

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

ELIAS DA CRUZ RIBEIRO

DIAGNÓSTICO VIRAL E LIMPEZA CLONAL DE MATRIZES DE MARACUJAZEIRO
(*Passiflora edulis* Sims) UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS

MANAUS-AM
2021

ELIAS DA CRUZ RIBEIRO

**DIAGNÓSTICO VIRAL E LIMPEZA CLONAL DE MATRIZES DE
MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* Sims) UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE
SEMENTES HÍBRIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade
Federal do Amazonas – UFAM, como requisito
para obtenção do título de mestre em
Biotecnologia.

ORIENTADOR: DR. JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA

MANAUS-AM
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484d Ribeiro, Elias da Cruz
Diagnóstico viral e limpeza clonal de matrizes de maracujazeiro
(*Passiflora edulis* Sims) utilizadas na produção de sementes
híbridas / Elias da Cruz Ribeiro . 2021
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. *Passiflora edulis*. 2. Cultura de ápices caulinares. 3.
Micropropagação. 4. CABMV. I. Scherwinski-Pereira, Jonny
Everson. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ELIAS DA CRUZ RIBEIRO

DIAGNÓSTICO VIRAL E LIMPEZA CLONAL DE MATRIZES DE MARACUJAZEIRO
(*Passiflora edulis* Sims) UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS

Dissertação apresentada ao Programa Multi
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade
Federal do Amazonas – UFAM, como requisito
para obtenção do título de mestre em
Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, Presidente
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Botânica, UNB

Fábio Gelape Faleiro, Membro titular
Embrapa Cerrados

Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch, Membro titular
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio e incentivo aos estudos;

Ao coordenador do curso, Dr. Edmar Vaz de Andrade, pelo auxílio e esclarecimento prestado;

Ao meu orientador, Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, pelo incentivo, acompanhamento constante e ajuda prestada durante todo o período de realização deste trabalho;

Ao Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu pelo acompanhamento constante e ensino de técnicas indispensáveis para a realização deste trabalho;

À Dra. Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso pelos esclarecimentos e auxílio prestados;

Aos membros dos laboratórios LCT2 e LPP3 pelo auxílio no ensino das técnicas utilizadas e troca de conhecimentos;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de formação profissional;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de aprendizagem e utilização das instalações e equipamentos para realização dos experimentos;

À Fundação de Amparo à pesquisa do Amazonas pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo realizar o diagnóstico viral e a limpeza clonal de matrizes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas na produção de sementes híbridas. Para a realização do diagnóstico viral, folhas dos genótipos CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR foram coletadas e o RNA e DNA extraídos para a detecção viral por RT-PCR e PCR, utilizando primers que codificam regiões genômicas de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV) e *Begomovirus*. Complementarmente, os resultados obtidos para os primers de CABMV foram hibridizados por *Southern blot* para um diagnóstico mais confiável. Os resultados revelaram a presença de CABMV em 100% das amostras de todas as matrizes testadas. Além disso, amostras de CPGA1 (17%) e de CPMSC (11%) foram positivas utilizando os primers universais de begomovírus. Nenhuma amostra foi positiva para LCV. Num segundo experimento, um protocolo para a micropropagação dos genótipos foi desenvolvido, visando a posterior multiplicação das matrizes oriundas da limpeza clonal. Para tanto, inicialmente foi avaliado o melhor explante para a fase de o estabelecimento e multiplicação *in vitro*. Verificou-se que o desenvolvimento de gemas preexistentes foi observado apenas nas microestacas, em relação à inoculação de gemas isoladas, gerando brotos com tamanho médio de 7 mm após 45 dias de cultivo. Em seguida, apenas as microestacas foram utilizadas em novo experimento para o estabelecimento *in vitro* em meio de MS acrescido de 4,43 μ M de BAP. Nele, observou-se o desenvolvimento de brotos com pelo menos 6 mm após 30 dias de cultivo. O material proveniente destas microestacas foi utilizado para os demais experimentos de multiplicação, alongamento e enraizamento. Por fim, para testar a eficiência da cultura de ápices caulinares na eliminação do CABMV nas matrizes previamente diagnosticadas, ápices caulinares (0,1 - 0,3 mm) foram isolados e inoculados em meio de MS acrescido de 0,05 μ M de ANA, 0,44 μ M de BAP e 0,28 μ M de AG₃. Após a regeneração do meristema apical, os explantes foram transferidos para meio de MS acrescido de 4,43 μ M de BAP para indução de proliferação de gemas e multiplicação. Agregados de gemas provenientes da cultura de ápices caulinares foram utilizados para indexação do material vegetal para o vírus CABMV por meio de RT-PCR. Os resultados observados demonstraram diminuição na intensidade das bandas referentes ao CABMV nos genótipos CPGA1, MR1 e CPMGA2, indicando diminuição de carga viral. Por fim, a limpeza viral foi observada em apenas uma amostra do genótipo CPGA1.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*. Cultura de ápices caulinares. Micropropagação. CABMV.

ABSTRACT

This work aimed to perform the viral diagnosis and clonal cleaning of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) matrices used for hybrid seed production. To carry out the viral diagnosis, leaves of the genotypes CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 and CPF1SSBR were collected and the RNA and DNA extracted and used for viral detection by RT-PCR and PCR, using primers that encode *Cowpea aphid-brown mosaic virus* (CABMV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV) and *Begomovirus* genomic regions. In addition, the results obtained by using CABMV primers were hybridized by *Southern blot* for a more reliable diagnosis. The results revealed the presence of CABMV in 100% of the samples tested for all matrices. Furthermore, CPGA1 (17%) and CPMSC (11%) samples tested positive using the universal primers for begomoviruses. No sample tested positive for LCV. In a second experiment, a micropropagation protocol for the genotypes was developed, in order to perform a matrices multiplication arising from the clonal cleaning. Therefore, initially the best explant was evaluated for the *in vitro* establishment and multiplication phase. It was found that the development of pre-existing buds is only observed in the single node cuttings, compared to inoculation of isolated buds, generating shoots with an average size of 7 mm after 45 days of cultivation. Then, Only single node cuttings were used in another *in vitro* establishment experiment using MS medium supplemented with 4.43 μM of BA. In it, the shoots development was observed with at least 6 mm after 30 days of culture. The material arising from the single nodes cuttings was used for the other multiplication, elongation and rooting experiments. Finally, to test the efficiency of shoot tip culture in CABMV eliminating in previously diagnosed matrices, apical meristems (0.1 - 0.3 mm) were isolated and inoculated in MS medium supplemented with 0.44 μM NAA, 0.44 μM BA and 0.28 μM GA₃. After the apical meristema regeneration, the explants were transferred to MS medium with 4.43 μM BA to induce shoot proliferation and multiplication. Shoot clusters from the shoot tip culture were used to index the plant material for the presence of CABMV by means of RT-PCR. The observed results showed a decrease in the bands intensity referring to CABMV in the genotypes CPGA1, MR1 and CPMGA2, an indication of decreased viral load. Finally, viral cleaning was observed in only one sample of the CPGA1 genotype.

Keywords: *Passiflora edulis* Sims. Shoot tip culture. Micropropagation. CABMV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Técnicas adotadas pelos produtores de maracujazeiro no Cerrado.....	18
Figura 2 – Sintomas da doença do endurecimento dos frutos.....	22

Capítulo I

Figura 1 – Diferentes genótipos de maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i> Sims) em casa de vegetação apresentando sintomas nas folhas e fruto.....	30
Figura 2 – Análise de RT-PCR e PCR para detecção dos vírus <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV), <i>lettuce chlorosis virus</i> (LCV) e <i>Begomovirus</i> em diferentes genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	33
Figura 3 – Sequência de nucleotídeos obtida a partir da análise <i>in silico</i> do fragmento de 829 pb do genoma do <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) isolado dos genótipos.....	35
Figura 4 – Análise por <i>Southern blot</i> de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por RT-PCR.....	36

Capítulo II

Figura 1 – Explantes de <i>Passiflora edulis</i> Sims inoculadas em meio de MS desprovido de reguladores para estabelecimento <i>in vitro</i>	39
Figura 2 – Microestacas de <i>Passiflora edulis</i> Sims inoculadas em meio de MS contendo 4,43 µM BAP durante estabelecimento <i>in vitro</i>	40
Figura 3 – Excisão de gemas desenvolvidas em microestacas de <i>Passiflora edulis</i> Sims para multiplicação <i>in vitro</i> em tubos de ensaio contendo meio de MS acrescido de 4,43 µM de BAP.....	42
Figura 4 – Diferentes tampas utilizadas na vedação de frascos em experimento de propagação <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	43
Figura 5 – Fases de desenvolvimento de microestacas de <i>Passiflora edulis</i> Sims inoculadas em meio de MS em um período de 45 dias de cultivo visando estabelecimento <i>in vitro</i>	45
Figura 6 – Altura de explantes de distintos genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims observada após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de MS sem adição de reguladores.....	46
Figura 7 – Desenvolvimento <i>in vitro</i> de microestacas de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims, observado em um período de 30 dias após inoculação em meio de MS contendo BAP.....	48

Figura 8 – Altura de microestacas de distintos genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims observada após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS contendo 4,43 µM de BAP.....	49
Figura 9 – Diferentes padrões morfológicos de desenvolvimento de gemas/brotos observados na micropropagação de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	52
Figura 10 – Explantes de <i>Passiflora edulis</i> Sims após diferentes tempos de cultivo em recipientes com diferentes sistemas de vedação.....	54
Figura 11 – Gemas de <i>Passiflora edulis</i> Sims após dois subcultivos para multiplicação <i>in vitro</i> em um período total de 135 dias.....	55
Figura 12 – Gemas de <i>Passiflora edulis</i> Sims inoculadas em meio contendo sais de MS e diferentes concentrações de BAP.....	57
Figura 13 – Fases de enraizamento observadas em gemas de <i>Passiflora edulis</i> Sims inoculadas em meio de MS acrescido de AIB em um período de 45 dias.....	59
Figura 14 – Pré-aclimatização de gemas enraizadas de <i>Passiflora edulis</i> Sims em copos plásticos contendo substrato <i>Bioplant</i> e areia 3:1 (v/v).....	61

Capítulo III

Figura 1 – Local da coleta do material de <i>Passiflora edulis</i> Sims apresentando sintomas indicativos de virose (doença do endurecimento dos frutos) no Centro de Inovação em Genética Vegetal da Embrapa Cerrados.....	63
Figura 2 – Ápices caulinares excisados de maracujazeiro <i>Passiflora edulis</i> Sims com a finalidade de limpeza viral.....	64
Figura 3 – Fases da regeneração de ápices caulinares do genótipo CPGA1 de <i>Passiflora edulis</i> Sims cultivados em meio de MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento..	68
Figura 4 – Proliferação de gemas a partir de ápices caulinares de quatro genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims cultivados em meio MS contendo BAP e avaliados após 180 dias de cultivo.....	70
Figura 5 – Diâmetros de ápices caulinares de distintos genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims observados após 180 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 4,43 µM de BAP.....	71
Figura 6 – Frascos contendo agregados de gemas provenientes de cultura de ápices caulinares de genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims após 60 dias em multiplicação <i>in vitro</i>	73
Figura 7 – Indexação por meio de RT-PCR para detecção de CABMV em material oriundo de cultura de ápices caulinares de <i>Passiflora edulis</i> Sims em comparação com amostras de material micropropagado sem aplicação de limpeza clonal.....	74

Figura 8 – Análise por *Southern blot* de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims oriundos de cultura de ápices caulinares, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por RT-PCR..75

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Área colhida, produção e rendimento de maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i> Sims) dos estados Brasileiros em 2019.....	15
---	----

Capítulo I

Tabela 1 – Relação das matrizes genitoras de maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i> Sims) a serem utilizadas nos experimentos.....	29
Quadro 1 – Informações dos primers utilizados para a amplificação dos vírus em <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	31
Tabela 2 – Relação dos resultados obtidos quanto a presença dos vírus <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV), <i>Lettuce chlorosis virus</i> (LCV) e <i>Begomovirus</i> em genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	34

Capítulo II

Tabela 1 – Desenvolvimento, oxidação e contaminação de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims após 30 dias em meio de MS contendo 4,43 µM de BAP visando estabelecimento <i>in vitro</i>	50
Tabela 2 – Taxa de multiplicação (gemas/explante) de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims após três subcultivos mensais em meio de MS acrescido de 4,43 µM de BAP.....	51
Tabela 3 – Ocorrência de gemas observadas em diferentes genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims ao final de três subcultivos visando à multiplicação <i>in vitro</i>	53
Tabela 4 – Médias do número de gema/explante e tamanho obtidas após dois subcultivos de gemas de <i>Passiflora edulis</i> Sims em meio de MS contendo 4,43 µM de BAP.....	56
Tabela 5 – Enraizamento, número de raízes por explante e comprimento de raiz observados em gemas de <i>Passiflora edulis</i> Sims após 45 dias de inoculação em meio de MS acrescido de AIB.....	60

Capítulo III

Tabela 1 – Regeneração, oxidação e média do número de folhas primordiais por explante de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims após 30 dias em meio contendo ANA, BAP e AG ₃	68
--	----

Tabela 2 – Indução de proliferação de gemas (gemas/explante) e porcentagem de oxidação em distintos genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims observados após 180 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de MS (1962) suplementado com 4,43 µM de BAP.....	71
Tabela 3 – Multiplicação de agregado de gemas de cinco genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims após dois subcultivos mensais em meio de MS com 4,43 µM de BAP.....	72
Tabela 4 – Relação dos resultados obtidos pela técnica de <i>Southern blot</i> quanto a presença dos vírus <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV), em genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims oriundos de cultura de ápices caulinares.....	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 A cultura do maracujazeiro.....	17
2.2 Dificuldades no cultivo	18
2.2.1 Infecções virais.....	19
2.2.2 Movimento dos vírus no interior da planta.....	20
2.2.3 Principais viroses que acometem os maracujazeiros.....	21
2.3 PCR no diagnóstico viral	23
2.4 Cultivo e micropropagação <i>in vitro</i>	24
2.5 O uso da cultura de tecidos para a limpeza clonal.....	25
2.5.1 Cultura de meristemas/ápices caulinares na erradicação de vírus.....	26

CAPÍTULO I

Diagnóstico de viroses em matrizes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas na produção de sementes híbridas

1. MATERIAL E MÉTODOS	29
1.1 Coleta do material vegetal e extração de DNA e RNA.....	29
1.3.1 Detecção do CABMV, LCV e <i>Begomovirus</i>	30
1.3.2 Hibridização por <i>Southern blot</i>	32
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.1 Detecção do CABMV, LCV e <i>Begomovivurs</i>	32
2.2 Hibridização por <i>Southern blot</i>	35

CAPÍTULO II

Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims)

1. MATERIAL E MÉTODOS	38
1.1 Efeito do tipo de explante e do genótipo no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims	38
1.1.2 Coleta do material vegetal	38
1.1.4 Estabelecimento dos explantes <i>in vitro</i>	38

1.2 Efeito do genótipo, do tipo de tampa dos recipientes de cultivo e da presença de BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims	39
1.2.1 Coleta do material vegetal	39
1.2.2 Estabelecimento dos explantes <i>in vitro</i>	40
1.2.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de gemas axilares.....	41
1.2.3 Influência da tampa do recipiente de cultivo no desenvolvimento de agregados de gemas	42
1.2.4 Alongamento das gemas.....	43
1.2.5 Enraizamento dos brotos	44
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.1 Efeito do tipo de explante e do genótipo no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims	44
2.1.2 Estabelecimento dos explantes <i>in vitro</i>	44
2.2 Efeito do genótipo e do tipo de tampa dos recipientes de cultivo e da presença de BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims	47
2.2.2 Estabelecimento dos explantes	47
2.2.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de gemas axilares.....	50
2.2.4 Influência do tipo de vedação do recipiente de cultivo no desenvolvimento de agregado de gemas	53
2.2.5 Alongamento de agregados de gemas	57
2.2.5 Enraizamento de agregados de gemas.....	58

CAPÍTULO III

Limpeza clonal de plantas matrizes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas na produção de sementes híbridas

1. MATERIAL E MÉTODOS	63
1.1 Coleta do material vegetal	63
1.3 Excisão e estabelecimento dos ápices caulinares	63
1.4 Indução de proliferação de gemas.....	65
1.5 Multiplicação de gemas em meio de MS contendo BAP	65
1.6 Indexação do material proveniente da limpeza clonal.....	66
1.6.1 Detecção do CABMV por RT-PCR	66
1.6.2 Hibridização por <i>Southern blot</i>	67

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.1 Excisão e estabelecimento dos ápices caulinares	67
2.2 Indução de proliferação de gemas	69
2.3 Multiplicação de agregados de gemas em meio de MS contendo BAP	72
2.4 Indexação do material proveniente da limpeza clonal	73
2.4.1 Deteção do CABMV por RT-PCR	73
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma trepadeira glabra (exceto ovário e fruto imaturo) semi-perene, lenhosa ou herbácea. As folhas de *Passiflora edulis* Sims podem ser simples, alternas e trilobadas ou inteiras e bilobadas. Além disso, apresentam margem serrilhada e pode-se observar glândulas nos bordos das margens e dois nectários extraflorais côncavos no pecíolo próximos ao ápice (BERALDO e KATO, 2010). Apresenta flor solitária, vistosa, brácteas verticiladas, ovadas, serreadas a pectinadas e frequentemente glandulares próximo à base. Fruto arredondado a obovado-elíptico, vináceo, amarelado ou verde-amarelado; semente obovada, ápice emarginado e mucronulado, enegrecida, foveolada (BERNACCI, 2003). Pertencente à família *Passifloraceae*, com cerca de 19 gêneros e 530 espécies nas regiões tropicais e subtropicais. No Neotrópico ocorrem cinco gêneros e quase 400 espécies, sendo que no Brasil ocorrem quatro gêneros e cerca de 130 espécies, sendo *P. edulis* e *Passiflora. alata* Curtis as mais cultivadas (BERNACCI, 2003; JUNQUEIRA et al., 2005).

O cultivo de maracujá tem evoluído rapidamente ao longo dos anos. Por cerca de duas décadas, o Brasil tem sido considerado o maior produtor, com produção em torno de 593 mil toneladas da fruta por ano. No cenário nacional, o Nordeste se sobressai como maior produtor, embora o Distrito Federal apresente o melhor rendimento (27,68 t/ha), devido às cultivares utilizadas e às técnicas de plantio adotadas (Tabela 1) (MELETTI, 2011; LIRA, 2018). Apesar de liderar a produção do fruto, o Brasil não é o principal exportador, posição ocupada pelo Equador que é o maior exportador de suco concentrado produção (MELETTI, 2011; ZACHARIAS et al., 2016).

O alto valor agregado à produção tem incentivado cada vez mais o cultivo do maracujá. No entanto, pode se tratar de uma cultura de risco, devido à suscetibilidade a diversas doenças como viroses, bacterioses e fusariose. A constante alteração da área cultivada é uma consequência da ação destes patógenos (MELETTI, 2011), podendo causar perdas econômicas de até 60% na lavoura (ZERBINI JR. e MACIEL-ZAMBOLIM (1999) apud VIANA et al, 2014).

A doença do endurecimento dos frutos, causada por vírus, representa um dos principais fatores limitantes para a produção de maracujá, afetando gravemente a produtividade e longevidade das colheitas, uma vez que o vírus danifica todas as partes do maracujazeiro (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Segundo estudos de Nascimento et al. (2006), o CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*) é o principal causador do vírus do endurecimento dos frutos no Brasil, dentre os possíveis agentes causadores da doença.

Tabela 1 – Área colhida, produção e rendimento de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) dos estados Brasileiros em 2019

Estados	Área Colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento (t/ha)
Bahia	15,616	168,457	10,79
Ceará	6,225	145,102	23,31
Santa Catarina	1,891	44,934	23,76
Minas Gerais	2,167	33,765	15,58
São Paulo	1,870	30,809	16,48
Pernambuco	1,995	21,430	10,74
Espírito Santo	875	20,022	22,88
Alagoas	1,413	19,221	13,60
Paraná	1,079	16,634	15,42
Pará	1,655	15,486	9,36
Amazonas	804	14,053	17,48
Paraíba	1,073	9,967	9,29
Sergipe	1,174	9,593	8,17
Rio Grande do Norte	1,087	8,334	7,67
Rio Grande do Sul	312	5,722	18,34
Goiás	298	5,715	19,18
Rio de Janeiro	398	5,173	13,00
Mato Grosso	282	4,625	16,40
Rondônia	454	3,889	8,57
Roraima	419	3,602	8,60
Distrito Federal	120	3,321	27,68
Acre	125	1,096	8,77
Tocantins	84	840	10,00
Amapá	89	626	7,03
Piauí	26	490	18,85
Mato Grosso do Sul	33	378	11,45
Maranhão	20	145	7,25
BRASIL	41,584	593,429	14,27

Fonte: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf

Em uma pesquisa recente foram isolados 29 genótipos resistentes ao CABMV, provenientes da espécie *P. setacea*, apresentando grande potencial para serem incluídos em programas de melhoramento genético do maracujazeiro (SACOMAN et al., 2018). Além do melhoramento genético, pesquisas envolvendo o maracujá podem ter aplicações variadas. Diversos estudos, por exemplo, observaram propriedades medicinais em diferentes espécies de maracujá, dentre elas a *P. foetida* que apresenta ação antibacteriana, sendo utilizada no Brasil para tratar inflamações cutâneas e na Nigéria para tratar histeria e insônia (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; MOHANASUNDARI et al., 2007). Outra espécie com

propriedade medicinal é a *P. alata*, usada no Brasil como ansiolítica, sedativa, diurética e analgésica (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). A utilização dessas espécies como fitoterápicos vem crescendo no Brasil. Em um estudo realizado em Belo Horizonte, a *P. incarnata* aparece em quarto lugar dentre os fitoterápicos mais utilizados na região (MARLIÉRE et al., 2008).

Outro segmento potencial de pesquisas envolvendo o maracujá, consiste no uso de plantas com potencial ornamental. Com o objetivo de obter plantas mais atrativas comercialmente, são realizados experimentos que promovem cruzamentos interespecíficos entre diversas espécies, obtendo-se flores, cores e formas variadas (CRUZ et al., 2008; SANTOS et al., 2012a).

A propagação de plantas *in vitro* tem sido uma das técnicas desenvolvidas para ser aplicada na produção comercial de plantas de interesse. Apesar dos custos envolvidos, ela pode garantir a produção de material selecionado, uniforme e livre de doenças, possibilitando avanços em pesquisa básica e no melhoramento de espécies, com importantes vantagens em relação às técnicas tradicionais (CID; TEIXEIRA, 2014). Especificamente para *Passiflora*, o estabelecimento *in vitro* carece de protocolos bem estabelecidos para espécies e genótipos específicos. Segundo Faria et al. (2007), a variação de respostas entre genótipos trata-se de um dos principais fatores que afetam o estabelecimento de protocolos *in vitro* para as espécies. Apesar do estabelecimento *in vitro* de *P. edulis* ser relativamente bem documentado, os resultados são divergentes e nem sempre reproduzíveis, sugerindo a necessidade de ajustes gerais nos protocolos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* (SEVERIN et al., 2011; SOARES et al., 2012; VIEIRA et al., 2014).

Uma das grandes aplicabilidades da cultura de tecidos em plantas é a possibilidade de se realizar a limpeza clonal para obtenção de plantas livres de patógenos. A limpeza clonal pode ser realizada por diversas formas, entre as quais incluem-se a quimioterapia, a termoterapia, a cultura de meristemas e a crioterapia (PRAMMANEE et al., 2011; SALAS et al., 2012; BETTONI et al., 2019; ITA et al., 2020). A utilização da cultura de meristemas/ápices caulinares, seguida por micropropagação, é possivelmente a técnica mais utilizada para limpeza clonal de espécies de propagação vegetativa (AGÜERO et al., 2013; NERWAY; DUHOKY; RETHEESH; BHAT, 2010; KASSIM, 2020). No entanto, são raros os trabalhos encontrados na literatura que aplicam a técnica de cultura de meristemas na limpeza clonal de *Passiflora*. Prammanee et al. (2011) realizaram a limpeza clonal de *P. edulis* por meio da cultura de ápices caulinares, obtendo plantas aclimatizadas e livres do vírus testado no experimento (*Passion fruit woodiness virus* – PWV). Em outro estudo realizado por Biricolli e Chiari (1994) na

regeneração de plantas por meio da cultura de ápices caulinares houve sucesso apenas quando essa técnica foi associada à microenxertia. Neste estudo não foi realizado diagnóstico viral ou indexação, embora a técnica tenha sido indicada pelos autores para limpeza clonal em estudos futuros.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal realizar a limpeza clonal de matrizes parentais de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) utilizados na produção de sementes híbridas, por meio da cultura de ápices caulinares, seguida de indexação das plantas por PCR e RT-PCR. Para isso, em um primeiro momento foi realizado o diagnóstico prévio de CABMV, LCV e *Begomovirus* nas matrizes e, em seguida, ajustado um protocolo para otimizar as etapas de estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* dos genótipos estudados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

A cultura do maracujazeiro é bastante difundida nas regiões tropicais e sua propagação pode ocorrer por sementes, estaquia ou enxertia. A preferência da técnica depende do país e a pouca longevidade do cultivo é um problema para os produtores (FILHO et al., 2005). Em menor escala, a planta é cultivada em pequenas propriedades, geralmente em pomares de 3 – 5 ha, sendo um importante atrativo para fixação de mão de obra rural. Isso confere forte caráter social à cultura, com índice de geração de 3 a 4 empregos diretos por hectare, além de ocupar mais pessoas, em diferentes elos da cadeia produtiva (MELETTI, 2011).

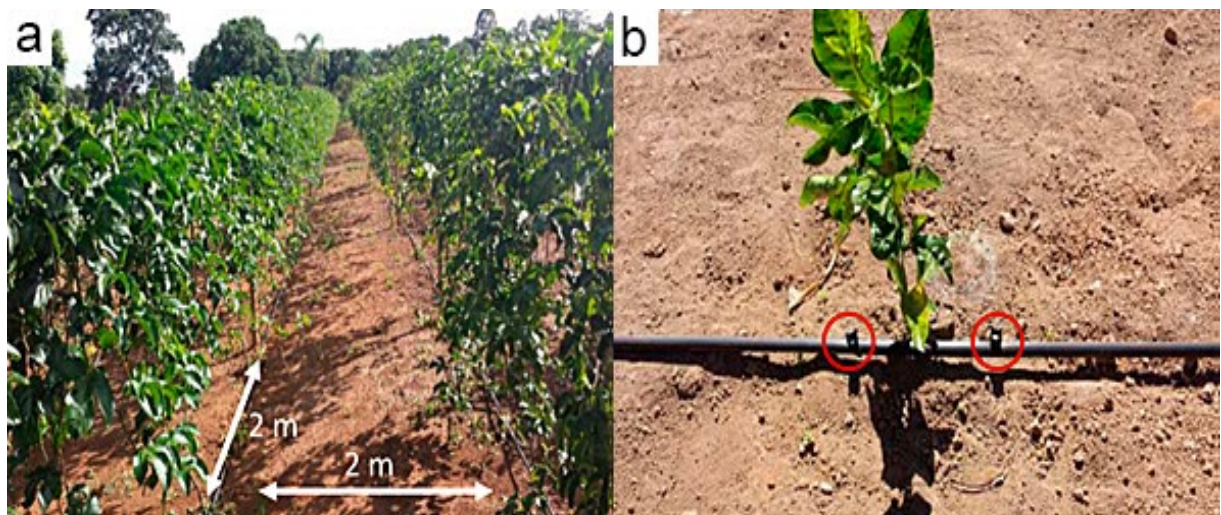
O mais indicado para estas culturas são os solos arenosos ou levemente argilosos e bem drenados, o que evita problemas com doenças de raízes. Porém, a ocorrência de chuvas intensas e prolongadas durante a floração pode causar diminuição na produtividade, em decorrência do baixo pegamento do fruto e maior incidência de doenças. Com isso, o cultivo em estufas torna-se uma alternativa para contornar tais problemas, já que a polinização pode ser realizada mesmo em épocas chuvosas. Esta forma de cultivo ainda pode proporcionar plantas com melhor sanidade, maior vigor e redução do uso de agrotóxicos (GONTIJO, 2017).

