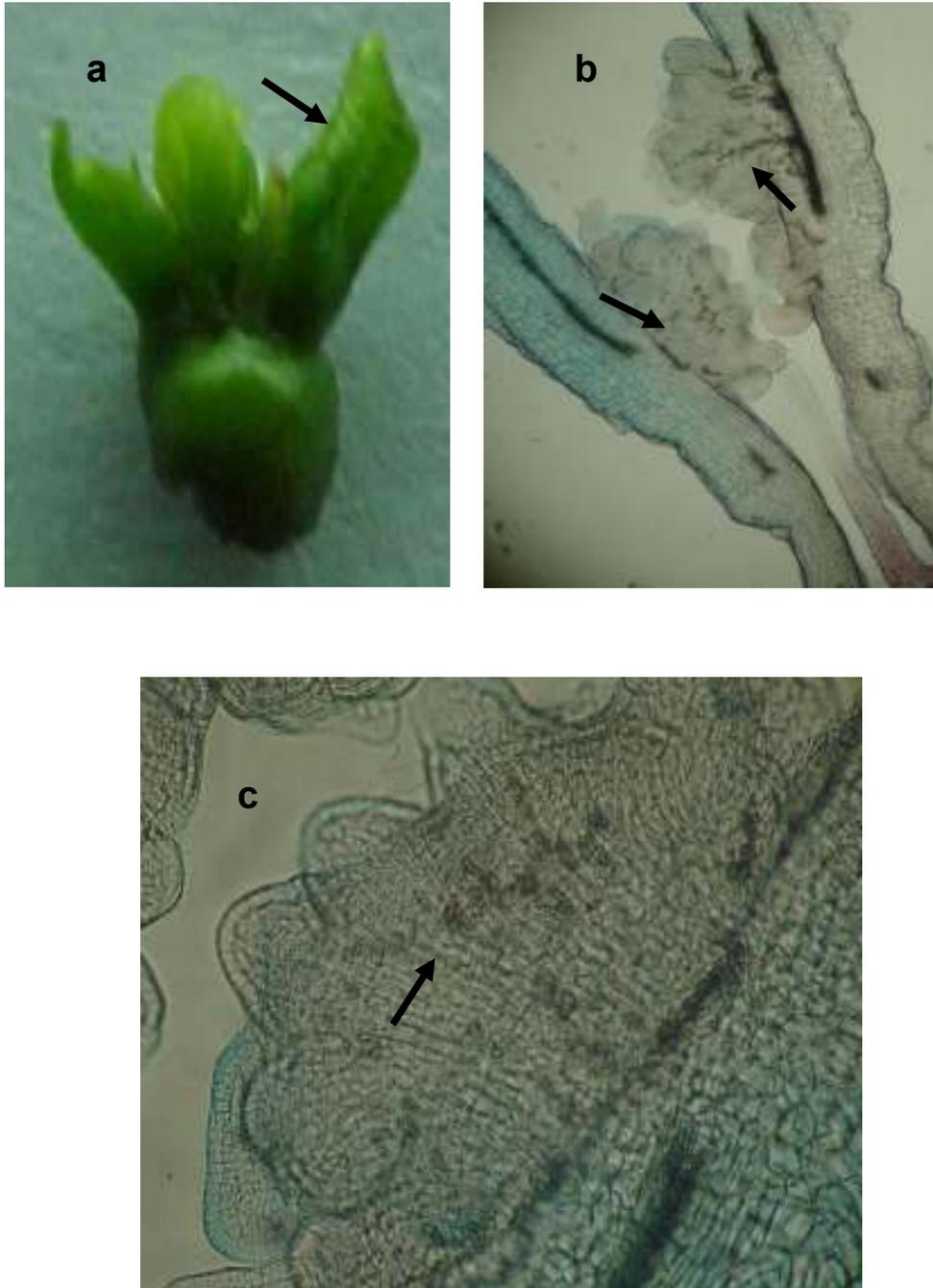


Figura 1.3. Organogênese em explante de ápice de maracujazeiro-azedo aos 30 dias de cultivo. a. explante com brotações apresentando expansão foliar e meristemóides no limbo (seta); b. desenvolvimento de brotações em folhas jovens com formação do sistema vascular (setas); c. detalhe de meristemóides, sem vascularização (na periferia) e do desenvolvimento inicial do sistema vascular (seta). Brasília-DF, 2005.

Tabela 1.1 – Percentual de explantes vivos, organogênicos e com brotos em função da fonte aos 21 dias de cultivo de maracujazeiro-azedo. Brasília-DF, 2005.

Fonte	Explantes vivos (%)	Explantes Organogênicos (%)	Explantes com brotos (%)
Ápice	96,0 a	95,5 a	92,0 a
Nó	96,0 a	95,5 a	61,5 b
Caule	89,0 ab	83,5 b	9,0 c
Folha	78,5 b	3,0 c	0 d
Média	89,9	69,4	40,4
C.V.	17,3	17,9	48,1

As letras iguais na mesma coluna representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação

Tabela 1.2 – Percentual de explantes vivos em função da fonte aos 42 dias de cultivo de maracujazeiro-azedo. Brasília-DF, 2005.

Fonte	Explantes vivos (%)				
	MAR-2024	MAR-2048	MAR-2003	MAR-2021	RG
Nó	92,5 a	87,5 a	77,7 a	70,0 a	70,0 a
Ápice	82,5 a	67,5 a	70,0 a	70,0 a	90,2 a
Caule	82,5 a	70,2 a	70,2 a	65,0 a	40,2 b
Folha	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c
Média	64,4	56,3	54,5	51,3	50,1
C.V.	14,9	28,1	19,6	32,1	31,4

As letras iguais na mesma coluna representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 1.3 – Percentual de explantes organogênicos em função da fonte aos 42 dias de cultivo de maracujazeiro-azedo. Brasília-DF, 2005.

Fonte	Explantes organogênicos (%)
Nó	79,5 a
Ápice	75,0 a
Caule	61,0 b
Média	71,8
C.V.	24,0

As letras iguais na representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 1.4 – Percentual de explantes com brotos em função da fonte aos 42 dias de cultivo de maracujazeiro-azedo. Brasília-DF, 2005.

Fonte	Explantes com brotos (%)
Ápice	70,5 a
Nó	69,0 a
Caule	13,0 b
Média	50,8
C.V.	35,0

As letras iguais coluna representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.
C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 1.5 – Número médio de brotos por explante em função da fonte aos 42 dias de cultivo de maracujazeiro-azedo. Brasília-DF, 2005.

Acesso	Brotos por explante
Nó	4,66 a
Ápice	2,88 b
Caule	0,64 c
Média	2,72
C.V.	40,3

As letras iguais representam ausência de diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.
C.V.= coeficiente de variação.

CAPÍTULO II

MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A ELIMINAÇÃO DO *COWPEA*
APHID-BORNE MOSAIC VIRUS EM MARACUJAZEIRO-AZEDO

MICROENXERTIA EX VITRO VISANDO A ELIMINAÇÃO DO COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS EM MARACUJAZEIRO-AZEDO

RESUMO: O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito de meios de cultura utilizados sobre o ponto da enxertia na microenxertia ex vitro visando a eliminação do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em plantas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Ápices caulinares provenientes de plantas infectadas foram microenxertados em plântulas obtidas pela germinação de sementes e cultivo em substrato comercial em condição de laboratório. Foram conduzidos experimentos com a microenxertia realizada no hipocótilo e no epicótilo e testados cinco meios de cultura como adjuvantes, aplicados no ponto da enxertia (meio MS suplementado com 3% de sacarose, 10 mg.L⁻¹ de tiamina; 1 mg.L⁻¹ de piridoxina; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 2 g.L⁻¹ de Phytigel (meio básico); meio básico acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ácido 3-indolbutírico (AIB); meio básico acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); meio básico acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 1 mg.L⁻¹ de BAP e meio básico acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de AIB e 2 mg.L⁻¹ de BAP) . Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições, 6 tratamentos (cinco meios de cultura mais controle) e cada parcela foi constituída por cinco microenxertias. O índice de pegamento médio foi de 27,22 % quando a microenxertia foi realizada no hipocótilo e 32,22 % quando realizada no epicótilo. Na microenxertia realizada no hipocótilo não houve efeito da aplicação de meios de cultura ou reguladores de crescimento. Na microenxertia realizada no epicótilo o meio básico acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 1 mg.L⁻¹ BAP proporcionou 53,3% de pegamento na microenxertia e foi superior aos demais tratamentos, com exceção do tratamento meio básico suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP. O mesmo tratamento ocasionou maior desenvolvimento das brotações. O início da formação da conexão vascular entre os participantes foi observada aos 15 dias e estava estabelecida aos 30 dias. A indexação realizada pelo teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto 80 a 100 dias após a microenxertia mostrou que 90% das plantas testadas não apresentavam vírus detectável.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; CABMV; microenxertia; eliminação de vírus

EX VITRO MICROGRAFTING AIMING THE *COWPEA APHID-BORNE MOSAIC VIRUS* ELIMINATION IN THE SOUR PASSION FRUIT PLANT

ABSTRACT: This work has the objective of evaluating the effect of the culture media used over the grafting spot in ex vitro micrografting with the objective of eliminating the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in sour passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Cauline apexes originated from infected plants were micrografted in seedlings obtained by the germination of seeds and cultivated in commercial substrate under laboratory conditions. Experiments were conducted with the micrografting performed on the hypocotyl and epicotyl and five culture media tested as adjuvant, applied on the grafting spot (MS medium supplemented with 3% sucrose, 10 mg.L⁻¹ thiamine; 1 mg.L⁻¹ pyridoxine; 1 mg.L⁻¹ nicotinic acid; 100 mg L⁻¹ mio-inositol and 2 g.L⁻¹ Phytigel (basic medium); basic medium supplemented of 0.1 mg.L⁻¹ 3-indolbutiric acid (IBA); basic medium supplemented of 2 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP); basic medium supplemented of 0,1 mg.L⁻¹ AIB and 1 mg.L⁻¹ BAP and basic medium supplemented of 0,2 mg.L⁻¹ de AIB and 2 mg.L⁻¹ de BAP). Was used randomized blocks design, six treatments (cultures media more control), with each plot consisting of five micrografting. The average rate of setting was 27.22 % when the micrografting was performed on the hypocotyl and 32.22 % when performed on the epicotyl. In the micrografting performed on the hypocotyl there was no effect for the applying of culture media or growth regulators. In the micrografting performed on the epicotyl the basic medium supplemented of 0.1 mg.L⁻¹ 3-indolbutiric acid (IBA) and 1 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) resulted in 53.3% setting in the micrografting and was superior to the other treatments, excepting the basic medium treatment supplemented with 2 mg L⁻¹ BAP. The same treatment caused larger development of shoots. The beginning of the formation of vascular connection between the participants was observed in 15 days and was established in 30 days. The indexing performed by the indirect Elisa test within 80 to 100 days of the micrografting showed that 90% of the plants tested did not present detectable virus.

Key words: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.; CABMV; micrografting; virus elimination

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) é uma das principais frutíferas cultivadas no Brasil e em muitos outros países tropicais (AGUIAR; SANTOS, 2001). A cultura ocupou no Brasil área superior a 34.900 ha em 2003 havendo produção comercial em praticamente todos os estados, especialmente na região nordeste (FNP, 2006). A produção apresenta tendência de expansão devido ao aumento da demanda e preços considerados atraentes (AGUIAR; SANTOS, 2001; PIRES; MATA, 2004). O desenvolvimento da cultura tem sido prejudicado pela grande ocorrência de enfermidades que são responsáveis por diminuição da produção, da qualidade dos frutos e pelo aumento dos custos de produção (PIRES; MATA, 2004; SANTOS FILHO et al, 2004). As doenças causadas por vírus são especialmente danosas pela inexistência de medidas curativas, pela disseminação por insetos vetores e através da propagação vegetativa (HANWEG, 1999).

A Doença do Endurecimento dos Frutos, causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e anteriormente atribuída ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (NASCIMENTO et al., 2004) é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro-azedo no Brasil e atualmente está disseminada na maioria das regiões produtoras (KITAJIMA; REZENDE, 2001; ANJOS et al., 2002; BUENO et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2006). A enfermidade causa o aparecimento de sintomas de mosaico e embolhamento das folhas e a diminuição do tamanho dos frutos associado à deformação e à ocorrência de bolsas de goma no albedo que se torna espessado, sendo que, as plantas afetadas têm a produtividade e a vida útil diminuídas (KITAJIMA; RESENDE, 2001; SANTOS FILHO et al, 2004).

A disseminação da virose tem comprometido a utilização de métodos de propagação vegetativa como a estaquia e a enxertia, utilizadas em outros países e que permitem a obtenção de plantas precoces e com grande uniformidade (LIMA; TRINDADE, 2004). A propagação vegetativa é particularmente importante para os programas de melhoramento genético nas fases de preservação e a multiplicação de genótipos superiores (DUVAL, 1998; FERREIRA et al., 1998).

Para a eliminação de vírus em plantas a técnica mais utilizada é o cultivo in vitro de meristemas ou ápices caulinares (PARMESSUR et al., 2002). O meristema apical consiste na região meristemática apical ou domo meristemático, com no máximo 0,1 mm de comprimento, desprovida de primórdios foliares e o ápice caulinar consiste no meristema apical com primórdios foliares subjacentes e, em algumas situações, com as folhas emergentes, sendo que seu tamanho pode variar de 0,3 a 20 mm (TORRES et al., 1998). A

adequação do cultivo da região apical para a eliminação de vírus é devida a menor distribuição dos patógenos em porções jovens e avascularizadas das plantas e sua dificuldade de multiplicação nestes locais (NAVARRO et al., 1975; TORRES et al., 1998). A pequena dimensão e o desbalanço hormonal na região, no entanto, acarretam grande dificuldade de obtenção do explante e na regeneração das plantas (TORRES et al., 1998; PARMESSUR et al., 2002). Normalmente os índices de sucesso são baixos e o processo é trabalhoso e lento (AYABE; SUMI, 2001). Em maracujazeiro, uma dificuldade adicional é a baixa propensão ao cultivo dos tecidos adultos, que é considerada por Drew (1991) como um dos principais empecilhos à eliminação de vírus via cultivo de ápices caulinares, como ocorre em espécies lenhosas e semi-lenhosas (MURASHIGE et al., 1972; NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998; MNENEY; MANTELL, 2001).

