

**Estudos Preliminares para o Uso de Termoterapia ex vitro em Maracujazeiro-Azedo visando à Eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos-frutos**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 267***

## **Estudos Preliminares para o Uso de Termoterapia ex vitro em Maracujazeiro-Azedo Visando à Eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos- frutos**

*Solange Rocha Monteiro de Andrade  
Lia Padilha Fonseca  
Marília Santos Silva  
Fábio Gelape Faleiro  
Nilton Tadeu Vilela Junqueira*

Embrapa Cerrados  
Planaltina, DF  
2010

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: *Paloma Guimarães Correa de Oliveira*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Foto(s) da capa: *Fábio Gelape Faleiro*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

*Alexandre Moreira Veloso*

**1ª edição**

1ª impressão (2010): tiragem 100 exemplares

Edição online (2010)

**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**

---

E81 Estudos preliminares para o uso de termoterapia ex vitro em maracujazeiro-azedo visando à eliminação de vírus-do-endurecimento-dos-frutos / Solange Rocha Monteiro de Andrade... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.

18 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X, ISSN online 2176-509X ; 267).

1. Maracujá. 2. Tratamento térmico. I. Andrade, Solange Rocha Monteiro de. II. Série.

641.344 25 - CDD 21

© Embrapa 2010

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract.....	6
Introdução .....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	10
Conclusões.....	13
Referências .....	14

# Estudos Preliminares para o Uso de Termoterapia ex vitro em Maracujazeiro-Azedo Visando à Eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos-frutos<sup>1</sup>

*Solange Rocha Monteiro de Andrade<sup>2</sup>; Lia Padilha Fonseca<sup>3</sup>; Marília Santos Silva<sup>4</sup>; Fábio Gelape Faleiro<sup>5</sup>; Nilton Tadeu Vilela Junqueira<sup>6</sup>*

## Resumo

O vírus-do-endurecimento-dos-frutos é o principal agente etiológico que ataca as plantações de maracujazeiro-azedo no Brasil. Os progenitores dos híbridos de maracujazeiro-azedo, BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho, apresentam evidentes sintomas da virose causada por esse vírus, o que afeta a longevidade e diminui a produção de sementes, podendo até levar à perda total desse material genético. Este trabalho objetivou efetuar a limpeza clonal desses progenitores por meio da submissão das mudas à termoterapia, à temperatura na faixa de 35 °C a 45 °C por 40 dias; utilizaram-se mudas de 100 dias, propagadas por estaquia. O material tratado foi indexado utilizando a metodologia de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Houve diminuição da concentração viral em todos materiais testados e provável limpeza clonal dos genótipos CPMSC1 e do CPGA2, concluindo-se que a técnica é eficiente para diminuir a quantidade de inóculo do vírus na planta; no entanto são necessários estudos posteriores dos materiais propagados para avaliar se houve a completa eliminação do vírus.

Termos para indexação: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), limpeza clonal, termoterapia.

<sup>1</sup> Apoio Financeiro: Embrapa, CNPq/PIBIC

<sup>2</sup> Bióloga, D.Sc., pesquisadora da Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

<sup>3</sup> Graduanda da UnB, bolsista PIBIC da Embrapa Cerrados, liapadilha.liapadilha@gmail.com

<sup>4</sup> Engenheira Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Cerrados, marilia@cpac.embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, ffaleiro@cpac.embrapa.br

<sup>6</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, junqueira@cpac.embrapa.br

# Use of ex vitro Thermotherapy in Passion Fruit for the Elimination of Passion Fruit Woodiness Virus

---

## Abstract

*The Passion fruit woodiness virus is the main agent that attacks the passion fruit plantations in Brazil. The parents of the hybrids of passion fruits cultivars BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho show symptoms of viral disease caused by this virus, which affects the longevity and reduces seed production and may even lead to total loss of this genetic material. This study was aimed to obtain the virus free plants of these progenitors by the submission of the plants to thermotherapy. We used thermal treatment at temperatures ranging from 35 to 45 ° C for 40 days. We worked with 100 days seedlings, propagated by cuttings. This treated material was indexed using the method of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). There was a decrease of virus concentration in all tested materials and genotypes CPMSC1 and CPGA2 were effectively, concluding that the technique is efficient in decreasing the amount of virus inoculum in the plant. However, further studies are necessary with other cultivars; and to evaluate whether there was complete elimination of the virus in genotype CPMSC1 and CPGA2.*