No Brasil, o Cerrado apresenta condições edafoclimáticas adequadas para o cultivo do maracujazeiro, já que muitos fruticultores têm conseguido produtividade até três vezes maiores que a média nacional. No entanto, isso se deve também à adoção de técnicas específicas como irrigação localizada, cultivo utilizando espaçamento adensado (FIGURA 1), polinização manual e uso de híbridos produzidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária

(Embrapa) (FALEIRO et al., 2019). Dentre os híbridos mais cultivados no Distrito Federal estão: Híbridos BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Rubi Cerrado, FB 200 e Marília (GONTIJO, 2017).

Três destes híbridos citados são provenientes de cruzamentos intraespecíficos dos cinco genótipos utilizados nesta pesquisa, obtidos através de melhoramento populacional por seleção recorrente. Cada híbrido possui características de grande interesse para produtores e, entre eles citam-se o BRS Gigante Amarelo; BRS Sol do Cerrado; BRS Rubi do Cerrado, BRS Ouro Vermelho (FALEIRO et al., 2014, 2017; Embrapa Cerrados, 2019, 2020).

Figura 1– Técnicas adotadas pelos produtores de maracujazeiro no Cerrado. a) Plantação utilizando espaçamento adensado; b) Irrigação por gotejamento.



Fonte: (GONTIJO, 2017).

2.2 Dificuldades no cultivo

O alto valor agregado à produção tem incentivado o cultivo do maracujá. No entanto, a cultura enfrenta algumas dificuldades relacionadas ao estabelecimento e condução da planta em campo, como é o caso da polinização que precisa ser realizada, na maioria dos casos, manualmente. Além disso, a planta é autoincompatível e, uma vez aberta, a flor não sendo polinizada irá murchar e cair no mesmo dia (GONTIJO, 2017).

Outro obstáculo no cultivo é a suscetibilidade da planta a diversas pragas que podem afetar a produtividade do pomar. As doenças de ocorrência mais comum no maracujazeiro são a antracnose (manchas e necrose causadas por diversos agentes etiológicos), verrugose (verrugas no fruto causadas principalmente pelo fungo *Sphaceloma fawcetti*) e fusariose (murcha e escurecimento do caule causado por fungos do gênero *Fusarium*) (MOURA et al.,

2012; OLIVEIRA et al., 2013). Além destas doenças, insetos também podem causar dano mecânico e servir de vetor para os microorganismos, como é o caso dos percevejos, lagarta do maracujazeiro, ácaros, cochonilhas, cigarrinha verde e mosca branca (GONTIJO, 2017).

Entre os patógenos que afetam os pomares, tem-se uma atenção especial à virose do endurecimento do fruto (CABMV), bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e fusariose (*Fusarium oxysporum*). A constante alteração da área cultivada é uma consequência da ação destes patógenos, as quais causam elevadas perdas econômicas (MELETTI, 2011).

2.2.1 Infecções virais

De modo geral, os vírus representam um grande obstáculo para culturas agrícolas e horticulturas no mundo todo, com perdas estimadas em 50 bilhões de euros por ano (PALLÁS; SÁNCHEZ-NAVARRO; JAMES, 2018). São cerca de 2.000 doenças causadas por mais de 600 tipos diferentes de vírus de plantas identificados, o que acaba por voltar grande parte da atenção dos pesquisadores para este problema (EVERT; EICHHORN, 2014).

Quando ocorrem alterações visíveis nas plantas decorrentes de infecções virais, estas são denominadas de sintomas da doença. No entanto, o vírus pode se replicar na planta e não apresentar nenhum sintoma, causando uma infecção latente. Além disso, um mesmo vírus pode causar sintomas diferentes em plantas distintas, uma vez que o sintoma se trata de um reflexo da resposta da hospedeira à infecção e que ainda sofre influência de fatores como duração da infecção, presença de outros patógenos, estágio de desenvolvimento da planta hospedeira e condições do ambiente (SALAS et al., 2012).

O sintoma mais comumente observado em infecções virais é a redução da velocidade de crescimento, causando nanismo ou atrofia na planta. Outros sintomas mais óbvios costumam aparecer nas folhas, interferindo na produção de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese. Isso acarreta a formação de mosaicos e manchas anelares, sintomas comuns em vírus sistêmicos, causando o aparecimento de áreas verde-claras, amarelas ou brancas, intercaladas com o verde normal da folha ou fruto (mosaicos). Já as manchas anelares são caracterizadas por anéis cloróticos (amarelos) ou necróticos, em folhas, caules ou frutos. Sintomas como enrolamento de folhas, amarelecimento, cancro e tumor costumam ser mais raros (MUKHOPADHYAY, 2010). É importante ressaltar que outras situações também podem causar os sintomas anteriormente citados como deficiência mineral, senescência e infecção por fitoplasmas (SALAS et al., 2012).

A entrada dos vírus em células animais e vegetais é bastante distinta. Esse fato, ocorre devido a presença de parede celular nas células vegetais, que atua como uma barreira para os vírus. Assim, fitovírus não conseguem penetrar por meio de endocitose mediada por receptores, como ocorre em células animais. Isso torna a transmissão dependente de fatores externos, principalmente insetos vetores, como afídeos, cigarrinhas ou moscas-brancas, com aparelho bucal capaz de perfurar a planta. Além dos vetores, ferimentos causados mecanicamente por nematódeos ou durante a colheita podem proporcionar a entrada dos vírus nas plantas (EVERT; EICHHORN, 2014).

As formas de transmissão dos vírus nas plantas podem ocorrer ou serem facilitadas em razão de transmissão mecânica (injúrias que facilitam a entrada do vírus), propagação vegetativa (tubérculos, bulbos, rizomas, colmos e estolões), enxertia e através de vetores (artrópodes, nematoides e fungos). Em alguns casos, também é possível a transmissão a partir de sementes e pólen (SALAS et al., 2012).

Apesar dos vírus causarem grandes perdas aos agricultores, algumas pesquisas observaram a interação positiva entre vírus e plantas indicando que a presença destes microorganismos pode aumentar a tolerância de plantas à stresse hídrico (WESTWOOD et al., 2013; DASTOGEER et al., 2018).

2.2.2 Movimento dos vírus no interior da planta

A capacidade dos vírus em se movimentar no interior da planta é o que determina seu caráter sistêmico ou localizado. Este movimento pode ser dividido em duas fases: movimento de célula para célula ou a curtas distâncias entre as células parenquimáticas e movimento a longas distâncias através dos tubos crivados do floema (VAN BEL, 2003).

No movimento célula a célula, os vírus necessitam decodificar uma proteína chamada de proteína de movimento, capaz de causar alterações nos plasmodesmos (filamentos citoplasmáticos que possibilitam a comunicação entre células). Sem essa proteína os vírus são incapazes de se deslocarem dentro da planta. O vírus da degenerescência da videira (*Grapevine fanleaf virus* – GFLV) e o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* – TMV) são exemplos que causam infecção sistêmica, por meio da movimentação pelos plasmodesmos. Este movimento é consideravelmente lento. Em uma folha, por exemplo, o vírus move-se cerca de 1 mm ou 8 a 10 células do parênquima por dia. Já no floema, o vírus pode se mover a velocidades de 1 cm por dia, podendo chegar em todos os tecidos da planta (EVERT & EICHHORN, 2014).

2.2.3 Principais viroses que acometem os maracujazeiros

As viroses representam um grande problema na cultura do maracujá, podendo causar perdas no rendimento entre de 50 e 80%. Diversos vírus já foram relatados em infecções de maracujazeiro, sendo cinco deles no Brasil: o vírus do mosaico do Caupi (CABMV), o vírus do Mosaico do Pepino (*Cucumber mosaic virus* – CMV), o vírus do Mosaico Amarelo do Maracujazeiro (*Passion fruit yellow mosaic virus* – PFYMV), o vírus do mosaico do maracujá-roxo (*Granadilla mosaic virus* – GMV), além do vírus do enfezamento do maracujazeiro (*Passion fruit vein-clearing rhabdovirus* – PFVVCV) (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001; NARITA; YUKI; PAVAN, 2012).

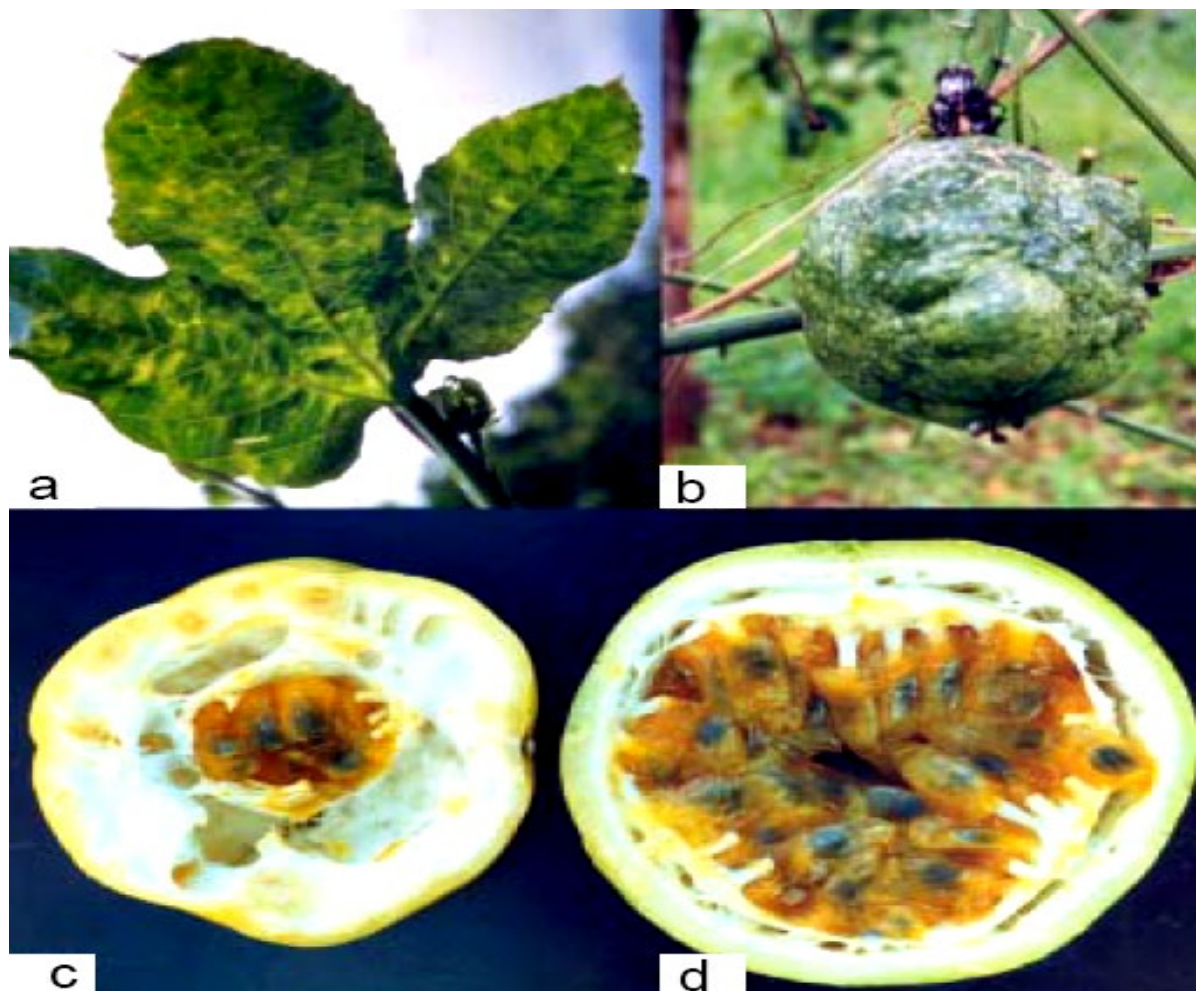
O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a doença considerada mais importante para esta cultura. O nome da doença é proveniente do seu sintoma mais característico, que pode ser provocado por diferentes vírus, como o PWV, CABMV e EAPV (*East asian Passiflora virus*) (RIBEIRO et al., 2008; PRAMMANEE et al., 2011; OCHWO-SSEMAKULA et al., 2012). Por isso, a identificação do agente causal não pode ser realizada apenas pelos sintomas (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001).

De fato, o CABMV representa um dos principais fatores limitantes para a produção de maracujá, pois afeta gravemente a produtividade e longevidade das colheitas, uma vez que o vírus danifica todas as partes do maracujazeiro (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Segundo Nascimento et al. (2006), dentre os possíveis agentes causadores da doença, o CABMV é o principal causador do endurecimento dos frutos no Brasil, apesar de, erroneamente, acreditar-se que a doença seja atribuída ao PWV em trabalhos mais antigos. Melo et al. (2015) corroboram com este achado ao demonstrar a prevalência do CABMV, nos casos de endurecimento dos frutos em maracujazeiro no Brasil, quando comparado com a ocorrência de PWV e EAPV.

O CABMV é um vírus da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* e seu genoma é constituído por um RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (MINK et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2004). A principal forma de transmissão do vírus ocorre através de afídeos. Alguns estudos apontam diferença na dominância de afídeos dependendo da região e da época do ano, porém sem afetar a epidemiologia da doença. Dentre os principais transmissores estão as espécies *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae/solanella*, *Aphis craccivora*, *Toxoptera citricidus*, *Uroleucon ambrosiae* e *Myzus nicotianae* (DI PIERO et al., 2006; GARCÊZ et al., 2015).

Quanto aos sintomas, o mosaico comum é o mais observado, podendo estar acompanhado de enrugamento, deformação e bolhas no limbo foliar (FIGURA 2) (SAMPAIO et al., 2008). Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2013), diferentes espécies de *Passiflora* apresentaram sintomas distintos, porém 80% dos acessos avaliados apresentaram mosaico e enrugamento das folhas. Nascimento et al. (2006) observaram sintomas nos frutos, tornando-se endurecidos, menores e com diminuição do pericarpo, impossibilitando a sua comercialização. Todos estes fatores contribuem para a redução da vida útil de um pomar, causando grandes perdas econômicas para o produtor.

Figura 2 – Sintomas da doença do endurecimento dos frutos. a) Folha apresentando mosaico; b) Fruto deformado; c) Fruto com polpa reduzida; d) Fruto de planta sadia.



Fonte: (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001)

Estudos que visam a detecção de vírus como agentes causais de sintomas em maracujazeiro buscam cada vez mais a relação dos sintomas com a ação de mais de um vírus na planta. As infecções virais mistas, envolvendo mais de um vírus diferente, costumam ocorrer na natureza e podem ter diferentes implicações para as plantas, tornando a manifestação de

sintomas mais severa ou até mesmo ocorrendo exclusão mútua (SYLLER, 2012). A manifestação de sintomas mais graves em infecções mistas foi observada em estudos realizados com os vírus X e Y da batata em *Nicotiana tabacum* (ROCHOW; ROSS, 1955) e com os vírus Y e PLRV (*Potato leafroll virus*) em batata (*Solanum tuberosum*) (SRINIVASAN; ALVAREZ, 2007). A interação do CABMV com outros vírus já foi documentada em cultivares de feijão, onde as combinações envolvendo o CABMV causaram necrose apical e morte das plantas (TAIWO et al., 2007).

Além da interação entre diferentes vírus, a interação entre vírus e planta também influencia na progressão da infecção. No trabalho de Wintermantel et al. (2008), a acumulação viral do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) diferiu em plantas distintas. Outro fator associado à interação entre planta e vírus é a disseminação de vírus diferentes em uma mesma planta, podendo ocorrer a detecção do vírus em todas as partes da planta ou ausência do vírus em tecido meristemático (AGÜERO et al., 2013).

Segundo Cerqueira-Silva et al. (2014), certos cuidados podem ser tomados para diminuir a perda causado por essa doença. Estas medidas podem não ser completamente efetivas ou duradouras, mas podem ajudar a aumentar a vida útil dos pomares e reduzir possíveis danos. As recomendações incluem o uso de mudas sadias obtidas de viveiros certificados, a completa eliminação de plantas infectadas antes de realizar uma nova plantação, a adoção de técnicas mais cuidadosas de poda para prevenir a transmissão mecânica do vírus, a eliminação de plantas com sintomas de mosaico em até sete meses após a plantação ou transferência para o campo, o uso de irrigação localizada, além da realização do plantio em locais isolados e distantes de focos do vírus.

2.3 PCR no diagnóstico viral

A detecção de vírus em plantas é comumente realizada por meio de ensaios imunenzimáticos, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e suas variações (NASCIMENTO et al., 2003). No entanto, com advento das técnicas de biologia molecular a detecção de vírus tornou-se mais específica e sensível, ultrapassando a sensibilidade limitada dos testes de ELISA (O'DONNELL, 2000). Dentre estas técnicas de biologia molecular pode-se observar na literatura trabalhos que utilizaram Hibridização *dot-blot*, PCR, RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) e suas variações, qPCR (PCR em tempo real), entre outros (PARRY; DAVIS; THOMAS, 2004; HERRANZ et al., 2005; RISKÁ et al., 2019). A utilização de técnicas de hibridização de forma complementar ao PCR também pode ser

observada na literatura, aumentando a confiabilidade do diagnóstico (BERTACCINI, 1990; KUFLU; CUPPELS, 1997; RÊGO, 2016).

Desde o desenvolvimento da técnica PCR por Kary Mullis, em 1980, estudos envolvendo análise de DNA se tornaram muito mais eficazes (MULLIS et al., 1986). Rapidamente, a técnica começou a ser utilizada para o diagnóstico de fitopatógenos. No entanto, devido à problemas técnicos relacionados a execução do PCR e custo mais elevado, o diagnóstico molecular ainda não era tão utilizado até o início dos anos 2000 (LANGEVELD et al., 1991; O'DONNELL, 2000).

Apesar dos problemas supracitados, atualmente podemos observar a utilização de PCR em diversos estudos relacionados ao diagnóstico viral. No maracujazeiro, a técnica de PCR tem sido utilizada para detectar a presença de vírus de DNA, como o gênero *Begomovirus* (VACA-VACA et al., 2016). Além disso, devido a variedade de vírus de RNA que afetam o maracujazeiro, costuma-se utilizar o RT-PCR para o diagnóstico de tais vírus. Gonçalves et al. (2018) utilizaram o RT-PCR a fim de detectar o CAMBV em espécies de *Passiflora*, em um estudo de melhoramento genético. Em outro estudo, realizado por Sato et al. (2019), o RT-PCR foi empregado em maracujazeiros com sintomas de endurecimento dos frutos, através de primers específicos para o vírus que costuma causar a doença no Japão. Neste caso, a técnica não detectou o vírus, por isso o sequenciamento genômico das plantas estudadas foi necessário, onde um novo vírus em potencial foi identificado.

2.4 Cultivo e micropropagação *in vitro*

Diversas técnicas têm sido aplicadas no cultivo do maracujazeiro *in vitro*, variando de acordo com a espécie e explante utilizado no estudo. Tais técnicas visam regenerar plantas por organogênese ou embriogênese somática. Silva et al. (2009) induziram a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Passiflora cincinnata*. Os autores obtiveram, bons resultados ao final do estudo e sugeriram esta técnica como uma forma de propagação em massa dessa planta. Em outro estudo realizado por Vieira et al. (2014) a influência do tipo de explante, reguladores de crescimento e condições de incubação sobre a micropropagação foi avaliada. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou segmentos hipocotiledonares de *P. setacea* em meio MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com 6-Benzilaminopurina (BAP).

Quanto ao meio de cultura e reguladores crescimento, comumente tem sido utilizado o meio de MS desprovido de reguladores de crescimento para estabelecer o explante *in vitro*.

Posteriormente utiliza-se o meio de MS acrescido de BAP para induzir a organogênese e, por consequência, a micropropagação do material (SOARES et al., 2012; VIEIRA et al., 2014). No estudo de Faria & Segura (1997a) foi utilizado gemas axilares para micropropagação de *P. edulis*, onde foi observado o desenvolvimento das gemas apenas nos explantes que foram inoculados em BAP na fase de estabelecimento. Apesar dos bons resultados desta combinação citada anteriormente, alguns ajustes podem ser realizados, tanto no meio de cultura, como nos reguladores de crescimento utilizados e, a depender do objetivo da pesquisa, do explante ou espécie a ser utilizada. Neste sentido, Monteiro et al. (2000) sugerem alterações na composição mineral do meio de MS para cultivo *in vitro* de *P. edulis*, devido à constatação de sintomas de deficiência mineral em trabalhos com maracujazeiro. Faria et al. (2007) testaram a utilização do meio de MS com metade das concentrações de sais minerais e vitaminas, em comparação com a formulação completa e concluíram que o segundo apresentou melhor resultado.

Além de variações no meio, a utilização de diversos reguladores de crescimento pode ser observada na literatura. Na indução de raízes, a utilização do Ácido Indol-3-Butírico (AIB) e Ácido a-Naftaleno Acético (ANA) é bem documentada (GLORIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; TREVISAN; MENDES, 2005; PRAMMANEE et al., 2011). Outros reguladores como Thidiazuron (TDZ) e Ácido Diclorofenóxiacético (2,4-D) também são utilizados com diferentes objetivos (DA SILVA et al., 2009; VIEIRA et al., 2014). Esta variedade de possibilidades demonstra a importância de se desenvolver e a necessidade de se otimizar os protocolos de estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* para as diferentes espécies (FARIA et al., 2007).

2.5 O uso da cultura de tecidos para a limpeza clonal

A limpeza clonal pode ser aplicada para obtenção de plantas livres de patógenos. Ela pode ser realizada por meio de diferentes tratamentos, como quimioterapia, termoterapia, cultura de meristemas/ápices caulinares e crioterapia e deve ser seguida por testes de indexação, como ELISA e PCR (PRAMMANEE et al., 2011; SALAS et al., 2012; BETTONI et al., 2019; ITA et al., 2020). A cultura de meristemas ou de ápices caulinares, seguida por micropropagação, são técnicas bastante difundidas e utilizadas para a limpeza clonal em diversas espécies (AGÜERO et al., 2013; RETHEESH; BHAT, 2010; NERWAY; DUHOKY; KASSIM, 2020). No entanto, são raros os trabalhos encontrados na literatura que aplicam a técnica de cultura de meristemas na limpeza clonal de espécies de *Passiflora*. Prammanee et al. (2011) realizaram a limpeza clonal de *P. edulis* através da cultura de ápices caulinares, obtendo

plantas aclimatizadas e livres do vírus testado no experimento (PWV). Outro estudo realizado por Biricolti & Chiari (1994), obteve sucesso na regeneração de plantas por meio da cultura de ápices caulinares apenas quando associou esta técnica à microenxertia. Neste estudo, não foi realizado diagnóstico viral ou indexação, embora a técnica seja indicada pelos autores para limpeza clonal em estudos futuros.

2.5.1 Cultura de meristemas/ápices caulinares na erradicação de vírus

A utilização de cultura de tecidos vegetais para erradicação de vírus iniciou em 1934, quando White realizou experimentos com subcultivos de segmentos de raízes de plantas infectadas por vírus, tendo como resultado, a eliminação do vírus. Posteriormente, outros cientistas observaram que a gema apical e meristemas caulinares também poderiam ser utilizados neste processo. Murashige, em 1972, também contribuiu com os primeiros estudos utilizando a cultura de meristemas associada a microenxertia. Atualmente esta técnica é utilizada no mundo todo, trazendo grande impacto na produção agrícola vegetal (MUKHOPADHYAY, 2010).

A ausência ou a baixa concentração de vírus nos meristemas pode ser explicada por diversos fatores. A hipótese mais aceita diz respeito ao ritmo ativo de divisões celulares nesta região, a qual compete com a velocidade de replicação viral. Outros fatores estão associados com a ausência de tecido vascular nas regiões meristemáticas e as dimensões diminutas dos plasmodesmos. Isso torna o material uma excelente fonte de explante para a inoculação *in vitro* com o objetivo de limpeza viral (BEEMSTER, 1972; QUAK, 1987; AGÜERO et al., 2013). Além disso, a presença ou ausência de vírus nos meristemas pode estar relacionada à fatores inerentes ao próprio vírus ou à interação do vírus com a planta. Um estudo realizado com *Nicotiana benthamiana* no qual inoculou-se os vírus *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) e *Citrus tristeza virus* (CTV) na planta, mostrou que, após a realização da cultura de meristemas, utilizando-se explantes de até 0,2 mm, o CLBV não foi eliminado, contrariamente ao CTV que foi eliminado (AGÜERO et al., 2013).

A cultura de meristemas refere-se à inoculação do domo apical da brotação, excluindo as folhas primordiais. O tamanho do explante meristemático retirado é um fator importante na obtenção de plantas livres de vírus. Segundo Nehra e Kartha (1994) o tamanho do meristema apical varia entre 0,1 e 0,5 mm, sendo que explantes maiores (0,5 a 5,0 mm) são denominados de ápices caulinares. No entanto, esta dimensão é subjetiva e o tamanho exato do explante utilizado na cultura depende da espécie da planta e do propósito da pesquisa. Deve-se considerar

que quanto menor o tamanho do explante, maior é a chance de se obter material livre de vírus, porém, mais difícil é a chance de regeneração (TIWARI et al., 2011). Para a realização da técnica de cultura de meristemas/ápices caulinares com a intenção de limpeza viral, os tamanhos recomendados e mais utilizados variam entre 0,1 a 0,3 mm (BIRICOLTI; CHIARI, 1994; RETHEESH; BHAT, 2010; NERWAY; DUHOKY; KASSIM, 2020). Apesar disso, a utilização de tamanhos maiores de explante (2 mm), para eliminação de vírus, pode ser encontrada na literatura (PRAMMANEE et al., 2011). Porém, de modo geral, a opção pela utilização de explantes maiores que 0,5 mm necessita de associação da cultura de ápices caulinares com outras técnicas, como a termoterapia (RAMGAREEB et al., 2010; VIVEK; MODGIL, 2018).

No ápice de todas as raízes e caules é que são encontrados os meristemas apicais. Eles são compostos, principalmente, pelas células iniciais, que se dividem de modo que uma das células-irmãs permanece no meristema e outra se torna uma nova célula do corpo, ou derivada. As células derivadas podem se dividir várias vezes, próximo ao meristema, antes de se diferenciarem. Outras células importantes no crescimento da planta são as da protoderme, procâmbio e meristema fundamental (Meristemas primários), que proporcionam o crescimento primário. Cada uma dessas células dará origem a tecidos específicos da planta (EVERT; EICHHORN, 2014).

Apesar de ser uma técnica difundida mundialmente, a porcentagem de regeneração de plantas a partir de meristemas é relativamente baixa para algumas espécies vegetais. Isso pode ser relacionado a diversos fatores como a composição do meio nutritivo, a concentração e combinação de reguladores de crescimento, a luminosidade e temperatura de crescimento, além do tamanho do explante e da espécie. O emprego de reguladores de crescimento neste caso é indispensável para estimular o crescimento celular e melhorar a porcentagem de regeneração (ALBUQUERQUE et al., 2000).

CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO DE VIROSES EM MATRIZES DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* Sims) UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Coleta do material vegetal e extração de DNA e RNA

Com o objetivo de identificar a presença de vírus em maracujazeiros mantidos em casa de vegetação no Centro de Inovação em Genética Vegetal da Embrapa Cerrados, situada em Riacho Fundo II, Brasília – DF, folhas jovens de plantas sintomáticas foram coletadas e devidamente identificadas de acordo com os acessos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação das matrizes genitoras de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) a serem utilizadas nos experimentos

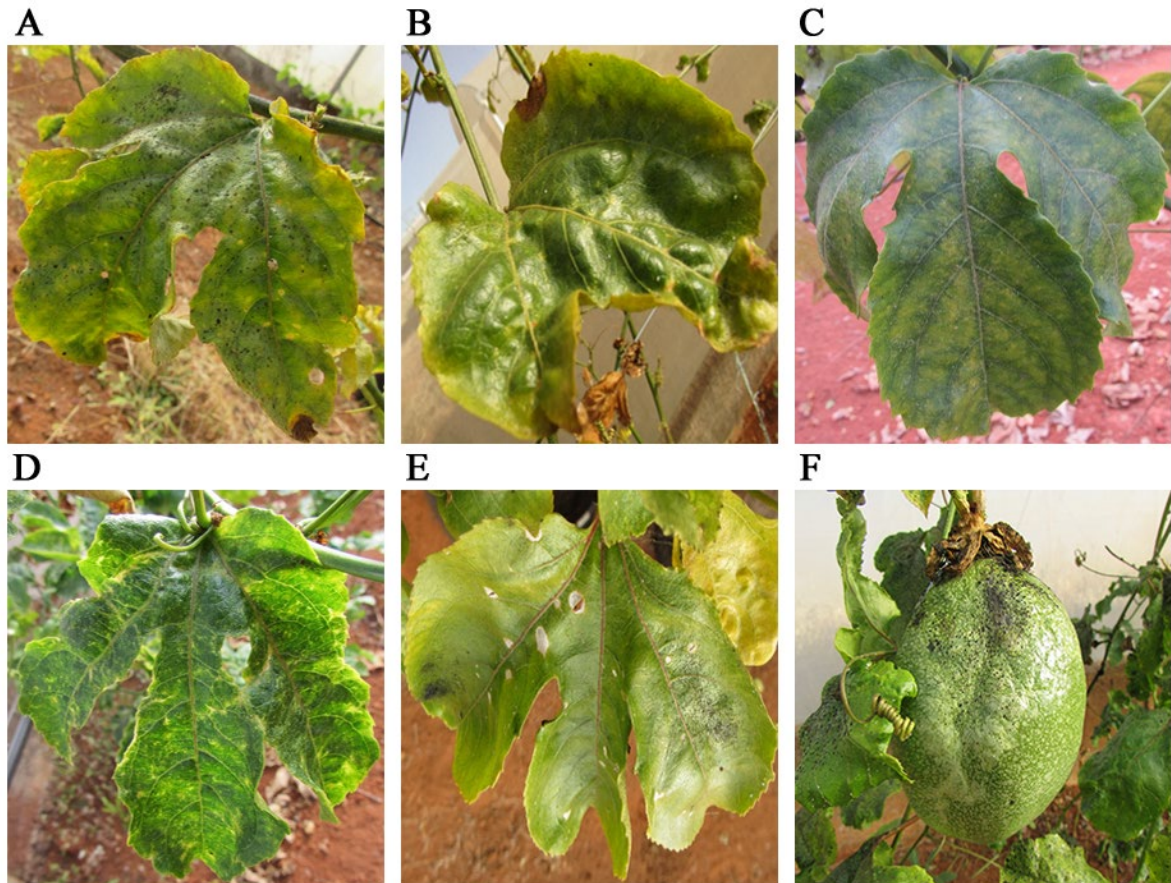
Genitor	Parental da variedade	Identificação
Genitor feminino	BRS Gigante amarelo	CPMSC1
Genitor masculino	BRS Gigante amarelo BRS Rubi do Cerrado	CPGA1
Genitor Masculino	BRS Sol do Cerrado	MR1
Genitor Feminino	BRS Sol do Cerrado	CPMGA2
Genitor Masculino	BRS Ouro vermelho	
Genitor feminino	BRS Ouro vermelho	CPF1SSBR

No momento da coleta, diversos sintomas foram observados nas plantas, entre os quais incluíam-se mosaico, clorose e enrugamento nas folhas, além de deformidade nos frutos (FIGURA 1). As amostras dos cinco genótipos foram coletadas (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2, CPF1SSBR), sendo cada amostra composta por três folhas para cada acesso. As amostras foram transportadas em isopor e imediatamente armazenadas em freezer à -80 °C.

Para a extração foram obtidos três discos foliares de cada acesso (100 – 200 mg), evitando a nervura central da folha, que foram inicialmente coletados e mantidos em freezer a -80°C. Os discos foliares foram macerados em nitrogênio líquido e a extração dos RNAs e DNAs das amostras seguiu os protocolos do kit Trizol (Life Technologies) e Doyle e Doyle (1990), respectivamente. O RNA resultante da extração foi utilizado para a síntese de cDNA (DNA complementar) utilizando a enzima M-MLV Transcriptase reversa (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante.

Para o diagnóstico de vírus de DNA, especificamente para o vírus do gênero *Begomovirus*, foi realizada a reação de RCA (*Rolling Circle Replication*) utilizando a enzima Phi29 polymerase (New England Biolabs). O produto do RCA e o cDNA foram utilizados nas reações de PCR e RT-PCR para confirmação da presença ou ausência dos vírus nas amostras.

Figura 1 – Diferentes genótipos de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) em casa de vegetação apresentando sintomas nas folhas e fruto. (A) CPMSC1 – folha com presença de fungo, cochonilha e bordas amareladas; (B) CPGA1 – folha apresentando enrugamento, bordas amareladas e reação de hipersensibilidade; (C) MR1 – formação de mosaicos nas folhas; (D) CPMGA2 – regiões amareladas na folha; (E) CPF1SSBR – presença de fungo e amarelecimento na folha; (F) Fruto do genótipo MR1 apresentando deformidade na casca e presença de fungo na superfície.



Fonte: O autor (2019).

1.3.1 Detecção do CABMV, LCV e *Begomovirus*

Os materiais extraídos na etapa anterior foram amplificados por meio da técnica de RT-PCR utilizando a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) em Termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, foram utilizados primers sintetizados em estudos anteriores (material não publicado). Inicialmente, para a amplificação do gene de CABMV e LCV no cDNA extraído, foi utilizado um par de primer para cada vírus (QUADRO 1). Complementarmente, primers universais de *Begomovirus* também foram utilizados no produto da reação de RCA. A amplificação por PCR foi realizada com um aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, com ajustes realizados para cada par de *primer* (QUADRO 1). Para o par de *primers* de CABMV a amplificação se deu por 36 ciclos de desnaturação (45 segundos

à 94°C), anelamento (30 segundos à 55°C) e extensão (1 minuto à 72°C). Para o par de *primers* de LCV a amplificação se deu por 36 ciclos de desnaturação (45 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 60°C) e extensão (2 minutos à 72°C). Para o par de *primers* universais de *Begomovirus* a amplificação se deu por 35 ciclos de desnaturação (1 minuto à 95°C), anelamento (1 minuto à 55°C) e extensão (1 minuto e 30 segundos à 72°C).

Quadro 1 – Informações dos primers utilizados para a amplificação dos vírus em *Passiflora edulis* Sims

Vírus	Primer	Sequência nucleotídica	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	CABMV_CP_9250F	GTGAGACGATA ACTGTGGCGA	55°C	829pb
	CABMV_CP_10115R	CAGAAGATGTT GTGCTCCA	61°C	
<i>Lettuce chlorosis virus</i>	LCV_RNA2_2793F	AAGGTTTCAGAT CCGTTTCATCTTG TA	60°C	1200pb
	LCV_RNA2_3997R	CTTCCACGCATT CTCTGAATAAG TC		
<i>Begomovirus</i>	PAL1v1978	GCATCTGCAGG CCCACATYGTC TTYCCNGT	55°C	1100pb
	PAR1c496	AATACTGCAGG GCTTYCTRACA TRGG		

Por fim, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em 1,0% de gel de agarose e visualizados em luz ultravioleta. Adicionalmente, os produtos de RT-PCR amplificados pelo par de primer de CABMV (CABMV_CP_9250F e CABMV_CP_10115R) foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Coréia do Sul). A sequência obtida foi alinhada com outras sequências depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), em que se observou a identidade nucleotídica por meio do BLASTn.

1.3.2 Hibridização por *Southern blot*

Para realizar um diagnóstico mais sensível, os produtos da RT-PCR realizada utilizando primers de CABMV foram hibridizados por *Southern blot*, utilizando sonda radioativa específica para o capsídeo viral deste vírus, que foi produzida do material sequenciado na etapa anterior. Para tal, após a realização da eletroforese, o gel foi incubado em HCL 0,25 N com agitação suave, por 10 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado em solução de desnaturação, com agitação suave, por 30 minutos. Após breve lavagem com água destilada o gel foi incubado em solução de neutralização, com agitação suave, por 30 minutos e lavado novamente com água destilada. A plataforma utilizada para a transferência de DNA para membrana por capilaridade foi confeccionada conforme protocolo descrito por Southern (2006). Após 16 horas de transferência, o sistema foi desmontado e a membrana foi lavada cuidadosamente com SSC 2X. Após secagem, a membrana foi envolvida com papel filtro e incubada a 80°C por duas horas.

Para realização da pré-hibridização, a membrana foi posicionada em um recipiente contendo um pequeno volume da solução de pré-hibridização e incubada por 2 horas em agitação suave em forno de hibridização a 65°C. Posteriormente, a sonda marcada radioativamente foi desnaturada por aquecimento a 100°C por 5 minutos e colocada imediatamente no gelo. A sonda desnaturada foi adicionada à solução de pré-hibridização e o sistema foi incubado por 16 horas, sob agitação suave, em forno de hibridização a 65°C. Após este período, a membrana foi lavada duas vezes com a solução de lavagem I, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Foram realizadas mais duas lavagens com as soluções de lavagem II e III, respectivamente, ambas realizadas por 15 minutos, em agitação suave, em forno de hibridização a 65°C. Após secagem com papel filtro, a membrana foi envolvida com filme plástico do tipo PVC e exposta a um filme de raios X em um cassete com telas intensificadoras a -80°C. Após 7 dias de exposição, a autorradiografia foi revelada, utilizando as soluções reveladoras e fixadoras.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

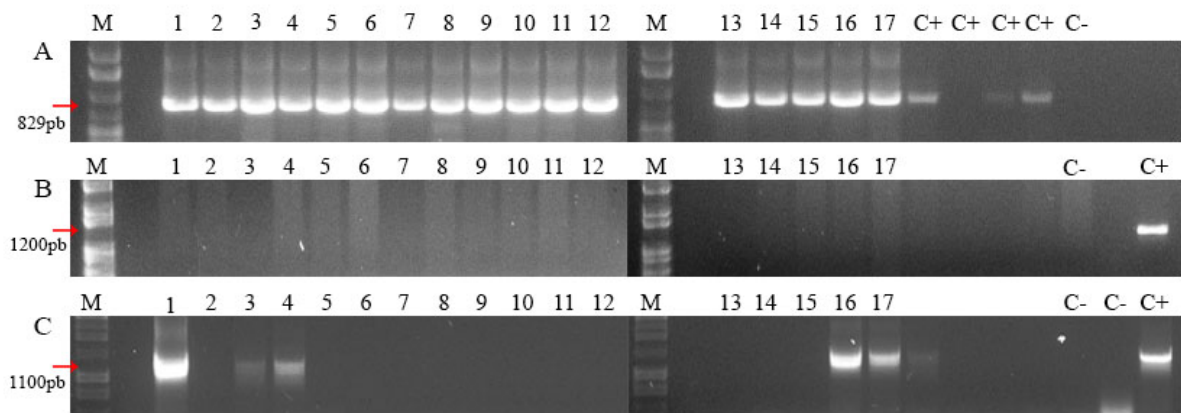
2.1 Detecção do CABMV, LCV e *Begomovirus*

O diagnóstico para a presença do CABMV, LCV e *Begomovirus* foi realizado em 17 amostras coletadas, sendo: três amostras de cada planta dos cinco genótipos representados nesse trabalho (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR). O número de plantas de cada

genótipo variou devido à perda de alguns acessos em decorrência de infecções virais, fungos e outras pragas na casa de vegetação.

Do total de amostras coletadas, todas foram positivas (100%) para o CABMV a partir da reação de RT-PCR (TABELA 2). Foi observado um fragmento de aproximadamente 829 pb (FIGURA 2-A). O fragmento da amostra controle foi selecionado para sequenciamento e posterior caracterização molecular em que se identificou a presença do CABMV na referida amostra. O resultado do alinhamento e avaliação da identidade entre o isolado sequenciado e outros vírus de CABMV com sequências depositadas na base de dados do NCBI, apresentou uma identidade de 97 % com outros isolados de maracujazeiro, número de acesso *GenBank* – KF725715.1, KF725308.1, KF725707.1 (FIGURA 3).

Figura 2 – Análise de RT-PCR e PCR para detecção dos vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV) e *Begomovirus* em diferentes genótipos de *Passiflora edulis* Sims. A) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR da sequência parcial do gene da capa proteica do CABMV de aproximadamente 829 pb. M = Star 1kb DNA ladder (Cellco). (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR do LCV de aproximadamente 1200 pb. M = 1kb plus DNA ladder (Cellco). (C) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de parte do DNA-A de *Begomovirus* de aproximadamente 1100 pb. M = 1kb (biometrix 1x). C- controle negativo. C+ controle positivo. Amostras: 1-4 CPGA1; 5-7 MR1; 8-11 CPMGA2; 12 -13 CPF1SSBR e 14-17 CPMSC1.



Fonte: O autor (2020).

Outros trabalhos em que foram utilizados primers que amplificam a mesma região da capa proteica obtiveram fragmentos com tamanhos aproximados. Melo et al. (2015) utilizaram estes primers para estudos filogenéticos em isolados de CABMV, caracterizando uma estirpe do vírus restrita ao estado da Bahia, o que evidencia a evolução do vírus no Brasil. Outros trabalhos em que foram utilizados primers que amplificam a mesma região da capa proteica obtiveram fragmentos com tamanhos semelhantes e elevada identidade entre as sequências (Melo et al., 2015). Os primers utilizados no referido estudo serviram para realização de estudos filogenéticos de 10 isolados de CABMV coletados de diferentes campos de cultivo na cidade de Nossa Senhora do livramento, na Bahia. Os isolados analisados pertencem às espécies de

CABMV, formando um cluster isolado dentro clado monofilético de CABMV dominante no Brasil, indicando que se trata de uma cepa restrita ao estado da Bahia, diferindo de outros isolados da mesma região. Em outro estudo Maciel et al. (2009), utilizaram primers que codificam parte da capa proteica do CABMV para a indexação de espécies de *Passiflora* infectadas.

Tabela 2 – Relação dos resultados obtidos quanto a presença dos vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *lettuce chlorosis virus* (LCV) e *Begomovirus* em genótipos de *Passiflora edulis* Sims.

Genótipos	Vírus testados por RT-PCR e PCR					
	CABMV (%)		LCV (%)		<i>Begomovirus</i> (%)	
	+	-	+	-	+	-
CPMSC1	(4/4) 23,5	(0/4)	(0/4)	(4/4) 23,5	(2/4) 11,7	(2/4) 11,7
CPGA1	(4/4) 23,5	(0/4)	(0/4)	(4/4) 23,5	(3/4) 17,6	(1/4) 5,8
MR1	(3/3) 17,6	(0/3)	(0/3)	(3/3) 17,6	(0/3)	(3/3) 17,6
CPMGA2	(4/4) 23,5	(0/4)	(0/4)	(4/4) 23,5	(0/4)	(4/4) 23,5
CPF1SSBR	(2/2) 11,7	(0/2)	(0/2)	(2/2) 11,7	(0/2)	(2/2) 100
Total	(17/17) 100	(0/17)	(0/17)	(17/17) 100	(4/17) 23	(12/17) 70

(+) Porcentagem de amostras positivas para a presença do vírus, (-) Porcentagem de amostras negativas para a presença do vírus.

Com a finalidade de identificar outras espécies de vírus presentes nos genótipos desse trabalho, primers do vírus LCV e primers universais de *Begomovirus* foram utilizados. Nesta etapa, nenhuma das amostras foram positivas na reação de RT-PCR para o LCV (FIGURA 2-B) (TABELA 2). Já para os primers universais pAL1v1978 e pAR1c496 (ROJAS, 1993) que detectam vírus do gênero *Begomovirus*, três amostras do genótipo CPGA1, representando 17,6%, e duas amostras de CPMSC1, representando 11,7% do total de amostras coletadas, foram positivas (FIGURA 2-C) (TABELA2).

A infecção por LCV em plantas de diversas espécies é bem documentada e já foi demonstrada em tomate (ZHANG et al., 2017), beterraba-sacarina (WISLER; DUFFUS; GERIK, 2007) e, mais recentemente, foi encontrado infectando pervinca (*Catharanthus roseus*) no Brasil (FAVARA et al., 2020). Até o momento, não há registros oficiais do LCV infectando espécies de *Passiflora*. Porém, a mosca branca (*Bemisia sp*, *Trialeurodes sp*), principal vetor do vírus (MARTELLI et al., 2002), é responsável pela transmissão de espécies de *Begomovirus* já documentadas em *Passiflora*. Vaca-Vaca et al. (2016) utilizaram os primers universais de *Begomovirus* e detectaram fragmentos do DNA-A e DNA-B em amostras de folha de *P. edulis* na Colômbia. Em outro estudo realizado no Brasil, Novaes et al. (2003) utilizaram os primers semelhantes para detectar a presença de um *Begomovirus* em amostras de *P. edulis* que apresentavam sintomas como mosaico amarelo, redução do tamanho de folhas e do desenvolvimento da planta.

Figura 3 – Sequência de nucleotídeos obtida a partir da análise *in silico* do fragmento de 829 pb do genoma do CABMV isolado dos genótipos.

```

TTACTGCCCATGYGTCATYCCTAAGAGGGAATGCATAGTTCTGATTAGACATCAGTGGCAGT
GTGCCTCTCAGTGTCTCACTAGTTGTTGCCACATTCCCATCCAGGCCAAACATCCTGGTGT
AACGTTGGCGAGAGCTGCAGCCTTCATTTGTGCTATTGCTTCCCTTGCTCTGTCAGAAGTCTT
GGATGTGACTTCATAGAAATCGAAAGCATACCTTGCTAAGCTCTTGCTCTTAAATTCCTCAG
TAGTCCATACCTGGGCATGTAGAACCCTTCAGAATTTCTCATCTCAATGTACGCTTCAGCTGC
GTCYGAGAAGTGGTGCATAATTTGTCTGAGTGTGGGTTTTGCATTCTCCACGATGGGCTTGA
GCGGAAATTCACCTTGCTCGTCCCGTCCATCATAGTCCACACCCCATTACATCAGGTGAA
GTTCCATTTTCAATGCACCAAACCATGAACCCRTTCATGATAACCCCATCTTGTCATCATCC
AACTCGTACTCTCCYTTGATGGCYTCAAACCATTTACTGAGTTGTGTCTTTGATGCTCTGGTG
TTATATAGATCRATTTGTGCTGGCTTGTATTCTATCAAATGATCCAAATTGAGAAGCACTCTA
CCAGCGACCATGGGCATGTTTCATCTTTTTGCTGATCTTTTGCAGACGTGGAAGTAGTTGCTCT
GGAGAAGTAGTTGAAACGTCTCTCTGTTTCCTTGRCTCCTTTGTCTTTGCATGCTTGTGT
GCATTGACTGCTCTTTAGCCTTCTTTGACCTCTATCTTTRCCTTGCTGCRCCAAAYTCTTA
TCCTTWCCATC

```

Fonte: O autor (2020).

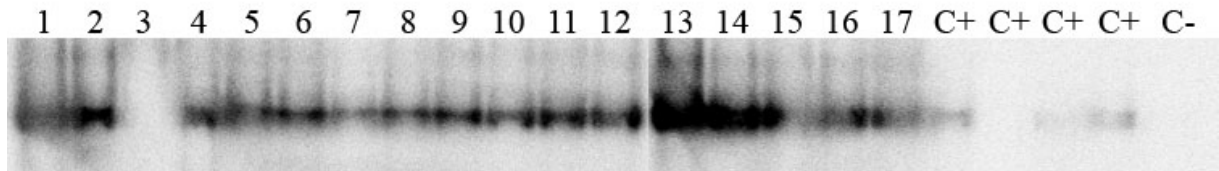
Nota: Sequência parcial do Capsídeo viral (CP).

A detecção de múltiplos vírus em *P. edulis* já foi documentada no Brasil. Novaes et al. (2002) detectaram a presença de PWV e TYLCV em amostras de *P. edulis*. Além da ampla distribuição do CABMV em *P. edulis* no Brasil (NASCIMENTO et al., 2006; MELO et al., 2015), a presença de um *Begomovirus* infectando a espécie já foi documentada (NOVAES et al., 2003). Em outros países ocorreu a detecção de vírus distintos, como o TMV na China (PRAMMANEE; PIPATTANAWONG, 2014; CHEN et al., 2018; CHIEMSOMBAT) e o PWV na Tailândia (PRAMMANEE et al., 2011), todos apresentando sintomas semelhantes. Estes dados demonstram a necessidade da identificação de todos os vírus presentes em plantas sintomáticas, podendo contribuir para estudos que visem avaliar a interação entre diferentes vírus em uma mesma planta.

2.2 Hibridização por *Southern blot*

Ao final dos diagnósticos quanto a presença do CABMV, LCV e *Begomovirus*, o produto da RT-PCR do controle positivo do CABMV foi utilizado para síntese da sonda radioativa, sendo esta utilizada para hibridização por *Southern blot* das amostras coletadas. A análise do resultado da hibridização confirmou a presença do CABMV em todas as mostras dos genótipos MR1 (17,6%), CPMGA2 (23,5%), CPF1SSBR (11,7%), CPMSC1 (23,5%) e em 3 (de um total de 4) amostras do genótipo CPGA1(17,6%), totalizando 94% de amostras positivas (FIGURA 4).

Figura 4 – Análise por *Southern blot* de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por RT-PCR. Amostras: (1-4) CPGA1; (5-7) MR1; (8-11) CPMGA2; (12 -13) CPF1SSBR e (14-17) CPMSC1. C- controle negativo. C+ controle positivo.



Fonte: O autor (2020).

O uso da análise por *Southern blot* como confirmação da técnica de PCR vem sendo documentada em outras espécies de plantas, para o diagnóstico de diferentes patógenos como bactérias (BERTACCINI, 1990; KUFLU; CUPPELS, 1997) e vírus (RÊGO, 2016). Esse tipo de teste além de servir para a confirmação do diagnóstico pela técnica de PCR, pois aumenta a sensibilidade do teste, é frequentemente usada para estudos de confirmação da presença de transgenes em plantas geneticamente modificada (PGM) (TREVISAN et al., 2006; MONTEIRO-HARA et al., 2011). Além disso, o *Southern blot* é utilizado para a caracterização de genes específicos em que se avalia o número de cópias destes no genoma de diferentes espécies, como em *Passiflora* sp (ABREU; ARAGÃO, 2007). Logo, a capacidade de detectar genes específicos através da hibridização de sondas radioativas, torna a técnica uma ferramenta útil na confirmação de diagnóstico viral em plantas.

CAPÍTULO II

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJAZEIRO

(*Passiflora edulis* Sims)

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Efeito do tipo de explante e do genótipo no estabelecimento *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims

1.1.2 Coleta do material vegetal

Com o objetivo de realizar um teste inicial de estabelecimento de matrizes de maracujazeiro *in vitro* para posterior micropropagação, ramos de aproximadamente 15 cm foram coletados de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR), mantidos em casa de vegetação no Centro de Inovação em Genética Vegetal da Embrapa Cerrados, situada em Riacho Fundo II, Brasília-DF.

Uma vez coletado, o material foi conduzido para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, onde os experimentos foram realizados.

1.1.4 Estabelecimento dos explantes *in vitro*

Para o estabelecimento de microestacas, os ramos coletados tiveram as folhas maiores retiradas e foram reduzidos a aproximadamente 5 cm. Posteriormente, em fluxo laminar, estas estacas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (1% de cloro ativo) e 3 gotas de Tween-20 por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

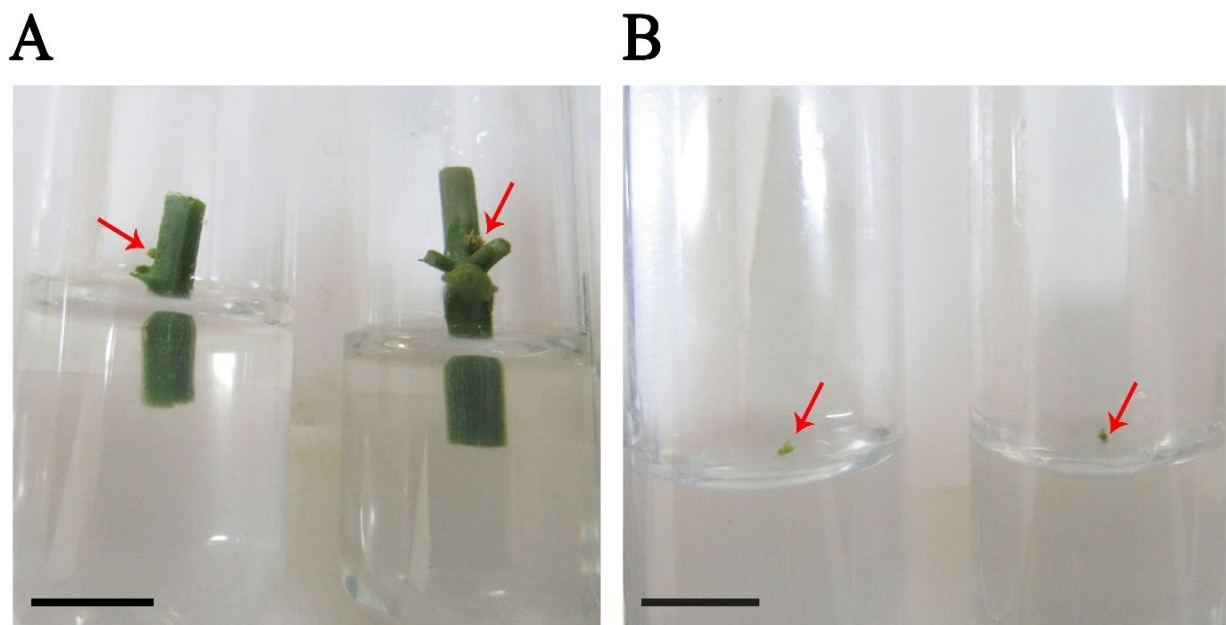
Com o auxílio de pinça e bisturi, foram removidas as folhas restantes deixando apenas uma gema lateral em cada microestaca. As extremidades das microestacas foram removidas para evitar oxidação pelo hipoclorito, reduzindo o tamanho para aproximadamente 3 cm (FIGURA 1-A). As estacas foram inoculadas imediatamente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura com sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) desprovido de reguladores de crescimento. Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA).

Para avaliar o melhor tipo de explante para o estabelecimento, neste experimento também foi realizada a inoculação de gemas axilares (FIGURA 1-B). Para tanto, após assepsia, as gemas preexistentes, medindo cerca de 0,3 cm, foram removidas das microestacas e

inoculadas no mesmo meio de cultura, sendo mantidas nas mesmas condições que as microestacas para crescimento.