A microenxertia foi proposta por Murashige et al. (1972) com a finalidade de superar a dificuldade de regeneração a partir de ápices caulinares em citrus na eliminação de vírus. A técnica consiste em se enxertar ápices caulinares das plantas a serem propagadas em caules de porta-enxertos jovens, cultivados *in vitro* (PAZ; PASQUAL, 1998). Navarro et al. (1975), trabalhando com citrus, aperfeiçoaram a metodologia. Segundo o protocolo o porta-enxerto é obtido através da germinação de sementes e manutenção das plântulas *in vitro*, em meio líquido, na ausência de luz. A microenxertia é realizada com a deposição do ápice, com 0,15 a 0,2 mm de comprimento e dois a três primórdios foliares, numa incisão em forma de “T” invertido no caule do porta enxerto. Em seguida o porta enxerto é reconduzido à condição *in vitro*, em meio líquido, com iluminação. Após o desenvolvimento de 2 a 3 folhas as plantas são transferidas para o solo. Os autores conseguiram índices próximos à 50% de pegamento em citrus. Estes procedimentos, com algumas variações, passaram a ser amplamente utilizados, tendo se mostrado eficientes para a eliminação de viroses em várias culturas (NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998).

Biricolti e Chiari (1994), utilizando meristemas de 0,2 a 0,4 mm de comprimento, com no máximo quatro primórdios foliares, coletados de plantas de *P. edulis* f. *edulis* com um ano de idade, não obtiveram regeneração apesar da sobrevivência dos explantes por longo período. Quando testaram a microenxertia, utilizando ápices com as mesmas características, conforme a metodologia de Navarro (1975), os autores obtiveram 50% de pegamento.

O desenvolvimento da microenxertia tem levado a diversificação da sua utilização com propósitos variados como o rejuvenescimento de clones de plantas adultas (NAVARRO, 1988; MNENEY; MANTELL, 2001; DANTHU et al., 2002), eliminação de patógenos (NAVARRO, 1988; LESSA, 1998; SUAREZ et al. 2005), diagnose de infecções virais

(PATHIRANA; MCKENZIE, 2005), regeneração de plantas a partir de embriogênese somática (RAHARJO; LITZ, 2005), regeneração de plantas a partir da transformação genética (DE PASQUALE et al., 1999; RAHARJO; LITZ, 2005), estudos sobre compatibilidade genética (ESTRADA-LUNA, et al., 2002; RAHARJO; LITZ, 2005), estudos anatômicos da junção dos tecidos e vascularização (ESTRADA-LUNA, et al.; 2002).

Oliveira et al. (2002) adaptaram a metodologia básica da microenxertia de modo a empregar procedimentos simples de assepsia e de cultivo o que favorece a execução e reduz o custo do processo. Neste caso é eliminado o uso de meio de cultura para a obtenção dos porta-enxertos, utilizando-se para tal substratos destinados à produção de mudas previamente esterilizados. Os autores, utilizando este processo, conseguiram índices de pegamento de 34% a 79% dependendo da combinação de genótipos doadores de ápices e porta-enxertos em citrus.

Como forma de aperfeiçoamento da técnica de microenxertia ex vitro têm-se estudado a aplicação localizada de meios de cultivo. Paz e Pasqual (1998) relatam que a utilização de adjuvantes que consistem em meios de cultura aplicados na região da enxertia podem melhorar os índices de pegamento. Estudos realizados em citrus por Jeffree e Yeoman (1983) demonstraram o efeito da utilização no ponto da enxertia de meios de cultura contendo o regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP). Starrantino e Caruso (1988) constataram que o uso de regulador de crescimento BAP aumentou o potencial regenerativo dos tecidos contribuindo para o incremento do índice de pegamento da microenxertia em citrus. Nunes et al. (2005) realizaram trabalho com objetivo de avaliar o efeito dos fitoreguladores ácido 3-indolbutírico (AIB) e BAP, em combinações de variedades copa e porta enxerto na microenxertia a partir de explantes obtidos por micropropagação em macieira (*Malus spp*). Os autores constataram que o fitoregulador AIB utilizado no meio de cultivo ou aplicado no ponto de enxertia promoveram maior desenvolvimento dos microenxertos.

Apesar dos muitos trabalhos realizados no Brasil e no exterior, a utilização prática da cultura de tecidos na passicultura ainda não é efetiva, sendo necessário aperfeiçoamento da tecnologia visando maior eficiência na micropropagação, redução de custos e determinação de um protocolo para a eliminação de vírus (JUNGHANS et al., 2004; SIQUEIRA; PEREIRA, 2004).

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo básico de microenxertia ex vitro visando a eliminação do vírus CABMV, avaliar histologicamente o processo e estudar o efeito de meios de cultura aplicados no local da microenxertia sobre o desenvolvimento dos microenxertos, brotações adventícias do porta-enxerto e pegamento da microenxertia.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I - Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no hipocótilo

Plantas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) da população MAR-2050, obtidas a partir de sementes, cultivadas em casa de vegetação da Estação Biológica da Universidade de Brasília, com dois meses de idade, foram inoculadas com vírus CABMV. A inoculação foi feita mecanicamente com extrato preparado a partir de amostras foliares coletadas de plantas exibindo sintomas de mosaico típicos da presença do vírus CABMV na Fazenda Água Limpa (FAL), pertencente a Universidade de Brasília (UnB).

O inóculo foi preparado em almofariz através de maceração do material foliar, na proporção de 5 g de tecido (folha) para 10 ml de solução tampão (Fosfato de potássio: 6,8 gramas por litro de água destilada e sulfito de sódio: 10 gramas por litro de água destilada), a 0,1 M e ajustada a pH 7,0. Em seguida, adicionou-se pequena quantidade de “celite” (abrasivo) ao extrato obtido, e o vírus foi inoculado, friccionando as partes superiores das folhas com o dedo, onde continha o extrato. Foram inoculadas três folhas por planta, utilizando-se preferencialmente as mais novas. Aproximadamente, 10 minutos após a inoculação, as plantas foram lavadas, a fim de que o abrasivo não queimasse as folhas inoculadas (ALFENAS et al., 2005).

Dois meses após a inoculação as plantas foram avaliadas por sintomatologia sendo constatada 100% de incidência e nível de 2,6 de severidade (BUENO et al., 2004) . Foi realizado o teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent Assay) indireto (ALMEIDA, 2001) e todas as plantas foram avaliadas como sendo positivas para CABMV. As plantas foram transferidas para o viveiro de mudas do departamento de Biologia da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) e quando as mesmas possuíam um ano de idade foi realizada a coleta de material e a execução dos experimentos.

Para a obtenção de porta-enxertos foram utilizadas sementes da variedade Rubi Gigante oriundas do programa de melhoramento genético de maracujazeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - Cerrados) em parceria com a Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília. As sementes, após desinfestação por imersão em solução de 1% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, seguidas de tríplex lavagem em água destilada, foram plantadas em copos plásticos de 50 ml contendo substrato comercial, marca “Hortmax”, previamente esterilizado em estufa à 150°C por 24 horas. Os recipientes foram mantidos à sombra no laboratório de Botânica da Unimontes onde foi realizado o

experimento. As sementes iniciaram a germinação na segunda semana após a semeadura e a microenxertia foi realizada em plantas com 21 a 28 dias de idade (Fig 2.1).

Para realização da microenxertia, de cada planta matriz foi retirado a parte apical do ramo, com aproximadamente 3 cm de comprimento, contendo uma porção do caule e o ápice caulinar com algumas folhas recém expandidas. Os explantes foram submetidos à desinfestação por imersão em solução de 0,25% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, seguida por tríplice lavagem em água destilada. Após este procedimento o material foi imerso em água destilada até a realização da microenxertia.

Paralelamente plantas destinadas à porta-enxertos, com 5 a 7 cm de comprimento, possuindo as folhas cotiledonares e uma ou duas folhas definitivas, foram submetidas a processo de desinfestação por meio de pulverização com solução de hipoclorito de sódio 1% e após 5 minutos foram lavadas com água destilada. Os porta enxertos foram deitados, com o recipiente plástico onde foram cultivadas, sobre recipientes de acrílico, tipo Gerbox e fixadas com fita crepe aplicadas sobre as folhas (Fig. 2.2). Em seguida, com o auxílio de um estereomicroscópio e de uma seringa plásticas com agulha de 8 mm de comprimento e calibre de 0,3 mm, utilizada como um micro-bisturí, realizou-se incisões até a obtenção de uma abertura retangular no caule na região hipocotiledonar, na altura de aproximadamente 3 cm acima do coleto. A abertura, de aproximadamente 8 X 5 mm, foi realizada no sentido longitudinal ao caule (Fig. 2.3). Após a retirada dos tecidos da epiderme e de uma porção do córtex que preenchiam a abertura, foram aplicadas sobre a mesma gotas de solução antioxidante composta pela associação de 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico e 100 mgL⁻¹ de ácido cítrico (SANTOS et al., 2001).

Em seguida, um segmento apical de ramo fornecedor do ápice foi fixado por fita crepe em recipientes plástico tipo Gerbox e sobre ele aplicado solução antioxidante. Com auxílio de um estereomicroscópio e uma agulha de seringa plástica procedeu-se a retirada do ápice caulinar, constituído pelo meristema apical com dois a quatro primórdios foliares de aproximadamente 0,2 a 0,4 mm de comprimento (Fig 2.4). O ápice foi transportado utilizando-se a agulha e depositado na base da abertura, com a base dos tecidos do ápice em contato com o córtex do porta-enxerto (Fig 2.5). Após estes procedimentos foi aplicado sobre a microenxertia o meio de cultura utilizado como tratamento. O meio de cultura foi aplicado com auxílio de uma seringa plástica, de modo a preencher a abertura e cobrir o ápice.

Após a aplicação do meio de cultura foi realizado o corte do caule do porta-enxerto, imediatamente acima da abertura da microenxertia, com auxílio de um bisturi (Fig. 2.6). Os procedimentos foram repetidos na ordem citada em cada microenxertia. As plantas

microenxertadas foram cobertas por um saco plástico de polietileno com a finalidade de manutenção de alta umidade (Fig 2.7) e mantidas sob temperatura ambiental e fotoperíodo de 16 horas de luz, com nível de irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig 2.8).

Foram utilizados seis tratamentos incluindo cinco meios de culturas utilizados como adjuvantes, preparados conforme recomendações de Torres et al. (2001): controle; sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionados de: 3% de sacarose, 10 mg.L^{-1} de tiamina; 1 mg.L^{-1} de piridoxina; 1 mg.L^{-1} de ácido nicotínico; 100 mg.L^{-1} de mio-inositol; 2 g.L^{-1} de Phytigel, com pH ajustado para 5,8 (meio básico); meio básico acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB; meio básico acrescido de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; meio básico acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; meio básico acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

Quinze dias após a microenxertia as plantas foram avaliadas quanto às características dos tecidos envolvidos e desenvolvimento do ápice microenxertado, adotando-se a escala a seguir:

1) Explante morto, parcialmente necrosado ou não evidente; ausência de calejamento no porta-enxerto. 2) Explante morto, parcialmente necrosado ou não evidente; calejamento no porta-enxerto. 3) Explante vivo, sem ou com pequeno desenvolvimento, coloração verde clara ou clorótico. 4) Explante com crescimento, coloração verde, sem emissão de primórdios foliares. 5) Explante com emissão de primórdios foliares, sem folhas expandidas. 6) Explante com folhas expandidas (Fig. 2.9).

Na mesma ocasião foi avaliada a ocorrência de brotações adventícias no porta-enxerto, segundo a escala: 1) Ausência de gema no porta enxerto. 2) Gema sem primórdios desenvolvidos no porta enxerto. 3) Brotação com primórdios foliares no porta-enxerto. 4) Brotação com folha expandida no porta enxerto (Fig. 2.10).

Após as avaliações das brotações, as gemas e brotações adventícias, quando presentes, foram excisadas, com auxílio de um bisturi para não comprometer o desenvolvimento do microenxerto.

Aos 30 dias da microenxertia as plantas foram avaliadas em relação ao percentual de pegamento. Como indicativo de pegamento foi considerado a presença de folhas expandidas decorrentes do desenvolvimento do ápice. Foi realizada também a avaliação do número médio de folhas expandidas por explante.

O experimento foi estabelecido no delineamento em blocos casualizados, uma vez que a meticulosidade das operações determinou a instalação do experimento em vários dias, com a montagem de um bloco por dia. Foram utilizados seis tratamentos, representados pelos meios de cultura aplicados sobre a microenxertia, cada tratamento foi utilizado em seis repetições, cada uma constituída por cinco microenxertos. Desta forma o experimento contou com 30

plantas microenxertadas por tratamento e um total de 180 microenxertos. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando constatada a significância pelo teste F, por meio do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1990), o efeito dos tratamentos foi submetido ao teste Tukey. Para os parâmetros percentual de pegamento e número de folhas emitidas por microenxerto foi utilizada a transformação dos dados no modelo \sqrt{x} para as comparações.

Experimento II - Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no epicótilo

Este experimento foi executado nos mesmos moldes do anterior com exceção da região da porta-enxerto em que foi realizada a microenxertia. Neste caso a abertura feita no caule foi realizada imediatamente acima da região de inserção das folhas cotiledonares, na altura de aproximadamente 5 cm em relação ao coleto. Após a deposição do ápice e a colocação do meio de cultura foi realizada a excisão das folhas cotiledonares e das gemas axilares correspondentes, além da decapitação do epicótilo imediatamente acima da abertura da microenxertia.

A condução e as avaliações foram semelhantes às do primeiro experimento.

