

**Limpeza Clonal de Maracujá  
por Microenxertia ex vitro  
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 279***

## **Limpeza Clonal de Maracujá por Microenxertia ex vitro Visando à Eliminação de Vírus- do-endurecimento-dos-frutos**

*Solange Rocha Monteiro de Andrade  
Leonardo Monteiro Ribeiro  
Lorena Melo Vieira  
Wilson Vicente Souza Pereira  
Cláudia Martellet Fogaça  
Sara Dantas Rosa  
Fábio Gelape Faleiro  
Marília Santos Silva  
Nilton Tadeu Vilela Junqueira*

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: *Nilton Junqueira*

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**

---

L734 Limpeza clonal de maracujá por microenxertia ex vitro visando à eliminação de vírus-do-endurecimento-dos- frutos / Solange Rocha Monteiro... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.

29 p. — (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X, ISSN online 2176-509X ; 279).

1. Maracujá. 2. Genética vegetal. I. Monteiro, Solange Rocha. II. Série.

---

634.42 - CDD 21

© Embrapa 2010

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão.....	15
Conclusões.....	25
Referências .....	25

# Limpeza Clonal de Maracujá por Microenxertia ex vitro Visando à Eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos-frutos

*Solange Rocha Monteiro de Andrade<sup>1</sup>; Leonardo Monteiro Ribeiro<sup>2</sup>; Lorena Melo Vieira<sup>3</sup>; Wilson Vicente Souza Pereira<sup>4</sup>; Lays Araujo Nery<sup>5</sup>; Cláudia Martellet Fogaça<sup>6</sup>; Sara Dantas Rosa<sup>7</sup>; Fábio Gelape Faleiro<sup>8</sup>; Marília Santos Silva<sup>9</sup>; Nilton Tadeu Vilela Junqueira<sup>10</sup>*

## Resumo

O presente trabalho utilizou a técnica microenxertia ex vitro, visando obter mudas livres do vírus do endurecimento dos frutos. Foram realizadas avaliações sobre o efeito do local de micro-enxertia associada ao estádio de porta-enxerto, do uso de fungicidas e adjuvantes no pegamento e estudos sobre a limpeza clonal de acessos da Embrapa Cerrados. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento do porta-enxerto. As microenxertias realizadas na região mediana do hipocótilo tiveram índice de pegamento de 25,33%, enquanto as realizadas na região do epicótilo tiveram 16% de pegamento. Na região do epicótilo as microenxertias apresentaram maior brotamento apical. Avaliações anatômicas demonstraram o efeito do local, do estádio de desenvolvimento dos porta-enxertos e da interação entre os fatores em todas as variáveis analisadas. Não houve efeito da concentração de fungicida no pegamento da microenxertia. As avaliações preliminares por RT-PCR dos acessos estudados indicaram 100% de limpeza dos microenxertos obtidos. Embora a técnica tenha demonstrado eficiência para a limpeza clonal, são necessários maiores estudos para aplicação em outros materiais.

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

<sup>1</sup> Bióloga, D.Sc., pesquisadora da Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, professor da Universidade Estadual de Montes Claros, leomrib@hotmail.com

<sup>3</sup> Bolsista de iniciação científica da FAPEMIG, graduanda da Universidade Estadual de Montes Claros, lorenamelovieira@hotmail.com

<sup>4</sup> Bolsista de iniciação científica da FAPEMIG, graduanda da Universidade Estadual de Montes Claros, wvicentes@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Bolsista de iniciação científica da FAPEMIG, graduanda da Universidade Estadual de Montes Claros, laysnery@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Bióloga, D.Sc., bolsista da Embrapa Cerrados do CNPq, claudia.fogaca@cpac.embrapa.br

<sup>7</sup> Bolsista de PIBIC da Embrapa Cerrados, graduanda da Universidade de Brasília, saradantas@agronoma.eng.br

<sup>8</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, ffaleiro@cpac.embrapa.br

<sup>9</sup> Engenheira Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Cerrados, marilia@cpac.embrapa.br

<sup>10</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, junqueir@cpac.embrapa.br

# Passion Fruit Micrografting *ex vitro* for the Elimination of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)

---

## Abstract

*The present study utilized the technique micrografting ex vitro; to obtain virus free plants from Passion fruit woodiness virus. Evaluations were conducted on the effect of local micro-grafting associated with the stage of the rootstock, the use of fungicides and adjuvants and efficiency of the method on Embrapa Cerrados access. The results showed no significant differences between the developmental stages of the rootstock. The micrografting performed at the hypocotyl had fixation rate of 25.33%, while those performed in the epicotyl region had 16% of fixation. Micrografting in the region of the epicotyl had higher apical bud development. Evaluations have shown the effect of anatomical location, developmental stage of the rootstocks and the interaction between the factors in all variables. No effect of the concentration of fungicide in the fixation of micrografting. Preliminary evaluations by RT-PCR of the accessions studied showed 100% of virus free plants obtained. Although the technique has proven to be efficient for cleaning the material, more studies are necessary for application to other cultivar and species.*

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

## Introdução

A família Passifloraceae compreende 12 gêneros, sendo *Passiflora* o mais rico em espécies, perfazendo aproximadamente 400, que estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e sul da América (BARBOSA; VIEIRA, 1997). *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, denominado maracujá amarelo, é uma das espécies mais importantes do ponto de vista econômico. É uma planta lenhosa, trepadeira perene, que se fixa a suportes por meio de gavinhas. Seus frutos são valiosos por seu sabor e aroma, sendo ricos em vitamina C e ácido nicotínico (LIMA; GOLOMBIESK; AYUB, 2000).