Os explantes foram mantidos sob 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×5 , caracterizado por 2 tipos de explante (gema e microestaca) e 5 genótipos (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR), totalizando dez tratamentos. Cada tratamento foi formado por 25 repetições, sendo a unidade experimental composta por um explante por tubo de ensaio. A cada duas semanas, os explantes foram avaliados quanto à altura (cm), oxidação/amarelecimento (%) e contaminação (%).

Figura 1 – Explantes de *Passiflora edulis* Sims inoculadas em meio de MS desprovido de reguladores para estabelecimento *in vitro*. (A) Microestacas com aproximadamente 3 cm; notar gemas laterais (setas); (B) Gemas axilares (seta) isoladas com aproximadamente 0,3 cm. Barras = 1 cm.



Fonte: O autor (2020).

1.2 Efeito do genótipo, do tipo de tampa dos recipientes de cultivo e da presença de BAP na multiplicação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims

1.2.1 Coleta do material vegetal

Após análise dos resultados obtidos no primeiro experimento (item 1.1), um segundo experimento de estabelecimento foi realizado com o uso de microestacas. Para tal, ramos de aproximadamente 15 cm foram coletados dos cinco genótipos de *P. edulis* (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR) mantidos em casa de vegetação no Centro de Inovação em

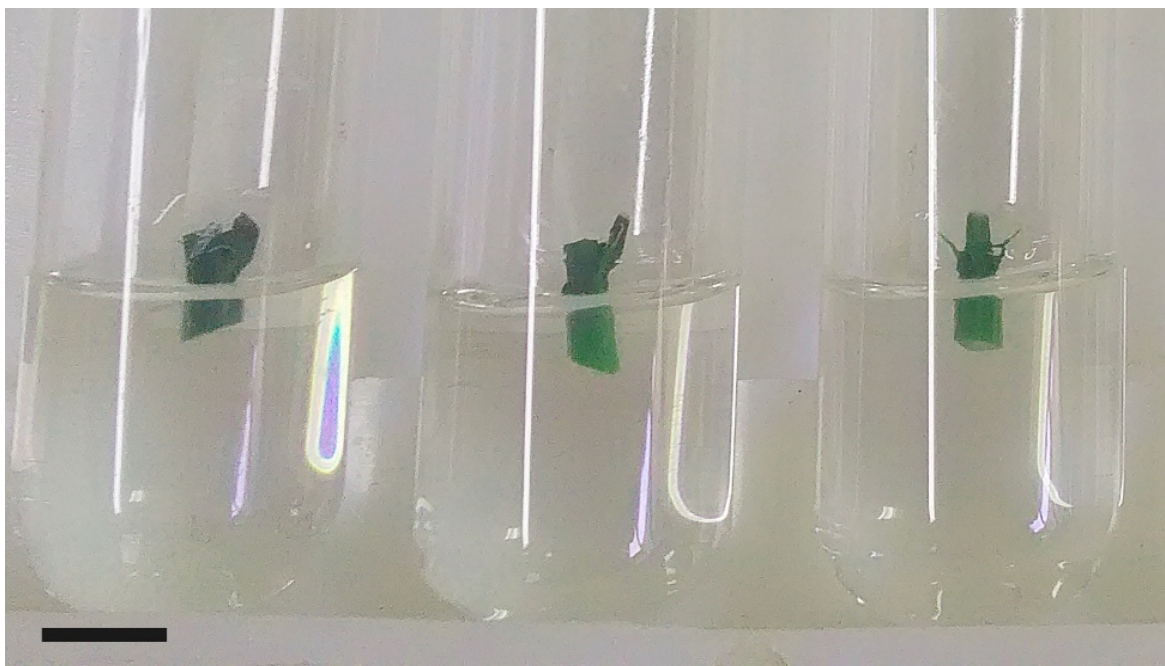
Genética Vegetal da Embrapa Cerrados, situada em Riacho Fundo II, Brasília-DF. O material coletado foi levado imediatamente para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, onde o experimento foi realizado.

1.2.2 Estabelecimento dos explantes *in vitro*

Em laboratório, os ramos coletados foram reduzidos a aproximadamente 3 cm e tiveram todas as folhas retiradas, deixando-se apenas uma gema lateral em cada microestaca. Posteriormente, as estacas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (1% de cloro ativo) e 3 gotas de Tween-20 por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

Com o auxílio de pinças e bisturis, as extremidades das microestacas foram excisadas, sendo a extremidade basal cortada em formato de bisel e a extremidade apical cortada perpendicularmente, seguindo o proposto por Santos et al. (2012b). As microestacas, com cerca de 1 cm (FIGURA 2), foram então inoculadas em meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 4,43 μM de BAP (ANAND et al., 2012; SEVERIN et al., 2011). Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA).

Figura 2 – Microestacas de *Passiflora edulis* Sims inoculadas em meio de MS contendo 4,43 μM BAP durante estabelecimento *in vitro*. Barra = 1 cm.



Fonte: O autor (2020).

Uma vez seccionados, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura e mantidos sob 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação luminosa de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (genótipos) e 30 repetições, sendo cada repetição formada por um explante.

As avaliações foram efetuadas a cada 15 dias, considerando-se a altura das gemas, a porcentagem de desenvolvimento (microestacas com gemas maiores que 3 mm), além das porcentagens de oxidação/amarelecimento e de contaminação.

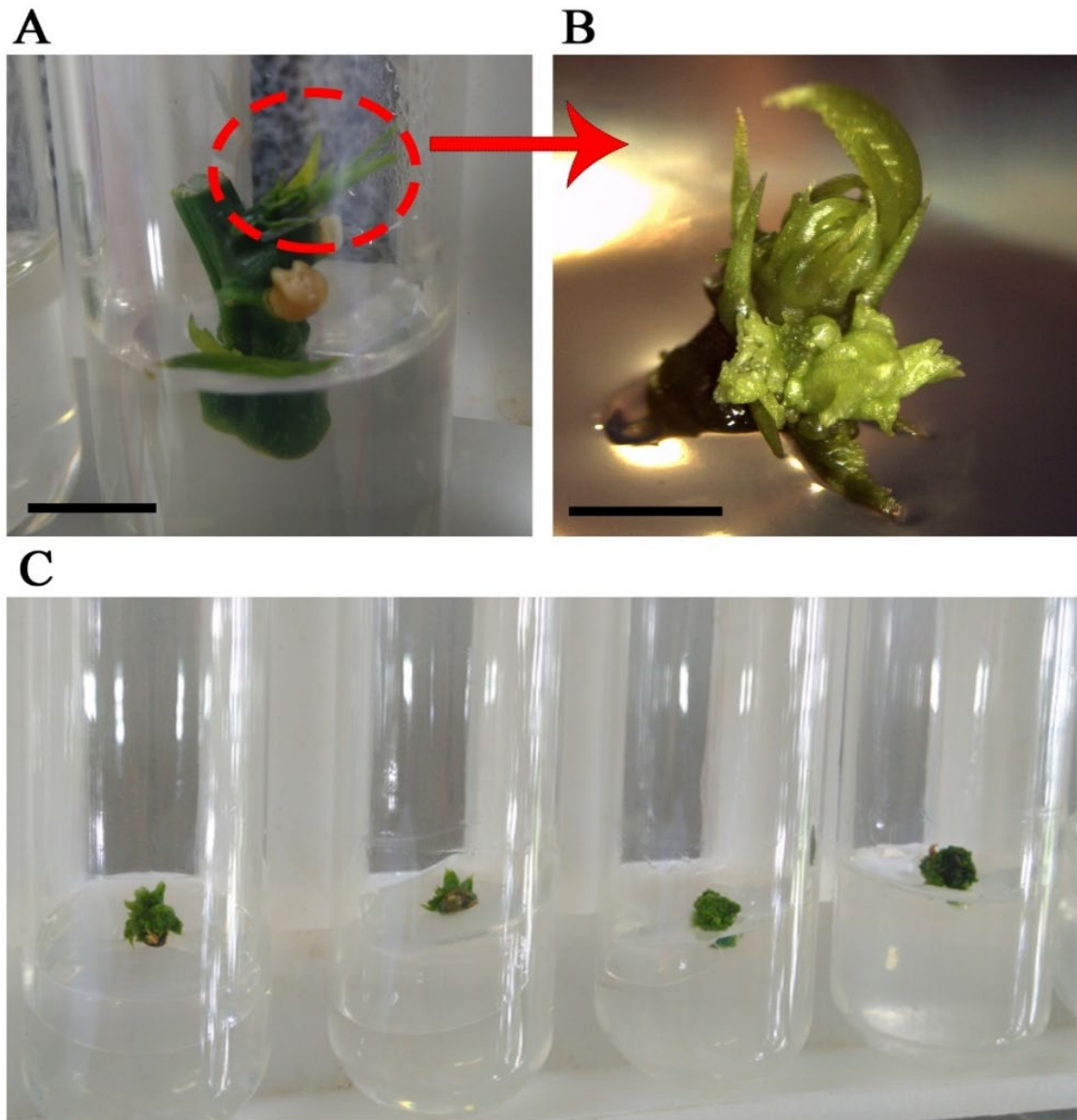
1.2.3 Multiplicação *in vitro* de gemas axilares

Com o objetivo de multiplicar o material estabelecido *in vitro* para realização de outros experimentos e avaliar métodos de multiplicação, após o desenvolvimento dos ápices caulinares inoculados no Capítulo III deste trabalho, após 45 dias, as gemas preexistentes foram separadas das microestacas (inoculadas no item 2.2.2) (FIGURA 3-A, B) e transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL do mesmo meio de cultura utilizado inicialmente (FIGURA 3-C). As gemas foram mantidas nas mesmas condições ambientais do experimento anterior. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo 5 x 3, caracterizado por 5 genótipos e 3 subcultivos, totalizando 15 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 14 repetições com um explante por unidade experimental.

Ao todo foram realizados três subcultivos mensais, além de uma avaliação ao final de cada subcultivo. Os explantes foram avaliados quanto ao número de gemas por explante, formação de calo (%) e contaminação (%). Adicionalmente, foram contabilizados o número de gemas, as quais foram classificadas visualmente quanto ao seu desenvolvimento, como segue: 0 – com apenas uma gema; 1 – diversos primórdios foliares; 2 – diversas folhas formadas; 3 – pelo menos uma folha alongada e 4 – pelo menos uma folha alongada e aberta.

Seguindo metodologia realizada por Oliveira, Costa e Scherwinski-Pereira (2008), a estimativa do número de plantas produzidas por explante foi obtida a partir da razão entre o número de subcultivos (ns) realizados e a média do número de mudas produzidas por explante (TMns), representada pela taxa de multiplicação estimada (Tme). Através destes dados foi possível deduzir a quantidade média de plantas que seriam obtidas ao longo dos 3 subcultivos. Os dados foram transformados por $X^{0,5}$ e submetidos à análise de variância e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Sisvar.

Figura 3 – Excisão de gemas desenvolvidas em microestacas de *Passiflora edulis* Sims para multiplicação *in vitro* em tubos de ensaio contendo meio de MS acrescido de 4,43 μM de BAP. (A) Microestaca apresentando a gema lateral desenvolvida. Barra = 0,5 cm; (B) Gema com primórdios foliares em desenvolvimento excisada da microestaca, após 30 dias de cultivo. Barra = 2 mm; (C) Gemas excisadas de microestacas e inoculadas em tubos de ensaio.



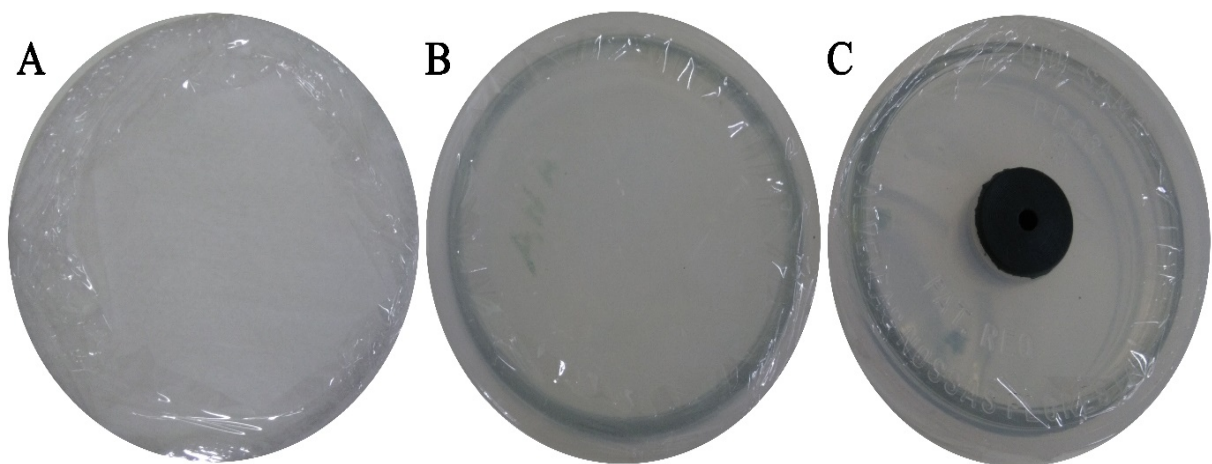
Fonte: O autor (2020).

1.2.3 Influência da tampa do recipiente de cultivo no desenvolvimento de agregados de gemas

Para testar a influência do tipo de vedação dos frascos no desenvolvimento dos explantes, agregados de gemas dos genótipos CPGA1 e MR1, provenientes da multiplicação *in vitro*, foram transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 4,43 μM de BAP. Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel*® (SIGMA).

Foram utilizados três tipos de vedação: membrana semipermeável confeccionada com máscara cirúrgica de tripla camada descartável (Descarpack), tampa em polietileno e tampa em polietileno contendo uma membrana semipermeável central (Bio Sama) (FIGURA 4). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 3, caracterizado por 2 genótipos, 2 subcultivos e 3 tipos de tampa, totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 10 repetições, com 5 explantes por parcela (frasco). Ao todo foram realizados dois subcultivos, aos 75 dias e aos 135 dias. O experimento foi avaliado ao final de cada subcultivo quanto à altura das gemas, número de gemas por explante e oxidação (%).

Figura 4 – Diferentes tampas utilizadas na vedação de frascos em experimento de propagação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims. (A) Membrana semipermeável confeccionada com máscara de tripla camada; (B) Tampa em polietileno; (C) Tampa contendo membrana semipermeável central (Bio Sama).



Fonte: O autor (2020).

1.2.4 Alongamento das gemas

Com a finalidade de alongamento, gemas com aproximadamente 5 mm de diâmetro provenientes da multiplicação *in vitro* dos genótipos CPMGA2 e MR1, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou MS com metade das concentração dos sais, ambos suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e BAP nas concentrações de 0, 0,1 e 1 µM, como proposto por Kawata et al. (1995). Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 3, caracterizado por 2 genótipos, 2 concentrações de sais de MS e 3 diferentes concentrações de BAP, totalizando 12 tratamentos,

cada um com 10 repetições cada, sendo 1 explante por unidade experimental. Ao final de 30 dias, os explantes foram avaliados quanto ao tamanho e oxidação/amarelecimento (%).

1.2.5 Enraizamento dos brotos

Para enraizar os brotos oriundos da multiplicação *in vitro*, os propágulos dos genótipos CPMSC1, CPGA1, MR1 e CPMGA2 foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0, 1,2, 2,4 e 4,9 μM . Para a solidificação do meio de cultura foi adicionado ao meio de cultura 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel*® (SIGMA). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial duplo 4 x 3, caracterizado por 4 genótipos e 3 concentrações de AIB, totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 10 repetições, cada uma composta por 1 explantes. Ao final de 45 dias os explantes foram avaliados quanto ao comprimento das raízes e número de raízes, além da porcentagem de enraizamento e oxidação.

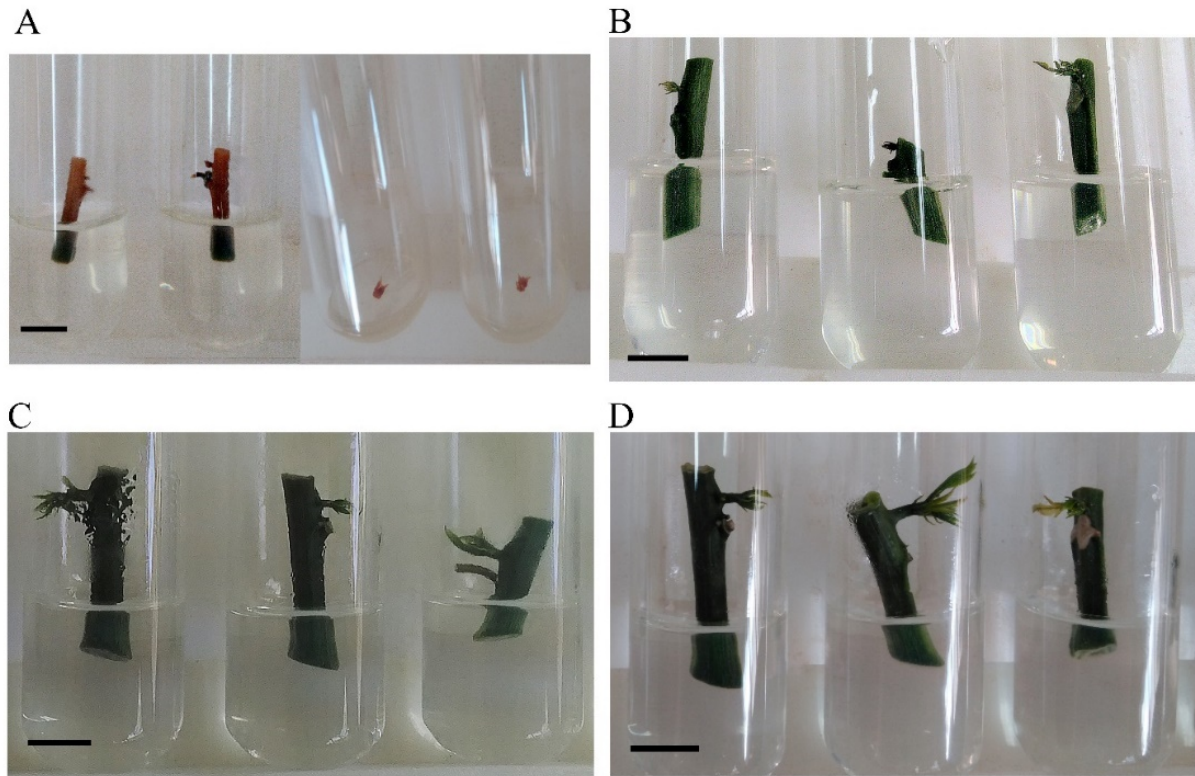
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Efeito do tipo de explante e do genótipo no estabelecimento *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims

2.1.2 Estabelecimento dos explantes *in vitro*

Após a inoculação em meio de MS, não foi observado crescimento significativo dos explantes dos genótipos CPMSC1, CPGA1, MR1 e CPF1SSBR. Além disso, o amarelecimento/oxidação dos explante aumentou gradativamente a partir dos 25 dias (FIGURA 5-A). O desenvolvimento das gemas preexistentes nas microestacas foi observado a partir de 15 dias apenas no genótipo CPMGA2 (FIGURA 5-B). Por esta razão, apenas o desenvolvimento das microestacas do genótipo CPMGA2 foi documentado durante 15, 25 e 45 dias (FIGURA 5). De modo geral, não se verificou desenvolvimento em nenhum genótipo, quando as gemas foram excisadas e inoculadas diretamente no meio de cultura, sendo a presença de amarelecimento/oxidação observada na maioria dos explantes inoculados (FIGURA 5-A).

Figura 5 – Fases de desenvolvimento de microestacas de *Passiflora edulis* Sims inoculadas em meio de MS em um período de 45 dias de cultivo visando estabelecimento *in vitro*. (A) Microestacas e gemas oxidadas/amareladas após 25 dias de inoculação; (B) Microestacas do genótipo CPMGA2 após 15 dias de inoculação; (C) Microestacas do genótipo CPMGA2 após 25 dias de inoculação apresentando crescimento pronunciado da gema preexistente; (D) Microestacas do genótipo CPMGA2, após 45 dias de inoculação apresentando crescimento estagnado e regiões amareladas no explante. Barras = 1 cm.



Fonte: O autor (2020)

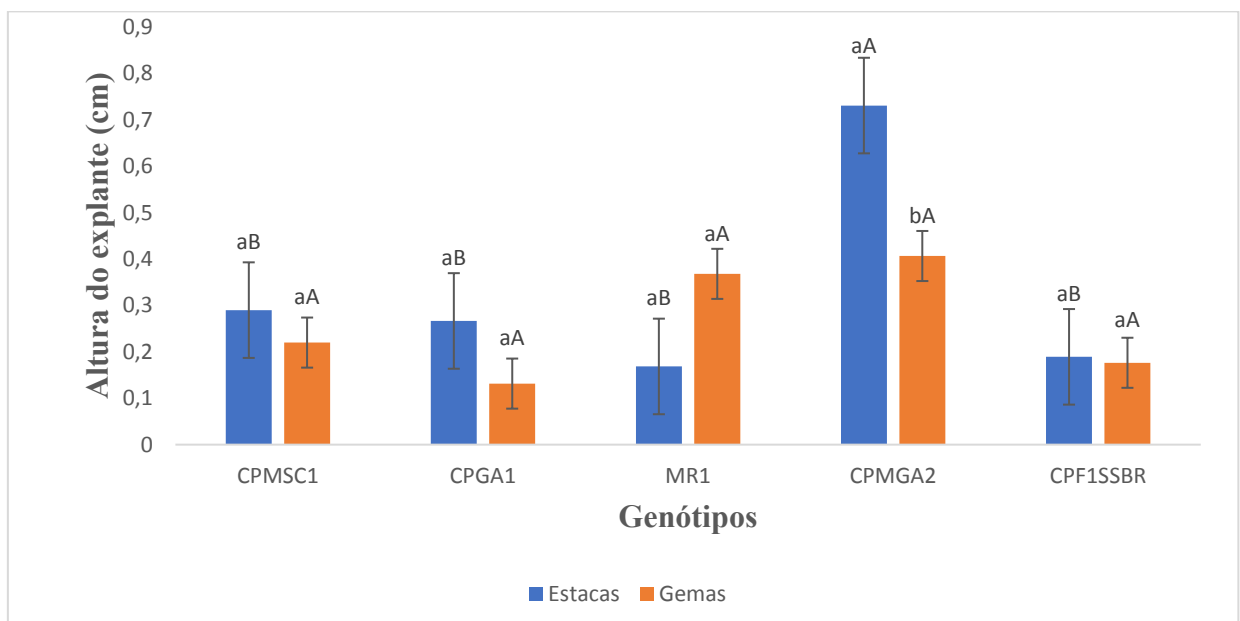
Outros estudos utilizaram o meio de cultura contendo sais de MS desprovido de reguladores de crescimento para estabelecimento de microestacas. Faria et al. (2007) testaram diferentes explantes e concentrações de sais de MS e obtiveram melhores resultados no estabelecimento *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora*, incluindo *P. edulis*. Em outro estudo, Santos et al. (2010) observaram o desenvolvimento de gemas em microestacas de *P. setacea* após a inoculação em meio de MS sem reguladores, apesar de relatarem a obtenção de brotos maiores quando utilizou-se o meio MSM (MONTEIRO et al., 2000) com diferença de 1 cm no tamanho dos brotos obtidos em relação ao meio de MS.

O baixo desenvolvimento das microestacas dos genótipos utilizados no presente estudo diferiu desses resultados observados na literatura, podendo estar ligado a diversos fatores, dentre eles a quantidade de gemas preexistentes por estaca, como foi observado por Faria et al. (2007). Além disso, a utilização de reguladores de crescimento, como a 6-Benzilaminopurina, pode ser crucial no estabelecimento *in vitro* de espécies de *Passiflora* (SEVERIN et al., 2011; ANAND et al., 2012).

A utilização de gemas para o estabelecimento *in vitro* de espécies de *Passiflora* é pouco documentado, podendo indicar que o explante não é apropriado para este fim. O trabalho de Reis et al. (2003) corrobora com essa hipótese, demonstrando que o acúmulo de etileno causa a senescência do explante e impede seu desenvolvimento. Apesar disso, Faria e Segura (1997b) obtiveram brotos de *P. edulis* após a inoculação de gemas, com cerca de 0,3 cm, em meio de MS independente da presença de BAP, indicando o uso desse explante para multiplicação *in vitro*.

A análise dos dados confirmou o desenvolvimento mais pronunciado em altura apenas das microestacas oriundas do genótipo CPMGA2, considerando que as gemas iniciais tinham entre 0,1 - 0,3 cm. Apesar de ocasionalmente ocorrer desenvolvimento em outros genótipos, este não foi estatisticamente significativo (FIGURA 6). Após 25 dias de cultivo *in vitro*, os explantes de ambos os tratamentos (microestacas e gemas) começaram a apresentar sinais de oxidação/amarelecimento, o que prejudicou o seu desenvolvimento. As porcentagens de oxidação/amarelecimento e contaminação das microestacas inoculadas foram de 67,8% e 35,6%, respectivamente. Para as gemas inoculadas, as porcentagens de oxidação/amarelecimento e contaminação foram de 78,4% e 17,6%, respectivamente. Logo, pode-se considerar que a oxidação/amarelecimento foi o principal fator limitante no desenvolvimento dos explantes.

Figura 6 – Altura de explantes de distintos genótipos de *Passiflora edulis* Sims observada após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio de MS sem adição de reguladores. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre explantes e maiúscula entre genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Severin et al. (2011) observaram resultados semelhantes em relação ao amarelecimento (clorose) das folhas de *P. caerulea* após inoculação em tubos com meio de cultura contendo sais de MS e BAP, atribuindo o acontecimento à produção de etileno pelo explante. Esta alta produção de etileno é comum em diversas espécies de *Passiflora*, sendo um fenômeno bem documentado na literatura (REIS et al., 2003; TREVISAN; MENDES, 2005; PINTO et al., 2010). Para solucionar o problema, algumas técnicas podem ser adotadas e substâncias específicas adicionadas ao meio de cultura, como a utilização de tampas com ventilação (TREVISAN; MENDES, 2005), adição de nitrato de prata (PINTO et al., 2010), tiosulfato de prata e aminoetoxivinilglicina (AVG) (REIS et al., 2003). Logo, mais estudos são necessários para otimizar o estabelecimento dos genótipos testando diferentes meios de cultura, reguladores de crescimento, sistemas de vedação dos recipientes de cultivo e métodos de controle de alta produção de etileno.

2.2 Efeito do genótipo e do tipo de tampa dos recipientes de cultivo e da presença de BAP na multiplicação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims

2.2.2 Estabelecimento dos explantes

Após avaliação dos resultados obtidos no experimento anterior (item 3.1), microestacas foram utilizadas para inoculação em meio de MS contendo 4,43 μM de BAP. O desenvolvimento das gemas preexistentes foi observado a partir de 15 dias na maioria dos genótipos, embora tenha sido o genótipo CPMGA2 que apresentou crescimento mais pronunciado (FIGURA 7-1). Aos 15 dias, os genótipos CPGA1, MR1 e CPMGA2 apresentaram folhas abertas com cerca de 1 cm (Figura 7-B1, C1, D1). Ao final dos 30 dias de estabelecimento, a maioria dos genótipos apresentaram múltiplas folhas com cerca de 1 cm, nas microestacas (FIGURA 7-3). No entanto, o amarelecimento dos explantes começou a ser observado neste período, sendo necessário o repique imediato dos propágulos para novo meio de cultura. O genótipo CPF1SSBR apresentou pouco crescimento em comparação aos outros genótipos (FIGURA 7-E1).