Avaliação histológica da microenxertia

Foram realizadas 90 microenxertias utilizando-se como fonte de ápices plantas da população MAR-2050 e como porta-enxerto plantas da variedade Rubi Gigante, conforme procedimentos citados anteriormente. As microenxertias foram realizadas no epicótilo sem a adição de meios de cultura.

Aos 7, 15, 30 e 90 dias após a realização das microenxertias 5 microenxertos considerados viáveis foram retirados do cultivo e destinados à análise histológica. Porções de aproximadamente 3 cm do caule com a microenxertia foram seccionadas e fixadas em solução FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940) por 48 horas após as quais foram transferidas para solução de álcool 50%. Os segmentos de caule foram corados com azul de toluidina e realizou-se cortes histológicos em micrótomo de mesa. Em seguida, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes (KRAUS; ARDUIM, 1997) a partir das quais foram realizadas análises microscópicas e descrição do processo de soldadura ápice-porta-enxerto e da vascularização dos tecidos.

Eliminação do vírus CABMV

Aos 30 dias das microenxertias viáveis foram retiradas as embalagens plásticas de polietileno e as mesmas foram mantidas na câmara clara para aclimação à condição ambiente. Aos 45 dias as mesmas foram transferidas para copos plásticos de 200 mL contendo substrato comercial para produção de mudas e encaminhadas para casa de vegetação sob estufim com isolamento contra insetos.

As primeiras sessenta mudas obtidas foram utilizadas na indexação para o vírus CABMV quando haviam passado 80 a 100 dias após as microenxertias. De cada planta foi retirada uma folha que foram embaladas em sacos plásticos e conduzidas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília para a realização do teste sorológico ELISA indireto, conforme procedimentos descritos por Almeida (2001) a fim de se detectar a presença do vírus CABMV nas mesmas. Foram utilizadas diluições de 1:20 para as amostras, 1:250 para a imunoglobulina específica para o vírus, de 1:30.000 para o conjugado imunoglobulina-enzima. Foram efetuadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro com filtro de 405 nm após 30 minutos e uma hora após a adição do substrato. Como controle positivo foi utilizado folha de planta usada como fonte de explante que apresentava sintoma da virose e, como controle negativo, folha de plântula com 21 dias de idade, obtida por germinação de semente desinfestada e cultivada em laboratório. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram nível de absorbância duas vezes superior ao do controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no hipocótilo

Observações nos primeiros dias após a realização da microenxertia mostraram que não houve ressecamento ou oxidação dos tecidos do porta-enxerto em nenhum tratamento. Este resultado indica a adequação da câmara úmida proporcionada pela embalagem de polietileno e do uso da solução de ácido cítrico e ácido ascórbico na prevenção da oxidação. A oxidação enzimática de compostos fenólicos em tecidos expostos que reduz a chance de sucesso da microenxertia por acarretar a produção de compostos fitotóxicos foi eficientemente prevenida pela utilização de solução 200 μ M de ácido ascórbico na microenxertia de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (MNENEY; MANTELL, 2001). A câmara úmida também mostrou-se eficiente quanto a manutenção da umidade do substrato não sendo necessárias irrigações até os 15 dias. Navarro et al. (1975) comprovou a eficiência de saco de polietileno para minimizar a perda de umidade das plantas de citrus microenxertadas retiradas da condição *in vitro*.

A partir do segundo dia da microenxertia foi observado, através de estereomicroscópio, intenso calejamento na região afetada do porta-enxerto em todas as plantas (Fig. 2.11). Esta observação também foi descrita por Biricolti e Chiari (1994) a partir dos cinco dias da microenxertia de *P. edulis* f. *edulis*. Aos sete dias, observações realizadas através de estereomicroscópio permitiram constatar o início do desenvolvimento dos ápices que, na grande maioria das microenxertias, encontravam-se estabelecidos sobre intenso calejamento (Fig. 2.12).

As avaliações do desenvolvimento da microenxertia aos 15 dias não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. A média geral do índice igual a 2,98 indica que a maioria dos microenxertos apresentava-se com calejamento e com o explante sem ou com pequeno desenvolvimento (Fig. 2.26). Em alguns casos observou-se grande desenvolvimento do microenxerto com emissão de primórdios foliares e expansão foliar (Fig. 2.13 e 2.14). Os explantes mortos apresentavam-se necrosados, com coloração marrom e frequentemente atacados por fungos, que não colonizaram os tecidos do porta-enxerto, levando a suposição da condição saprofítica ou oportunista (Fig. 2.9, índice 2). Estudos sobre as características dos fungos, a utilização de técnicas mais eficientes de assepsia e a utilização de fungicidas poderão contribuir para o incremento dos resultados.

Os tratamentos não influenciaram significativamente o aparecimento de gemas adventícias e sua brotação nos porta-enxertos com média geral do índice igual a 1,88 (Fig. 2.27). A correlação entre o índice de brotação e o índice de desenvolvimento do explante foi de 0,10 evidenciando que existiu pequena relação entre a tendência de organogênese do porta-enxerto e o desenvolvimento do ápice (Tab 2.1). Do mesmo modo, as correlações entre as brotações adventícias e o pegamento aos 30 dias e entre as brotações adventícias e o número de folhas emitidas aos 30 dias foram $-0,064$ e $-0,007$, respectivamente, indicando a ausência de influência entre as brotações e o sucesso da microenxertia realizada no hipocótilo. A figura 2.15 mostra o desenvolvimento do ápice microenxertado concomitante ao desenvolvimento de numerosas brotações apicais do porta-enxerto.

A avaliação aos 30 dias constatou o nível de pegamento médio de 27,22 %. O meio básico MS, proporcionou maior nível de pegamento, 36,7%, porém, não houve efeito significativo resultante da aplicação dos meios de cultivo (Fig 2.28).

Em trabalho com microenxertia em maçã, Richardson et al. (1996) constataram que o desenvolvimento aos 15 dias foi indicativo consistente do pegamento. No presente trabalho, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos aos 15 dias e a correlação geral entre desenvolvimento aos 15 dias e pegamento aos 30 dias ter sido de apenas 0,18 (Tab. 2.1), o tratamento MS, que resultou em maior nível de desenvolvimento, também resultou maior pegamento aos 30 dias.

O resultado da avaliação do número médio de folhas expandidas por microenxerto aos 30 dias mostrou-se parecido com o do pegamento. A média geral foi de 0,52 folhas emitidas por microenxerto e o tratamento MS apresentou melhor resultado, com média 0,67 folhas expandidas por microenxerto, porém, também nesta avaliação não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos (Fig 2.29). A correlação entre o pegamento e o número de folhas emitidas foi alto (0,82), como seria esperado (Tab. 2.1). A correlação entre o desenvolvimento aos 15 dias e o número de folhas emitidas aos 30 dias também se mostrou baixo (0,31) evidenciando que a avaliação aos 15 dias não é um bom critério indicativo do sucesso da microenxertia. Os microenxertos mais desenvolvidos apresentavam folhas vigorosas e início do desenvolvimento do ramo (Fig. 2.16)

Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no epicótilo

Foi observado calejamento intenso a partir do segundo dia da microenxertia em todos os tratamentos. As avaliações do desenvolvimento da microenxertia aos 15 dias revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. Os meio MS acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e

1 mg.L⁻¹ de BAP (média do índice de desenvolvimento igual a 3,3) e MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIB (média do índice de 3,0) foram significativamente superiores ao meio MS acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de AIB e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (índice médio de 2,3) (Fig. 2.30). A média geral do índice igual a 2,85 indica que a maioria dos microenxertos apresentava-se com calejamento e com o explante sem ou com pequeno desenvolvimento. Os explantes mortos apresentavam-se necrosados, com coloração marrom e frequentemente atacados por fungos.

Os tratamentos, neste experimento, também não influenciaram significativamente o aparecimento de gemas adventícias e sua brotação nos porta-enxertos com média geral do índice igual a 2,47 (Fig. 2.31). A correlação entre o índice de brotação e o índice de desenvolvimento do explante foi de - 0,17 (Tab. 2.2) evidenciando que não existiu forte relação entre a tendência de organogênese do porta-enxerto e o desenvolvimento do ápice. As correlações entre as brotações adventícias e o pegamento aos 30 dias e entre as brotações adventícias e o número de folhas emitidas aos 30 dias foram - 0,291 e - 0,126, respectivamente, indicando uma maior influência entre as brotações e o sucesso da microenxertia realizada no epicótilo em relação à microenxertia no realizada no hipocótilo (Tab. 2.1 e 2.2). A correlações negativas, apesar de pequenas, apontam a tendência prejudicial das brotações em relação ao desenvolvimento do explante. Apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos em relação ao desenvolvimento do ápice e a emissão de brotações adventícias do porta-enxerto, observou-se que as plantas do tratamento MS acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de AIB e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, que apresentaram maior nível de brotações adventícias (Fig. 2.31), apresentaram menor desenvolvimento do microenxerto (Fig. 2.30). Brotações adventícias do porta-enxerto foram relatadas como constantes em citrus (NAVARRO et al., 1975), em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (LUO; GOULD, 1999), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (MNENEY; MANTELL, 2001) e cactos do gênero *Opuntia* (ESTRADA-LUNA et al., 2002). Todos os autores observaram efeito deletério das mesmas em relação ao desenvolvimento do explante. Navarro et al., (1975) recomendam a excisão das brotações assim que sejam constatadas e a adoção da incisão em “T” invertido por facilitar a identificação das brotações adventícias do porta-enxerto. No presente estudo, verificou-se que a abertura retangular também se mostrou apropriada para este fim e de mais fácil execução.

O percentual de pegamento aos 30 dias apresentou média de 32,22 %. Houve efeito significativo resultante da aplicação do meio MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, que proporcionou 53,3% de pegamento, em relação aos outros tratamentos, com exceção do tratamento MS acrescido de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (Fig. 2.32).

No presente trabalho, foi constatada correlação de 0,39 entre o desenvolvimento do explante aos 15 dias e o percentual de pegamento aos 30 dias e de 0,51 entre o desenvolvimento aos 15 dias e o número de folhas emitidas aos 30 dias (Tab. 2.2). Estes resultados indicam que os resultados da avaliação aos 15 dias não proporcionaram um indicativo confiável do sucesso da microenxertia realizada no epicótilo, embora os valores tenham sido maiores que os obtidos na avaliação da microenxertia realizada no hipocótilo (Tab. 2.1).

Também neste experimento o resultado da avaliação do número médio de folhas expandidas por microenxerto aos 30 dias apresentou-se próximo ao do pegamento em relação ao efeito dos tratamentos. A média geral foi 0,50 folhas por parcela e o tratamento MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 1,0 mg.L⁻¹ apresentou melhor resultado, com média 0,97 folhas expandidas por parcela, resultado significativamente superior ao dos demais tratamentos (Fig 2.33). A correlação entre o pegamento e o número de folhas emitidas foi alto (0,82), como seria esperado (Tab. 2.2).

A tabela 2.3 apresenta a comparação entre os resultados dos experimentos realizados no hipocótilo e epicótilo. Os resultados mostraram-se próximos em relação ao índice de desenvolvimento aos 15 dias, percentual de pegamento e número de folhas expandidas aos 30 dias. Houve maior brotação adventícia nos porta-enxertos na microenxertia realizada no epicótilo e a correlação negativa (- 0,172) entre o índice de brotações e o desenvolvimento do ápice aos 15 dias sugerem que pode ter havido efeito prejudicial das brotações sobre a microenxertia. Estas observações indicam a necessidade da retirada das brotações adventícias precocemente evitando-se o seu efeito prejudicial sobre o desenvolvimento do ápice. Embora não tenha havido diferença significativa nos níveis de pegamento entre microenxertias in vitro realizadas no hipocótilo e epicótilo em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) foi observado que as brotações das microenxertias no hipocótilo foram mais vigorosas. O fato foi atribuído a menor competição com as brotações das gemas laterais cotiledonares e brotações apicais mais presentes nas microenxertias no epicótilo (MNENEY; MANTELL, 2001).

O meio básico MS suplementado com sacarose vitaminas e mio-inositol não afetou o resultado da microenxertia nas duas regiões. Estes resultados podem ser devido à condição nutricional adequada do ápice, e a eficiência da solução antioxidante e da câmara úmida em evitar a deterioração dos tecidos.

Apenas na microenxertia realizada no epicótilo houve efeito dos reguladores de crescimento sobre o pegamento e o desenvolvimento dos microenxertos. O epicótilo é fisiologicamente mais ativo que o hipocótilo que é mais diferenciado. Como a competência

para a absorção e reação à indutores é decorrente da condição fisiológica dos tecidos (Kerbaudy, 1998) é provável que estes tecidos possuam maior potencial para responder ao estímulo hormonal. Pio et al. (2001) avaliaram a organização anatômica dos tecidos de porta-enxerto de citrus e demonstraram que a mesma é diferenciada a partir de 2 cm até a altura de 10 cm, com a ocorrência de tecidos mais especializados no ápice. Os autores afirmam que a interação e sincronia entre os ciclos celulares dos tecidos, afinidade anatômica quanto ao tamanho e forma das células, exigência nutricional e ciclo de vida dos tecidos envolvidos do explante e do porta-enxerto são fatores fundamentais para o sucesso da microenxertia.

Embora vários estudos envolvendo a cultura de tecidos jovens em espécies do gênero *Passiflora* tenham demonstrado a resposta ao fitorregulador BAP (FARIA; SEGURA, 1997; BIASE et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; RIBAS et al., 2002; LOMBARDI, 2003; GONÇALVES et al. 2004; VIDAL et al., 2004) o mesmo não foi capaz de induzir eficientemente a regeneração de plantas através do cultivo de ápices caulinares de tecidos de plantas de *P. edulis* f. *edulis* com um ano de idade, segundo os trabalhos de Biricolti e Chiari, 1994. Os autores testaram vários níveis do regulador e não obtiveram regeneração de plantas apesar dos explantes sobreviverem por longo período.