*Index terms: **Passiflora edulis** f. **flavicarpa** Cowpea aphid-borne mosaic Virus (CABMV), Passion fruit woodiness virus (PWV) virus free plants, thermotherapy.*

## Introdução

O maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) representa 95% dos pomares comerciais de passifloras, sendo cultivado em quase todo o território nacional, destacando-se como principais produtores os estados da Bahia, Sergipe, São Paulo, Pará e Minas Gerais. A produção de maracujá-azedo cresceu cerca de 40% de 2004 a 2008, saindo de 490.000 t para 685.000 t. Porém, segundo dados do IBGE (2010), a produtividade da cultura do maracujazeiro não tem seguido o ritmo de alta da área, estando estagnada nos mesmos patamares desde o início da década de 1990, em torno de 14 t/ha/ano. Essa produtividade é muito baixa, considerando o potencial da cultura que é superior a 50 ton/ha/ano (FALEIRO et al., 2008). Entre outros fatores, as várias moléstias que afetam a cultura e a inexistência de cultivares resistentes são apontadas como as causas mais significativas para essa baixa produtividade (FALEIRO et al., 2005).

Nesse contexto, a Embrapa Cerrados e seus parceiros lançaram, no primeiro semestre de 2008, os híbridos de maracujazeiro-azedo BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho, que apresentam maior produtividade e resistência a patógenos que as cultivares atualmente utilizadas no Cerrado. No entanto, os genitores desses materiais vêm sendo conservados em campo na coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, e propagados assexuadamente por mais de uma década. A propagação assexuada é utilizada na manutenção de material de plantio, pois mantém a identidade genética e as características varietais do material a ser propagado e utilizado na produção dos híbridos. Assim, esses genitores apresentam evidentes sintomas da virose causada pelo vírus-do-endurecimento-dos-frutos, que diminuem a longevidade, a produção de sementes, podendo levar à perda total desse material genético.

A virose-do-endurecimento-dos-frutos é uma das doenças mais importantes da cultura do maracujá-azedo. Essa virose tem se disseminado por todo o país e na maioria das regiões produtoras,

causando sérios problemas à produtividade e à qualidade dos frutos (ANJOS et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006). Nascimento et al. (2006) realizaram estudo com amostras provenientes de sete estados brasileiros e no Distrito Federal. Os autores isolaram o vírus de diversas amostras de folhas de maracujazeiro-azedo que apresentavam sintomas da doença-do-endurecimento-dos-frutos. Todos os isolados infectaram caupi que é considerado como não hospedeiro de PWV (*Passion Woodiness Virus*). Além disso, o teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent assay) indicou que todos os isolados eram relacionados entre si e também com CABMV (*Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus*). As sequências completas das proteínas dos capsídeos foram determinadas e comparadas, indicando uma alta relação com o CABMV. A análise filogenética indicou que os isolados representam um grupo monofilético claramente distinto do PWV e correspondente ao CABMV; por fim os autores determinaram que o agente causal da virose-do-endurecimento-do-fruto no Brasil é o CABMV, e que ainda é necessário comprovar a existência do PWV no país.

Segundo Nascimento et al. (2006), o CABMV, assim como o PWV, é um típico potyvirus, espécie cuja forma de transmissão é não circular em quase todas espécies de afídeos. Suas partículas são flexíveis com 690 nm a 760 nm de comprimento e 11 nm a 16 nm de diâmetro e seus genomas são compostos por uma única fita simples positiva de RNA de aproximadamente 10.000 nucleotídeos.

O processo de limpeza clonal é utilizado para várias espécies vegetais de propagação vegetativa, como citrus (D'ONGHIA et al., 2001), maçã (WANG et al., 2006), morango (PALONEN; LINDEN, 2001), abacate (SUAREZ et al., 2005), cana-de-açúcar (FITCH et al., 2001), entre outras, para eliminar patógenos de material propagado vegetativamente. O objetivo é produzir mudas saudáveis, livres de doenças – principalmente vírus – que possam ser mais produtivas e tenham maior longevidade no campo, e que possam ser distribuídas a viveiristas, como matrizes, sem o risco de disseminação de patógenos

para outras regiões onde ainda não ocorrem. Existem diversos métodos visando à eliminação de vírus, sendo os mais comuns a cultura de ápices caulinares, microenxertia, termoterapia, quimioterapia, crioterapia ou a combinação desses (HANWEG, 1999).

