

## Microenxertia ex vitro Visando à Eliminação de Vírus em Maracujazeiro



ISSN 1517-5111

ISSN online 2176-5081

Fevereiro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados*

*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Documentos 242***

# **Microenxertia *ex vitro* Visando à Eliminação de Vírus em Maracujazeiro**

*Leonardo Monteiro Ribeiro*

*Solange Rocha Monteiro de Andrade*

*Lorena Melo Vieira*

*Wilson Vicente Souza Pereira*

Embrapa Cerrados

Planaltina, DF

2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

[sac@cpac.embrapa.br](mailto:sac@cpac.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*

*Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufé*

Tratamento de ilustrações: *Wellington Cavalcanti*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

*Jéssica Spíndula*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Foto(s) da capa: *Solange Rocha Monteiro de Andrade*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*

*Alexandre Moreira Veloso*

**1ª edição**

1ª impressão (2009): tiragem 100 exemplares

Edição online (2009)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Cerrados**

---

M626 Microenxertia *ex vitro* visando à eliminação de vírus em maracujazeiro/ Leonardo Monteiro Ribeiro... [et al]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2009.

28 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081; 242).

1. Enxerto. 2. Microenxertia *ex vitro*. 3. Maracujá. I. Ribeiro, Leonardo Monteiro. II. Série.

---

631.541 - CDD 21

© Embrapa 2009

# **Autores**

## **Leonardo Monteiro Ribeiro**

Engenheiro Agrônomo, M.Sc.

Professor da Universidade Estadual de Montes  
Claros, Departamento de Biologia Geral,

Montes Claros, MG

leomrib@hotmail.com

## **Solange Rocha Monteiro de Andrade**

Engenheira Agrônoma, D.Sc.

Pesquisadora da Embrapa Cerrados

solange@cpac.embrapa.br

## **Lorena Melo Vieira**

Bióloga

Estagiária da Universidade Estadual de Montes  
Claros, Departamento de Biologia Geral, Montes  
Claros, MG

lorenamelovieira@hotmail.com

## **Wilson Vicente Souza Pereira**

Biólogo

Universidade Estadual de Montes Claros,

Departamento de Biologia Geral, Montes Claros, MG

wvicentesp@yahoo.com.br

# Apresentação

O Maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis*), apesar de ser uma das frutíferas de grande importância para o Brasil, apresenta baixa produtividade frente ao seu potencial. Entre os principais fatores, está a ocorrência de enfermidades que afetam, além da produtividade, a qualidade dos frutos e aumentam os custos de produção. A virose-do-endurecimento-dos-frutos, causada por "*Cowpea aphid-borne mosaic virus*" (CABMV) e por "*Passion fruit woodiness virus*" (PWV), é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro-azedo no Brasil e está disseminada na maioria das regiões produtoras.

A virose apresenta alto índice de disseminação no Brasil e tem comprometido a utilização de métodos de propagação vegetativa como a estaquia e a enxertia. A erradicação de viroses no campo é um processo difícil, pois o controle não é conhecido e os vírus são facilmente disseminados mecanicamente e por afídeos. A obtenção de mudas sadias pode ocorrer a partir de germinação de sementes, pois, em geral, patógenos não costumam acumular em sementes. No entanto, o pomar apresentará alto índice de heterozigose e alta variação de crescimento e produção. A limpeza clonal é outro método para obtenção de mudas livres de patógenos, sendo mais adequada quando o objetivo é obter propagação vegetativa de cultivares de interesse.

O processo de limpeza clonal consiste em produzir mudas livres de doenças e geneticamente semelhantes à planta mãe. Existem diversos métodos de limpeza clonal. A microenxertia *in vitro* consiste em enxertar ápices caulinares das plantas infectadas em caules de porta-enxertos jovens, cultivados *in vitro*. Adaptações posteriores empregando procedimentos simples de assepsia reduziram o custo do processo que culminaram com o desenvolvimento da microenxertia *ex vitro*.

O presente trabalho descreve as etapas da técnica de microenxertia *ex vitro* desenvolvida pela Unimontes, em parceria com a Embrapa Cerrados e UnB. A metodologia foi descrita passo a passo, com fotografias para ilustrar cada etapa. Nos anexos, é apresentada uma escala com fotografias para a avaliação do microenxerto, bem como uma tabela para dar suporte a essa avaliação.

O objetivo do trabalho foi desenvolver um pequeno manual para permitir a obtenção da limpeza clonal de *Passiflora edulis* por pesquisadores de outros programas de melhoramento, bem como viveiristas, estudantes e demais interessados.