Não existem informações relativas ao uso de fitorreguladores na microenxertia em espécies do gênero *Passiflora*. Para outras culturas os resultados têm sido variados. Navarro et al. (1975) não encontraram efeito significativo na aplicação de AIB e BAP sobre o porta-enxerto antes da colocação do ápice. Estudos realizados por Jeffree e Yeoman (1983) demonstram o efeito da utilização no ponto da enxertia de meios de cultura contendo o regulador de crescimento BAP que proporcionaram o aumento de 40% para 90% da taxa de pegamento em citrus. Starrantino e Caruso (1988) constataram que o uso do fitorregulador BAP aumentou o potencial regenerativo dos tecidos contribuindo para o incremento do índice de pegamento da microenxertia em citrus. Demonstrou-se que a deposição de ápices caulinares de 0,1 a 0,3 mm de comprimento e porta-enxertos dacapitados em solução de 0,5 ppm de BAP proporcionou incremento no pegamento de 73% para 91%. Nunes et al. (2005) realizaram trabalho com objetivo de avaliar o efeito dos fitorreguladores AIB e BAP, em combinações de variedades copa e porta enxerto na microenxertia a partir de explantes obtidos por micropropagação em macieira (*Malus* spp). Os autores constataram que para a combinação de variedades Gala(enxerto)/Marabakaido(porta-enxerto) o fitoregulador AIB na concentração de 2µM em meio MS utilizado no cultivo do porta enxerto e 4µM de AIB aplicado no ponto de enxertia promoveram maior desenvolvimento dos microenxertos.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de estudos envolvendo o teste de diferentes concentrações dos reguladores AIB e BAP visando o incremento nos resultados. Segundo Taiz e Zeiger (2004) a interação entre os níveis de AIB e BAP em tecidos vegetais é fundamental para o controle do ciclo celular e da organogênese, sendo os níveis ótimos e inibitórios variáveis em função das condições anatômicas e fisiológicas dos tecidos. Outros componentes do meio podem também afetar a microenxertia e merecem ser estudados. Navarro et al. (1975) observaram que a concentração de sacarose no meio de manutenção das plantas microenxertadas in vitro afetou favoravelmente o pegamento até o nível de 7,5%.

Avaliação histológica da microenxertia

A observação dos cortes histológicos relativos aos sete dias da microenxertia indicam a ausência de vascularização dos ápices, o que denota a adequação do tamanho do explante utilizado com a finalidade de eliminação de vírus. Constatou-se a formação de intenso calejamento proveniente, principalmente, a partir da região do córtex do porta-enxerto, o que propiciou uma junção dos participantes, soldando o ápice (Fig. 2.19 e 2.20). Pio et al. (2001) afirmam que na junção microenxerto-porta-enxerto, ocorre desenvolvimento de calo, resultante da proliferação de várias células de tecido parenquimático situadas próximas à superfície, entre as lesões dos dois tecidos. Este calo preenche os espaços entre ambas as partes, tornando-as contínuas pela conexão formada pela diferenciação de suas células em tecidos vasculares. Na microenxertia in vitro em macieira foi observada a formação de calo a partir do cambio vascular e na medula 10 dias após a microenxertia em estudo realizado por Richardson et al. (1996). Os autores discorrem que neste período inicial em que não há conexão vascular, a água disponível ao explante pode ser provida pela exudação do porta-enxerto em resposta à injúria da excisão. Esta exudação normalmente cessa poucos dias após a incisão e as condições de hidratação e nutricional do explante são fundamentais para a sua sobrevivência. Após a fase inicial o contato celular deve ser estabelecido para que haja formação de sistemas de transporte simplástico e apoplástico suficientes para o transporte de água e metabólitos entre os parceiros. Na microenxertia realizada em cactos do Gênero *Opuntia*, Estrada-Luna et al. (2002) relataram que a primeira evidência de divisão celular foi o desenvolvimento de calo formando uma ponte na interface explante-porta-enxerto observado do primeiro ao quarto dia. A formação de calo ocorreu a partir da divisão de células do parênquima em diferentes pontos dos tecidos do explante e do porta-enxerto. Após

muitos dias a proliferação de várias camadas de células de calo formaram a junção entre os tecidos participantes.

Aos 15 dias da microenxertia os cortes histológicos observados mostraram o início do desenvolvimento da conexão vascular entre microenxerto e porta-enxerto (Fig. 2.21). O ápice encontrava-se estabelecido sobre intenso calejamento que ocupava toda a profundidade do córtex atingindo o cilindro vascular. O desenvolvimento da vascularização ocorreu a partir da região do procambio do primórdio foliar do ápice (Fig. 2.22). Estrada e Luna (2002) relatam que em *Opuntia* a partir do 12º dia ocorreu diferenciação de células do parênquima próximas aos tecidos vasculares interrompidos tanto no porta enxerto quanto no explante iniciando a conexão vascular.

Aos 30 dias da microenxertia as observações demonstraram que já estava estabelecida a conexão vascular entre os participantes com vigorosos vasos ligando o caule do microenxerto ao cilindro vascular do porta enxerto (Fig. 2.23). Nesta ocasião os microenxertos viáveis já se apresentavam com uma ou mais folhas desenvolvidas (Fig. 2.16 e 2.17). Esta observações coincidem também com as realizadas por Estrada e Luna (2002) em *Opuntia*, onde evidências da união funcional foram observadas 28 dias após a microenxertia, quando o explante iniciou vigoroso crescimento. O presente trabalho também evidenciou em maracujazeiro-azedo um intenso crescimento do explante a partir dos 30 dias em que provavelmente se dá a união vascular entre microenxerto e porta-enxerto (Fig. 2.17; 2.18 e 2.23).

Cortes anatômicos relativos a plantas microenxertadas há 90 dias mostraram a consolidação da microenxertia com a diferenciação das células do calo e formação de uma região de soldadura que foi reforçada por camadas de células lignificadas muitas das quais apresentando drusas de oxalato de cálcio (Fig. 2.24 e 2.25). As plantas nesta ocasião apresentavam seis a oito folhas bem desenvolvidas (Fig. 2.18).

As observações realizadas neste trabalho demonstram a precocidade do processo de junção e vascularização na microenxertia do maracujazeiro-azedo em relação à observação de Abreu et al. (2003) que relata que apenas 30 dias após a microenxertia ocorreu a soldadura parcial dos microenxertos de macieira. Richardson et al. (1996) também observaram na microenxertia em macieira que, apesar da continuidade entre o novo sistema vascular do porta-enxerto e explante começar a ser estabelecido próximo de 40 dias, o desenvolvimento do sistema vascular continuava 6 meses após a microenxertia.

Estrada-Luna et al. (2002), a partir de observações de cortes histológicos, relataram em cacto do gênero *Opuntia* a ocorrência de 5 etapas no estabelecimento da união entre porta-enxerto e explante: desenvolvimento de uma camada de células necróticas nas superfícies

seccionadas; proliferação de calo formando uma ponte na interface dos tecidos participantes; diferenciação de um novo cambium vascular; constituição de um novo tecido vascular na região de interface; constituição da continuidade da epiderme dos tecidos na zona de união. No presente trabalho não foi possível a identificação exata e a delimitação das fases o que poderá ser estabelecido em trabalhos posteriores envolvendo a avaliação anatômica mais pormenorizada do processo.

Microenxertia ex vitro

Os resultados obtidos neste trabalho, média de 27,22 % e 32,22 % de pegamento para as microenxertias realizada no hipocótilo e epicótilo, respectivamente, permitem inferir que a microenxertia ex vitro pode atingir índices compatíveis com a microenxertia in vitro, mesmo com a utilização de explantes com tamanho adequado à eliminação de vírus. Paz e Pasqual (1998) afirmam que é comum a obtenção de taxas médias de pegamento em torno de 50% em microenxertia in vitro em citrus, sendo o resultado diretamente relacionado com o tamanho do explante. Os autores relatam que ápices com 0,05 mm apresenta taxa de sucesso de cerca de 2%, ao passo que ápices com seis primórdios foliares propiciam uma taxa de sucesso mais elevada, em torno de 50%. Navarro et al. (1975) observaram que ápices caulinares de citrus sem primórdios foliares resultaram em apenas 1,8% de pegamento e recomendam a utilização de ápices com 0,14 a 0,18 mm com três primórdios. O pegamento da microenxertia em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) também foi dependente do tamanho do explante. Explantes de 0,1 a 0,2 cm proporcionaram sobrevivência de 37,5 a 40% dos microenxertos enquanto que explantes com 0,8 a 1,0 cm proporcionaram 95% de sobrevivência das microenxertias (LUO; GOULD, 1999). Ápices caulinares com 2 a 3 primórdios foliares foram usados em microenxertia em abacateiro (*Persea americana*) visando a eliminação do viróide ASBVd. O tamanho do explante afetou o sucesso da microenxertia. Melhor nível de pegamento, 58,8%, foi obtido com explantes entre 0,5 a 1,0 mm em relação a explantes menores que 0,5 mm, que proporcionaram 10,3% de pegamento (SUAREZ et al.; 2005).

Vários trabalhos têm comprovado a viabilidade e vantagens da realização da microenxertia em condição ex vitro. Mneney e Mantell (2001) conduziram experimentos paralelos com a microenxertia in vitro de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em condições assépticas e na ausência destas tendo as operações sido realizadas em ambiente aberto. Na microenxertia em condições assépticas foi utilizado o meio MS suplementado por 2 % de sacarose. Na microenxertia na ausência de condições assépticas foi suprimida a sacarose do

meio de cultivo visando restringir as condições favoráveis à contaminação microbiológica. Os resultados mostraram que a microenxertia in vitro em condições não axênicas não só é viável, com níveis de pegamento entre 60 e 80%, como também se mostrou mais fácil e rápida que o método tradicional.

Takahara et al (1980) citado por Navarro (1988), enxertou ápices com 0,8 a 1 mm de comprimento de plantas crescendo a 30-40°C por 40 a 80 dias em plântulas desenvolvidas em casa de vegetação. A maioria das plantas resultantes apresentaram-se livres do vírus da tristeza dos citrus que infectavam as matrizes doadoras. Navarro (1988) considera este método uma alternativa que pode ser adequada para obtenção de plantas livres de vírus em locais onde a cultura de tecidos não seja possível. Oliveira et al. (2002), trabalhando com citrus, concluíram que a enxertia de ápices de 2 a 3 mm em porta-enxertos de 60 dias de idade em condição de casa de vegetação, mostra-se factível e efetiva em condições não axênicas, tendo sido obtido 34 a 79% de sucesso no procedimento.

Com objetivo de otimizar a recuperação de plantas a partir da embriogênese somática em abacateiro (*Persea americana*), Raharjo e Litz (2005) testaram a microenxertia em condição in vitro e ex vitro. O pegamento das microenxertias realizadas in vitro variaram de 30,4% a 100%. Na microenxertia ex vitro brotações obtidas de ápices caulinares ou segmentos nodais cultivados in vitro foram utilizadas a partir de explantes de 8 a 10 mm em porta-enxertos com 20 a 30 cm em condição de casa de vegetação com níveis de pegamento variando de 52% a 76%. As brotações obtidas na microenxertia ex vitro foram mais precoces que as obtidas na microenxertia in vitro.

Paiva e Carvalho (1993) consideram que a microenxertia ex vitro apresenta vantagens importantes principalmente no processo de aclimação. Os autores ponderam que em vista de diversos fatores, como sistema radicular pouco funcional, comportamento heterotrófico, e estresse, decorrentes da mudança de ambiente, as plantas transplantadas da condição in vitro podem apresentar dificuldades na aclimação e crescimento bastante lento.

A condição de ausência de luminosidade na obtenção dos porta-enxertos não se mostrou essencial em maracujazeiro. No entanto, investigações sobre o nível de estiolamento dos tecidos do porta-enxerto poderão trazer incremento aos resultados obtidos. Em citrus o estiolamento obtido pela manutenção das plântulas destinadas à porta-enxerto na ausência de luz é considerada como necessária (PAZ; PASQUAL, 1998). Navarro et al. (1975) constataram efeito da condição de luminosidade na produção dos porta-enxertos na microenxertia in vitro em citrus. Maiores níveis de pegamento, 37,5%, foram obtidos com a obtenção dos porta-enxertos no escuro, contra 2,7% em exposição a 1000 lux.

O tecido do porta-enxerto sobre o qual é depositado o ápice pode ter influência sobre o pegamento. Navarro et al. (1975) testaram várias possibilidades na microenxertia in vitro de citrus e concluíram que os melhores resultados foram obtidos com a deposição do explante sobre o cilindro vascular no ápice do porta-enxerto decapitado ou sobre o córtex na base do “T” invertido com índices de 50% e 45%, respectivamente. Os autores recomendaram a utilização do “T” invertido por proporcionar maior facilidade na identificação das brotações adventícias do porta enxerto. No presente trabalho procurou-se a deposição do ápice sobre o córtex na base da abertura retangular. A abertura retangular foi adotada em função da ordem das operações propostas serem diferentes com a realização da microenxertia anterior à decapitação do porta-enxerto, o que facilita a fixação do mesmo. Neste caso a realização da incisão em “T” invertido não permite a adequada abertura da epiderme. Esta adequação contribuiu para a facilidade das operações, o que é relevante considerando que a habilidade manual é um dos principais fatores de sucesso na microenxertia (MURASHIGE et al. 1972; PAZ; PASQUAL, 1998) e que tanto a excisão em “T” invertido quanto o corte do ápice caulinar devem ser perfeitos e rápidos, para facilitar a aderência e evitar o ressecamento dos tecidos (NAVARRO, 1975; PAZ; PASQUAL 1998).

Eliminação do vírus CABMV

Todas as plantas obtidas apresentaram-se assintomáticas em relação à virose do endurecimento dos frutos até a redação deste trabalho. O resultado do teste ELISA indireto realizado nas primeiras sessenta mudas obtidas indicou que, 93% das mesmas, 54 plantas, encontravam-se livres de vírus detectável pela acuidade do teste. As medidas das absorvâncias estão relacionadas no Anexo B.3. Torres et al (1998) consideram os métodos sorológicos para a indexação de vírus em plantas, especialmente o ELISA, como amplamente adotados, sendo eficientes e rápidos. Torrance (1998) e Almeida (2001), no entanto, afirmam que o teste ELISA possui baixa acuidade para a detecção de baixas concentrações virais, de modo que, avaliações posteriores deverão ser realizadas para confirmar o diagnóstico.