Segundo Zandbergen, citado por Nyland (1969), o calor como agente terapêutico era utilizado há mais de 150 anos pelos jardineiros, que tratavam os bulbos em água quente antes de transplantá-los. Porém, Kristensen, citado por Nyland (1969), afirmou que os benefícios da termoterapia passaram a ser conhecidos após o trabalho de Jensen e Wilbrinsk, sugerindo que esse trabalho provavelmente influenciou a utilização de termoterapia para controle de vírus em cana-de-açúcar (NYLAND, 1969). A técnica consiste na exposição de plantas ou partes delas a temperaturas elevadas (34 °C a 45 °C) por um período determinado, sendo que alguns pesquisadores utilizam calor seco, como, por exemplo, estufas, casas de vegetação ou câmaras de crescimento, e outros trabalham com imersão em água aquecida. O primeiro relato de sucesso foi de Kassanis, em 1950, que obteve batatas livres do vírus-do-enrolamento-das-folhas. A partir desse momento, a técnica foi utilizada como único tratamento ou em associação com outras técnicas, como cultura de tecidos ou microenxertia, para aumentar a eficiência da recuperação de plantas livres de vírus (TORRES et al., 1998).

Os progenitores dos híbridos de maracujazeiro-azedo, BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho, vêm sendo conservados e propagados assexuadamente por mais de uma década e apresentam evidentes sintomas da virose causada por esse vírus, o que afeta a longevidade e diminui a produção de sementes, podendo até levar à perda total desse material genético. Este trabalho objetivou efetuar a limpeza clonal desses progenitores por meio da submissão das mudas à termoterapia. Utilizou-se termoterapia, à temperatura na faixa de 35°C a 45°C. Utilizaram-se mudas de 100 dias, propagadas por estaquia, e testaram-se os progenitores: CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, CPMR1, CPF1SSBR.

## Material e Métodos

### Material vegetal

As estacas apresentando sintomas do vírus *CABMV* foram coletadas a partir de plantas dos genitores CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, CPMR1, CPF1SSBR mantidas no campo experimental da Embrapa Cerrados. Em seguida, foram transferidas para sacos plásticos e enviadas para a Estação Experimental Biológica da Universidade de Brasília. Estacas de 3 a 4 nós e apenas uma folha foram imersas em gel enraizador e plantadas em bandejas de poliestireno e mantidas sob nebulização intermitente durante 35 dias. Ao vigésimo dia, foram lançados na superfície duas gramas por célula do adubo Osmocote<sup>R</sup> (14:14:14). Dois meses após, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos (20 cm x 25 cm) com 2/3 de substrato convencional, com terra na base inferior, e 1/3 de Plantmax HT, na parte superior, e transferidas para casa de vegetação na Embrapa Cerrados (Figura 1).



Foto: Lia Padilha Fonseca

Figura 1. Mudanças dos genitores antes do tratamento.

### Experimento da termoterapia

O experimento foi instalado em casa de vegetação, utilizando dez campânulas de madeira (140 cm x 25 cm x 25 cm), cada uma revestida com tela antiáfideo e plástico preto, contendo uma lâmpada incandescente de 100 W para manter a temperatura interna na faixa de

35 °C a 45 °C. Cada campânula continha uma muda de 100 dias em seu interior, que foram mantidas em tratamento por 40 dias (Figura 2). A determinação da infecção do vírus-do-endurecimento-dos-frutos foi baseada primeiramente na manifestação de sintomas e posteriormente por RT-PCR.



Foto: Lia Padilha Fonseca

Figura 2. (A) Campânula vista no seu interior; (B) Campânulas vistas de fora.

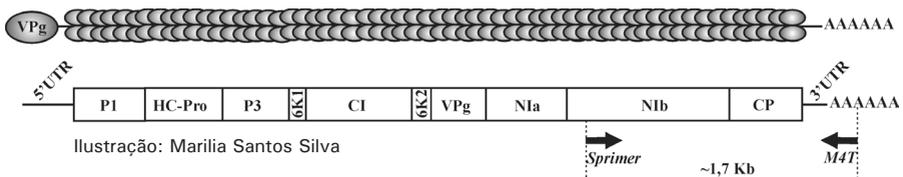
## Avaliação visual

As avaliações visuais foram baseadas no aspecto das folhas, uma vez que todas as matrizes doadoras apresentavam sintomas da doença. Para análise visual, consideramos que a planta estava infectada quando apresentavam os seguintes sintomas de presença do vírus: folhas apresentando manchas amarelas em forma de anéis, mosqueamento e rugosidade, embolhamento ou distorção; internódios curtos e redução do porte das plantas infectadas (ANJOS et al., 2001). Coletamos folhas com sintomas e sem sintomas para realizar a detecção do vírus por transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia (RT-PCR).