*José Robson Bezerra Sereno*

Chefe - Geral da Embrapa Cerrados

# Sumário

Introdução.....	9
Obtenção de mudas livres de vírus por limpeza clonal por microenxertia .....	11
Metodologia .....	13
Obtenção do porta-enxerto.....	13
Obtenção do enxerto.....	14
Microenxertia .....	15
Considerações Finais .....	20
Referências .....	20
Anexo 1 .....	25
Anexo 2.....	26
Anexo 3.....	27
Abstract.....	28

# Microenxertia *ex vitro* Visando à Eliminação de Vírus em Maracujazeiro

---

*Leonardo Monteiro Ribeiro*

*Solange Rocha Monteiro de Andrade*

*Lorena Melo Vieira*

*Wilson Vicente Souza Pereira*

## Introdução

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis*) é uma das principais frutíferas cultivadas no Brasil (AGUIAR; SANTOS, 2001). A cultura está presente em praticamente todos os estados, especialmente na Região Nordeste (AGRIANUAL, 2006). A produção nacional apresenta tendência de expansão por causa do aumento da demanda e preços considerados atraentes (AGUIAR; SANTOS, 2001; PIRES; MATA, 2004). Em 2006 a área plantada cresceu de 35.856 ha para 45.327 ha, 26 % a mais que 2005, aumentando a produção de 450.000 t para 615.000 t (IBGE, 2008). No entanto, a produtividade do maracujazeiro-azedo no Brasil tem-se mantido estável, entre 13.000 a 14.000 t.ha<sup>-1</sup>, apresentado, inclusive, queda em regiões tradicionais de produção, como os estados da Bahia, Pará, São Paulo e Minas Gerais. Os principais fatores responsáveis pela queda de produtividade no Brasil são: mudas de baixa qualidade, incidência de pragas e doenças, manejo incorreto de solo e dos sistemas de irrigação e, por fim, ausência de polinização manual (AGRIANUAL, 2006).

A grande ocorrência de enfermidades é um dos fatores responsáveis pela diminuição da produtividade e da qualidade dos frutos e pelo aumento dos custos de produção (PIRES; MATA, 2004; SANTOS

FILHO et al., 2004). A virose-do-endurecimento-dos-frutos, causada por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e por *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (NASCIMENTO et al., 2004), é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro-azedo no Brasil e está disseminada na maioria das regiões produtoras (KITAJIMA; REZENDE, 2001; ANJOS et al., 2002; BUENO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006).

A enfermidade causa o aparecimento de sintomas de mosaico, embolhamento das folhas e a diminuição do tamanho dos frutos associado à deformação e à ocorrência de bolsas de goma no albedo, que se torna espessado. Além disso, plantas afetadas têm a produtividade e a vida útil diminuídas (KITAJIMA; RESENDE, 2001; SANTOS FILHO et al., 2004).

A alta disseminação da virose no Brasil tem comprometido a utilização de métodos de propagação vegetativa como a estaquia e a enxertia. Esses métodos são utilizados normalmente em outros países, pois permitem a obtenção de plantas precoces e com grande uniformidade (LIMA; TRINDADE, 2004). A propagação vegetativa também é importante para os programas de melhoramento genético para fixação e multiplicação de genótipos selecionados (DUVAL et al., 1998; FERREIRA et al., 1998).

A erradicação de viroses no campo é um processo difícil, pois o controle não é conhecido e os vírus são facilmente disseminados mecanicamente e por afídeos (MELETTI et al., 2005). Assim, recomendam-se medidas de exclusão, como a eliminação de pomares contaminados e improdutivos, instalação dos novos pomares distantes dos locais onde já ocorreu infecção, manutenção do pomar limpo e livre de plantas, para evitar a procriação de insetos vetores e eliminação periódica das plantas doentes (BARBOSA; SANTOS FILHO, 2005). Além disso, deve-se adotar como prática rotineira a limpeza das ferramentas de corte entre as manipulações de cada planta, bem como o uso de mudas sadias e certificadas na formação de novos pomares (BARBOSA; SANTOS FILHO, 2005; MELETTI et al., 2005).

A obtenção de mudas sadias pode ocorrer a partir de germinação de sementes, pois, em geral, patógenos não costumam-se acumular em sementes, ou por limpeza clonal para propagação vegetativa das matrizes de interesse. O processo de limpeza clonal consiste em produzir mudas livres de doenças e geneticamente semelhantes à planta mãe. Esse processo foi inicialmente utilizado por meio da cultura de meristemas, considerando que, em geral, o vírus não está presente no meristema apical. No entanto, com o tempo, os métodos foram aprimorados e novos foram desenvolvidos, como a cultura de ápices caulinares, o tratamento por termoterapia e a microenxertia (DUVAL et al, 1998). Atualmente, essas metodologias são utilizadas para várias espécies vegetais de propagação vegetativa, como citrus (D'ONGHIA et al., 2001), maçã (WANG et al., 1996), morango (JAIN; PEHU; 1992), abacate (SUAREZ et al., 2005), e cana-de-açúcar (FITCH et al., 2001; PARMESSUR et al., 2002).