A utilização do BAP para o estabelecimento de espécies de *Passiflora* é comumente encontrada na literatura, podendo ser utilizado em combinação com outros reguladores de crescimento (VIEIRA et al., 2014) ou sozinho (NHUT et al., 2007; SOARES et al., 2012). Além disso, as concentrações utilizadas costumam ser aproximadas, independentemente do tipo de

explante, sendo a concentração de 4,43 μM a mais observada em diferentes espécies (NHUT et al., 2007; SEVERIN et al., 2011; SOARES et al., 2012; VIEIRA et al., 2014).

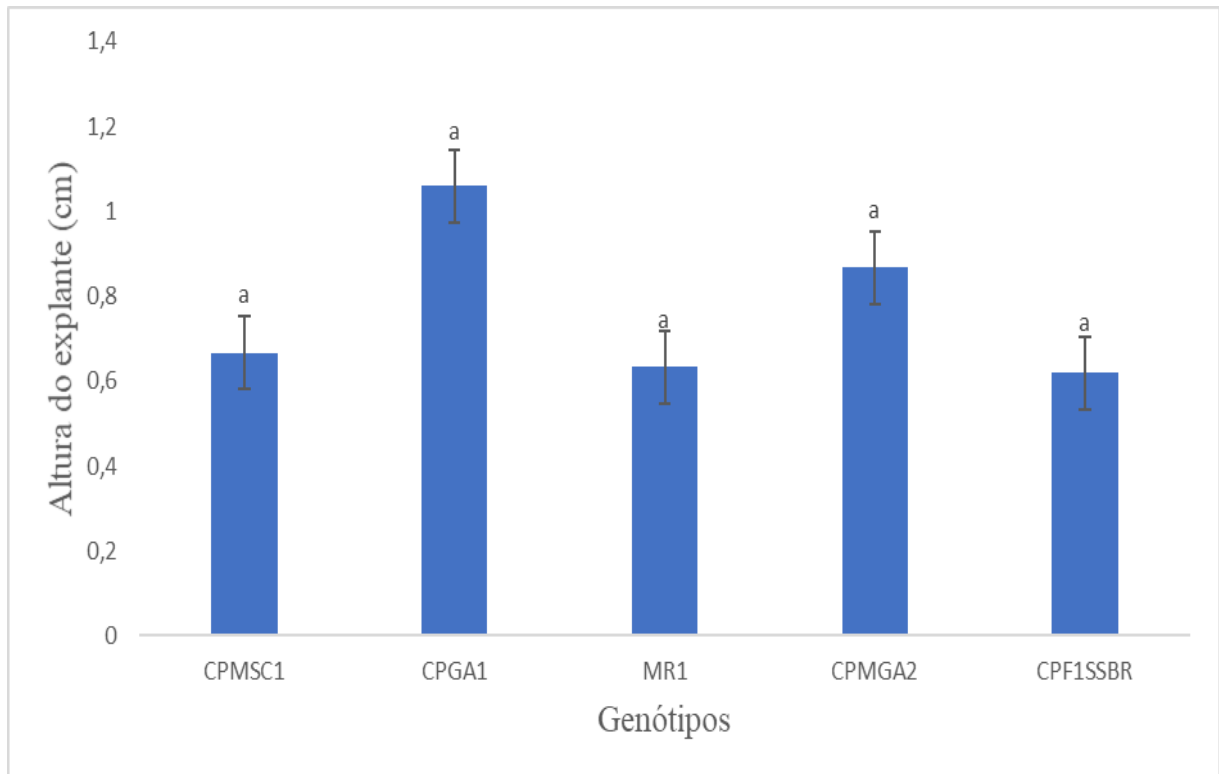
Figura 7 – Desenvolvimento *in vitro* de microestacas de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims, observado em um período de 30 dias após inoculação em meio de MS contendo BAP. Genótipos: (A) CPMSC1; (B) CPGA1; (C) MR1; (D) CPMGA2; (E) CPF1SSBR. Tempo: (1) 10 dias, (2) 15 dias, (3) 30 dias. Barras = 1 cm.



Fonte: O autor (2020)

O genótipo CPGA1 apresentou o maior valor médio (10 ± 1 mm) em relação à altura dos brotos (FIGURA 8). Porém, a análise dos dados não revelou diferença entre os genótipos em relação à altura dos brotos obtidos. Esse resultado é inferior aos obtidos em trabalhos anteriores. Santos et al (2010) testaram a eficiência de diferentes meios de cultura no estabelecimento e micropropagação de *P. setacea* e obtiveram explantes com 5,44 cm em meio MSM (MONTEIRO et al., 2000) sem reguladores. Em outro estudo, Faria e Segura (1997b) obtiveram explantes com cerca de 3 cm após inocular ápices caulinares de *P. edulis* em meio de MS em diferentes concentrações de BAP. A diferença nos resultados observada no presente estudo em relação à literatura pode ser explicada pela origem do material inoculado, uma vez que os experimentos supracitados utilizaram plantas germinadas *in vitro*. Além disso, o meio de cultura e a sua suplementação podem ter contribuído para estes resultados.

Figura 8 – Altura de microestacas de distintos genótipos de *Passiflora edulis* Sims observada após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de MS contendo 4,43 μ M de BAP. Médias \pm erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



A porcentagem de desenvolvimento obtida variou entre 90,4% e 71,4%, sendo a maior porcentagem observada nos genótipos CPMSC1 e CPF1SSBR e a menor no genótipo CPMGA2 (TABELA 1). Deve-se considerar que alguns genótipos apresentaram maiores valores em relação à altura, mas a quantidade de explantes que apresentaram algum desenvolvimento foi menor. A porcentagem de desenvolvimento obtida pelo genótipo CPMSC1 (TABELA 1) foi próxima à observada no estudo de Severin et al. (2011), que obtiveram a porcentagem de desenvolvimento de 94,74% após 45 dias de inoculação em microestacas de *P. caerulea* em meio de MS contendo 4,43 μ M de BAP. Já Soares et al. (2012) obtiveram uma porcentagem menor (45%) em relação ao presente trabalho, após inoculação de segmentos hipocotiledonares de *P. foetida* em mesmo meio e mesma concentração de BAP. Por outro lado, Vieira et al. (2014) obtiveram maior porcentagem de desenvolvimento de brotos de *P. setacea* após a inoculação de segmentos hipocotiledonares em meio de MS acrescido de 4,43 μ M de BAP, o que evidencia a variabilidade de respostas em função da espécie utilizada.

De modo geral, as porcentagens de oxidação/amarelecimento e contaminação (TABELA 1) não afetaram o estabelecimento dos genótipos. Para evitar a perda de explantes

por amarelecimento, o material foi imediatamente repicado para ovo meio após 30 dias de cultivo.

Tabela 1 – Desenvolvimento, oxidação e contaminação de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims após 30 dias em meio de MS contendo 4,43 μ M de BAP visando estabelecimento *in vitro*

Genótipos	Desenvolvimento (%)	oxidação/amarelecimento (%)	contaminação (%)
CPMSC1	90,4 a	9,5 a	14,2 a
CPGA1	85,7 ab	28,5 a	23,8 a
MR1	80,9 ab	0 a	28,5 a
CPMGA2	71,4 b	14,2 a	23,8 a
CPF1SSBR	90,4 a	9,5 a	38,0 a

Médias de porcentagens seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2.2.3 Multiplicação *in vitro* de gemas axilares

Após a excisão das gemas de microestacas e inoculação em mesmo meio, a proliferação de gemas foi observada na maioria dos genótipos, a partir do primeiro subcultivo, formando agregados de gemas que se proliferaram por todas as regiões do explante. Então, essas gemas foram separadas e inoculadas em tubos diferentes ao longo de 90 dias.

A análise dos resultados demonstrou diferenças estatísticas entre os genótipos na avaliação do número de gemas por explante. Quanto aos subcultivos considerando cada genótipo, verificou-se incremento da taxa de multiplicação, com exceção do genótipo CPF1SSBR (TABELA 2). Segundo Faria et al (2007) a variação de resposta entre genótipos trata-se de um dos principais fatores que afetam o estabelecimento de protocolos *in vitro* para espécies de *Passiflora*. Apesar do estabelecimento *in vitro* de *P. edulis* ser relativamente bem documentado, ajustes podem ser observados em diferentes trabalhos de propagação e estabelecimento *in vitro*, podendo dificultar a escolha da melhor forma de multiplicação.

Ao final do último subcultivo (90 dias) foram obtidas médias entre 1,4 e 6,3 gemas/explante, sendo os maiores valores observados nos genótipos CPGA1, MR1 e CPGMA2, sem diferenças estatísticas entre as médias. O genótipo CPF1SSBR apresentou a menor média (1,4 gemas/explante) (TABELA 2), mesmo valor encontrado por Soares et al (2012) após realizarem 6 subcultivos de *P. foetida* em meio de MS acrescido de 4,43 μ M de BAP. Faria e Segura (1997a) obtiveram valor médio de 3,7 gemas/explante na micropropagação de *P. edulis* em meio de MS contendo 5 μ M de BAP e 2 μ M de AIA (ácido indol-3-acético), resultado próximo ao obtido para o genótipo CPMSC1 neste experimento (TABELA 2).

Em diversos trabalhos a utilização de BAP é indispensável para a proliferação de gemas em diferentes espécies de *Passiflora*, apesar de haver diferenças na concentração. Segundo Vieira et al (2014), o tipo de explante e regulador de crescimento ideais para proliferação de brotos em *Passiflora* variam de acordo com a espécie, sendo segmentos hipocotiledonares e BAP, respectivamente, os mais indicados para proliferação de gemas em *P. setacea*. No entanto, essa variação é observada em diferentes estudos com a mesma espécie. Para estudos realizados com *P. edulis* as concentrações de BAP variam entre 4,43 μM (SOARES et al., 2012) e 10 μM (KAWATA et al., 1995).

Tabela 2 – Taxa de multiplicação (gemas/explante) de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims após três subcultivos mensais em meio de MS acrescido de 4,43 μM de BAP.

Subcultivos	Genótipos				
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2	CPF1SSBR
1	2,1 \pm 0,2 cA	2,6 \pm 0,2 bA	2,7 \pm 0,3 bA	2,8 \pm 0,2 bA	1,2 \pm 0,1 aA
2	3,5 \pm 0,3 bC	6,1 \pm 0,5 aB	8,2 \pm 0,5 aA	5,6 \pm 0,5 aB	1,0 \pm 0,07 aD
3	5,7 \pm 0,4 aA	6,7 \pm 0,4 aA	7,4 \pm 0,4 aA	6,7 \pm 0,4 aA	2,0 \pm 0,6 aB
Média	4,1 \pm 0,3 B	5,4 \pm 0,3 A	6,3 \pm 0,3 A	5,5 \pm 0,3 A	1,4 \pm 0,3 C
Tme	68	157	250	166	2,7

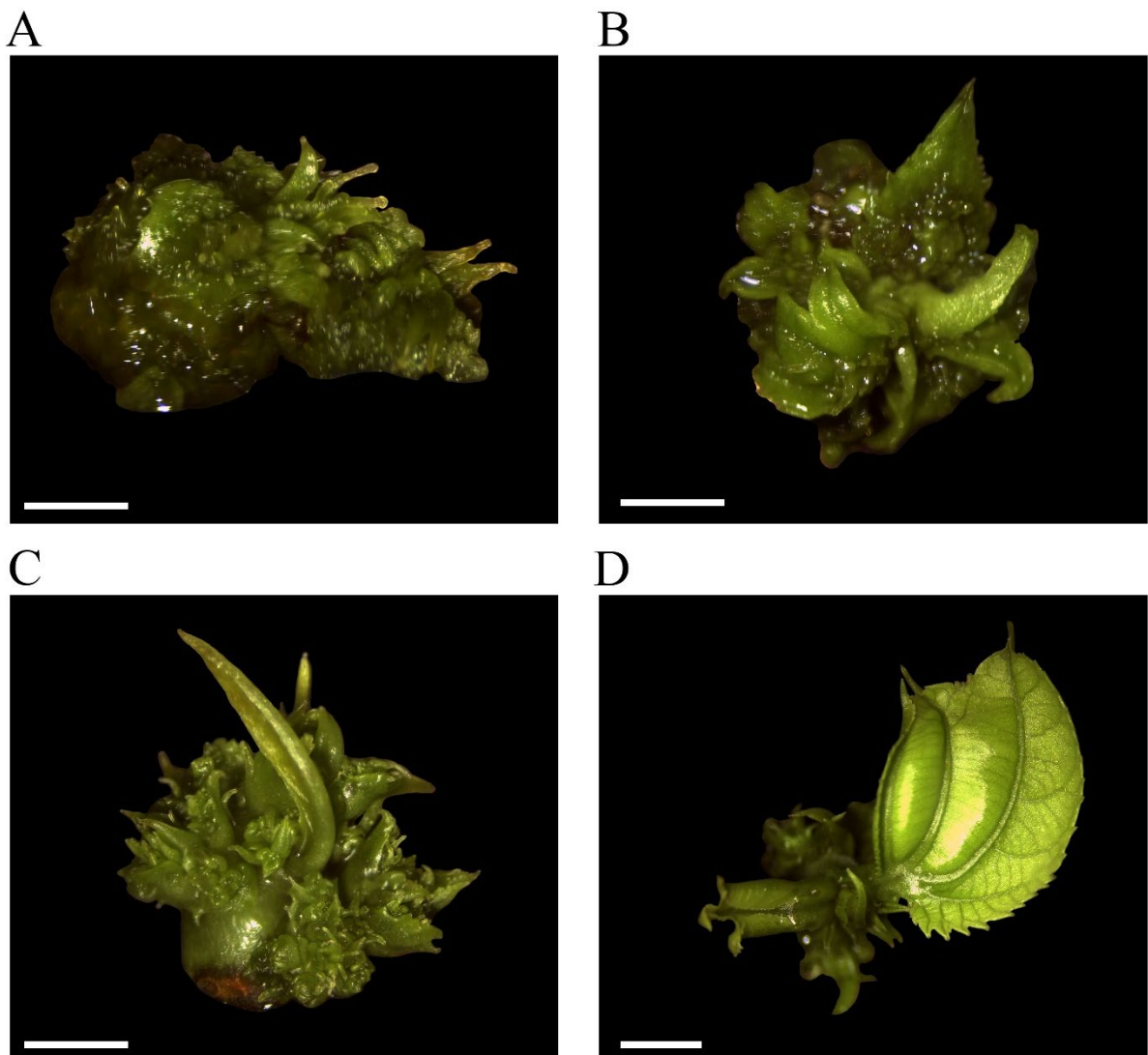
Médias \pm erro padrão seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade. Tme = Taxa de multiplicação estimada.

A maior taxa de multiplicação estimada foi observada no genótipo MR1, indicando que em três subcultivos pode-se obter 250 gemas. Considera-se a hipótese que cada uma dessas gemas tem potencial para dar origem a uma planta. No trabalho de Kawata et al. (1995) foram realizados subcultivos de gemas de *P. edulis* a cada três semanas em um período total de mais de 3 anos, indicando a possibilidade do uso da técnica para multiplicação em larga escala. Ainda nesse experimento, a concentração de 10 μM de BAP foi considerada a mais eficiente para multiplicação. Para a formação de brotos, as concentrações de 0,1 e 1 μM foram utilizadas, produzindo respostas morfológicas semelhantes as obtidas neste experimento (FIGURA 9-C).

No presente estudo os agregados de gemas obtidos após três subcultivos foram classificadas quanto ao nível de desenvolvimento do explante (FIGURA 9). Verificou-se que os genótipos CPGA1, MR1 e CPMGA2 apresentaram maior porcentagem de explantes mais desenvolvidos, ou seja, com pelo menos uma folha alongada e aberta – tipo 4 (TABELA 3), podendo facilitar a resposta desses genótipos a experimentos de alongamento em estudos

posteriores. Na avaliação referente à formação de calos observaram-se menos de 6% de formação de calo nos genótipos CPMSC1, MR1 e CPMGA2, 10% no genótipo CPGA1 e 60% no genótipo CPF1SSBR. A porcentagem de oxidação obtida no genótipo CPF1SSBR foi próxima ao observado por Soares et al. (2012), que obtiveram 50% de formação de calo. De modo geral, o experimento apresentou menos de 2% de contaminação.

Figura 9 – Diferentes padrões morfológicos de desenvolvimento de gemas/brotos observados na micropropagação de *Passiflora edulis* Sims. Barras = 2 mm.



Fonte: O autor (2020)

(A) Tipo 1 – diversos primórdios foliares; (B) Tipo 2 – diversas folhas formadas; (C) Tipo 3 – pelo menos uma folha alongada; (D) Tipo 4 – pelo menos uma folha alongada e aberta.

Observou-se que a presença de calo nos explantes interferiu na proliferação de gemas, havendo proliferação apenas quando não houve formação de calos. Vieira et al. (2014) observaram organogênese direta e indireta na proliferação de gemas de *P. setacea* nos explante

utilizados, concluindo que o tipo de explante e regulador de crescimento ideais para proliferação de brotos em *Passiflora* variam de acordo com a espécie. Segundo Faria et al. (2007), a organogênese direta (sem formação de calo) é a rota ideal para a micropropagação de material vegetal, evitando a ocorrência de variantes somaclonais. Logo, a baixa porcentagem de formação de calos observada nos genótipos, com exceção do genótipo CPF1SSBR, torna o material ideal para a multiplicação clonal.

Tabela 3 – Ocorrência de gemas observadas em diferentes genótipos de *Passiflora edulis* Sims ao final de três subcultivos visando à multiplicação *in vitro*.

Classificação dos tipos de explantes	Tipos de explantes formados em cada genótipo durante a multiplicação (%)				
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2	CPF1SSBR
0	18,7	14,1	8,3	11,2	0
1	47,3	39,0	62,4	48,3	60,1
2	18,7	32,0	22,3	26,7	20,4
3	12,0	3,1	1,3	9,3	20,4
4	5,1	12,0	7,2	6,1	0

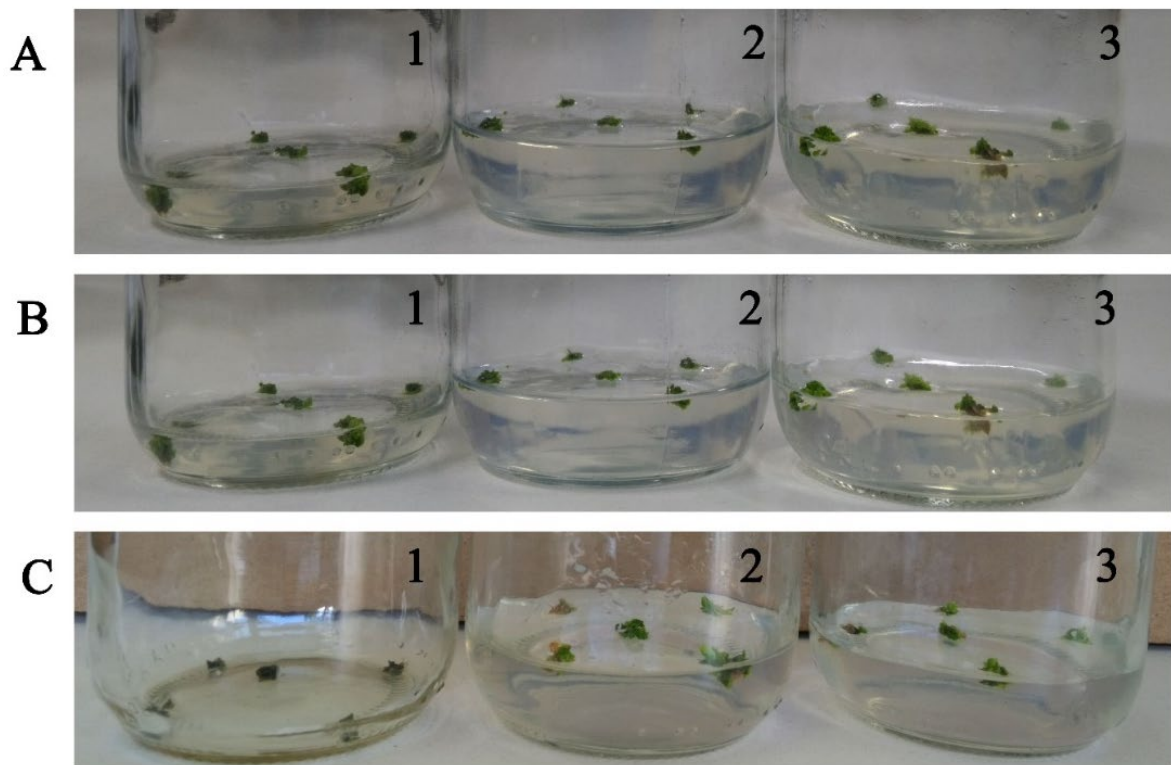
Classificação dos explantes: 0 – Com apenas uma gema; 1 – Diversos primórdios foliares; 2 – Diversas folhas formadas; 3 – Pelo menos uma folha alongada; 4 – Pelo menos uma folha alongada e aberta.

2.2.4 Influência do tipo de vedação do recipiente de cultivo no desenvolvimento de agregado de gemas

Visando mitigar perdas de material por oxidação/amarelecimento observada em experimentos anteriores, por meio de melhorias nas trocas gasosas no interior dos recipientes de cultivo, gemas propagadas *in vitro* dos genótipos CPGA1 e MR1 de *P.edulis* foram transferidas para frascos contendo meio de MS acrescido de 4,43 μ M de BAP e três tipos de tampas diferentes. Após 10 dias de inoculação do material foi observado a evaporação acelerada do meio de cultura nos frascos vedados com máscara de tripla camada (FIGURA 10-A1) em relação aos frascos vedados com outras tampas. Ainda nestes frascos vedados com máscara, após 15 dias foi possível observar leve aumento na evaporação do meio (FIGURA 10-B1), sendo que aos 20 dias o meio secou completamente (FIGURA 10-C1), o que ocasionou a morte dos explantes. Em decorrência da perda destes explantes antes da primeira análise, aos 75 dias, os dados referentes ao tratamento onde se utilizou máscaras de tripla camada para vedação dos frascos não foram avaliados.

Ao final do primeiro subcultivo, aos 75 dias, foi possível observar incremento no tamanho das gemas nos dois genótipos, com destaque para o genótipo MR1 (FIGURA 11-A). Ao final do segundo subcultivo, aos 60 dias, a diferença de tamanho das gemas entre os dois genótipos tornou-se mais pronunciada, podendo-se observar maior oxidação no genótipo CPGA1 (FIGURA 11-B).

Figura 10 – Agregado de gemas (AG) de *Passiflora edulis* Sims após diferentes tempos de cultivo em recipientes com diferentes sistemas de vedação (1 – Membrana confeccionada com máscara de tripla camada; 2 – tampa em polietileno; 3 – tampa em polietileno com membrana central (Bio Sama). Observar a evaporação do meio de cultivo dos recipientes vedados com tampas confeccionadas com máscaras de tripla camada (1). (A) Frascos após 10 dias de inoculação dos AG; (B) Frascos após 15 dias de inoculação dos AG; (C) Frascos após 20 dias de inoculação dos AG.

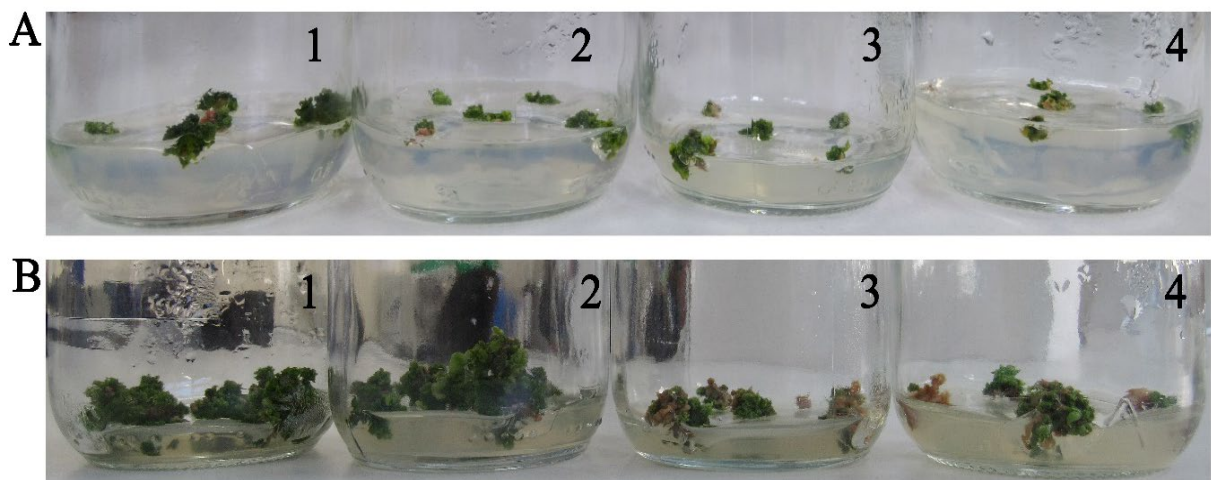


Fonte: O autor (2020)

Apesar de ser observado maiores resultados, em relação ao número de gemas por explante e altura quando se utilizou a tampa com membrana central, esta diferença não foi significativa em comparação aos frascos fechados com tampa comum (TABELA 4). Além disso, o incremento no número de gemas por explante não foi significativo ao longo dos dois subcultivos, sendo observada diminuição no genótipo CPGA1 causada principalmente pela perda do material por oxidação/amarelecimento (TABELA 4). Para esse genótipo, verificaram-se 20% de oxidação/amarelecimento quando se utilizou a tampa de polietileno e 11% quando se utilizou a tampa de polietileno contendo uma membrana central. Para o genótipo MR1 a

porcentagem de oxidação/amarelecimento foi menor que 5%, independentemente do tipo de tampa. Diferença significativa foi observada apenas entre genótipos, indicando que os maiores valores obtidos pelo genótipo MR1 estão relacionados à fatores intrínsecos ao mesmo, ou seja, sem relação com a tampa ou subcultivo.

Figura 11 – Gemas de *Passiflora edulis* Sims após dois subcultivos para multiplicação *in vitro* em um período total de 135 dias. (A) Gemas após 75 dias do primeiro subcultivo; (B) Gemas após 60 dias do segundo subcultivo. Tratamentos: 1 – Genótipo MR1/tampa de polietileno; 2 – Genótipo MR1/tampa de polietileno com membrana central (Bio Sama); 3 – Genótipos CPGA1/tampa de polietileno; 4 – Genótipo CPGA/tampa de polietileno com membrana central (Bio Sama).



Fonte: O autor (2020)

A utilização de diferentes tipos de vedação que facilitem as trocas gasosas pode ser observada na literatura para o estabelecimento *in vitro* de diversas espécies. Rodrigues et al. (2012) observaram a diminuição do aparecimento de clorose em explantes de nem (*Azadirachta indica*) ao utilizarem tampas de polietileno contendo membrana hidrofóbica. O referido estudo atribuiu o resultado ao aumento das trocas gasosas e, conseqüentemente, diminuindo o acúmulo do gás etileno nos frascos. O trabalho de Saldanha et al. (2012) complementa estes resultados, ao observar que o uso de membranas permeáveis, em comparação com a vedação completa de frascos, conduziu a um maior crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*. Além disso, o uso de diferentes tipos de vedação em tubos também pôde ser observado. Miranda, Titon e Pereira, (2016) observaram melhor desenvolvimento *in vitro* de explantes de candeia (*Eremanthus incanus*), após a utilização de fita microporosa na vedação dos tubos de ensaio.