## Detecção da presença do vírus por RT-PCR

Para a detecção do vírus, foi utilizada a técnica de transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia (RT-PCR). O RNA foi extraído pelo método de tiocianato de guanidina, conforme metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi et al. (1987). Utilizaram-se 10µm dos

primers universais M4 10  $\mu$ mT (5' GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)15 3') e Sprimer 10  $\mu$ m,(5' GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC 3', X = A, G, C ou T; Y = T ou C; Z = A ou G) para a detecção de potyvírus (CHEN et al., 2001), gênero viral a qual pertence o CABMV, vírus-do-endurecimento-do-fruto. A indexação foi realizada em cada um dos exemplares das cinco matrizes submetidas à limpeza clonal, e, para efeito de comparação, as amostras de folhas com e sem sintomas da doença foram coletadas antes e depois do tratamento da termoterapia. Utilizaram-se como controle negativo folhas de maracujá-amarelo do genótipo CPMGA1, propagado por semente, pois o vírus não é transmitido via semente. A identificação do fragmento de RT-PCR amplificado, de tamanho esperado de 1,7 Kb (Figura 3), foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2% e coloração com brometo de etídio 05  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Representação esquemática da partícula de potyvírus (acima), mostrando o RNA viral, de aproximadamente 9,7 Kb, protegido por unidades de proteínas da capa proteica (CP), a proteína viral VPg na extremidade 5' e a cauda poli-A na extremidade 3' do RNA viral. Representação esquemática do genoma de potyvírus (abaixo) mostrando as extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTR = "Untranslated Region"), os genes codantes das proteínas virais P1, HC-Pro ("Helper Component-Proteinase"), P3, 6K2, CI ("Cytoplasmic Inclusion"), 6K2, VPg, NIa, NIB ("Nuclear Inclusion" a e b) e CP ("Coat Protein"). Os primers universais para detecção de potyvírus, Sprimer e M4T (abaixo), amplificam um fragmento de aproximadamente 1,7 Kb, compreendendo parte do gene NIB, o gene integral da CP, a 3'UTR e parte da cauda poli-A.

Fonte: Adaptada de Yamamoto; Fuji (2008). p. 98.

A primeira coleta foi realizada no viveiro, três dias antes de as mudas apresentando sintomas da doença serem transferidas às campânulas na casa de vegetação. Essas amostras foram retiradas das folhas mais sintomáticas do vírus. A segunda coleta foi feita 40 dias após o início do tratamento da termoterapia, na casa de vegetação, retiradas das

novas folhas (de aproximadamente 30 dias), que não apresentavam sintomas do vírus.

## Resultados e Discussão

### Detecção visual da presença do vírus

Aproximadamente, a partir da primeira semana de tratamento, foram observados novos brotos nascendo do ápice caulinar. As folhas geradas desses brotos não apresentaram o sintoma de mosaico-do-vírus (Figura 4 B, D e F). No entanto, as folhas mais velhas da parte inferior da muda permaneceram com o sintoma do mosaico, embora não tenham apresentado sintomas de ressecamento ou oxidação (Figura 4 A, C e E). Embora a termoterapia para limpeza clonal vegetal seja principalmente utilizada com outras técnicas, também são comuns relatos de obtenção de mudas livres de patógenos após o tratamento térmico. Viveiristas produtores de cravo no sul da França submetem as plantas ao tratamento de 40 °C durante 1 mês em casa de vegetação para produção de mudas saudáveis (NYLAND, 1969). Estudos desenvolvidos para limpeza clonal de Damasco demonstraram que o tratamento de mudas por 45 dias com 16 horas de fotoperíodo a 37 °C na luz e 35 °C no escuro foi suficiente para obter plântulas livres de vírus (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ; 2009). A vantagem dessa metodologia, além de ser mais barata, é que apresenta maior índice de sobrevivência após o tratamento (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ; 2009).