### **Obtenção de mudas livres de vírus por limpeza clonal por microenxertia**

A microenxertia *in vitro* foi proposta por Murashige e colaboradores (1972) com a finalidade de superar a dificuldade de regeneração a partir de ápices caulinares em citrus no processo de limpeza clonal. A técnica consiste em enxertar ápices caulinares das plantas infectadas em caules de porta-enxertos jovens, cultivados *in vitro* (PAZ; PASQUAL, 1998). Navarro e colaboradores (1975) aperfeiçoaram a metodologia, obtendo o porta-enxerto por meio da germinação e manutenção *in vitro* das plântulas, em meio líquido e ausência de luz. A microenxertia foi realizada com a deposição do ápice, com 0,15 mm a 0,2 mm de comprimento e dois a três primórdios foliares, numa incisão no caule do porta-enxerto em forma de "T" invertido. Em seguida, o porta-enxerto foi reconduzido à condição *in vitro*, em meio líquido, com iluminação. Após o desenvolvimento de 2 a 3 folhas, as plantas foram transferidas para o solo. Os autores conseguiram índices próximos a 50 % de pegamento em citrus. Esses procedimentos, com algumas variações, passaram a ser amplamente utilizados, tendo se mostrado eficientes para a eliminação de viroses em várias culturas como

citrus (DE PASQUALE et al., 1999; PAIVA; CARVALHO, 1993), uva (PATHIRANA; MCKENZIE, 2005), abacate (RAHARJO; LITZ, 2005), maçã (RICHARDSON et al., 1996), cactus (ESTRADA LUNA et al., 2002), e outros (NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998).

Os trabalhos de microenxertia *in vitro* de maracujá, *Passiflora edulis*, iniciaram com Biricolti e Chiari (1994). Os autores utilizaram meristemas de 0,2 mm a 0,4 mm de comprimento, com no máximo quatro primórdios foliares, coletados de plantas de *P. edulis f. edulis* com um ano de idade e obtiveram 50 % de pegamento.

Oliveira et al. (2002) adaptaram a metodologia empregando procedimentos simples de assepsia e de cultivo visando reduzir o custo do processo. Os autores eliminaram o uso de meio de cultura para a obtenção dos porta-enxertos, utilizando para isso substratos destinados à produção de mudas previamente esterilizados. Conseguiram índices de pegamento de 34 % a 79 %, dependendo da combinação de genótipos doadores de ápices e porta-enxertos em citrus. Essa técnica foi denominada microenxertia *ex vitro*.

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

micropropagação em macieira (*Malus* spp.). Os autores constataram que o fitoregulador AIB utilizado no meio de cultivo ou aplicado no ponto de enxertia promoveram maior desenvolvimento dos microenxertos.

Este trabalho descreve a técnica de microenxertia *ex vitro*, desenvolvida pela Unimontes em parceria com a Embrapa Cerrados e com a UnB, que tem sido utilizada para a limpeza clonal dos acessos de maracujazeiro azedo de interesse para o Programa de Melhoramento de Maracujazeiro dessas instituições. A técnica foi testada com sucesso para a limpeza de cultivares da UnB e da Embrapa Cerrados.

## Metodologia

### Obtenção do porta-enxerto

Para a obtenção de porta-enxertos, as sementes de *Passiflora edulis* devem ser descontaminadas por imersão em solução de 1 % de hipoclorito de sódio, durante 10 minutos, seguidas de tríplice lavagem em água destilada. As sementes devem ser semeadas em copos plásticos de 50 ml contendo substrato comercial, previamente esterilizado em estufa a 150 °C, durante 24 horas. A microenxertia é realizada em plântulas com 20 a 30 dias de idade (Fig. 1).



Fig. 1. Porta-enxerto de maracujazeiro-azedo com 20 a 30 dias de idade.

As plantas destinadas a serem utilizadas como porta-enxertos, com 5 cm a 7 cm de comprimento, que possuem as folhas cotiledonares e uma ou duas folhas definitivas, devem ser submetidas a desinfestação superficial por meio de pulverização com solução de hipoclorito de sódio 1 % e, após 5 minutos, lavadas com água destilada. Os porta-enxertos devem ser apoiados sobre recipientes de acrílico, tipo Gerbox e fixados com fita crepe aplicadas sobre as folhas e caule (Fig. 2 A e B).