Pelo critério de avaliação utilizado no teste ELISA, em que se considerou como positivo a amostra cujo nível de absorvância foi duas vezes maior que o controle negativo, foi possível detectar uma amostra positiva e três suspeitas. As possíveis causas da não eliminação de vírus podem ser atribuídas ao tamanho inadequado do explante e à características do patógeno. Paz e Pasqual (1998) consideram a dimensão do ápice fundamental para a obtenção de plantas livres de vírus, sendo recomendável a utilização de ápices acompanhados de dois primórdios

foliares, com aproximadamente 0,15 mm, o que pode limitar substancialmente o pegamento. No presente trabalho foram utilizados ápices com 2 a 4 primórdios foliares e 0,2 a 0,4 mm de comprimento, o que sugere que os explantes de maior dimensão poderiam estar contaminados. Navarro (1988) classifica os patógenos sistêmicos como sendo de fácil ou difícil eliminação via microenxertia, de acordo com seu potencial de infecção à tecidos apicais. Trabalho realizado por Suarez et al. (2005) demonstrou que microenxertia *in vitro* em abacateiro (*Persea americana*) não foi capaz de eliminar o viróide ASBVd, resultando em 100% de plantas ainda infectadas a partir de 137 microenxertias realizadas, metade com ápices menores que 0,5 mm e metade com ápices entre 0,5 e 1mm.

O uso da termoterapia associada à microenxertia pode elevar a taxa de obtenção de plantas livres de vírus e contribuir para o incremento no pegamento por permitir o uso de explantes maiores (NAVARRO, 1975; PAZ; PASQUAL, 1998).

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível estimar como promissora a utilização da microenxertia *ex vitro* em maracujazeiro-azedo com finalidade da eliminação de vírus.

CONCLUSÕES

A microenxertia ex vitro em maracujazeiro-azedo mostrou-se viável e apresentou índice de pegamento médio de 27,22 % quando realizada no hipocótilo e 32,22 % quando realizada no epicótilo de plântulas conduzidas na sombra em substrato comercial esterilizado em condição de laboratório.

Quando a microenxertia foi realizada no hipocótilo não houve efeito da aplicação de meios de cultura sobre o sucesso da microenxertia. Quando a microenxertia foi realizada no epicótilo, o meio MS acrescido dos fitorreguladores AIB e BAP proporcionou o maior índice de pegamento na microenxertia, 53,3%, e maior desenvolvimento das brotações. Ocorreram brotações adventícias nos porta-enxertos nas microenxertias realizadas nas duas regiões e as mesmas não foram influenciadas pelos meios de cultura.

Observações anatômicas mostraram a ocorrência de intenso calejamento que proporcionou a junção entre microenxerto e porta-enxerto aos sete dias após a microenxertia. O início da formação da conexão vascular entre os participantes foi observada aos 15 dias e estava estabelecida aos 30 dias. A região da soldadura aos 90 dias mostrou-se lignificada e reforçada por drusas de oxalato de cálcio.

Noventa e três por cento das plantas avaliadas pelo teste ELISA indireto, com 80 a 100 dias da microenxertia, foram consideradas livres do vírus CABMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.F.; NUNES, J.C. O.; SANTOS, M.; PEDROTTI. Estudos histológicos preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, p. 195-196, 2003.

AGUIAR, D. R. D.; SANTOS, C. C. F. Importância econômica e mercado. In: BRUCNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 9-49.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S. do; CARVALHO, M. G de; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 33-38, 2005.

ALMEIDA, A. M. R. de. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A. M. R. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001.

ANJOS, J. R. dos; JUNQUEIRA, N. T.; CHARCHAR, M. J. A. Levantamento do *passion fruit woodiness virus* em maracujazeiro-azedo no cerrado do Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém:SBF, 2002. 1 CD-ROM.

AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 20, p. 503-507, 2001.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, Viale delle Idee, v.8, n. 3, 171-175, 1994.

BUENO, P.A. de O.; MIRANDA, H.A.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUZA, M.A. de F.; PIRES, M de C. Incidência e severidade de *passionfruit woodiness virus* (PWV) em 50 genótipos de maracujazeiro azedo, sob condições de campo do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. Fortaleza, 2004. **Anais...** Fortaleza: CBF, 2004, 1 CD-ROM.

DANTHU, P.; HANE, B.; SAGNA, P.; GASSAMA, Y.K. Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree, through serial root sucker micrografting. **New Forests**, Netherlands, v. 24, p. 239-244, 2002.

DE PASQUALE, F.; GIUFFRIDA, S.; CARIMI, F. Minigrafting of shoots, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of in vitro citrus regenerants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 152-157, 1999.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explant of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 26, p. 23-27, 1991.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 45-68.

ESTRADA-LUNA, A.A.; LÓPEZ-PERALTA, C. CÁRDENAS-SORIANO, E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 92, p. 317-327, 2002.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, p. 1276-1277, 1997.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 21-43.

FNP. **Agriannual 2006-Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP - Consultorias & Agroinformativos, 2006. p. 394-395.

GONÇALVES, K. S.; JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da S. **Efeito residual do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* do maracujazeiro amarelo**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBF, 2004. 1 CD-ROM.

HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. **Neltropica Bulletin**, Nelspruit, n. 304, p. 7-8, 1999.

JEFFRE, C.E.; YEOMAN, M.M. Development of intercellular connections between opposing cells in graft unions. **New Phytologist**, Sheffield, v. 93, p. 491-509, 1983.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mac Graw Book Company Inc., 1940. 523p.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; KOBAYASHI, A. K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 97-106.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 2, p. 519-531.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 85-137.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 1997.198p.

LIMA, A. de A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p.109-116.

LESSA A. O. **Utilização de microenxertia para obtenção de plantas de *Malus domestica* Borkh livres do vírus da mancha clorótica das folhas da macieira**. 1998. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas, 1998.

LOMBARDI, S. P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

LUO, J.; GOULD, J. H. In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, v. 57, p. 211-213, 1999.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic médium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Development Biology**. Oxford, v. 36, p. 527-531, 2000.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. In vitro micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, V. 66, p. 49-58, 2001.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting an its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **Hortscience**, Alexandria, v.7, p. 118-119, 1972.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.

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

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. MURILO. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**. Viena, v. 161, p.21-34, 2006.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-fre Citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, p. 471-479, 1975.

NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody espécies. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227, p. 43-55, 1988.

NUNES, J. C. O.; ABREU, M. F. de, DANTAS, A. C. de M. Morphologic characterization in apple micrografts. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, p.80-83. 2005.

OLIVEIRA, I. V. M, DAMIÃO FILHO, C. F., CARVALHO, S. A. de. Enxertia em citrus por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas**, v. 24, p. 744-747, 2002.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A. de. Alternativa para promoção do crescimento *in vitro* de microenxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 1095-1099, 1993.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 561-566. 2002.

PATHIRANA R.; MCKENZIE M. J. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using in vitro micrografting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 81, p.11-18, 2005.

PAZ, O. P. da; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPQ; CBAB, 1998. v. 1, p. 147-159.

PIO, R.; CASTRO, E. M. de; RAMOS, J. D.; GAVILANES, M. L.; RIBEIRO, W. G. Características anatômicas de porta-enxertos de citrus para microenxertia em diferentes alturas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, p. 848-852, 2001.

PIRES, M. de M.; MATA, H. T. da C. Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 325-343.

RAHARJO S. H.T.; LITZ R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 82, p.1-9, 2005.

RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 237-241, 2002.

RICHARDSON, F. V. M.; SAOIR, S. M; HARVEY, B. M. R. A study of the graft union in in vitro micrografted apple. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 20 p. 17-23, 1996.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. dos; BARBOSA, C. de J. Doenças do maracujazeiro . In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-280.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F. Problemas no cultivo in vitro. In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p.72-79.

SAS INSTITUTE. **SAS User's guide: statistics version**. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1990. 846p.

SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, W. E. Propagação. In: BRUCNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 85-137.

STARRANTINO, A.; CARUSO, A. The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. **Acta Horticulturae**. Oxford, v. 227, p. 101-103, 1988.

SUAREZ, I. E.; SCHNELL, R. A.; KUHN, D. N.; LITZ, R. E. Micrografting of ASBDD-infected Avocado (*Persea americana*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, V. 80, p. 179-185, 2005.

TAKAHARA, T.; OKUDAI, N.; OIYAMA, I. Studies on producing tristeza-free budwood of citrus cultivars. **Agriculture and Horticulture**. Tokyo, v. 56, p. 333-334, 1980.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TORRANCE, L. Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, v. 52, p. 37-32, 1998.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 133-145.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 2001, 20 p. (Circular Técnica, 24)

VIDAL, A. M.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. **Estabelecimento in vitro de maracujazeiro amarelo, acesso BGM 39**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18, 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza:SBF, 2004. 1 CD-ROM.

ILUSTRAÇÕES



Figura 2.1 - Porta enxerto de maracujazeiro-azedo com 21 dias de idade. Montes Claros-MG, 2006.

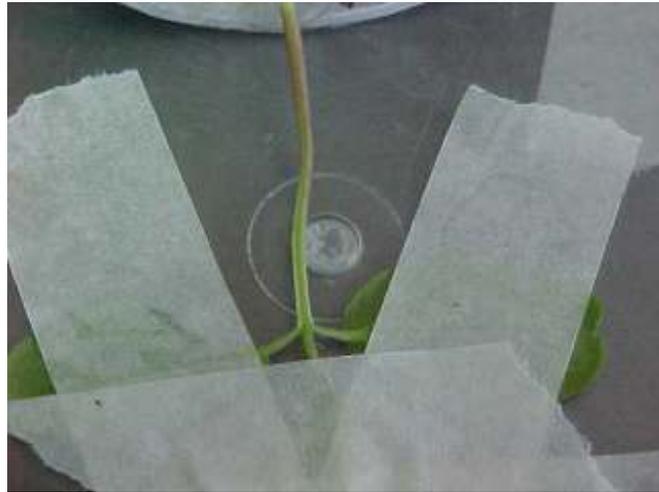


Figura 2.2 - Porta enxerto de maracujazeiro-azedo fixado com fita adesiva em recipiente tipo Gerbox para a realização da microenxertia. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.3 - Incisão retangular com agulha de seringa hipodérmica em caule de maracujazeiro-azedo para a retirada da epiderme. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.4 - Excisão de ápice caulinar de maracujazeiro-azedo com agulha de seringa hipodérmica. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.5 – Ápice caulinar de maracujazeiro-azedo depositado na abertura do caule. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.6 - Decapitação do caule de maracujazeiro-azedo acima do ponto da microenxertia realizado com bisturi. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2. 7 – Cobertura de planta de maracujazeiro-azedo microenxertada com saco plástico de polietileno. Montes Claros-MG, 2006



Figura 2.8 – Cultivo de plantas microenxertadas de maracujazeiro-azedo em câmara de crescimento com iluminação artificial. Montes Claros-MG, 2006

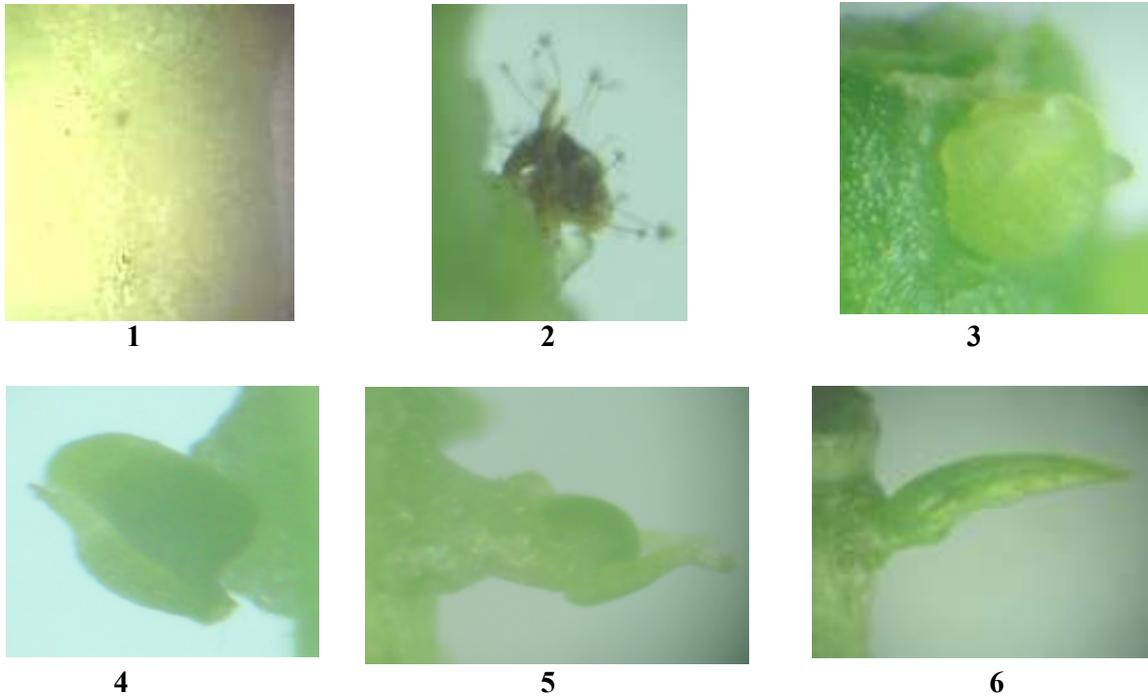


Figura 2.9 – Fotomicrografias ilustrativas da escala de desenvolvimento da microenxertia em maracujazeiro-azedo utilizada na avaliação aos 15 dias: 1) explante morto e ausência de calejamento; 2) explante morto, neste caso atacado por fungos, presença de calejamento; 3) explante com pequeno desenvolvimento, clorótico; 4) explante com desenvolvimento, coloração verde, sem desenvolvimento de primórdios foliares; 5) explante apresentando desenvolvimento de primórdios foliares; 6) explante com desenvolvimento foliar. Montes Claros-MG, 2006.