As hipóteses sobre o efeito da termoterapia conjecturam que a replicação do vírus é inibida em temperaturas subletais para a planta, porém a atividade metabólica do vírus é destruída em temperaturas acima de 40°C, no entanto a planta hospedeira consegue se recuperar (NYLAND, 1969). Por outro lado, alguns autores consideram que ocorre uma redução da movimentação das partículas virais na planta infectada (NYLAND, 1969). Mas atualmente, pesquisadores avaliam a hipótese de que a termoterapia altera a translocação do vírus, diminuindo a infecção das brotações desenvolvidas durante o tratamento, seja por meio do silenciamento de RNA seja por afetar a relação planta-vírus (PANATTONI, 2010; VALERO et al., 2003; RAMÍREZ-MALAGÓN, et al., 2006)

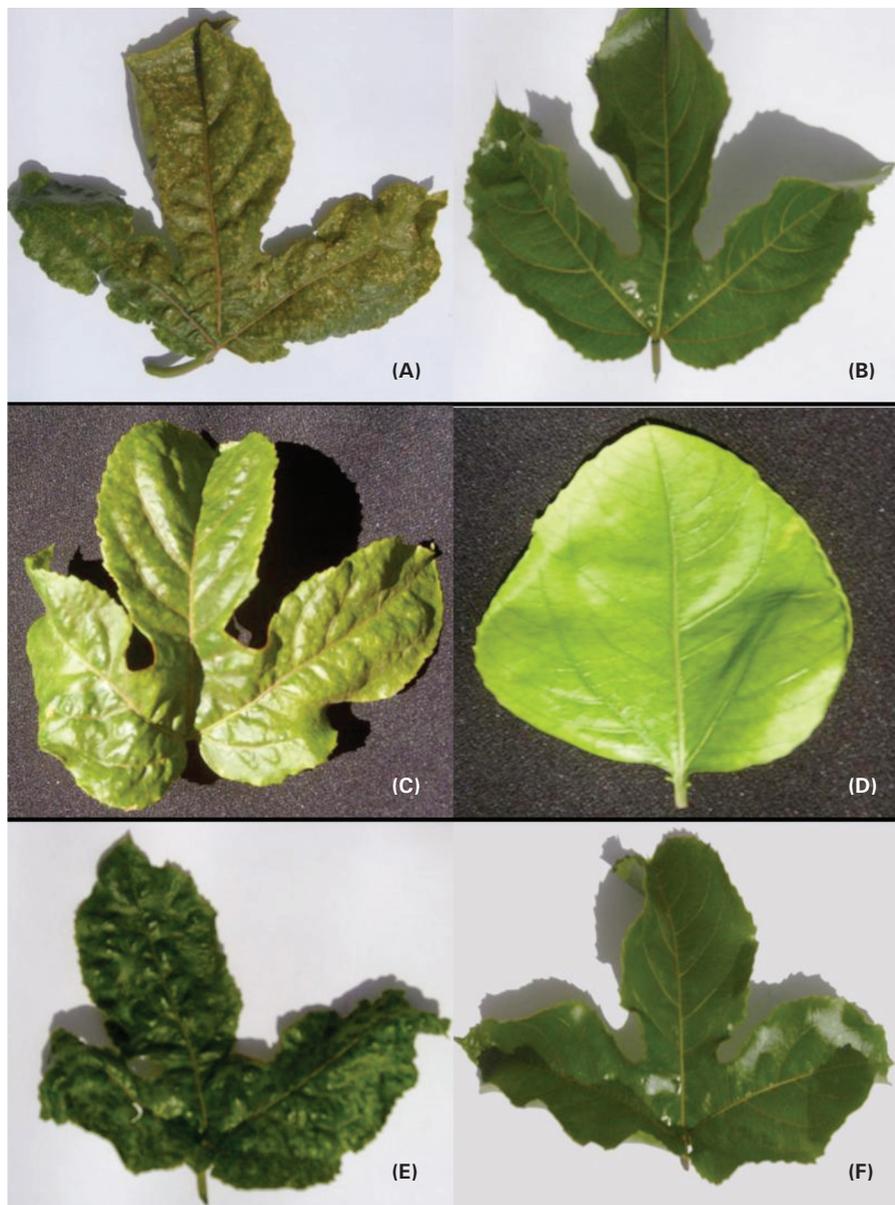


Foto: Lia Padilha Fonseca

**Figura 4.** (A) CPF1SSBR; (B) CPF1SSBR 40 dias após termoterapia; (C) CPGA; (D) CPGA 40 dias após termoterapia; (E) CPMGA-2; (F) CPMGA-2 40 dias após termoterapia.