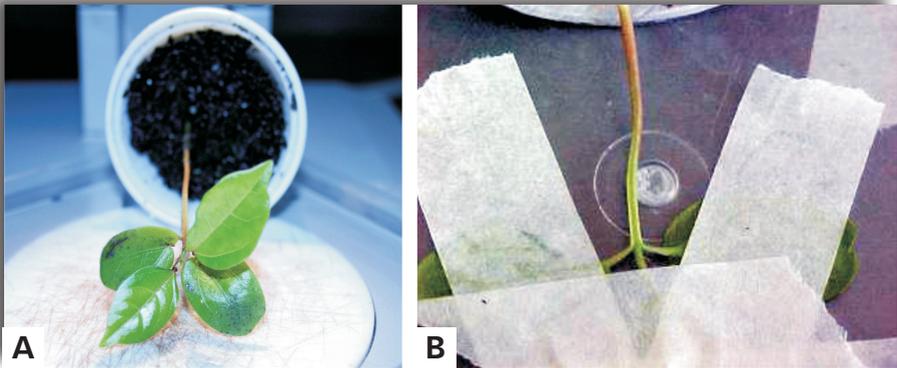


Fig. 2. Porta-enxerto de maracujazeiro-azedo fixado com fita adesiva em recipiente tipo Gerbox para a realização da microenxertia.

### Obtenção do enxerto

Para realização da microenxertia, a parte apical do ramo deve ser retirada da planta matriz. Esse explante deve conter uma porção do caule, do ápice caulinar e algumas folhas recém-expandidas (Fig. 3 A). Os explantes devem ser desbastados com estiletos até aproximadamente 3 cm de comprimento, e submetidos à desinfestação por imersão em solução de 0,25 % de hipoclorito de sódio, durante 10 minutos, seguida por tríplice lavagem em água destilada (Fig. 3 B). Após esse procedimento, o material deve ser imerso em água destilada até a realização da microenxertia.

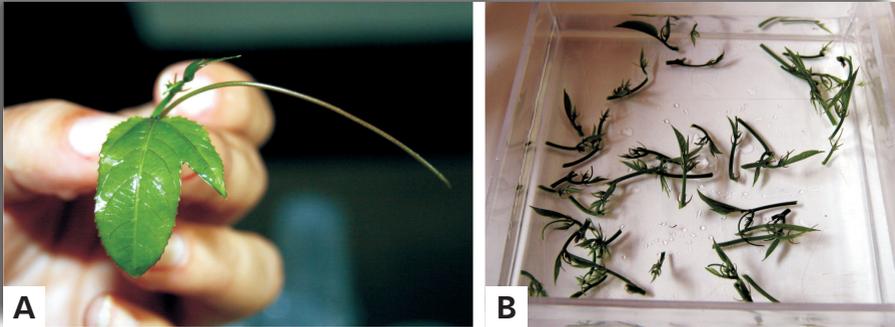


Fig. 3. Ápice caulinar de matriz: antes do desbaste (A); após o desbaste, descontaminada e prontos para serem enxertados (B).

No momento da enxertia, o segmento apical de ramo fornecedor do ápice deve ser fixado por fita crepe em recipientes plástico tipo Gerbox (Fig. 4) e sobre ele aplicado a solução antioxidante ( $100 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico) (SANTOS et al., 2001).

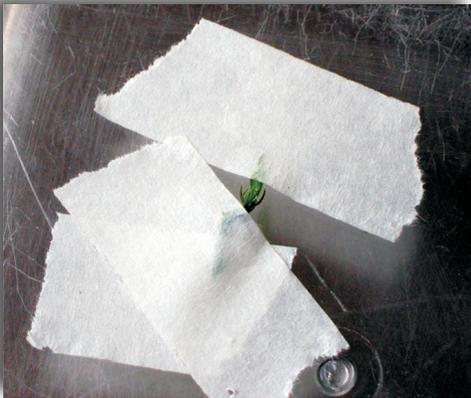
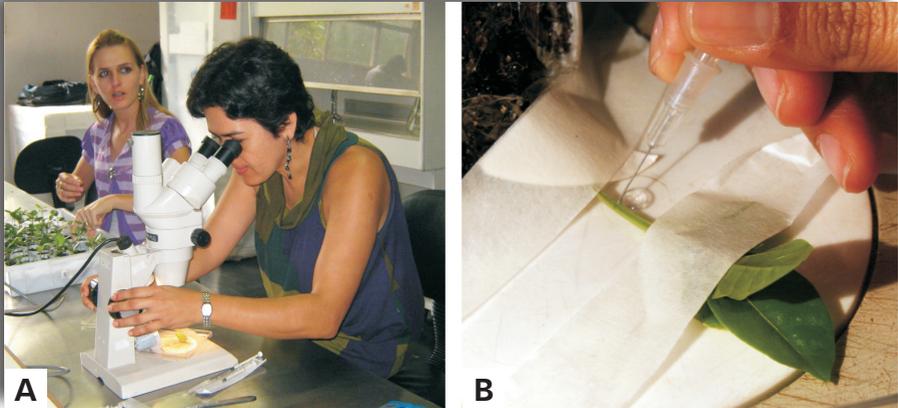


Fig. 4. Fixação dos ápices para desbaste em microscópio estereomicroscópio.