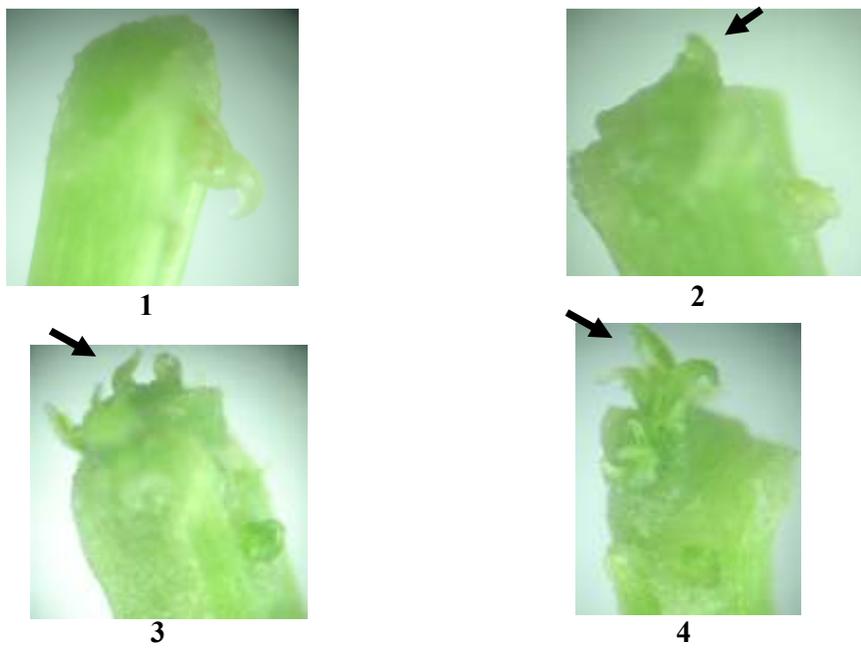


Figura 2.10 – Fotomicrografias ilustrativas da escala de desenvolvimento das brotações adventícias do porta-enxerto na microenxertia em maracujazeiro-azedo utilizada na avaliação aos 15 dias: 1) ausência de brotações adventícias no porta-enxerto; 2) presença de gema adventícias no porta-enxerto (seta); 3) brotações adventícias com desenvolvimento de primórdios foliares no porta-enxerto (seta); 4) brotações adventícias com desenvolvimento foliar no porta-enxerto (seta). Montes Claros-MG, 2006.

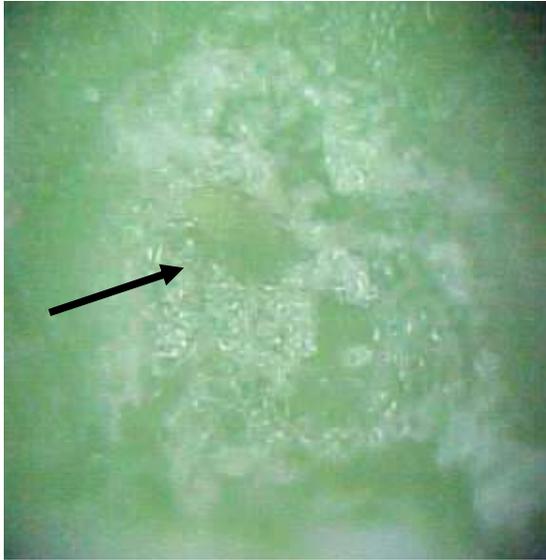


Figura 2.11 – Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo com cinco dias com ápice caulinar (seta) envolvido por intenso calejamento. Montes Claros-MG, 2006



Figura 2.12 - Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo com sete dias com início do desenvolvimento do ápice caulinar soldado pelo calejamento. Montes Claros-MG, 2006



Figura 2.13 – Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Ápice com crescimento soldado pelo calejamento. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.14 – Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Microenxerto apresentando desenvolvimento de folha. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.15 – Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 15 dias. Desenvolvimento do microenxerto (seta) concomitante à brotação advéncia do porta-enxerto. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.16 – Microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo aos 30 dias. Desenvolvimento do microenxerto com expansão foliar e desenvolvimento do ápice caulinar. Montes Claros-MG, 2006.



Figura 2.17 – Plantas de maracujazeiro-azedo 30 dias após a microenxertia. Montes Claros-MG, 2006



Figura 2.18 – Planta de maracujazeiro-azedo 90 dias após a microenxertia. A seta indica o ponto da microenxertia. Montes Claros-MG, 2006

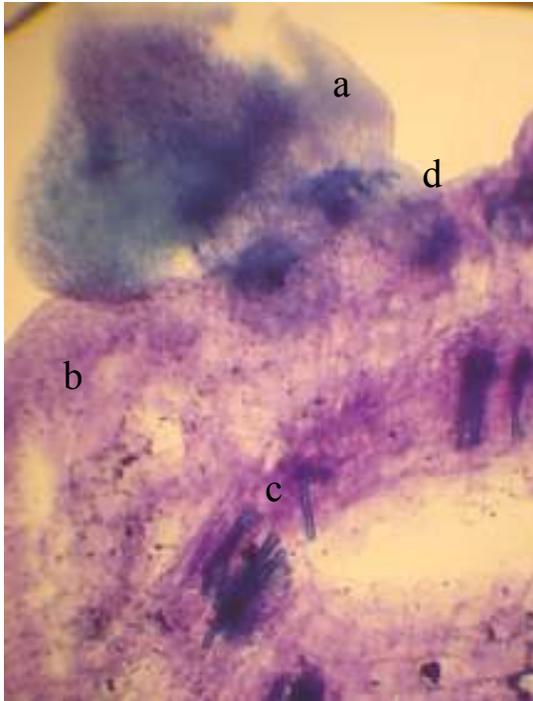


Figura 2.19 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos sete dias. A imagem evidencia tecidos do ápice não vascularizado (a), a região do córtex (b) e do cilindro vascular (c) do porta-enxerto e o calejamento que estabelece a junção entre os participantes (d). Montes Claros-MG, 2006.

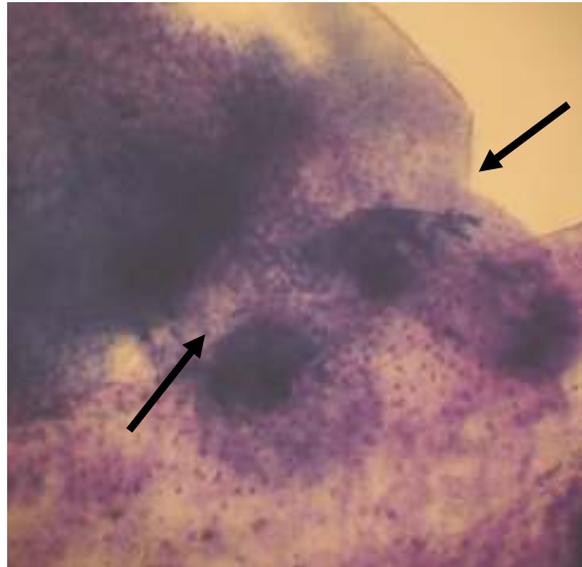


Figura 2.20. Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos sete dias. Detalhe da junção dos tecidos do ápice e porta-enxerto estabelecida pelo calejamento (setas). Montes Claros-MG, 2006



Figura 2.21 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 15 dias. O ápice (a) encontra-se estabelecido sobre calo (b) que ocupa toda a profundidade do córtex (c) atingindo o cilindro vascular (d). A seta indica o desenvolvimento da vascularização. Montes Claros-MG, 2006

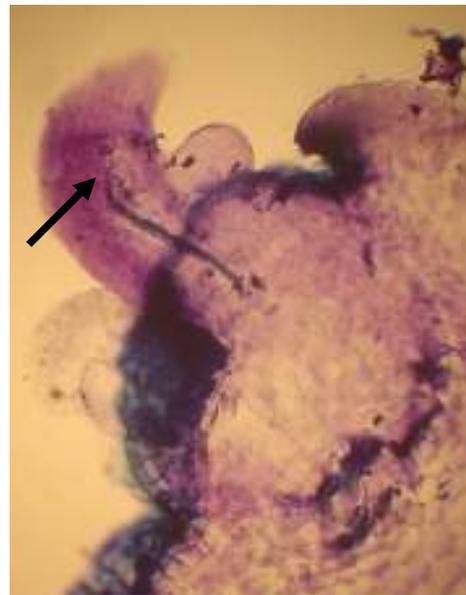


Figura 2.22 - Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 15 dias. Detalhe da vascularização do ápice. A seta indica a região de origem dos vasos que coincide com a região do procâmbio do primórdio foliar. Montes Claros-MG, 2006

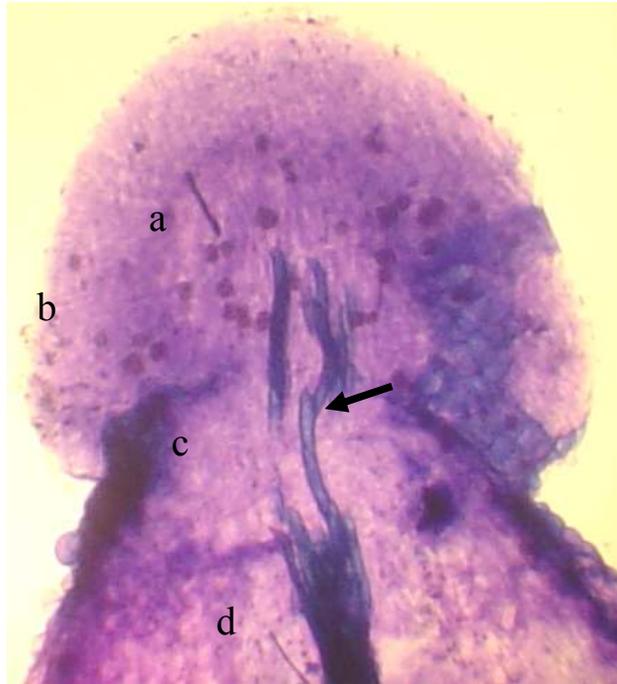


Figura 2.23 – Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 30 dias. Tecidos do ápice (a) envoltos em calejamento (b e c). A seta indica o estabelecimento da conexão vascular entre o ápice e o porta-enxerto (d). Montes Claros-MG, 2006

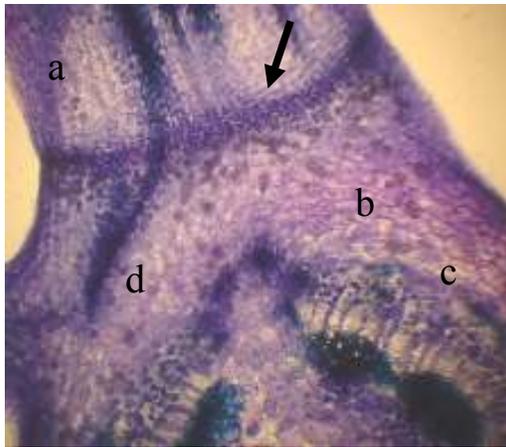


Figura 2.24 – Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 90 dias. Tecidos do enxerto (a), córtex (b) e cilindro vascular (c) do porta-enxerto e conexão vascular entre os participantes (d). A seta indica a região de soldadura entre os participantes. Montes Claros-MG, 2006.

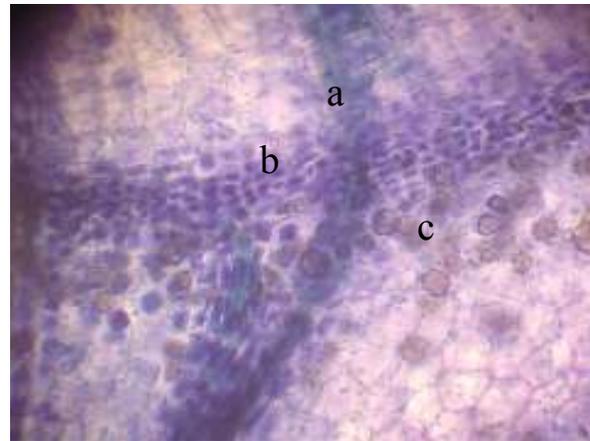


Figura 2.25 – Fotomicrografia de corte histológico da microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no epicótilo aos 90 dias. Detalhe da região de soldadura mostrando a conexão vascular (a) células lignificadas (b) e drusas de oxalato de cálcio (c). Montes Claros-MG, 2006.

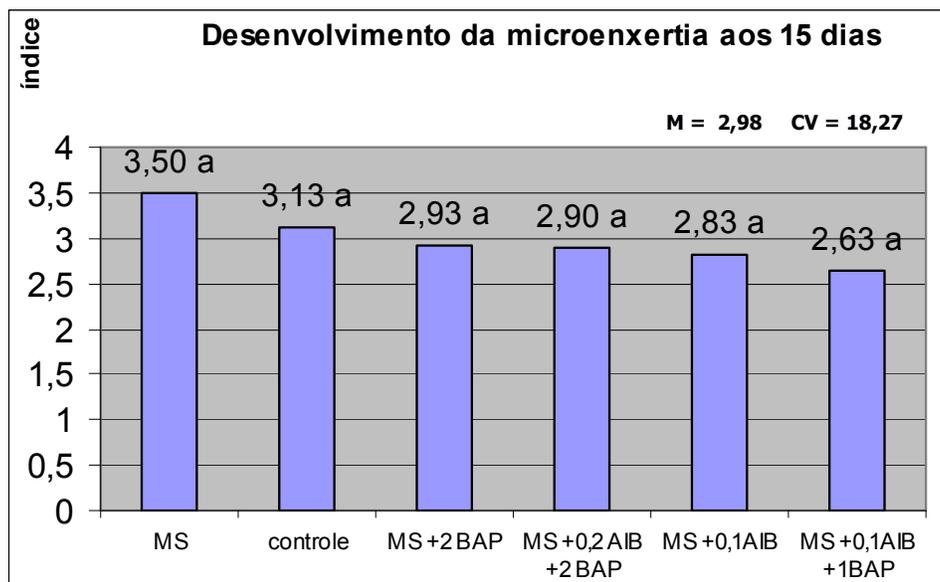


Figura 2.26 - Índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no hipocótilo de maracujazeiro-azedo aos 15 dias. Montes Claros-MG, 2006.