## Detecção da presença do vírus por RT-PCR

Amostras dos genitores sintomáticos doadores das estacas para o tratamento térmico apresentaram fragmento amplificado de aproximadamente 1.700 pb (Figura 5 – 1 a 5). Chen et al. (2001) observaram um fragmento de 1750 pb amplificado por RT-PCR a partir de folhas de caupi infectado por CABMV e utilizando os mesmos primers. Por outro lado, amostras das folhas de CPGA, CPMR e CPF1SSBR após o tratamento de termoterapia apresentaram um fragmento significativamente menos intenso (Figura 5 – 7, 9 e 10), o que pode indicar uma diminuição na quantidade do inóculo do vírus pela termoterapia, apesar da limpeza clonal não ter sido totalmente efetiva. Nenhum fragmento correspondente a *Potyvirus* foi detectado a partir das amostras de CPMSC1 e de CPMGA2 após tratamento de termoterapia (Figura 5 – 6 e 8), o que indica que o tratamento foi efetivo para eliminar o vírus contaminante. Esses resultados divergentes na concentração de vírus das matrizes doadoras após o tratamento podem estar relacionados ao grau de infecção das plantas hospedeiras, bem como à temperatura utilizada, tempo de tratamento e tamanho dos brotos no início do tratamento (NYLAND, 1969). Resultados similares têm sido descritos por diversos autores (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ; 2009).

Assim, para garantir a limpeza clonal das matrizes, deve-se aprimorar os tratamentos de termoterapia estudando-se o efeito do tamanho e idade das estacas, tempo de exposição e temperatura. Além disso, deve-se avaliar a eficácia da termoterapia associada a outras técnicas, como a enxertia dos ápices caulinares das plantas tratadas ou propagação de estacas das mudas tratadas por estaquia. Também podemos associar a metodologia às técnicas de propagação de meristemas ou ápices caulinares para multiplicação dos brotos. Após o desenvolvimento das mudas, deve ser feita nova indexação para confirmar a efetiva limpeza clonal dessas plantas, bem como monitorar manifestação de sintomas e efetuar RT-PCR quantitativa (RT-PCR em tempo real) para quantificarmos a presença do vírus.

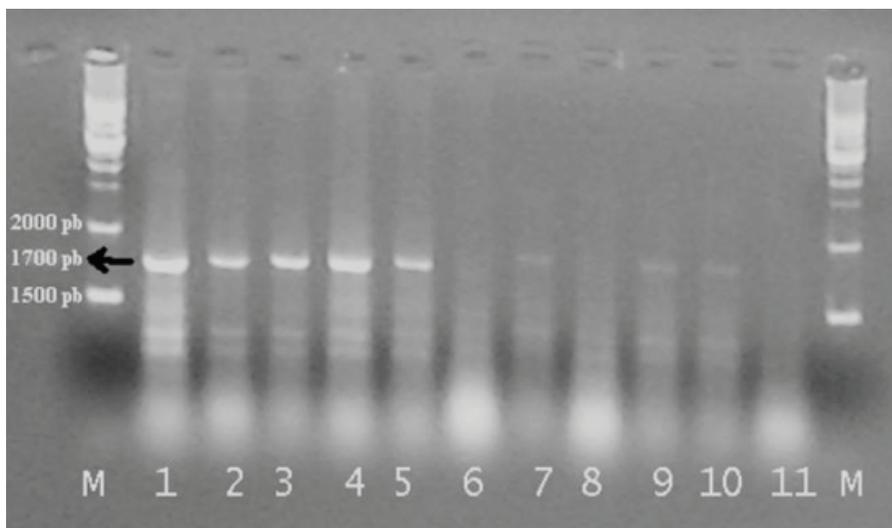


Foto: Aline Rabello

**Figura 5.** RT-PCR para detecção de potyvírus. (M) marcador de peso molecular; (1) folha sintomática de CPMSC; (2) folha sintomática de CPGA; (3) folha sintomática CPMGA-2; (4) folha sintomática CPMR; (5) folha sintomática CPS1SSBR; (6) folha de CPMSC 40 dias após o tratamento; (7) folha de CPGA 40 dias após o tratamento; (8) folha de CPMGA-2 40 dias após o tratamento; (9) folha de CPMA 40 dias após o tratamento; (10) folha de CPF1SSBR 40 dias após o tratamento; (11) controle negativo da presença de vírus, de folha de CPMGA-2 propagado por semente (livre de vírus). Seta indica fragmento correspondente à amplificação de potyvírus (1700 pb).