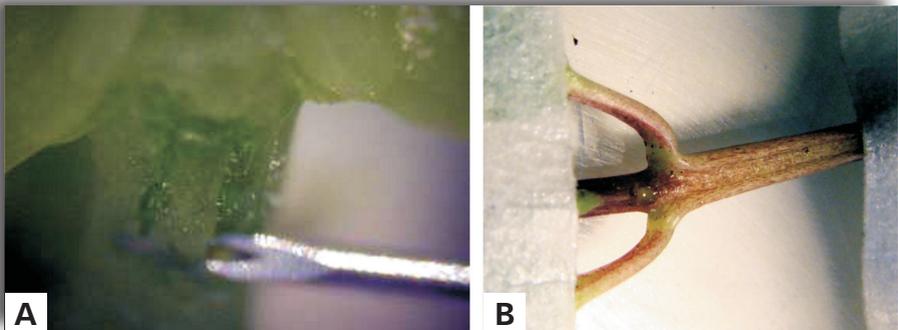
## Microenxertia

A microenxertia pode ser feita no hipocótilo ou epicótilo, com o auxílio de um estereomicroscópio e de uma seringa plástica com agulha de 8 mm de comprimento e calibre de 0,3 mm, utilizada como um microbisturi (Fig. 5 A e B).



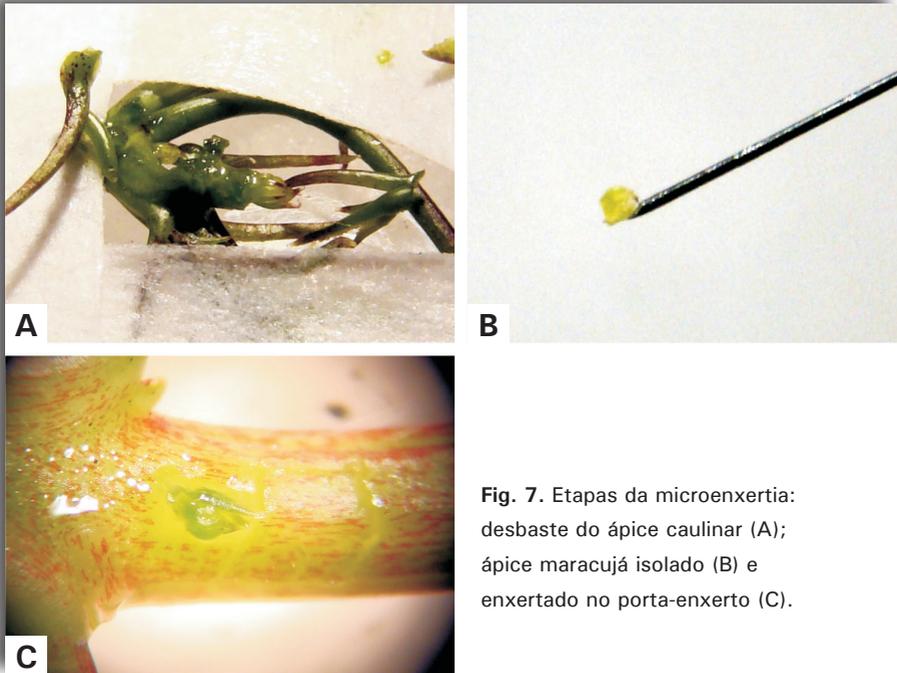
**Fig. 5.** Etapas da obtenção da janela no porta-enxerto: uso do microscópio estereoscópico (A); inserção com agulha de seringa (B).

Para a microenxertia hipocotiledonar, realizam-se incisões até a obtenção de uma abertura retangular no caule na altura de aproximadamente 3 cm acima do coleto. Na microenxertia epicotiledonar, a abertura feita no caule é realizada imediatamente acima da região de inserção das folhas cotiledonares, cerca de 5 cm em relação ao coleto. A abertura, de aproximadamente 8 mm x 5 mm, deve ser feita no sentido longitudinal ao caule (Fig. 6 A e B). Após a retirada dos tecidos da epiderme e de uma porção do córtex, devem ser aplicadas sobre a mesma gotas de solução antioxidante ( $100 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico) (SANTOS et al., 2001).