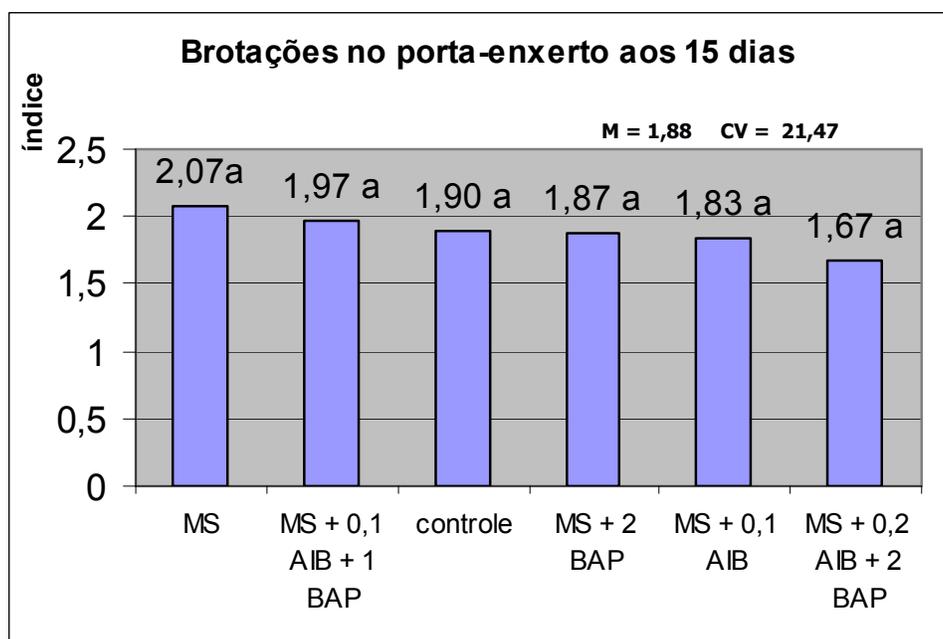


Figura 2.27 - Índice de brotações no porta-enxerto na microenxertia realizada no hipocótilo de maracujazeiro-azedo aos 15 dias. Montes Claros-MG, 2006.

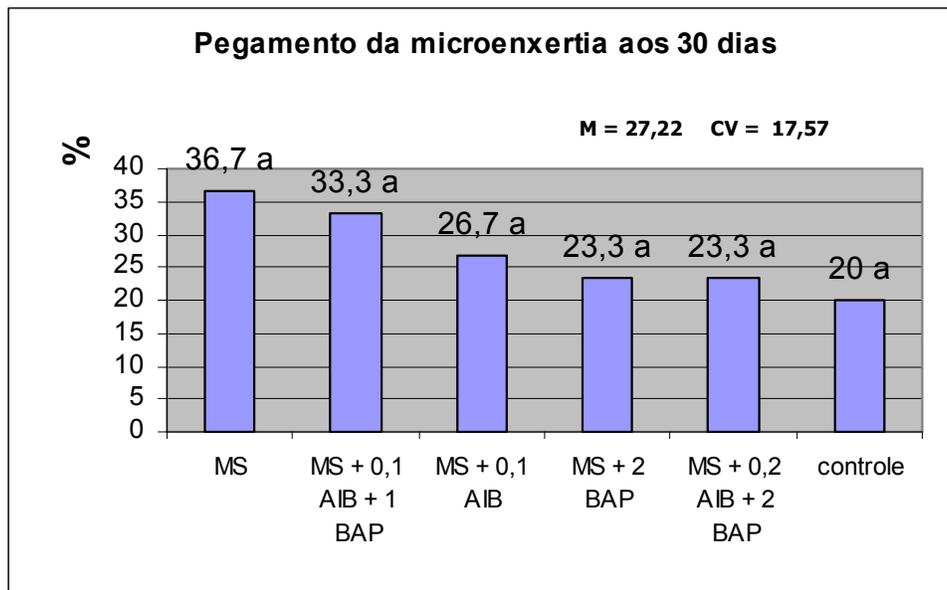


Figura 2.28 - Percentual de pegamento da microenxertia realizada no hipocótilo de maracujazeiro-azedo aos 30 dias. Montes Claros-MG, 2006.

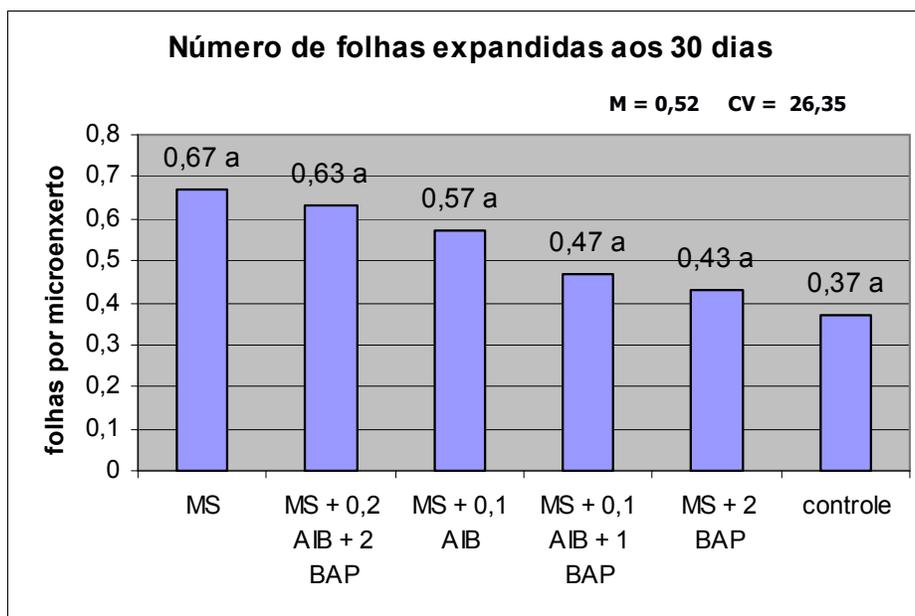


Figura 2.29 - Número médio de folhas expandidas na microenxertia realizada no hipocótilo de maracujazeiro-azedo aos 30 dias. Montes Claros-MG, 2006.

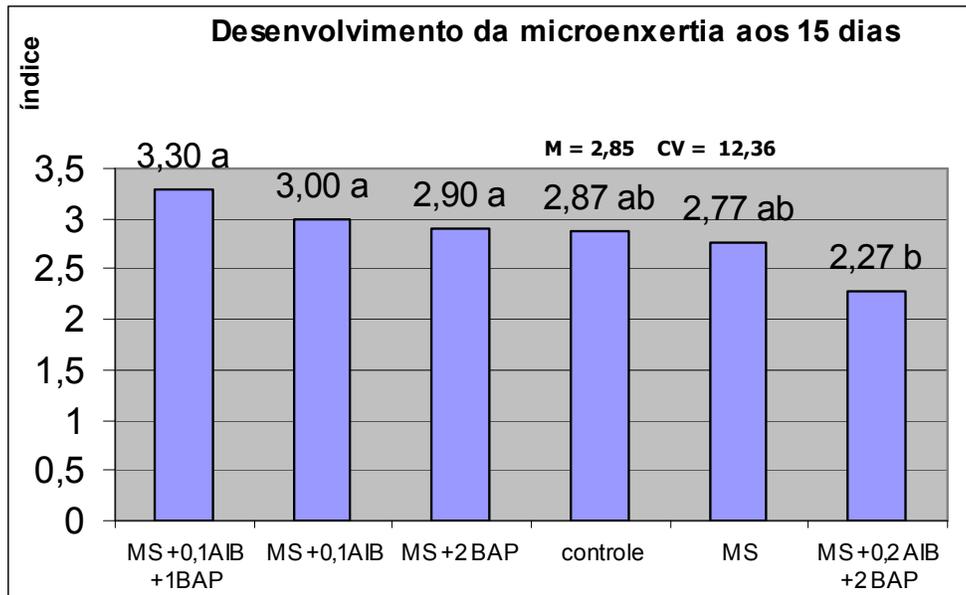


Figura 2.30 - Índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no epicótilo de maracujazeiro-azedo aos 15 dias. Montes Claros-MG, 2006.

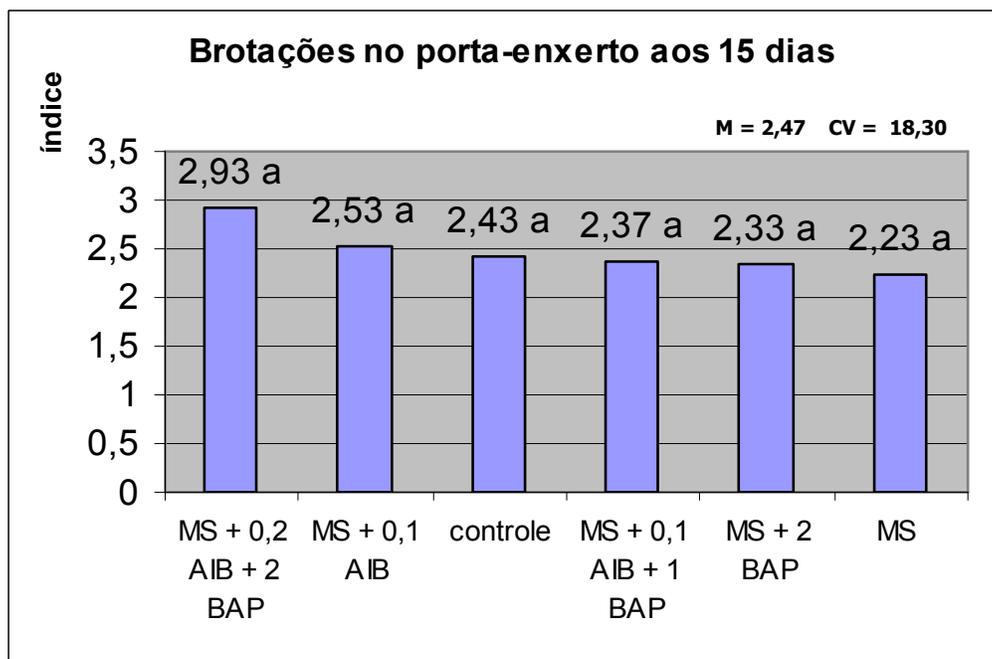


Figura 2.31 - Índice de brotações no porta-enxerto na microenxertia realizada no epicótilo de maracujazeiro-azedo aos 15 dias. Montes Claros-MG, 2006.

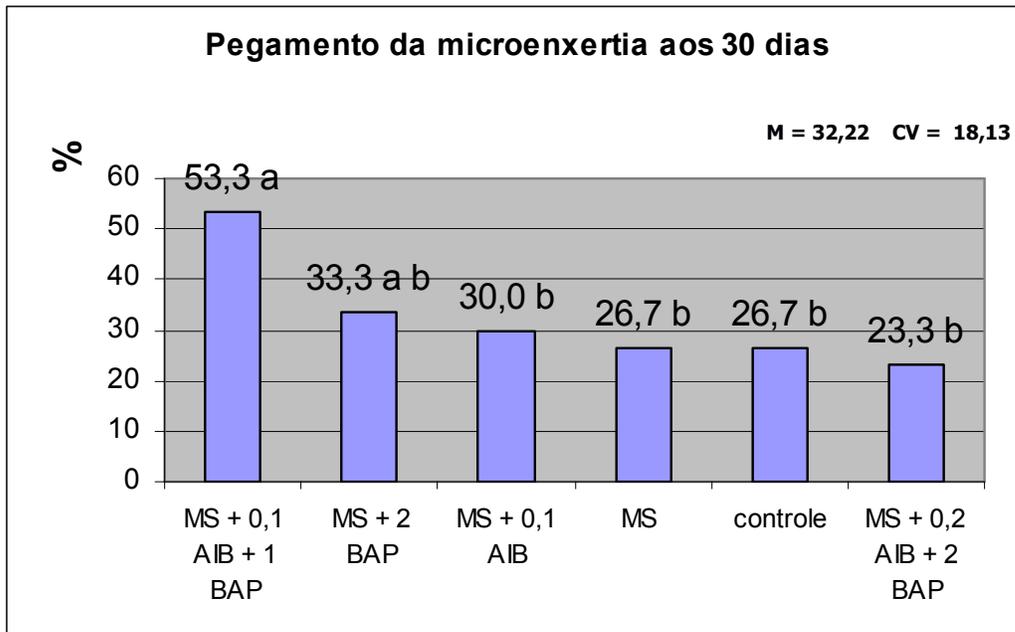


Figura 2.32 - Percentual de pegamento da microenxertia realizada no epicótilo de maracujazeiro-azedo aos 30 dias. Montes Claros-MG, 2006.