Os resultados observados na literatura diferem dos obtidos no presente trabalho. Trevisan e Mendes (2005) obtiveram melhores resultados em um experimento de alongamento

após inocular brotos de *P. edulis* em frascos ventilados do tipo magenta. Por ser tratar de uma espécie produz grandes quantidades de etileno *in vitro* (REIS et al., 2003; PINTO et al., 2010), é possível observar a utilização de recipientes com tampas ventiladas em diversos estudos (TREVISAN; MENDES, 2005; TREVISAN et al., 2006; MONTEIRO-HARA et al., 2011) e ainda em combinação com nitrato de prata (PINTO et al., 2010). Enfatiza-se que a média do número de gemas por explante observada no presente estudo foi superior ao relatado em outros trabalhos semelhantes, onde as médias variaram entre 1,4 e 3,7 gemas/explante (FARIA; SEGURA, 1997b; SOARES et al., 2012).

Tabela 4 – Médias do número de gema/explante e tamanho obtidas após dois subcultivos de gemas de *Passiflora edulis* Sims em meio de MS contendo 4,43 µM de BAP.

Genótipo	Subcultivo	Tipo de Tampa		
		Polietileno	Com membrana central	Membrana de máscara tripla
Número de gemas/ explante				
1	1	5,7±0,3aA	6,2±0,4aA	N/A
	2	6,3±0,3aA	6,0±0,4aA	N/A
2	1	7,1±0,6aA	7,4±0,5aA	N/A
	2	7,6±0,3aA	8,5±0,4aA	N/A
Média 1		6,1±0,3bA	6,1±0,3bA	N/A
Média 2		7,4±0,2aA	8.1±0,3aA	N/A
Altura (cm)				
1	1	0,6±0,1aA	0,7±0,1aA	N/A
	2	0,6±0,1aA	0,6±0,1aA	N/A
2	1	0,7±0,1bA	0,8±0,1bA	N/A
	2	1,1±0,1aA	1,2±0,1aA	N/A
Média 1		0,6±0,1bA	0,6±0,1bA	N/A
Média 2		1,0±0,1aA	1,1±0,1aA	N/A

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Genótipos: (1) CPGA1, (2) MR1. N/A = dados não avaliados.

Dias et al. (2010) demonstraram a ação do etileno na morfogênese *in vitro* de *P. cincinnata* por meio da inoculação de segmentos hipocotiledonares em MS meia força acrescido de diferentes concentrações e combinações dos inibidores de etileno Aminoetoxivinilglicina (AVG), Tiosulfato de Prata (STS) e Perclorato de Mercúrio (MP). Além disso, utilizaram o ácido aminociclopropano-1-carboxílico sintetase (ACC), precursor de etileno, para aumentar a produção deste gás em um tratamento à parte. Como resultado, a

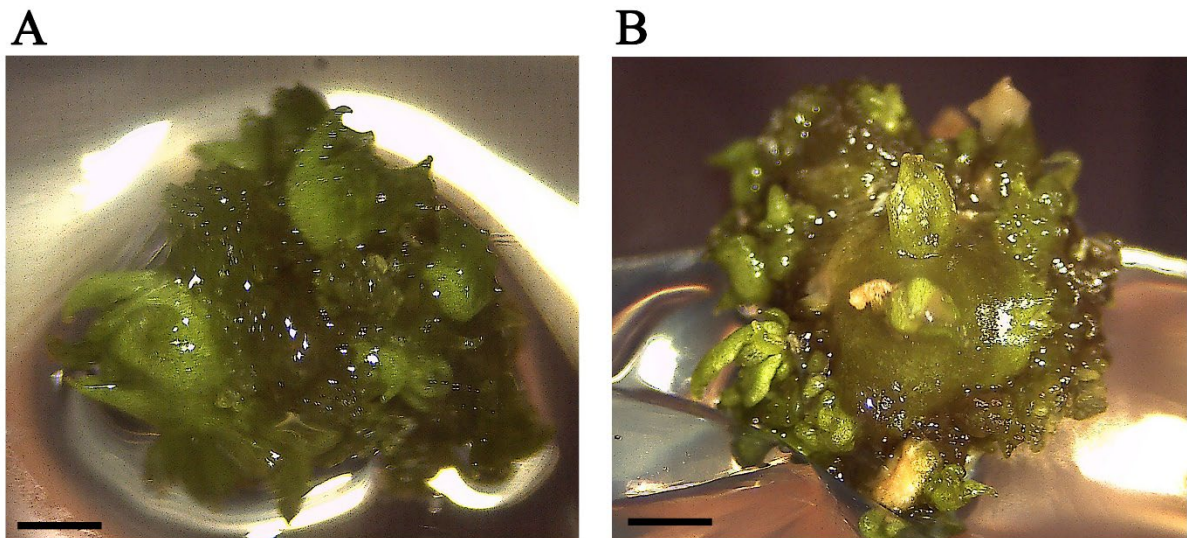
utilização dos inibidores de etileno separadamente ou em conjunto com ACC promoveu maior porcentagem de regeneração, enquanto a adição de ACC, separadamente, promoveu a redução da porcentagem de regeneração e número de brotos por explante.

Reis et al. (2003) testaram os mesmos inibidores e o mesmo precursor da produção de etileno supramencionados e obtiveram maior número de gemas por explante e folhas maiores de *P. edulis* em meio de MS acrescido destes inibidores. Com isso, pode-se considerar que a alta produção de etileno se trata de um limitador do estabelecimento e propagação *in vitro* de espécies de *Passiflora*.

2.2.5 Alongamento de agregados de gemas

Após 30 dias de transferência das gemas para o meio de alongamento, nenhuma resposta foi observada nos explantes em nenhuma concentração de BAP ou genótipo, apresentando as mesmas características do tempo zero (FIGURA 12). Além disso, não ocorreu oxidação dos explantes no período avaliado.

Figura 12 – Gemas de *Passiflora edulis* Sims inoculadas em meio contendo sais de MS e diferentes concentrações de BAP. (A) Gema inoculada no tempo zero; (B) Gema após 30 dias de inoculação em meio de alongamento. Barras = 1 mm.



Fonte: O autor (2020).

Os resultados observados no presente estudo diferem de trabalhos semelhantes encontrados na literatura. Kawata et al. (1995) utilizaram as concentrações de 0,1 e 1 μM de BAP no alongamento de gemas de *P. edulis* provenientes de multiplicação *in vitro* em concentrações maiores do mesmo regulador, obtendo 100% de formação de brotos alongados.

A utilização de citocininas, principalmente o BAP, em experimentos de alongamento *in vitro* de explantes de *Passiflora* é comumente observada. Prammanee et al. (2011) utilizaram BAP em diferentes concentrações para alongamento de explantes regenerados de cultura de meristema apical de *P. edulis*, obtendo brotos alongados na concentração de 4,43 μM que foram enraizados e aclimatizados com sucesso. A utilização de BAP em combinação com ANA nas concentrações de 6,6 e 2,6 μM , respectivamente, foi utilizada por Anand et al. (2012) e propiciou o melhor alongamento de microestacas de *P. foetida*.

Além do BAP, a utilização de giberelinas no alongamento de brotos de *Passiflora* pode ser observada. Vieira et al. (2014) obtiveram até 80% de alongamento de brotos de *P. setacea* em meio MS contendo 2,88 μM de Ácido giberélico (AG_3). Porém observou-se que os melhores resultados foram obtidos quando os explantes foram previamente inoculados em meio contendo BAP e TDZ (Tidiazuron), indicando que a presença prévia do TDZ no meio de cultura influenciou positivamente o alongamento. O trabalho de Trevisan e Mendes (2005) corrobora com esta hipótese, ao utilizar TDZ em fase anterior ao alongamento e obtendo brotos alongados de *P. edulis* em meio de cultura acrescido de 4,9 μM de AG_3 , apesar do tratamento que utilizou água de coco ter promovido os melhores resultados. A utilização de água de coco para alongamento de brotos pode ser observada no trabalho de Pacheco et al. (2012), obtendo brotos de *P. alata* com até 6 cm após inoculação em meio MSM (MONTEIRO et al., 2000) contendo 10% de água de coco.

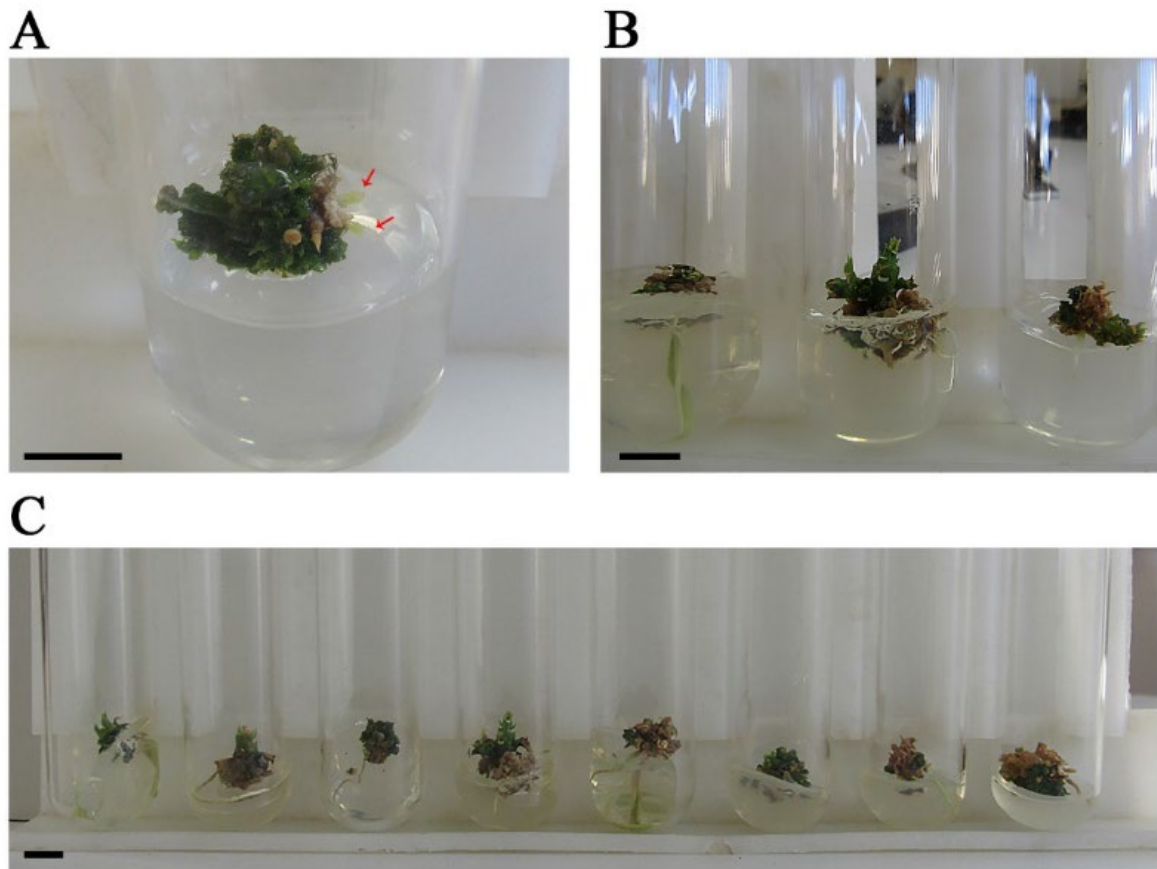
Devido à ausência de alongamento observada no presente trabalho, mais estudos são necessários para estabelecer um protocolo de alongamento dos genótipos testados, considerando um período maior de realização do experimento, necessidade de suplementação com outros reguladores como AG_3 e ANA, ou ainda, a utilização de meio de cultura complexo contendo água de coco.

2.2.5 Enraizamento de agregados de gemas

Após a transferência de gemas provenientes da multiplicação *in vitro* para o meio de enraizamento, a emissão de raízes foi observada primeiramente aos 21 dias (FIGURA 13-A). Após 30 dias, raízes maiores que 2 cm foram observadas em diferentes repetições dos genótipos (FIGURA 13-B). Ao final do experimento, aos 45 dias, diversas repetições emitiram raízes maiores que 2 cm (FIGURA 13-C), embora a emissão só tenha ocorrido na presença de estruturas calogênicas. Kawata et al. (1995) observaram formações calogênicas semelhantes ao enraizar brotos de *P. edulis* em meio de MS contendo diferentes concentrações de AIB, ANA

e 2,4-D, o que impactou negativamente na sobrevivência dos explantes no processo de aclimatização.

Figura 13 – Fases de enraizamento observadas em gemas de *Passiflora edulis* Sims inoculadas em meio de MS acrescido de AIB em um período de 45 dias. (A) Primeiro explante a emitir raiz (setas) aos 21 dias; (B) Explantes emitindo raízes maiores aos 30 dias; (C) Raízes observadas em diversas repetições aos 45 dias. Barras = 1cm.



Fonte: O autor (2020).

Ao final do experimento, a maior porcentagem de enraizamento foi observada no genótipo CPGA1 na concentração de 1,2 μM de AIB, contabilizando 20% (TABELA 5), mesma observada por Isutsa (2004) ao enraizar brotos de *P. edulis* de 2 cm em meio de MS contendo 9,8 μM de AIB. Apesar disso, a concentração de 2,4 μM de AIB promoveu enraizamento (10%) em um maior número de genótipos CPMSC1, CPGA1 e MR1 (TABELA 5). As porcentagens obtidas no presente estudo foram inferiores ao que pode ser observado em outros trabalhos. Isutsa (2004) obteve 100% de enraizamento *in vitro* em brotos de *P. edulis* na presença de 24,5 μM de AIB. Em outro estudo de Shekhawat, Manokari e Ravindran (2015), o valor de 98% de enraizamento foi obtida em meio de MS meia força suplementado com 9,8 μM de AIB.

Quanto ao número de raízes, a concentração de 2,4 μM de AIB proporcionou os melhores resultados, variando entre 0,1 e 0,6 raízes/explante, resultados próximos aos obtidos por Goyal et al. (2015) ao utilizarem 4,9 a 9,8 μM de AIB. Em comparação, Isutsa (2004) obteve em seu melhor tratamento (24,5 μM de AIB) a média de 3 raízes por explante. O comprimento das raízes foi maior no genótipo CPGA1 na concentração de 2,4 μM de AIB, porém a concentração de 1,2 μM de AIB proporcionou em média o maior valor, totalizando 0,09 cm. De modo geral, A porcentagem de oxidação foi menor que 5% independente do genótipo ou concentração de AIB. Após os experimentos de rizogênese, para pré-aclimatização, os explantes que emitiram alguma raiz foram transferidos para copos plásticos contendo substrato Bioplant e areia na proporção 3:1 (v/v) e mantidos em câmara de crescimento tipo BOD (FIGURA 14).

Tabela 5 – Enraizamento, número de raízes por explante e comprimento de raiz observados em agregados de gemas de *Passiflora edulis* Sims após 45 dias de inoculação em meio de MS acrescido de AIB.

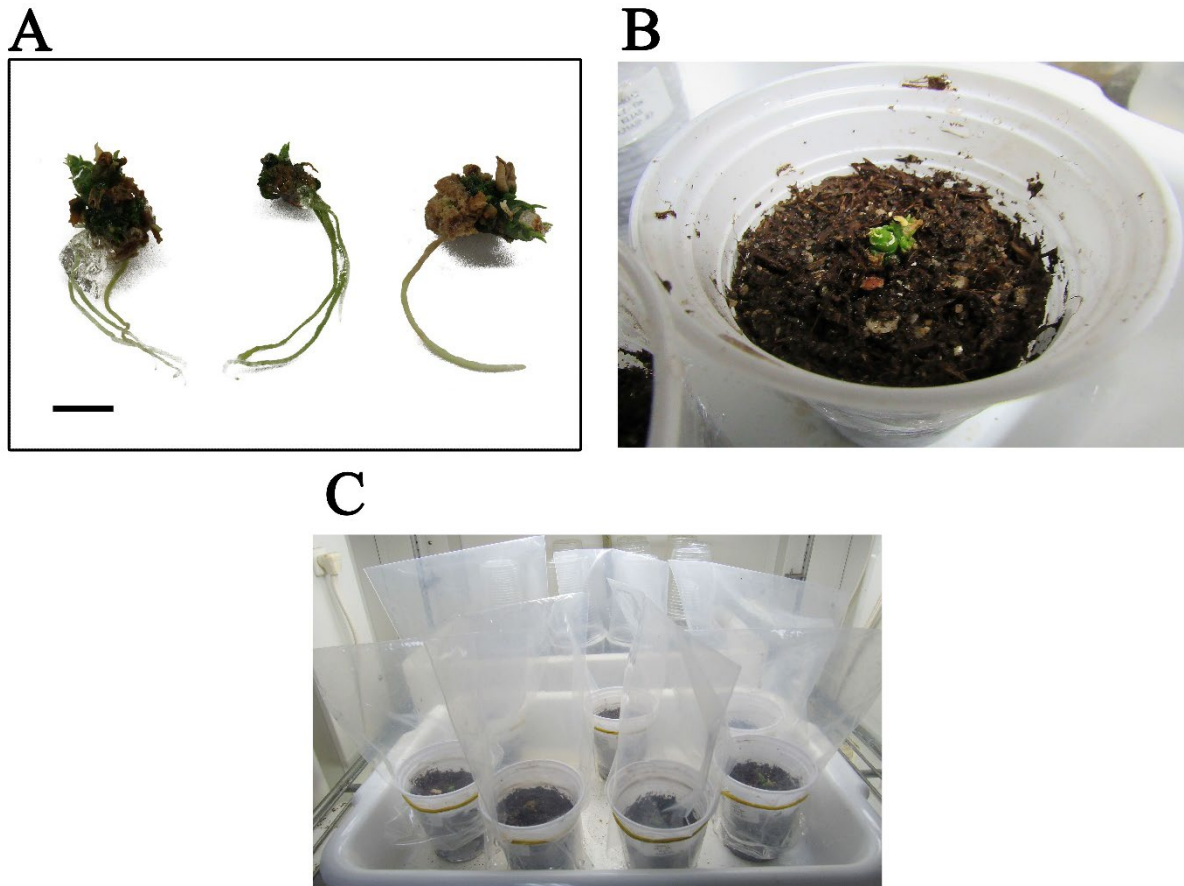
Concentração de AIB (μM)	Genótipos			
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2
Enraizamento (%)				
0	0	0	0	0
1,2	0	20,2	0	10,0
2,4	10,0	10,0	10,0	0
4,9	0	10,0	10,0	0
No. de raízes/ explante				
0	0	0	0	0
1,2	0	0,3 \pm 0,2	0	0,1 \pm 0,1
2,4	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,4	0,6 \pm 0,6	0
4,9	0	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0
Comprimento de raiz (cm)				
0	0	0	0	0
1,2	0	0,08 \pm 0,07	0	0,1 \pm 0,1
2,4	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,05 \pm 0,05	0
4,9	0	0,02 \pm 0,02	0,06 \pm 0,06	0

Os valores não diferem entre si de acordo com o teste-F a 5% de probabilidade.

Apesar dos resultados mencionados, a análise dos dados não identificou diferenças estatísticas entre genótipos ou entre as concentrações de AIB. A baixa porcentagem de

enraizamento observada no presente trabalho pode indicar a necessidade de estudos futuros considerando a utilização de concentrações maiores de AIB, em combinação com ANA ou outras auxinas. Além disso, o enraizamento *ex vitro* pode ser uma alternativa mais eficiente como observado por Isutsa (2004) e Shekhawat, Manokari e Ravindran (2015), que obtiveram resultados superiores no enraizamento *ex vitro* em comparação ao *in vitro*. Porém, deve-se considerar que estes trabalhos utilizaram brotos com no mínimo 2 cm.

Figura 14 – Pré-aclimatização de agregados gemas enraizadas de *Passiflora edulis* Sims em copos plásticos contendo substrato Bioplant e areia 3:1 (v/v). **(A)** Gemas emitindo raízes com cerca de 3 cm; **(B)** Gema enraizada transferida para substrato + areia; **(C)** Gemas em copos cobertos com saco plástico para pré-aclimatização em BOD. Barra = 1 cm.



Fonte: O autor (2020).

CAPÍTULO III

LIMPEZA CLONAL DE PLANTAS MATRIZES DE MARACUJAZEIRO

UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS

(Passiflora edulis Sims)

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Coleta do material vegetal

Para testar a eficiência da cultura de ápices caulinares na limpeza clonal de maracujazeiros, infectados pelo vírus CABMV, mantidos em casa de vegetação (FIGURA 1) no Centro de Inovação em Genética Vegetal da Embrapa Cerrados, situada em Riacho Fundo II, Brasília – DF, ramos de aproximadamente 15 cm foram coletados de cinco genótipos de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims): CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Figura 1 – Local da coleta do material de *Passiflora edulis* Sims apresentando sintomas indicativos de virose (doença do endurecimento dos frutos) no Centro de Inovação em Genética Vegetal da Embrapa Cerrados.



Fonte: O autor (2020).

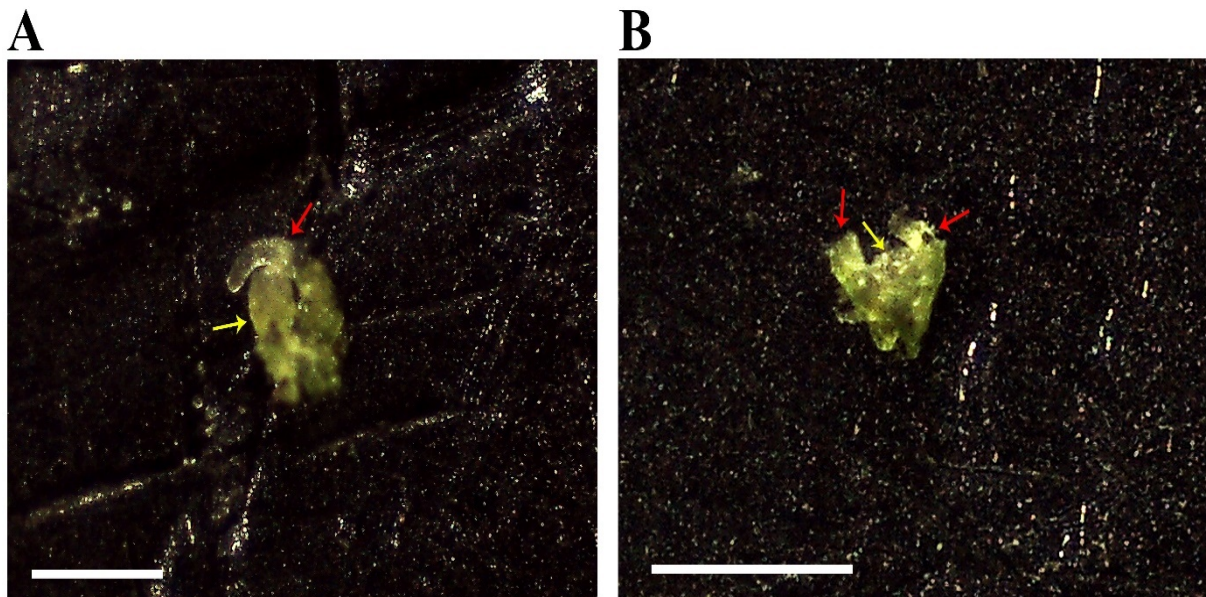
1.3 Excisão e estabelecimento dos ápices caulinares

Em laboratório, os brotos coletados foram reduzidos a aproximadamente 3 cm e tiveram as camadas mais externas de folhas retiradas, a fim de facilitar o manuseio na câmara de fluxo

laminar e evitar a contaminação dos explantes *in vitro*. Posteriormente, os brotos foram imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (1% de cloro ativo) e 3 gotas de Tween-20 por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

Com o auxílio de pinças e bisturis, o meristema apical com até duas folhas primordiais (0,1 – 0,3 mm) foi seccionado transversalmente (FIGURA 2). Os explantes foram inoculados em meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com adição de 300 mg/l de carvão ativado e suplementado com 0,05 μM de ANA, 0,44 μM de BAP e 0,28 μM de AG₃. Para a solidificação do meio de cultura foi adicionado 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA), conforme protocolo estabelecido por Fortes e Scherwinski-pereira *et al.* (2003a), com modificações.

Figura 2 – Ápices caulinares excisados de matrizes maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) com a finalidade de limpeza viral. (A) Explante (0,2 mm) contendo apenas uma folha primordia (Seta vermelha) e o meristema apical caulinar (Seta amarela); (B) Explante (0,1 mm) contendo duas folhas primordiais (Setas vermelhas) e o meristema apical caulinar (Seta amarela). Barras = 0,25 mm.



Fonte: O autor (2020).

Posteriormente à inoculação, os explantes foram mantidos na ausência de luz à 25±2 °C por 7 dias. Após esse período, os explantes foram mantidos sob mesma temperatura, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (genótipos) com 22 repetições cada, sendo um explante estabelecido por tubo de ensaio. Ao final de 30 dias, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de regeneração (explantes

esverdeados e intumescidos), número de folhas primordiais, oxidação (explantes com escurecimento total) e contaminação. Os dados utilizados para estimar a porcentagem de regeneração e oxidação foram transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$ e o número de folhas primordiais foi transformado por $\sqrt{x}+0,5$. Posteriormente, os dados transformados foram submetidos à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Sisvar.

1.4 Indução de proliferação de gemas

Com o objetivo de aumentar o número de gemas por explante, os ápices caulinares provenientes da fase de estabelecimento (2.3), com cerca de 1 mm que apresentaram regeneração, foram transferidos para meio de cultura contendo sais de MS, suplementado com 4,43 μM de BAP. Para a solidificação do meio de cultura foram adicionado 2,3 g.L^{-1} de *Phytigel*® (SIGMA).

Posteriormente, os explantes foram mantidos à 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo com irradiação de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (genótipos) com o seguinte número de repetições: CPMSC1= 5; CPGA1= 9; MR1= 9; CPMGA2= 15; CPF1SSBR= 9, sendo um explante por tubo. A quantidade de repetições foi afetada pelo desempenho de cada genótipo na fase de estabelecimento. Foram realizados repiques a cada 60 dias. Ao final de 180 dias, os explantes foram avaliados quanto ao número de gemas por explante, tamanho (diâmetro), oxidação (%) e contaminação (%). O diâmetro dos explantes foi medido com auxílio de estereoscópio binocular. Os dados obtidos foram transformados das seguintes maneiras: número de gemas por explante por \sqrt{x} , tamanho por $\text{Log}_{10}(x)$ e oxidação por arco seno $\sqrt{x}/100$. Posteriormente, os dados transformados foram submetidos à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Sisvar.

1.5 Multiplicação de gemas em meio de MS contendo BAP

Com o intuito de aumentar a quantidade de material disponível para indexação, os explantes provenientes da indução (item 2.4) que apresentaram pelo menos duas gemas visíveis, foram separados com auxílio de lupa, bisturi e pinça, visando à multiplicação do material. Os

agregados de gemas separados foram transferidos para meio de cultura contendo sais de MS, suplementado com 4,43 μM de BAP. Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,3 g.L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA).

Os explantes foram mantidos à 25±2 °C e 16 horas de fotoperíodo com irradiação de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). Os explantes foram inoculados em frascos, contendo 30 mL de meio de cultura. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 15 tratamentos (5 genótipos e 3 subcultivos) com o seguinte número de repetições: CPMSC1= 1; CPGA1= 1; MR1= 6; CPMGA2= 7; CPF1SSBR= 2, sendo 1 a 3 explantes por frasco. As quantidades de repetições e de unidades experimentais foram afetadas pelo desempenho de cada genótipo na fase de indução de gemas.