**Fig. 6.** Etapas da obtenção da janela no porta-enxerto: retirada da camada externa do caule (A); Janela com antioxidante (B).

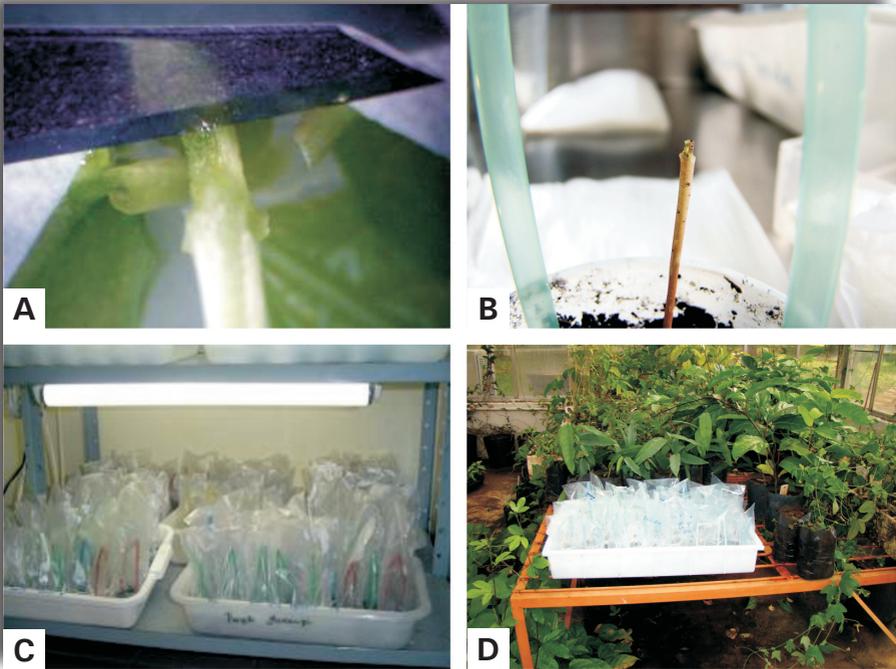
Com o auxílio de um estereomicroscópio e uma agulha de seringa plástica, procede-se a retirada do ápice caulinar, constituído pelo meristema apical, com dois a quatro primórdios foliares e com aproximadamente 0,2 mm a 0,4 mm de comprimento (Fig. 7 A). O ápice deve ser transportado utilizando-se a agulha (Fig. 7 B) e depositado na base da abertura, com a base dos tecidos do ápice em contato com o córtex do porta-enxerto (Fig. 7 C). Após esses procedimentos, pode-se aplicar sobre a microenxertia o meio de cultura composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionados de 3 % de sacarose; 10 mg L<sup>-1</sup> de tiamina; 1 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina; 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol; 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, com pH ajustado para 5,8. O meio de cultura deve ser aplicado com auxílio de uma seringa plástica, de modo a preencher a abertura e cobrir o ápice.



**Fig. 7.** Etapas da microenxertia: desbaste do ápice caulinar (A); ápice maracujá isolado (B) e enxertado no porta-enxerto (C).

Após a aplicação do meio de cultura, realiza-se o corte do caule do porta-enxerto, imediatamente acima da abertura da microenxertia,

com auxílio de um bisturi (Fig. 8 A). As plantas microenxertadas devem ser protegidas com um canudo dobrado e cobertas por um saco plástico de polietileno com a finalidade de manutenção de alta umidade (Fig. 8 B) e mantidas em câmara de crescimento sob temperatura natural e fotoperíodo de 16 horas de luz, com nível de irradiância de  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ou em casa de vegetação (Fig. 8 C e D).



**Fig. 8.** Etapas da microenxertia: decapitação do caule de maracujazeiro-azedo realizado com bisturi acima do ponto da microenxertia (A); microenxerto protegido por canudo e plástico (B); cultivo de plantas microenxertadas de maracujazeiro-azedo em câmara de crescimento com iluminação artificial (C) ou casa de vegetação (D).

Uma semana após a microenxertia, as plantas devem ser avaliadas quanto ao pegamento da enxertia, ao desenvolvimento do ápice microenxertado, à presença de brotações e contaminações e às características dos tecidos envolvidos. Os dados devem ser digitados em uma tabela (Anexo 1), utilizando-se um índice (Anexo 2). Após as avaliações das brotações, as gemas e brotações adventícias, quando

presentes, devem ser excisadas, com auxílio de um bisturi para não comprometer o desenvolvimento do microenxerto. Essa avaliação é repetida 15 dias após a microenxertia. Aos 30 dias da microenxertia, as plantas devem ser avaliadas em relação ao percentual de pegamento. Como indicativo de pegamento é considerado a presença de folhas expandidas decorrentes do desenvolvimento do ápice (Anexo 3).