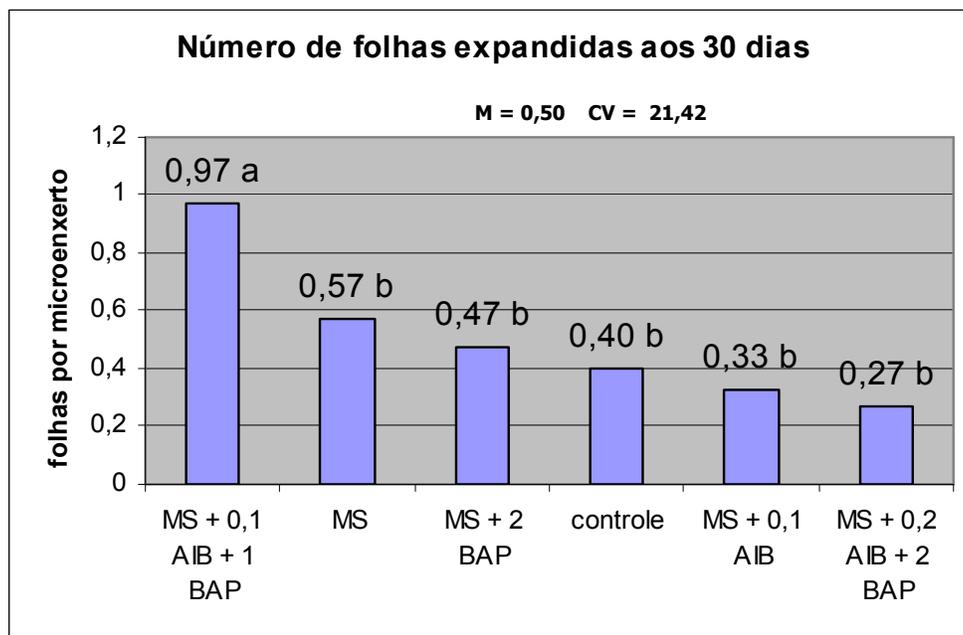


Figura 2.33 - Número médio de folhas expandidas na microenxertia realizada no epicótilo de maracujazeiro-azedo aos 30 dias. Montes Claros-MG, 2006.

Tabela 2.1 - Correlações entre os parâmetros avaliados no experimento com a microenxertia realizada no hipocótilo em maracujazeiro-azedo. Montes Claros-MG, 2006.

Parâmetros		Correlação
Desenvolvimento aos 15 dias	Brotações adventícias aos 15 dias	0,101
Desenvolvimento aos 15 dias	Pegamento aos 30 dias	0,180
Desenvolvimento aos 15 dias	Número de folhas aos 30 dias	0,315
Brotações adventícias aos 15 dias	Pegamento aos 30 dias	-0,064
Brotações adventícias aos 15 dias	Número de folhas aos 30 dias	-0,007
Pegamento aos 30 dias	Número de folhas aos 30 dias	0,808

Tabela 2.2 - Correlações entre os parâmetros avaliados no experimento com a microenxertia realizada no epicótilo em maracujazeiro-azedo. Montes Claros-MG, 2006.

Parâmetros		Correlação
Desenvolvimento aos 15 dias	Brotações adventícias aos 15 dias	-0,172
Desenvolvimento aos 15 dias	Pegamento aos 30 dias	0,393
Desenvolvimento aos 15 dias	Número de folhas aos 30 dias	0,514
Brotações adventícias aos 15 dias	Pegamento aos 30 dias	-0,291
Brotações adventícias aos 15 dias	Número de folhas aos 30 dias	-0,126
Pegamento aos 30 dias	Número de folhas aos 30 dias	0,818

Tabela 2.3 - Resumo dos resultados dos experimentos sobre a microenxertia em maracujazeiro-azedo realizada no hipocótilo e epicótilo. Montes Claros-MG, 2006.

Parâmetro	Local da microenxertia	
	Hipocótilo	Epicótilo
Índice de desenvolvimento aos 15 dias	2,98	2,85
Índice de brotações do porta-enxerto aos 15 dias	1,88	2,47
Correlação entre o índice de brotações do porta-enxerto e o índice de desenvolvimento aos 15 dias	0,101	- 0,172
Percentual de pegamento aos 30 dias	27,22	32,22
Folhas expandidas por parcela aos 30 dias	0,52	0,50

ANEXOS

Anexos A.1 – Resumos das análises de variância do experimento “Efeito acessos e fontes de explante na organogênese de maracujazeiro amarelo”

Anexo A.1.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes vivos aos 21 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	5.43903423	1.35975856	0.52	0.7219 ^{ns}
Fonte	3	57.25242568	19.08414189	7.28	0.0001**
Acesso*fonte	12	30.59643331	2.54970278	0.97	0.4762 ^{ns}
Erro	180	471.6115306	2.6200641		
Total	199	564.8994238			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.165141	17.34883		89.87500		9.330086

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes organogênicos aos 21 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	4.994443	1.248611	0.75	0.5596 ^{ns}
Fonte	3	3163.397413	1054.465804	632.90	<.0001**
Acesso*fonte	12	11.694000	0.974500	0.58	0.8526 ^{ns}
Erro	180	299.895929	1.666088		
Total	199	3479.981785			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.913823	17.90405		69.37500		7.209375

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes com brotos aos 21 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	2.424343	0.606086	0.13	0.9721 ^{ns}
Fonte	3	3117.771130	1039.257043	219.54	<.0001**
Acesso*fonte	12	49.228718	4.102393	0.87	0.5820 ^{ns}
Erro	180	852.084540	4.733803		
Total	199	4021.508731			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.788118	48.18039		40.78125		7.720832

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	27.134895	6.783724	2.66	0.0344 ^{ns}
Fonte	3	2652.418824	884.139608	346.51	<.0001**
Acesso*fonte	12	72.380969	6.031747	2.36	0.0076**
Erro	180	459.286057	2.551589		
Total	199	3211.220744			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.856975	25.49878		55.30000		6.264495

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.5 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2003.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Fonte	3	532.2056540	177.4018847	116.42	<.0001**
Erro	36	54.8589091	1.5238586		
Total	39	587.0645631			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.906554	19.56769		54.47500		6.308596

** : significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.6 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2021.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Fonte	3	479.5348523	159.8449508	43.16	<.0001**
Erro	36	133.3404817	3.7039023		
Total	39	612.8753340			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.782435	32.10795		51.25000		5.994007

** : significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.7 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2024.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Fonte	3	636.1173583	212.0391194	200.86	<.0001**
Erro	36	38.0044831	1.0556801		
Total	39	674.1218414			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.943624	14.90456		64.37500		6.893617

** : significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.8 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo MAR-2048.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Fonte	3	544.0726839	181.3575613	57.77	<.0001**
Erro	36	113.0134855	3.1392635		
Total	39	657.0861693			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.828008	28.05920		56.30000		6.314495

** : significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.9 – Quadro resumo da análise de variância da interação entre acesso e fonte na avaliação do percentual de explantes vivos aos 42 dias de cultivo no genótipo RG.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Fonte	3	532.8692439	177.6230813	53.26	<.0001**
Erro	36	120.0686977	3.3352416		
Total	39	652.9379416			
R²	CV		Média (x)		Média (√x)
0.816110	31.42360		50.10000		5.811760

** : significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.10 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes organogênicos aos 42 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	31.03216684	7.75804171	1.99	0.0990 ^{ns}
Fonte	2	71.93578356	35.96789178	9.24	0.0002**
Acesso*fonte	8	50.42540366	6.30317546	1.62	0.1247 ^{ns}
Erro	135	525.3085798	3.8911747		
Total	149	678.7019339			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.526010	24.04152		71.84667		8.204998

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.11 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do percentual de explantes com brotos aos 42 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	6.054079	1.513520	0.33	0.8592 ^{ns}
Fonte	2	1300.288310	650.144155	140.62	<.0001**
Acesso*fonte	8	32.488501	4.061063	0.88	0.5365 ^{ns}
Erro	135	624.141001	4.623267		
Total	149	1962.971891			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.682043	34.99726		50.83333		6.143847

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo A.1.12 – Quadro resumo da análise de variância do número de brotos por explante aos 42 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Acesso	4	0.55419130	0.13854782	0.44	0.7777 ^{ns}
Fonte	2	74.41701034	37.20850517	118.82	<.0001**
Acesso*fonte	8	2.12536038	0.26567005	0.85	0.5619 ^{ns}
Erro	135	42.2752908	0.3131503		
Total	149	119.3718528			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.645852	40.27186		2.726667		1.389552

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexos B.1 – Resumos das análises de variância do experimento “Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no hipocótilo”

Anexo B.1.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	2.66222222	0.53244444	1.78	0.1526 ^{ns}
Blocos	5	1.39555556	0.27911111	0.94	0.4750 ^{ns}
Erro	25	7.45777778	0.29831111		
Total	35	11.51555556			
R²	CV		Média (x)		
0.352374	18.27363		2.988889		

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo B.1.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de brotações adventícias do porta-enxerto da microenxertia realizada no hipocótilo aos 15 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	0.54333333	0.10866667	0.66	0.6539 ^{ns}
Blocos	5	5.23666667	1.04733333	6.40	0.0006**
Erro	10	4.09000000	0.16360000		
Total	35	9.87000000			
R²	CV		Média (x)		
0.585613	21.47655		1.883333		

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo B.1.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do pegamento da microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	0.10308849	0.02061770	2.54	0.0546 ^{ns}
Blocos	5	0.02302115	0.00460423	0.57	0.7247 ^{ns}
Erro	25	0.20315717	0.00812629		
Total	35	0.32926681			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.383001	17.57541		27.222222		0.512909

ns: não significativo à 5% de probabilidade;

Anexo B.1.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do número de folhas expandidas na microenxertia realizada no hipocótilo aos 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	0.17038015	0.03407603	1.01	0.4350 ^{ns}
Blocos	5	0.21630083	0.04326017	1.28	0.3051 ^{ns}
Erro	25	0.84718416	0.03388737		
Total	35	1.23386514			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.313390	26.35312		0,5222		0.698533

ns: não significativo à 5% de probabilidade

Anexos B.2 – Resumos das análises de variância do experimento do experimento “Efeito de meios de cultura aplicados no ponto da microenxertia realizada no epicótilo”

Anexo B.2.1 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de desenvolvimento da microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	3.45000000	0.69000000	5.56	0.0014**
Blocos	5	0.83666667	0.16733333	1.35	0.2772 ^{ns}
Erro	25	3.10333333	0.12413333		
Total	35	7.39000000			
R²	CV		Média (x)		
0.580063	12.36230		2.850000		

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo B.2.2 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do índice de brotações adventícias do porta-enxerto da microenxertia realizada no epicótilo aos 15 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	1.83222222	0.36644444	1.79	0.1517 ^{ns}
Blocos	5	3.61888889	0.72377778	3.53	0.0149*
Erro	25	5.12111111	0.20484444		
Total	35	10.57222222			
R²	CV		Média (x)		
0.515607	18.30731		2.472222		

ns: não significativo à 5% de probabilidade; *: significativo à 5 % de probabilidade

Anexo B.2.3 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do pegamento da microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	0.24068361	0.04813672	4.76	0.0034**
Blocos	5	0.04042381	0.00808476	0.80	0.5604 ^{ns}
Erro	25	0.25272699	0.01010908		
Total	35	0.53383441			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.526582	18.13462		32.22222		0.554431

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo B.2.4 – Quadro resumo da análise de variância da avaliação do número de folhas expandidas na microenxertia realizada no epicótilo aos 30 dias.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p>F
Tratamentos	5	0.85014037	0.17002807	8.05	0.0001**
Blocos	5	0.05337042	0.01067408	0.51	0.7695 ^{ns}
Erro	25	0.52820059	0.02112802		
Total	35	1.43171138			
R²	CV		Média (x)		Média (\sqrt{x})
0.631070	21.42604		0,50000		0.678403

ns: não significativo à 5% de probabilidade; **: significativo à 1% de probabilidade

Anexo B.3 – Resultado do teste ELISA indireto para detecção do vírus CABMV a partir da leitura do espectrofotômetro com filtro de 405 nm em amostras de folha maracujazeiro-azedo microenxertados.

Número da amostra	Posição na placa ELISA	Absorbância	Diagnóstico
P	2 B	2.309	Controle Positivo
N	11 G	0.563	Controle Negativo
1	2 C	0.478	NEGATIVO
2	2 D	0.473	NEGATIVO
3	2 E	0.960	SUSPEITO
4	2 F	0.494	NEGATIVO
5	2 G	0.438	NEGATIVO
6	3 B	0.491	NEGATIVO
7	3 C	0.366	NEGATIVO
8	3 D	0.447	NEGATIVO
9	3 E	0.682	NEGATIVO
10	3 F	0.463	NEGATIVO
11	3 G	0.560	NEGATIVO
12	4 B	0.447	NEGATIVO
13	4 C	0.486	NEGATIVO
14	4 D	0.815	SUSPEITO
15	4 E	0.465	NEGATIVO
16	4 F	0.438	NEGATIVO
17	4 G	0.478	NEGATIVO
18	5 B	0.433	NEGATIVO
19	5 C	0.451	NEGATIVO
20	5 D	0.447	NEGATIVO
21	5 E	0.416	NEGATIVO
22	5 F	0.445	NEGATIVO
23	5 G	0.463	NEGATIVO
24	6 B	0.397	NEGATIVO
25	6 C	0.465	NEGATIVO
26	6 D	0.468	NEGATIVO
27	6 E	0.438	NEGATIVO
28	6 F	0.453	NEGATIVO
29	6 G	0.450	NEGATIVO
30	7 B	0.546	NEGATIVO
31	7 C	0.334	NEGATIVO
32	7 D	0.583	NEGATIVO
33	7 E	1.938	POSITIVO
34	7 F	0.460	NEGATIVO
35	7 G	0.490	NEGATIVO
36	8 B	0.453	NEGATIVO
37	8 C	0.477	NEGATIVO
38	8 D	0.522	NEGATIVO
39	8 E	0.449	NEGATIVO
40	8 F	0.453	NEGATIVO
41	8 G	0.496	NEGATIVO
42	9 B	0.542	NEGATIVO
43	9 C	0.440	NEGATIVO
44	9 D	0.433	NEGATIVO
45	9 E	0.481	NEGATIVO
46	9 F	0.444	NEGATIVO
47	9 G	0.462	NEGATIVO
48	10 B	0.443	NEGATIVO
49	10 C	0.447	NEGATIVO
50	10 D	0.453	NEGATIVO
51	10 E	0.452	NEGATIVO
52	10 F	0.411	NEGATIVO
53	10 G	0.385	NEGATIVO
54	11 B	0.536	NEGATIVO
55	11 C	0.380	NEGATIVO
56	11 D	0.413	NEGATIVO
57	11 E	0.345	NEGATIVO
58	11 F	0.540	NEGATIVO
59	12 B	0.553	NEGATIVO
60	12 C	0.977	SUSPEITO