Ao todo foram realizados dois subcultivos, um a cada 30 dias, além de uma avaliação ao final de cada subcultivo. Os explantes foram avaliados quanto ao número de agregado de gemas por frasco (explante contendo várias gemas), oxidação (explante totalmente amarelado ou esbranquiçado) e contaminação. Os dados referentes ao número de agregado de gemas foram transformados por \sqrt{x} e submetidos à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Sisvar.

1.6 Indexação do material proveniente da limpeza clonal

1.6.1 Detecção do CABMV por RT-PCR

Para a verificar a eficiência da limpeza clonal, foi realizada a detecção do CABMV nas gemas multiplicadas anteriormente, provenientes da cultura de ápices caulinares. Além disso, gemas provenientes da microestaquia para multiplicação também foram coletadas para comparação. Logo, a extração do material genético foi realizada com cerca de 2 a 3 gemas (200 mg) de cada genótipo que foram maceradas em nitrogênio líquido e os demais procedimentos de extração de RNA e síntese de cDNA foram realizados como descrito no Capítulo I deste trabalho.

Utilizando o cDNA sintetizado, a combinação de primers CABMV_CP_9250F (5'-GTGAGACGATAACTGTGGCGA-3') e CABMV_CP_10115R (5'-CAGAAGATGTTGTGCTCCA-3') foi utilizada para amplificação do gene CP (Capa Proteica) de CABMV. O protocolo de amplificação por PCR foi realizado com um aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturação (94° C/ 45s), anelamento

(55 °C/ 30 s) e extensão (72 °C/ 1 min), seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Por fim, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em 1,0% de gel de agarose e visualizados em luz ultravioleta.

1.6.2 Hibridização por *Southern blot*

Para confirmação do resultado obtido anteriormente, os produtos da PCR realizada utilizando primers de CABMV foram hibridizados por *Southern blot*, utilizando a mesma sonda radioativa descrita no Capítulo I. Para tal, após a realização da eletroforese, o gel foi utilizado para transferir as amostras para uma membrana de nylon. Tais procedimentos de fixação do DNA à membrana, pré-hibridização e hibridização foram realizados conforme protocolo descrito por Southern (2006), para amostras preparadas na ausência de brometo de etídio.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Excisão e estabelecimento dos ápices caulinares

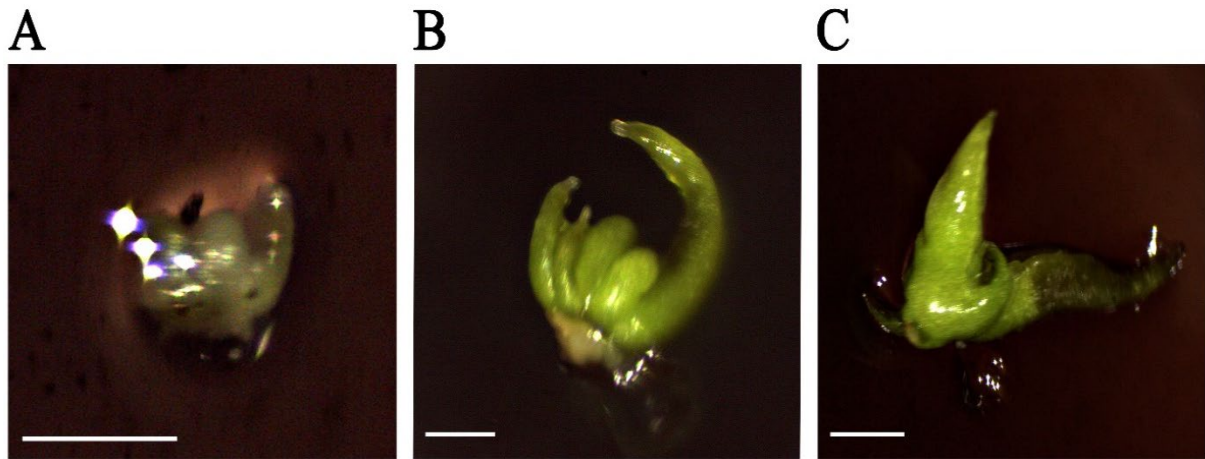
Após o estabelecimento dos ápices caulinares em meio de estabelecimento, o intumescimento dos explantes foi observado a partir de aproximadamente 5 dias de cultivo, para todos os genótipos (FIGURA 3-A), evento sucedido pelo esverdeamento dos explantes e aparecimento de novas folhas primordiais, aos 10 dias (FIGURA 3-B). Após este período, os explantes aumentaram gradativamente de tamanho até a última avaliação, realizada aos 30 dias (FIGURA 3-C). Porém, o número de explantes esverdeados foi decrescendo ao longo do tempo. Logo, a porcentagem de oxidação engloba tanto os explantes que não se tornaram esverdeados, quanto os que se tornaram esverdeados e perderam a cor nos dias subsequentes.

Ao final dos 30 dias de estabelecimento, a porcentagem de regeneração dos genótipos variou entre 22,7% a 68,1%, sendo o maior valor atribuído ao genótipo CPMGA2, apesar de diferir estatisticamente apenas do genótipo CPMS1 (TABELA 1). Biricolti e Chiari (1994) obtiveram 95,6% de regeneração de ápices caulinares de *P. edulis* após 70 dias em meio DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) suplementado com diferentes concentrações de BAP, AIB e AG₃.

A diferença considerável na porcentagem de regeneração obtida neste estudo em relação à literatura pode estar relacionada a diferença nos meios de cultura e fitormônios utilizados. Segundo Pereira e Fortes (2004a), o tamanho do explante utilizado pode dificultar a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro*. O trabalho de Tiwari et al. (2011) realizado com

Cana-de-açúcar (*Saccharum officinar*), corrobora com esta hipótese, mostrando que explantes com maior tamanho obtiveram maior porcentagem de sobrevivência .

Figura 3 – Fases da regeneração de ápices caulinares do genótipo CPGA1 de *Passiflora edulis* Sims cultivados em meio de MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento. (A) Explante intumescido após 5 dias de cultivo; (B) Explante esverdeado e apresentando novas folhas primordiais após 15 dias de cultivo; (C) Explante com folhas primordiais mais alongadas após 30 dias de cultivo. Barras = (A-B) 0,5 mm; (C) 1mm.



Fonte: O autor (2020).

Apesar disso, estudos realizados com cultura de meristemas e ápices caulinares em outras espécies apresentam porcentagens de regeneração variadas. Rethesh e Bhat (2010) obtiveram 23,2% de regeneração ao realizar a cultura de ápices caulinares de *Vanilla planifolia*. Outros trabalhos com cultura de meristemas/ápices caulinares obtiveram cerca de 60% (TIWARI et al., 2011) a 80% de regeneração, sendo esse segundo associado a presença de antioxidantes no meio de cultura (QUIROZ et al., 2017).

Tabela 1 – Regeneração, oxidação e média do número de folhas primordiais por ápice caulinar de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims após 30 dias em meio contendo ANA, BAP e AG₃

Genótipos	Regeneração (%)	Oxidação (%)	Número de FP/E ⁽¹⁾
CPMSC1	22,7 b	74,2 a	2.1±0.1 a
CPGA1	40,9 ab	59,0 ab	2.3±0.1 a
MR1	40,9 ab	59,0 ab	2.1±0.1 a
CPMGA2	68,1 a	31,8 b	2.0±0.0 a
CPF1SSBR	40,9 ab	59,0 ab	2.0±0.0 a

⁽¹⁾Médias dos números de folhas primordiais por explante. Médias ± erro padrão e porcentagens seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A análise de variância não detectou diferença significativa entre os genótipos quanto as médias do número de folhas primordiais por explante. O número de folhas primordiais se manteve sem alterações significativas em relação ao momento da inoculação dos meristemas (TABELA 1). Essa constatação pode ter relação com o tempo curto em que o material permaneceu *in vitro*. Segundo Fortes e Scherwinski-Pereira (2003a), a demora na diferenciação do tecido meristemático se trata de um dos principais inconvenientes desta técnica. Esta demora foi constatada no trabalho de Biricolti e Chiari (1994) que observaram maior desenvolvimento do meristema após 70 dias em meio contendo BAP.

A porcentagem de oxidação variou entre 31,8% a 74,2%, sendo o maior valor atribuído ao genótipo CPMSC1 (TABELA 1). Observa-se que o aumento na oxidação foi o principal fator limitante para a regeneração dos ápices caulinares, tendo em vista os valores inversamente proporcionais das variáveis. Além do tamanho do explante (TIWARI et al., 2011), a oxidação também pode estar relacionada à presença de determinados fitormônios no meio de cultura. Quiroz et al. (2017) observaram aumento do nível de oxidação no cultivo *in vitro* de meristemas de *Fragaria chiloensis* cultivados em meio de cultura suplementado com AG₃. Em contraste com os resultados obtidos com BAP, onde foi observada a diminuição do nível de oxidação.

De modo geral, a contaminação foi nula na maioria dos genótipos, com exceção do genótipo CPMSC1 que apresentou 4% de contaminação, resultado similar ao obtido por Biricolti e Chiari (1994) de 5% de contaminação. Além de fatores associados à manipulação do explante, a contaminação pode ter origem endógena como foi constatado por Scherwinski-Pereira, Mattos e Fortes (2003b) em explantes de batata micropropagadas.

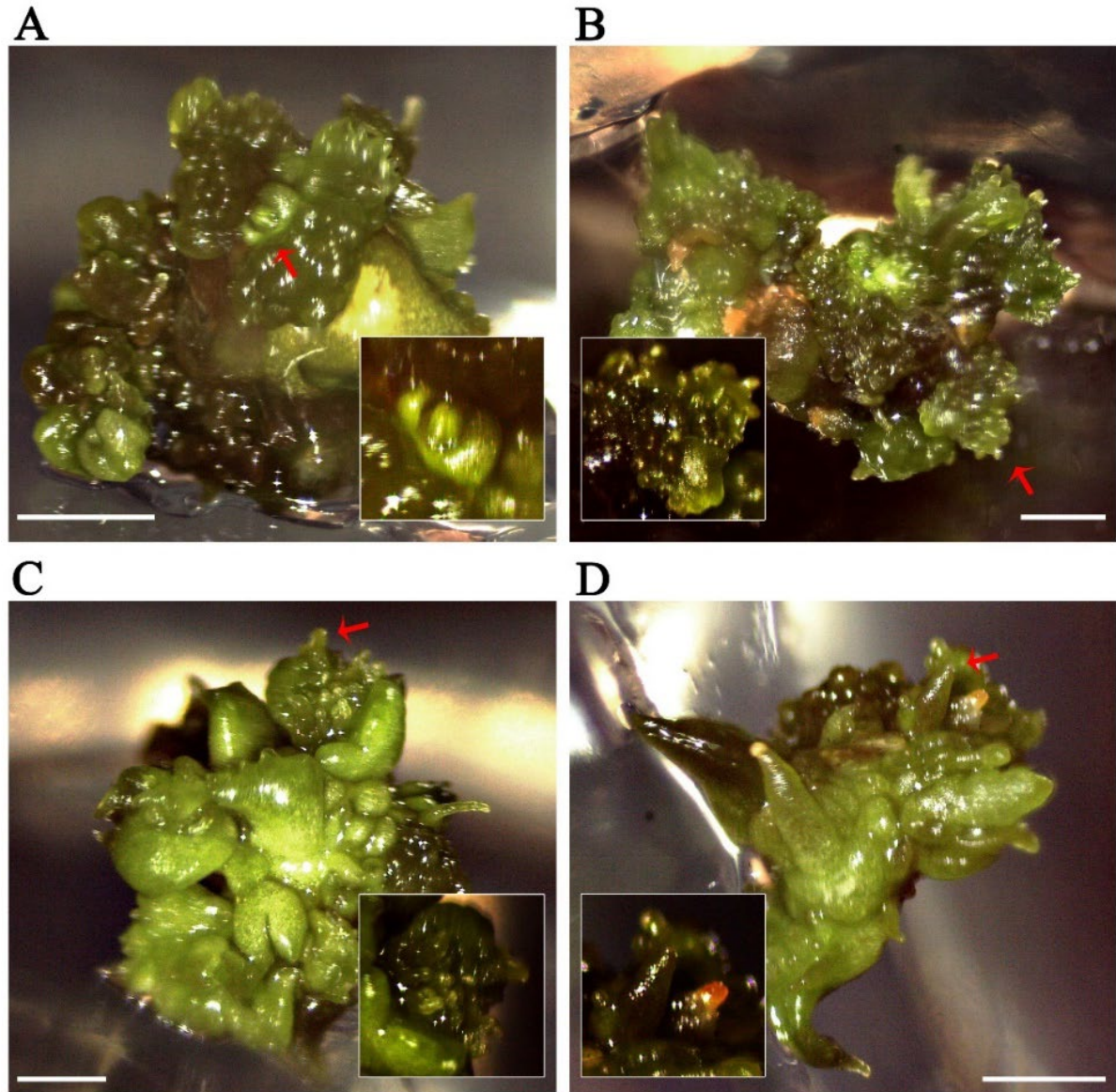
2.2 Indução de proliferação de gemas

Após a transferência dos ápices caulinares regenerados para meio de MS contendo 4,43 μM de BAP, o surgimento de novas gemas só foi observado nos genótipos CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR após 180 dias de cultivo (FIGURA 4). Não foram observadas novas gemas adventícias no genótipo CPMSC1. Ao final de 180 dias, o genótipo MR1 apresentou o maior número médio de gemas por explante, sendo os menores valores atribuídos aos genótipos CPMSC1 e CPF1SSBR (TABELA 2).

Faria e Segura (1997b) obtiveram, em seu melhor tratamento, a média de 3,7 gemas por explante de *P. edulis* após 45 dias de cultivo de explantes apicais em meio DE MS com 5 μM de BAP e 2 μM de AIA, resultado próximo ao obtido no genótipo CPGA1 (TABELA 2), apesar

da diferença no explante inicial utilizado. A porcentagem de oxidação obtida variou entre os genótipos, porém sem diferenças significativas (Tabela 2).

Figura 4 – Proliferação de gemas a partir de ápices caulinares de quatro genótipos de *Passiflora edulis* Sims cultivados em meio MS contendo BAP e avaliados após 180 dias de cultivo. Genótipos: (A) CPGA1; (B) MR1; (C) CPMGA2; (D) CPF1SSBR. Barras = 1 mm.



Fonte: O autor (2020).

O tamanho dos ápices caulinares, medido em diâmetro, foi maior nos genótipos MR1 e CPMGA2 (FIGURA 5), sendo os únicos com crescimento significativo, considerando que o tamanho inicial dos explantes inoculados nesta fase foi de 1mm. A capacidade dos genótipos de proliferar gemas pode ter influenciado no tamanho observado, uma vez que os dois genótipos com maior tamanho também foram os que apresentaram maior número de gemas por explante.

Além disso, o tamanho do material obtido nesta etapa influenciou a fase de micropropagação, uma vez que explantes maiores foram separados em maior quantidade de agregados de gemas.

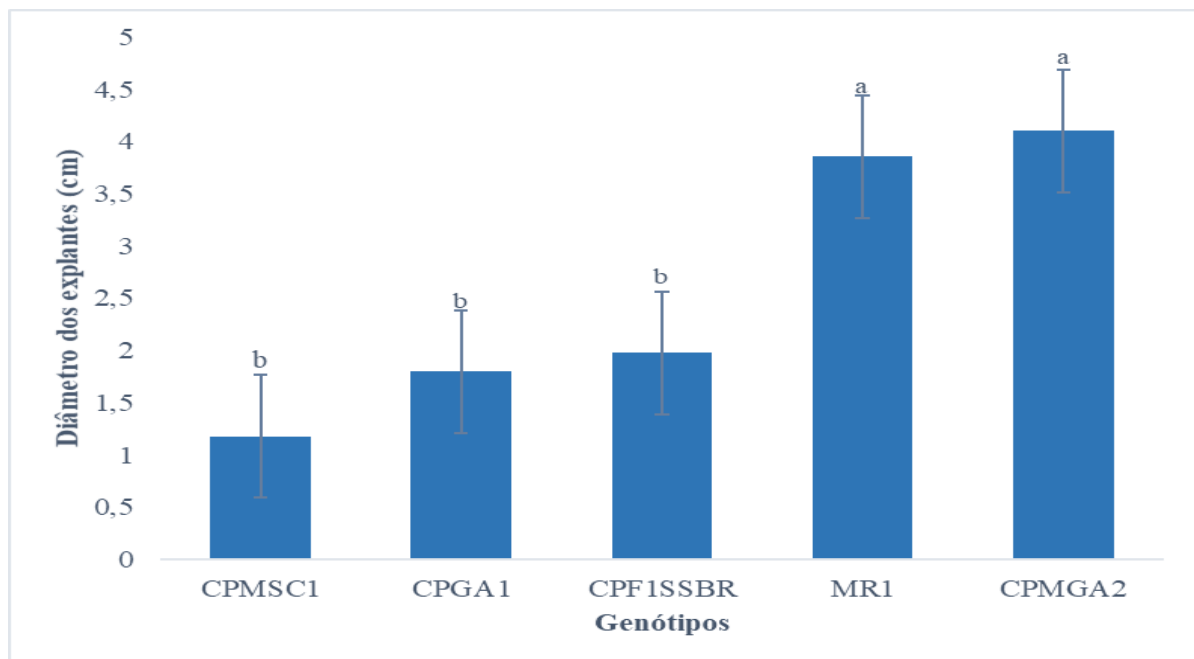
Tabela 2 – Indução de proliferação de gemas (gemas/explante) e porcentagem de oxidação em distintos genótipos de *Passiflora edulis* Sims observados após 180 dias de cultivo *in vitro* em meio de MS (1962) suplementado com 4,43 μ M de BAP.

Genótipos	Número de gemas/explante	Oxidação (%)
CPMSC1	1,0 \pm 0,0 b	60,1 a
CPGA1	3,5 \pm 0,9 ab	88,7 a
MR1	6,0 \pm 1,3 a	33,0 a
CPMGA2	4,2 \pm 1,1 ab	53,1 a
CPF1SSBR	1,2 \pm 0,1 b	77,3 a

Médias \pm erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De maneira geral a contaminação não foi um problema na maioria dos genótipos, excetuando-se o genótipo CPMSC1 que apresentou 20% de contaminação. Esse fato reforça a hipótese de contaminação endógena, visto que este foi o único genótipo que apresentou contaminação na fase de estabelecimento (3.1).

Figura 5 – Diâmetros de ápices caulinares de distintos genótipos de *Passiflora edulis* Sims observados após 180 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com 4,43 μ M de BAP.



Médias \pm erro padrão seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2.3 Multiplicação de agregados de gemas em meio de MS contendo BAP

Após a separação dos agregados de gemas para multiplicação foi observado aumento em tamanho dos explantes em todos os genótipos ao final de 30 dias, com exceção do genótipo CPMSC1, o que praticamente impossibilitou a sua multiplicação nos subcultivos subsequentes.

A análise dos dados demonstrou incremento da porcentagem de multiplicação ao longo dos subcultivos em relação à fase de estabelecimento, com exceção do genótipo CPMSC1. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR quanto ao número de agregado de gemas formadas por frasco (TABELA 3). O baixo desempenho do genótipo CPMSC1 pode estar relacionado ao fato de possuir apenas uma repetição no início da fase de multiplicação.

Tabela 3 – Taxa de multiplicação de agregado de gemas de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims após dois subcultivos mensais em meio de MS com 4,43 µM de BAP.

Subcultivos	Genótipos				
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2	CPF1SSBR
0 ⁽¹⁾	1,0±0,0 aA	2,0±0,0 bA	1,8±0,4 bA	1,2±0,2 bA	1,0±0,0 bA
1	1,0±0,0 aB	4,0±0,0 aA	4,4±0,6 aA	3,5±0,5 aA	4,0±0,0 aA
2	1,0±0,0 aB	5,0± 0,0aA	5,0±0,0 aA	4,0±0,3aA	3,6±0,7aA
Média	1,0±0,4 B	4,7±0,4 A	4,7±0,4 A	3,8±0,4 A	3,8±0,4 A

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade. ⁽¹⁾ Fase de estabelecimento.

Ao final de dois subcultivos, a taxa média de multiplicação variou entre 1,0 e 3,8, com os maiores valores atribuídos aos genótipos CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR. A análise do número de gemas por explante não foi avaliada nesta etapa para evitar a manipulação excessiva dos explantes, evitando assim, a contaminação. Como resultado, agregados de gemas foram obtidos nos frascos em boa quantidade e para a maioria dos genótipos, possibilitando a indexação (FIGURA 6).

Não foi observado oxidação nos genótipos CPMSC1 e MR1. No entanto, a porcentagem de oxidação avaliada nos genótipos CPGA1, CPMGA2 e CPF1SSBR foi de 20%, 15% e 19%, respectivamente. A diminuição da oxidação pode estar ligada diretamente ao menor número de repetições em relação às etapas anteriores. No entanto, esta diminuição pode estar associada à

presença de BAP no meio de cultura associada a multiplicação dos explantes (QUIROZ et al., 2017). De modo geral, não foi observado contaminação nesta etapa.

Figura 6 – Frascos contendo agregados de gemas provenientes de cultura de ápices caulinares de genótipos de *Passiflora edulis* Sims após 60 dias em multiplicação *in vitro*.



Fonte: O autor (2020).

2.4 Indexação do material proveniente da limpeza clonal

2.4.1 Detecção do CABMV por RT-PCR

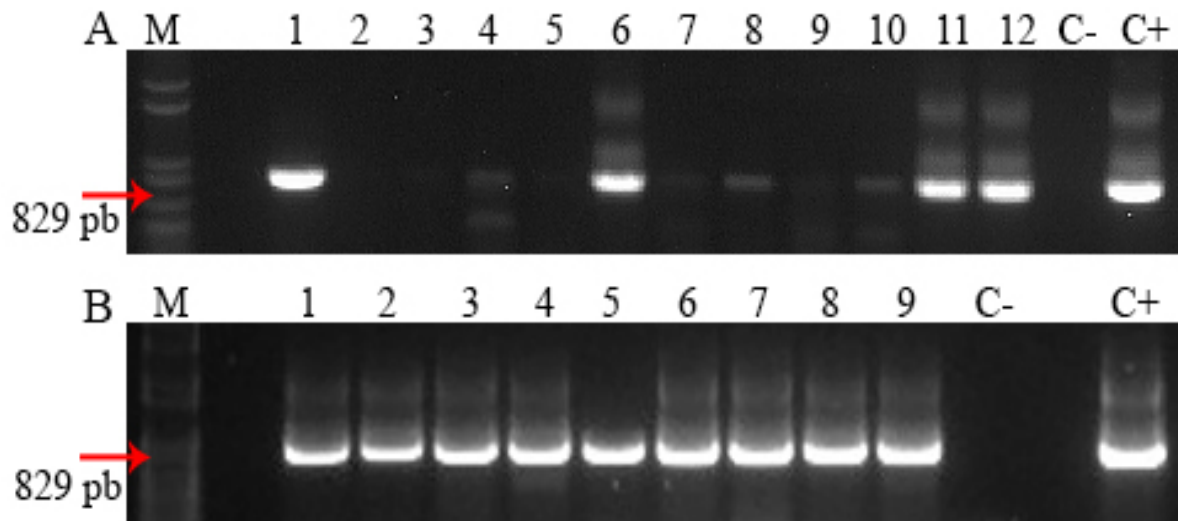
Para a indexação do material propagativo proveniente da cultura de ápices caulinares, explantes inteiros foram coletados de cada um dos genótipos, consistindo nos agregados de gemas micropropagados descritos no tópico 3.3. Além disso, agregados de gemas oriundos de microestaquia que foram propagados *in vitro* no Capítulo 2 deste trabalho também foram coletados e avaliados para comparação com os materiais obtidos pela cultura de ápices caulinares.

As amostras apresentaram fragmento amplificado de aproximadamente 829 pb (FIGURA 7) utilizando a combinação de primers CABMV_CP_9250F (5'-GTGAGACGATAACTGTGGCGA-3') e CABMV_CP_10115R (5'-CAGAAGATGTTGTGCTCCA-3'). Outros trabalhos utilizaram primers semelhantes e obtiveram fragmentos com tamanhos aproximadamente iguais (MACIEL et al., 2009; MELO et al., 2015). Algumas amostras dos genótipos CPGA1, MR1 e CPMGA2, provenientes da cultura de ápices caulinares, apresentaram um fragmento menos intenso (FIGURA 7A – 3, 5, 7, 9, 10) em comparação com o resultado do material que não passou pela limpeza clonal (FIGURA 7B). Isso pode indicar que houve diminuição na quantidade de inóculo do vírus após a cultura de ápices caulinares. Por outro lado, em uma amostra do genótipo CPGA1 não houve

a presença de fragmento (FIGURA 7A – 2), indicando a possível eliminação do vírus nesta amostra.

Andrade et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes após a aplicação da técnica de termoterapia. Neste estudo, três genótipos apresentaram fragmentos menos intensos (CPGA, CPMR e CPF1SSBR) e dois genótipos não apresentaram fragmento correspondente a *Potyvirus* (CPMSC1 e CPMGA2).

Figura 7 – Indexação por meio de RT-PCR para detecção de CABMV em material oriundo de cultura de ápices caulinares de *Passiflora edulis* Sims em comparação com amostras de material micropropagado sem aplicação de limpeza clonal. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de parte do gene do Capsídeo Viral de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) de aproximadamente 829 pb. M = Star 1bk DNA ladder (Cellco). (A) Amostras oriundas da cultura de ápices caulinares: 1 CPMSC1, 2-4 CPGA1, 5-7 MR1, 8-10 CPMGA2 e 11-12 CPF1SSBR; (B) Amostras micropropagadas a partir de microestacas, sem limpeza clonal: 1-3 CPMSC1, 4 CPGA1, 5-6 MR1, 7-9 CPMGA2.

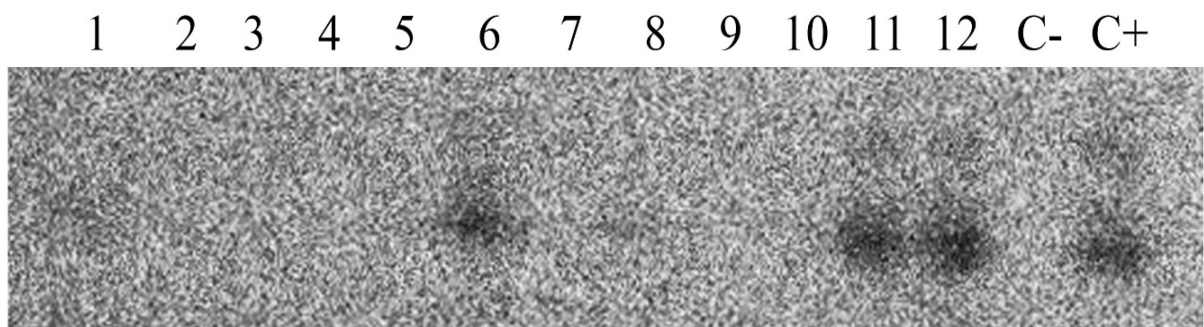


Fonte: O autor (2020).

Complementarmente foi realizada a hibridização por *Southern blot* do gel de agarose contendo os produtos resultantes da reação de PCR (Figura 8). A análise dos resultados demonstrou que não houve hibridização em amostras do genótipo CPGA1 (25,0%), MR1 (16,6%) e CPMGA2 (25,0%), totalizando 66,6% de amostras negativas para a presença do vírus CABMV (Tabela 4), sugerindo que este material poderia ser multiplicado para renovação das matrizes destes genótipos. Em contrapartida, todas as amostras dos genótipos CPMSC1 e CPF1SSBR hibridizaram com a sonda radioativa, indicando que não ocorreu a eliminação viral. No entanto, deve-se considerar que a sonda radioativa não estava em seu potencial máximo, sendo necessário outro teste de indexação neste material após seu eventual desenvolvimento *in vitro*.