As microenxertias viáveis devem ser retiradas das embalagens plásticas de polietileno e mantidas na câmara clara para aclimação à condição ambiente (Fig. 9 A). Aos 45 dias, elas devem ser transferidas para copos plásticos de 200 mL contendo substrato comercial para produção de mudas e encaminhadas para casa de vegetação com isolamento contra insetos (Fig. 9B). Aos 80 a 100 dias após as microenxertias, as mudas obtidas devem ser indexadas para o vírus CABMV. A indexação pode ser realizada por testes de ELISA ou por RT-PCR.



Fig. 9. Plantas de maracujazeiro-azedo aos 30 dias (A) e aos 90 dias após a microenxertia (B).

Trabalhos iniciais realizados com maracujazeiro-azedo têm evidenciado taxa de pegamento média de 27 %, quando a microenxertia é realizada no hipocótilo, e de 32 %, quando realizada no epicótilo. Apesar do maior pegamento, a microenxertia realizada no epicótilo é mais difícil de ser executada e proporciona maior incidência de brotações adventícias (RIBEIRO et al., 2008). A adição de meio de cultura em microenxertos realizados no epicótilo aumentou a taxa de pegamento para 53 % (RIBEIRO et al., 2008).

Estudos realizados com as cultivares Vermelho Redondo, CPGA e CPMR da Embrapa Cerrados demonstraram uma taxa de pegamento variando entre 30 % e 50%, sem a utilização de meio de cultura no enxerto e com a transferência dos enxertos para casa de vegetação. O procedimento foi realizado por diferentes técnicos e pesquisadores, demonstrando que a destreza do executor pode afetar diretamente a taxa de pegamento dos enxertos.

## Considerações Finais

A indexação por Elisa demonstrou que a taxa de eliminação de vírus foi superior a 90 % com a utilização da técnica. Assim, essa metodologia pode ser utilizada para limpeza clonal de genótipos elite, que posteriormente poderão ser propagados por estaquia para multiplicação massal e restauração dos campos experimentais ou mesmo comerciais.

A técnica é altamente viável para a limpeza clonal do maracujá, mas é necessário um bom treinamento dos técnicos, pesquisadores e estudantes, pois destreza de manipulação do executor afeta o percentual de pegamento.

## Referências

AGRIANUAL: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. p. 394-395.

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

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

BARBOSA, C. J.; SANTOS FILHO, H. P. Endurecimento dos frutos do maracujazeiro. 2005. Disponível em: <[http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=10925](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=10925)>. Acesso em: 17 jun. 2009.

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

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

D'ONGHIA, A. M.; CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; DJELOUAH, K.; MARTLLI, G. P. Elimination of citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. **Plant Pathology**, v. 50, p. 266–269, 2001.

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

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

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

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

FITCH, M. M. M.; LEHRER, A. T.; KOMOR, E.; MOORE, P. H. Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue immunoassay. **Plant Pathology**, v. 50, p. 676-680, 2001.

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

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=10&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 21 maio 2008.

JAIN, S. M.; PEHU, E. The prospects of tissue-culture and genetic-engineering for strawberry improvement. **Acta Horticulturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science**, Toyen, v. 42, p. 133-139, 1992.

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

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

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

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

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

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

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

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

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

NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Viena, v. 161, p. 21-34, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RIBEIRO, L. M.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, S. R. M.; FONSECA, R. S.; VIEIRA, L. M.; PEREIRA, W. V. S. Microenxertia *ex vitro* para eliminação do vírus CAMBV em maracujazeiro. **Pesquisa Brasileira Agropecuária**, Brasília, v. 43, p. 589-594, 2008.

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

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

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. dos; BARBOSA, C. de J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: produção**

e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-280.