## Conclusões

Os tratamentos de termoterapia ex vitro aplicados aos genótipos CPMSC1 e CPMGA2 resultaram em provável limpeza clonal de "*Cowpea aphid-borne mosaic virus*" (CABMV) nos novos tecidos formados.

Os tratamentos de termoterapia ex vitro aplicados aos genótipos CPMR1, CPGA1 e CPF1SSBR parecem ser promissores para limpeza clonal nos novos tecidos formados.

A termoterapia aplicada em mudas bem desenvolvidas, ex vitro, é uma alternativa metodológica, provavelmente mais simples e mais barata que a termoterapia associada a técnicas de cultura de tecidos.

## Referências

- ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CHARCHAR, M. J. A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro do cerrado do Brasil Central**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 17 p.
- CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M. J. A universal PCR primer to detect members of *Potyviriidae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of virology**, v. 146, p. 757-766. 2001.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159. 1997.
- D'ONGHIA, A. M.; CARIMI, F.; PASQUALE, F.; DJELOUAH, K.; MARTELLI, G.P. Elimination of *Citrus Psorosis virus* by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. **Plant Pathology**, v. 50, p. 266-269, 2001.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Pesquisa e desenvolvimento do maracujá**. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, R. C.; (Ed.). *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília, DF: Embrapa, 2008. p. 411-416
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Coord.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 677 p.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Pesquisa e desenvolvimento do maracujá**. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, R. C.; (Ed.). *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília, DF: Embrapa, 2008. p. 411-416
- FITCH, M. M. M.; LEHER, A. T.; KOMOR, E.; MOORE, P. H. Elimination of sugarcane yellow leaf virus from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. **Plant Pathology**, v. 50, p. 676-680, 2001.
- HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. **Neltropica Bulletin**, n. 304, p. 7-8, 1999.
- IBGE. **Banco de dados agregados: sistema de recuperação automática: SIDRA**. Disponível em: em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=10&u1=1&u2=1&>>. Acesso em: 28 jul. 2008.
- KASSANIS, B. Heat inactivation of leaf-roll virus in potato tubers, **Annals of Applied Biology**, v. 37, p. 339-341, 1950.
- KRIZAN, B.; ONDRUSIKOVA, E. Thermotherapy of apricot cultivars. **Acta Horticulture**, v. 839, p. 269-274, 2009.
- NASCIMENTO, A. V. S.; SOUZA, A. R. R.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO M. G.; ZERBINI, F. MURILO. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, v. 161, p. 21-34, 2006.

NYLAND, G.; GOHEEN, A. C. Heat therapy of vírus diseases of perennial plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 7, p. 331-354, 1969.

PALONEN, P.; LINDEN, L. Winter hardiness of micropropagated and conventionally propagated strawberry plants. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 685-690, 2001.

PANATTONI, A.; TRIOLO, E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 63-67, 2010.

RAMIREZ-MALAGON, R.; PEREZ-MORENOM L.; BORODANENKO, A.; SALINAS-GONZÁLEZ, G. J.; OCHOA-ALEJO, N. Differential organ infection studies potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 103-110, 2006.

SUAREZ, I. E.; SCHNELL, R. A.; KUHN, D. N.; LITZ, R. E. Micrografting os 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.

VALERO, M.; IBANÉZ, A.; MORTE, A. Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated vírus elimination from *Vitis vinifera* L. Cv. Napoleon tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p. 289-296, 2003.

WANG, L. P.; WANG, G. P.; HONG, N.; TANG, R. R.; DENG, X. Y.; ZHANG, H. Effect os thermotherapy on elimination os apple stem grooving virus and apple chlorotic leaf spot virus for in vitro for in vitro pear shoot tips. **Hostscience**, v. 41, p. 729-732, 2006.

YAMAMOTO, H.; FUJI, S. -I. Rapid determination of the nucleotide sequences of potyviral coat protein genes using semi-nested RT-PCR with universal primers. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 97-100, 2008.

**Embrapa**

---

*Cerrados*

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