Apesar dos resultados obtidos no presente trabalho, Prammanee et al. (2011) obtiveram plantas livres de PWV por meio da técnica de cultura de ápices caulinares em *P. edulis*, indicando que a técnica é eficiente para limpeza clonal em maracujazeiro. Para tal, ajustes podem ser feitos ao protocolo utilizado, visando aumentar a taxa de plantas livres de vírus. Deve-se considerar que fatores inerentes ao vírus podem ter implicado no insucesso da limpeza clonal dos genótipos, como demonstrado por Agüero et al. (2013) após a aplicação da técnica de cultura de meristemas para limpeza de *Citrus leafblotch virus* (CLBV) e *Citrus tristeza virus* (CTV) em *Nicotiana benthamiana* e *Citrus aurantifolia*. Neste caso, foi possível eliminar somente o CTV.

Figura 8 – Análise por *Southern blot* de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims oriundos de cultura de ápices caulinares, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por PCR. Amostras: 1 CPMSC1, 2-4 CPGA1, 5-7 MR1, 8-10 CPMGA2 e 11-12 CPF1SSBR. C- controle negativo. C+ controle positivo.



Fonte: O autor (2020).

A limpeza clonal a partir da cultura de meristemas/ápices caulinares é amplamente utilizada para eliminação de vírus em outras espécies. Rethesh e Bhat (2010) relataram a eliminação dos vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) de plantas de *Vanilla planifolia* após inoculação de meristemas com cerca de 0,1 a 0,25 mm em meio de MS contendo 0,45 μ M de TDZ. Para aumentar as chances de eliminação de vírus, a técnica de cultura de meristemas/ápices caulinares é comumente associada à termoterapia, a partir da exposição das plantas infectadas à temperaturas entre 37 e 40°C por duas a três semanas (VIVEK; MODGIL, 2018) ou cerca de 50°C por 40 minutos (RAMGAREEB et al., 2010), para posterior extração do meristema. Em um estudo mais recente, Nerway, Duhoky e Kassim (2020) compararam a eficiência da cultura de ápices caulinares, eletroterapia e quimioterapia para eliminação do vírus *Dahlia mosaic virus* (DMV) de plantas do gênero *Dahlia*. De acordo com os autores, 100% de plantas livres de vírus foram obtidas ao se inocular os ápices caulinares com cerca de 0,2 e 0,3 mm em meio de MS.

Considerando que a limpeza clonal pôde ser confirmada apenas em uma amostra do genótipo CPGA1 (FIGURA 7), ajustes podem ser realizados para melhorar a eficiência da técnica nos genótipos que testaram positivo para o CABMV após a aplicação da técnica de cultura de ápices caulinares. O cuidado com a manipulação dos explantes trata-se de um fator crucial para o sucesso da técnica, principalmente na multiplicação dos agregados de gemas resultantes do estabelecimento dos ápices caulinares. Além disso, a associação da cultura de ápices caulinares com outras técnicas como termoterapia e crioterapia pode aumentar as chances de se obter material livre de vírus.

Tabela 4 – Relação dos resultados obtidos pela técnica de *Southern blot* quanto a presença dos vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), em genótipos de *Passiflora edulis* Sims oriundos de cultura de ápices caulinares.

Genótipos	CABMV (%)	
	+	-
CPMSC1	(1/1) 8,3	(0/1)
CPGA1	(0/3)	(3/3) 25,0
MR1	(1/3) 8,3	(2/3) 16,6
CPMGA2	(0/3)	(3/3) 25,0
CPF1SSBR	(2/2) 16,6	(0/2)
Total	(4/12) 33,3	(8/12) 66,6

(+) Porcentagem de amostras positivas para a presença do vírus, (-) Porcentagem de amostras negativas para a presença do vírus.

CONCLUSÕES

- A utilização da técnica de RT-PCR em associação com a hibridização por *Southern blot* é eficiente no diagnóstico de vírus nos genótipos de *Passiflora edulis* testados neste trabalho;
- Todos os cinco genótipos estão infectados pelo vírus CABMV;
- Amostras dos genótipos CPMSC1 e CPGA1 estão infectadas por vírus do gênero *Begomovirus*;
- O sequenciamento do produto da RT-PCR realizada, com o par de *primers* CABMV_CP_9250F e CABMV_CP_10115R, confirmou a identidade do vírus CABMV presente nas amostras de *P. edulis* testadas.
- Nos genótipos testados neste trabalho, o uso de microestacas para estabelecimento em meio de MS contendo 4,43 μ M de BAP promove o desenvolvimento das gemas preexistentes presentes no explante;
- A multiplicação *in vitro* de agregados de gemas de *P. edulis* é eficiente para os genótipos CPMSC1, CPGA1, MR1 e CPMGA2 em meio de MS contendo 4,43 μ M de BAP. No entanto, ajustes ainda são necessários para o estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação para o genótipo CPF1SSBR, que praticamente não apresentou multiplicação ao longo dos subcultivos;
- As tampas de polietileno contendo uma membrana semipermeável central proporcionam maior crescimento e multiplicação de agregados de gemas do genótipo MR1 de *P. edulis*. No entanto, mais estudos precisam ser feitos com os genótipos utilizados no presente trabalho, especialmente considerando a utilização de inibidores de etileno;
- A utilização de BAP nas concentrações de 0,1 e 1 μ M não promove o alongamento de brotos nos genótipos MR1 e CPMGA2. Assim, novos estudos são necessários considerando a suplementação do meio de cultura com outros reguladores de crescimento, como AG₃ e ANA ou ainda a utilização de meio de cultura complexo contendo água de coco ou ainda, meio de consistência líquida;

- A utilização de AIB nas concentrações de 1,2; 2,4 e 4,9 μM promove o enraizamento dos genótipos CPMSC1, CPGA1, MR1 e CPMGA2 de *P. edulis*, embora em baixas taxas. Logo, mais estudos são necessários considerando a utilização de concentrações maiores de AIB, em combinação com ANA ou outras auxinas.

- A aplicação da técnica cultura de ápices caulinares isolada não foi suficiente para eliminar o vírus CABMV da maioria das matrizes de *P. edulis*, sendo necessária a associação com outras técnicas de limpeza clonal;

- Para os genótipos CPMSC1 e CPF1SSBR faz-se necessário a combinação de outras técnicas, como a crioterapia, termoterapia ou quimioterapia, por exemplo, para aumentar as chances de eliminação do vírus;

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. F.M.; ARAGÃO, F. J. L. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. **Annals of Botany**, vol. 99, no. 2, p. 285–292, 2007.
- AGÜERO, J.; VIVES, M. C.; VELÁZQUEZ, K.; RUIZ-RUIZ, S.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. *Citrus leaf blotch virus* invades meristematic regions in *Nicotiana benthamiana* and citrus. **Molecular Plant Pathology**, vol. 14, no. 6, p. 610–616, 2013.
- ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agricola**, vol. 57, no. 2, p. 363–366, 2000.
- ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, vol. 22, no. 1, p. 87–91, 2012.
- ANDRADE, S. R. M.; FONSECA, L. P.; SILVA, M. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Estudos Preliminares para o uso de termoterapia *ex vitro* em Maracujazeiro-Azedo visando à eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos- frutos**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 18, 2010.
- ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CHARCHAR, M. J. D. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil central**. Folheto. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 15, 2001. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/567061/incidencia-e-distribuicao-do-virus-do-endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro-no-cerrado-do-brasil-central>. Acessado em: 28/05/2019.
- BEEMSTER, A. B. R. Virus translocation in potato plants and mature-plant resistance. Em: BOKX, J. A. (ed.). **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: pudoc, 1972. p. 144–151.
- BERALDO, J.; KATO, E. T. M. Morfoanatomia de folhas e caules de *passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, no. 2, p. 233–239, 2010.
- BERNACCI, L. C. *PASSIFLORACEAE*. Em: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETTI, A. M.; KIRIZAWA, M. (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, 2003. vol. 3, p. 247–274.
- BERTACCINI, A. Detection of *Chrysanthemum* Yellow's Mycoplasma-like Organism by Dot Hybridization and *Southern blot* Analysis. **Plant Disease**, vol. 74, no. 1, p. 40, 1990.
- BETTONI, J. C.; SOUZA, J. A.; VOLK, G. M.; DALLA COSTA, M.; SILVA, F. N.; KRETZSCHMAR, A. A. Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa' shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. **Scientia Horticulturae**, vol. 250, p. 12–18, 2019.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, vol. 8, p. 171–175, 1994.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, A. P.; CORRÊA, R. X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, vol. 139, no. 2, p. 261–270, 2014.

Embrapa Cerrados. **Lançamento do híbrido de maracujazeiro azedo - BRS Rubi do Cerrado**. 2019. Embrapa Cerrados. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/lancamentobrsrubidocerrado/>. Acessado em: 28 mai. 2020.

Embrapa Cerrados. **Memória do Lançamento dos Híbridos de Maracujazeiro Azedo**. 2020. Embrapa Cerrados. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/lancamentoazedo/>. Acessado em: 28 mai. 2020.

CHEN, S.; YU, N.; YANG, S.; ZHONG, B.; LAN, H. Identification of *Telosma mosaic virus* infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. **Virology Journal**, vol. 15, no. 1, p. 1–9, 2018.

CHIEMSOMBAT, P.; PRAMMANEE, S.; PIPATTANAWONG, N. Occurrence of *Telosma mosaic virus* causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. **Crop Protection**, vol. 63, p. 41–47, 2014.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. Em: CID, L. Pedro Barreto (ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3ªed. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 17–45.

CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 30, no. 4, p. 875–879. 2008.

SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 99, no. 1, p. 47–54, 2009.

DASTOGEER, K. M.G.; LI, H.; SIVASITHAMPARAM, K.; JONES, M. G. K.; WYLIE, S. J. Fungal endophytes and a virus confer drought tolerance to *Nicotiana benthamiana* plants through modulating osmolytes, antioxidant enzymes and expression of host drought responsive genes. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 149, no. p. 95–108, 2018.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 94, no. 1, p. 1–23, 2004.

DI PIERO, R. M.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A.; PASCHOLATI, S. F.; DELFINO, M. A. Transmissão do *Passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera:

Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, vol. 35, no. 1, p. 139–140, 2006.

DIAS, L. L. C.; RIBEIRO, D. M.; CATARINA, C. S.; BARROS, R. S.; FLOH, E. I. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: Effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant Growth Regulation**, vol. 62, no. 1, p. 9–19, 2010.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven: Biologia Vegetal**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; OLIVEIRA, E. J.; MACHADO, C. F.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M.; GUIMARÃES, T. G.; JUNQUEIRA, K. P. **Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro Assistidos por Marcadores Moleculares - Fase II: resultados de pesquisa 2008-2012**. 1ªed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2014.

Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1019176/1/doc324.pdf>. Acessado em 07 jul. 2020.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JESUS, O.N.; MACHADO, C.F.; FERREIRA, M.E.; JUNQUEIRA, K.P.; SCARANARI, C.; WRUCK, D.S.M.; HADDAD, F.; GUIMARÃES, T.G.; BRAGA, M.F. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares - fase III: resultados de pesquisa e desenvolvimento 2012-2016**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2017. (Documentos, No. 324). 171p. ISSN 1517-5111. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/178286/1/Doc-341-Fabio-Faleiro-final.pdf>. Acessado em 13 fev. 2021.

FALEIRO, F.G.; ROCHA, F.E.C.; GONTIJO, G.M.; ROCHA, L.C.T. (Eds.) **Maracujá: prospecção de demandas para pesquisa, extensão rural e políticas públicas baseadas na adoção e no impacto de tecnologias**. Expedição Safra Brasília – Maracujá. Volume 2. Brasília, DF: Emater, DF, 2019. 275 p. il. ISBN 978-85-93659-01-0 (obra completa) e ISBN 978-85-93659-03-4 (volume 2). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197156/1/ExpedicaoSafra-Volume-2-versao-final.pdf>. Acessado em 13 fev. 2021.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, vol. 66, no. 4, p. 535–543, 2007.

FARIA, J. L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, vol. 32, no. 7, p. 1276–1277, Dec. 1997a.

FARIA, J. L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, vol. 33, no. 3, p. 209–212, 1997b.

FAVARA, G. M.; CAMELO-GARCÍA, V. M.; SPADOTTI, D. M. A.; SILVA, J. M. F.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. First report of *Lettuce chlorosis virus* infecting periwinkle in Brazil. **Plant Disease**, vol. 104, no. 4, p. 8–11, 2020.

- FILHO, G. C. N.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C.; MALHEIROS, E. B. Propagação vegetativa do maracujazeiro - conquista de novas adesões. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (eds.). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. 1ªed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 341–358.
- FORTES, G. R. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Batata-semente pré-básica: Cultura de Tecidos. Em: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado. 1ªed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 421–433.
- FORTES, G. R. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A planta de batata: classificação e descrição botânica. Em: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (eds.). **O cultivo da batata na Região Sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado. 1ªed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 69–79.
- GARCÊZ, R. M.; CHAVES, A. L. R.; EIRAS, M.; MELETTI, L. M. M.; FILHO, J. A. A.; SILVA, L. A.; COLARICCIO, A. Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in a subtropical region of Brazil. **SpringerPlus**, vol. 4, no. 1, p. 537, 2015.
- GLORIA, B. A.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 34, no. 11, p. 2007–2013, 1999.
- GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S.; SOARES, T. L.; ABREU, E. F. M.; BARBOSA, C. J.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, E. J. Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and leaf anatomical response under controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, vol. 231, no. 2018, p. 166–178, 2017.
- GONTIJO, G. M. **Cultivo do Maracujá: informações básicas**. Cartilha. Brasília, DF: Emater. p. 7–9, 2017. Disponível em: http://www.emater.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/06/cartilha_maracuja.pdf. Acessado em: 13 nov. 2019.
- GOYAL, A. K.; PRADHAN, S.; BASISTHA, B. C.; SEN, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. **3 Biotech**, vol. 5, no. 4, p. 473–482, 2015.
- HERRANZ, M. C.; SANCHEZ-NAVARRO, J. A.; APARICIO, F.; PALLÁS, V. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or ‘polyprobe.’ **Journal of Virological Methods**, vol. 124, no. 1–2, p. 49–55, 2005.
- ISUTSA, D K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticultura**, vol. 99, p. 395–400, 2004.
- ITA, E. E.; UYOH, E. A.; NAKAMURA, I.; NTUI, V. O. Efficient elimination of *Yam mosaic virus* (YMV) from white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) by cryotherapy of axillary buds. **South African Journal of Botany**, vol. 130, p. 123–129, 2020

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R. *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (eds.). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. 1ªed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81–92.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, vol. 147, no. 2, p. 281–284, 1995.

KUFLU, K. M.; CUPPELS, D. A. Development of a diagnostic DNA probe for *xanthomonads* causing bacterial spot of peppers and tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 63, no. 11, p. 4462–4470, 1997.

LANGVELD, S. A.; DORE, J. M.; MEMELINK, J.; DERKS, A. F. L. M.; VAN DER VLUGT, C. I. M.; ASJES, C. J.; BOL, J. F. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Journal of General Virology**, vol. 72, no. 7, p. 1531–1541, 1991.

LIRA, A. Cultivo de maracujá doce pode gerar mais renda dentro da agricultura familiar. 2018. EMBRAPA, Notícias. Internet. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/33562532/cultivo-de-maracuja-doce-pode-gerar-mais-renda-dentro-da-agricultura-familiar>. Acessado em: 28 set. 2018.

MACIEL, S. C.; NAKANO, D. H.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, vol. 66, no. 3, p. 414–418, 2009

MARLIÈRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18, p. 754–760, 2008.

MARTELLI, G. P.; AGRANOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H.A.; DOLJA, V. V.; FALK, B. W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A. V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H. J.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, vol. 147, no. 10, p. 2039–2044, 2002.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 33, p. 83–91, 2011.

MELO, J. R. F.; FIGUEIRA, A. R.; MOREIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. C. Recent characterization of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, vol. 14, no. 9, p. 735–744, 2015.

MINK, G. I.; VETTEN, H. J.; WARD, C. W.; BERGER, P. H.; MORALES, F. J.; MYERS, J. M.; SILBERNAGEL, M. J.; BARNETT, O. W. Taxonomy and classification of legume-infecting potyviruses. **Archives of Virology**, vol. 139, p. 231–235, 1994.

- MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia forentalis**, vol. 44, no. 112, p. 1009–1018, 2016.
- MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHANESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. a common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6, no. 23, p. 2650–2653, 2007.
- MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; JADÃO, A. S.; MENDES, B. M. J.; REZENDE, J. A. M.; MELLO, A. P. O. A.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M.M.; PIEDADE, S. M. S. Genetic transformation of passionflower and evaluation of R₁ and R₂ generations for resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Plant Disease**, vol. 95, no. 8, p. 1021-1025, 2011.
- 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 medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F. *Flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, vol. 36, no. 6, p. 527–531, 2000.
- MOURA, G. S.; SCHWAN-ESTRADA, A. P. F.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 79, no. 3, p. 371–379, 2012.
- MUKHOPADHYAY, S. Management: Strategies and Tactics Em: **Plant virus, vector: epidemiology and management**. 1ªed. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 252–260.
- MULLIS, K; FALOONA, F; SCHARF, S; SAIKI, R; HORN, G; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of dna *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, vol. 51, p. 263–273, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, vol. 15, no. 3, p. 473–497, 1962.
- NARITA, N.; YUKI, V. A.; PAVAN, M. A. Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. Comunicação. **Summa Phytopathologica**, vol. 37, no. 4, p. 221–221, 2012.
- NASCIMENTO, A. V. S.; SOUZA, A. R. R.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F. M. Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 29, no. 4, p. 378–383, 2004.
- NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; DE CARVALHO, M. G.; MURILO ZERBINI, F. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, vol. 151, no. 9, p. 1797–1809, 2006.
- NASCIMENTO, L. C.; PIO-RIBEIRO, G.; WILLADINO, L.; ANDRADE, G. P. Stock indexing and *Potato virus Y* elimination from potato plants cultivated *in vitro*. **Scientia Agricola**, vol. 60, no. 3, p. 525–530, 2003.

- NEHRA, N. S.; KARTHA, K. K. Meristem and Shoot Tip Culture: Requirements and Applications. Em: Plant Cell and Tissue Culture. **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994.
- NERWAY, Z. A. A.; DUHOKY, M. M. S.; KASSIM, N. A. *In vitro* elimination of *Dahlia mosaic virus* by using meristem culture, electrotherapy and chemotherapy. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences**, vol. 51, no. 2, p. 665–674, 2020.
- NOVAES, Q. S.; FREITAS-ASTUA, J.; SÃO JOSÉ, A. R.; YUKI, V. A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A.M. Infecção mista de maracujazeiro com o *Passion fruit woodiness virus* e um begomovírus no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 27, no. 6, p. 648–648, 2002.
- NOVAES, Q. S.; FREITAS-ASTUA, J.; YUKI, V. A.; KITAJIMA, E. W.; CAMARGO, L. E.A.; REZENDE, J. A.M. Partial characterization of a bipartite *Begomovirus* infecting yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, vol. 52, no. 5, p. 648–654, 2003.
- O'DONNELL, K.J. molecular diagnostics: technical and economic issues. **Acta Horticulturae**, vol. 530, p. 39–44, 2000.
- OCHWO-SSEMAKULA, M.; SENGGOBA, T.; HAKIZA, J. J.; ADIPALA, E.; EDEMA, R.; REDINBAUGH, M. G.; ARITUA, V.; WINTER, S. Characterization and distribution of a *potyvirus* associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. **Plant Disease**, vol. 96, no. 5, p. 659–665, 2012.
- OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, O. N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 35, no. 2, p. 485–492, 2013.
- PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, vol. 144, p. 42–47, 2012.
- PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A.; JAMES, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, p. 1–11, 2018.
- PARRY, J. N.; DAVIS, R. I.; THOMAS, J. E. *Passiflora virus Y*, a novel virus infecting *Passiflora* spp. in Australia and the Indonesian Province of Papua. **Australasian Plant Pathology**, vol. 33, no. 3, p. 423, 2004.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, vol. 22, no. 2, p. 197–201, 2004.
- PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, vol. 46, no. 1, p. 28–33, 2010.

PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, vol. 30, no. 11, p. 1425–1429, 2011.

QUAK, F. Therapy. Em: BOKX, J. A. (ed.). **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 158–166.

QUIROZ, K. A.; BERRÍOS, M.; CARRASCO, B.; RETAMALES, J. B.; CALIGARI, P. D. S.; GARCÍA-GONZÁLES, R. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). **Biological Research**, vol. 50, no. 1, p. 1–11, 2017.

RAMGAREEB, S.; SNYMAN, S. J.; VAN ANTWERPEN, T.; RUTHERFORD, R. S. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 100, no. 2, p. 175–181, 2010.

RÊGO, C. M. **Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (BRS sena) e susceptível (H-9553)**. Dissertação de mestrado. Brasília, DF. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G.C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, vol. 39, no. 6, p. 618–622, 2003.

RETHEESH, S. T.; BHAT, A. I. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. **Crop Protection**, vol. 29, no. 10, p. 1214–1217, 2010.

RIBEIRO, L. M.; ROCHA, S.; ANDRADE, M.; VIEIRA, L. M.; VICENTE, W.; PEREIRA, S. Microenxertia *ex vitro* para eliminação do vírus CABMV em maracujá-azedo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, vol. 43, no. 5, p. 589–594, 2008.

RISKA; SATO, Y.; INUDO, K.; NAKAMURA, M.; FUKUMOTO, T.; TAKUSHI, T.; FUJI, S.; IWAI, H. *East asian Passiflora distortion virus*: a novel *Potyvirus* species causing deformation of passionfruits in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, vol. 85, no. 3, p. 221–231, 2019.

ROCHOW, W. F.; ROSS, A. Frank. Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y. **Virology**, vol. 1, no. 1, p. 10–27, 1955.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, vol. 48, no. 1, p. 67–72, 2012.

ROJAS, M. R. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, vol. 77, no. 4, p. 340, 1993.

- SACOMAN, N. N.; VIANA, A. P.; CARVALHO, V. S.; SANTOS, E. A.; RODRIGUES, R. Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in *in vitro* germinated genotypes of *Passiflora setacea*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 40, no. 1, 2018.
- SALAS, F. J. S.; CHAVES, A. L. R.; GONÇALVES, M. C.; EIRAS, M.; BARRADAS, M. M. Princípios de vírus em plantas. Em: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.(ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 2ªed. Brasília: Embrapa, 2012.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 110, no. 3, p. 413–422, 2012.
- SAMPAIO, A. C.; SCUDELLER, N.; FUMIS, T. F.; ALMEIDA, A. M.; PINOTTI, R. N.; GARCIA, M. J. M.; PALLAMIN, M. L. Manejo cultural do maracujazeiro-amarelo em ciclo anual visando à convivência com o vírus do endurecimento dos frutos: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 30, no. 2, p. 343–347, 2008.
- SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; ALMEIDA, A. F.; FREITAS, J. C. O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) for ornamental use. **Euphytica**, vol. 184, no. 3, p. 389–399, 2012.
- SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, vol. 57, no. 1, p. 112–117, 2010.
- SANTOS, J. L.; MATSUMOTO, S. N.; D'ARÊDE, L. O.; LUZ, I. S.; VIANA, A. E. S. Propagação vegetativa de estacas de *Passiflora cincinnata* mast. em diferentes recipientes e substratos comerciais1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 34, no. 2, p. 581–588, 2012.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 38, no. 7, p. 827–834, 2003.
- SEVERIN, C.; BUENO, M.; SANTÍN, F.; GIUBILEO, M. G. Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, vol. 13, no. 1, p. 73–79, 2011.
- SHEKHAWAT, M. S.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. An Improved micropropagation protocol by ex vitro rooting of *Passiflora edulis* sims. f. flavicarpa deg. through nodal segment culture. **Scientifica**, vol. 2015, p. 1–8, 2015.
- SOARES, W.S.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BARROSO, P.A.; NASCIMENTO, K.S.; FERREIRA, K.T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, vol. 14, p. 138–142, 2012.
- SOUTHERN, E. *Southern blotting*. **Nature Protocols**, vol. 1, no. 2, p. 518–525, 2006.

- SRINIVASAN, R.; ALVAREZ, J. M. Effect of mixed viral infections (*Potato virus Y–Potato leafroll Virus*) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, vol. 100, no. 3, p. 646–655, 2007.
- SYLLER, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. **Molecular Plant Pathology**, vol. 13, no. 2, p. 204–216, 2012.
- TAIWO, M. A.; KAREEM, K. T.; NSA, I. Y.; D’A HUGHES, J. Cowpea viruses: Effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. **Virology Journal**, vol. 4, p. 1–5, 2007.
- TIWARI, A. K.; TRIPATHI, S.; LAL, M.; SHARMA, M. L.; CHIEMSOMBAT, P. Elimination of sugarcane grassy shoot disease through apical meristem culture. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, vol. 44, no. 20, p. 1942–1948, 2011.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M.J.; MACIEL, S. C.; REZENDE, J. A.M.; VIEIRA, M. L.C.; MELETTI, L. M.M. Resistance to *passion fruit woodiness virus* in transgenic plants of the yellow passion fruit expressing the viral coat protein gene. **Acta Horticulturae**, vol. 738, no. 8, p. 495–500, 2006.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, vol. 62, no. 4, p. 346–350, 2005.
- VACA-VACA, J. C.; CARRASCO-LOZANO, E. C.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.; BETANCUR-PEREZ, J. F.; LOPEZ-LOPEZ, K. Primer reporte de un *Begomovirus* presente en maracujá amarillo [*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Degener)] en Valle del Cauca, Colombia. **Revista Colombiana de Biotecnología**, vol. 18, no. 2, p. 56, 2016.
- VAN BEL, A. J.E. The phloem, a miracle of ingenuity. **Plant, Cell and Environment**, vol. 26, no. 1, p. 125–149, 2003.
- VIANA, C. A. S.; PIRES, M. C.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BLUM, L. E. B. Resistência parcial de genótipos de maracujá-azedo à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, vol. 30, no. 3. 1, p. 338–345, 2014.
- VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; DA SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (*Passifloraceae*): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, vol. 50, no. 6, p. 738–745, 2014.
- VIVEK, M.; MODGIL, M. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar ‘Oregon Spur-II.’ **Virus Disease**, vol. 29, no. 1, p. 75–82, 2018.
- WESTWOOD, J. H.; MCCANN, L.; NAISH, M.; DIXON, H.; MURPHY, A. M.; STANCOMBE, M. A.; BENNETT, M. H.; POWELL, G.; WEBB, A. A. R.; CARR, J. P. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, vol. 14, no. 2, p. 158–170, 2013.

WINTERMANTEL, W. M.; CORTEZ, A. A.; ANCHIETA, A. G.; GULATI-SAKHUJA, A.; HLADKY, L. L. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. **Phytopathology**, vol. 98, no. 12, p. 1340–1345, 2008.

WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E.; GERIK, J. S. First Report of *Lettuce chlorosis virus* Naturally Infecting Sugar Beets in California. **Plant Disease**, vol. 81, no. 5, p. 550–550, 2007.

ZACHARIAS, A. O.; ZACARONI, A. B.; BORGES, A. L.; LIMA, H. C. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1061917/maracuja-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde>. Acessado em: 04 out. 2019.

ZHANG, S. B.; ZHANG, D. Y.; LIU, Y.; LUO, X. W.; LIU, M. Y.; DU, J.; WANG, M. C. First report of *Lettuce chlorosis virus* infecting tomato in China. **Plant Disease**, vol. 101, no. 5, p. 846–846, 2017.