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

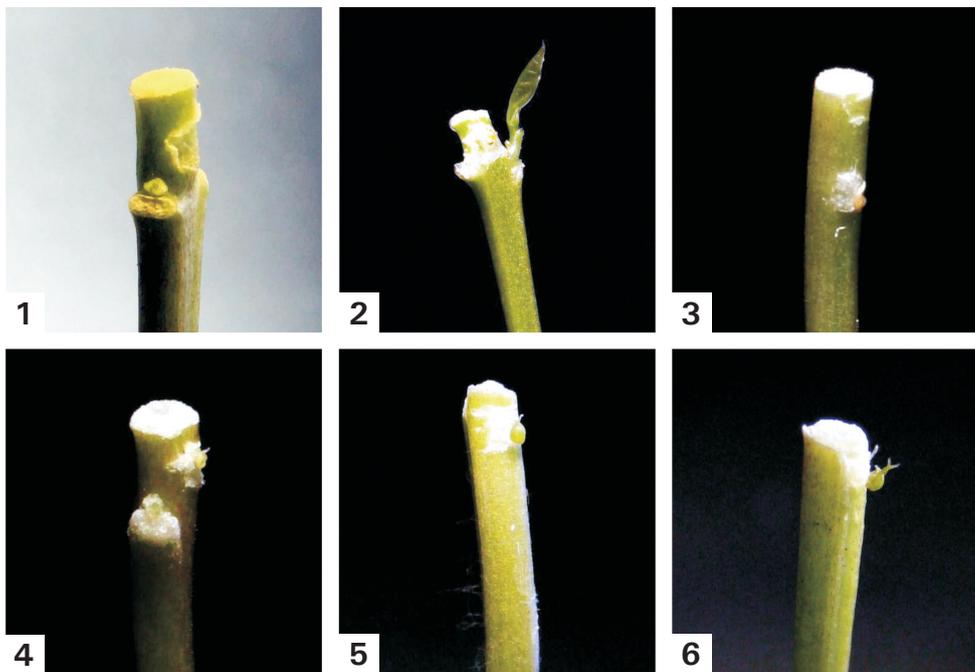
SUAREZ, I. E.; SCHNELL, R. A.; KUHN, D. N.; LITZ, R. E. Micrografting of ASBVd-infected Avocado (*Persea americana*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v. 80, p. 179-185, 2005.

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

WANG, G.; HONG, N.; ZHANG, Z.; DONG, Y.; YUE, G.; YANG, Z. On the techniques for obtaining virus-free mother trees of apple. **Scientia Agricultura Sinica**, China, v. 29, p. 41-48, 1996.

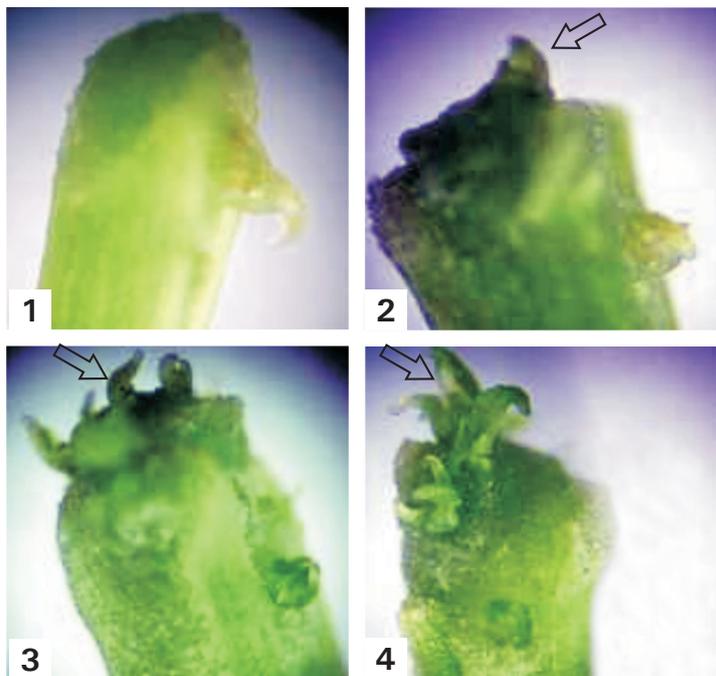


## Anexo 2



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

## Anexo 3



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

# Micrografting *ex vitro* Seeking to the Elimination of Virus in Passion Fruit Plant

---

## Abstract

*Protocols are commonly used to produce virus free plants in different vegetative plant species, such as, citrus, strawberry, apple and sugar cane. This paper aims to describe each step involved in cleaning passion fruit plants using ex vitro micrografting. The methodology was developed by Unimontes in partnership with Embrapa Cerrados and the Univerity of Brasília. The protocols were successfully used to clean Embrapa and UnB cultivars. Shoot apices were superficially cleaned and inserted in 30 days old seedlings. Micrografting was performed on the hypocotyl and epicotyls. The average rate of micrografted plants showing expanded leaves ranged from 27.22 % to 50 % after 30 days. The indexing performed by the indirect ELISA or RT-PCR, within 80 to 100 days after micrografting, revealed that over 90 % of the plants tested presented no detectable virus.*

*Index terms: Cowpea aphid-borne mosaic virus, CABMV, Passion fruit woodiness vírus, PWV, woodiness fruit, grafting spot.*