Embora *Passiflora edulis* seja uma espécie originária do Brasil, seu cultivo só alcançou destaque na economia do país na década de 1980, com o crescente incentivo da agroindústria de sucos, e principalmente a grande demanda de frutas frescas no mercado (BERNACCI et al., 2003). Na década de 1990, a produção brasileira de maracujá apresentava produções inferiores a 200.000 toneladas anuais, no entanto teve grande impulso nos últimos anos. A produção de maracujá azedo cresceu cerca de 40% de 2004 a 2008, saindo de 490.000 t para 685.000 t (IBGE, 2010).

A cultura está presente em praticamente todos os estados, especialmente na Região Nordeste. No entanto, a produtividade do maracujazeiro-azedo no Brasil tem-se mantido estável, entre 13.000 t.ha<sup>-1</sup> a 14.000 t.ha<sup>-1</sup>, apresentando, inclusive, queda em regiões tradicionais de produção como os estados da Bahia, Pará, São Paulo e Minas Gerais. Apesar de apresentar rusticidade, a cultura de maracujá ainda enfrenta deficiências quanto a sua produção, devido à aplicação de técnicas inadequadas de cultivo, ausência do uso de cultivares selecionadas, problemas fitossanitários, mudas de baixa qualidade e contaminadas com patógenos, manejo incorreto de solo, irrigação, incidência de pragas, e, por fim, ausência de polinização manual (FNP, 2006; FARIA et al., 2007).

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 (SANTOS FILHO et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2005). 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. A enfermidade causa o aparecimento de sintomas de mosaico, embolhamento das folhas e a diminuição do tamanho e dos frutos, associado à deformação e à ocorrência de bolsas de goma no albedo, que se torna espessado (ANJOS et al., 2001; SANTOS FILHO et al., 2004). Além disso, plantas afetadas têm a produtividade e a vida útil diminuídas (SANTOS FILHO et al., 2004). A alta disseminação da virose tem comprometido a utilização de métodos de propagação vegetativa como a estaquia e a enxertia, que são normalmente utilizadas em outros países, pois permitem a obtenção de plantas precoces e com grande uniformidade. A erradicação de vírus de plantios no campo é um processo difícil, pois o controle não é conhecido e os vírus são facilmente disseminados mecanicamente e por afídeos (SANTOS FILHO et al., 2004).

O processo de limpeza clonal é utilizado para várias espécies vegetais de propagação vegetativa, como citrus, maçã, morango, abacate, cana-de-açúcar 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 que tenham maior longevidade no campo. Existem diversos métodos de limpeza clonal, no entanto, no presente trabalho, utilizou-se a técnica microenxertia ex vitro, visando obter mudas livres do vírus-do-endurecimento-dos-frutos.

A microenxertia é uma técnica de micropropagação utilizada na limpeza clonal que consiste em enxertar ápices caulinares de plantas matrizes em plântulas cultivadas a partir de semente e representa uma alternativa para obtenção de plantas livres do vírus (Paz; Pasqual, 1998). O primeiro trabalho realizado com microenxertia foi desenvolvido na década de

1970 por Murashige et al. (1972). Esses autores, trabalhando com Citrus, objetivaram a execução da microenxertia in vitro para limpeza clonal com a manutenção das características da planta adulta que possuísse importância comercial. Com o aperfeiçoamento da técnica, houve grandes avanços na obtenção de plantas microenxertadas livres de patógenos sistêmicos (NAVARRO, 1988). Oliveira et al. (2002) demonstraram a eficiência da microenxertia ex vitro, tornando a técnica mais acessível, com a produção de porta-enxertos em substrato geralmente utilizado para produção de mudas.

Em trabalhos realizados por Biricolti e Chiari (1994), houve um pegamento de 50% das microenxertias em *Passiflora edulis* f. *edulis*. Ribeiro et al. (2008) adaptaram a técnica da microenxertia visando à eliminação do vírus CABMV em maracujazeiro-azedo, utilizando porta-enxertos produzidos em condição ex vitro e obtiveram 93% de plantas livres do patógeno. Os autores testaram duas regiões para realização da microenxertia associadas ao uso de fitorreguladores aplicados no local da enxertia e obtiveram 32% de pegamento quando essa enxertia foi realizada no epicótilo acrescida de meio MS adicionado 0,1 mg L<sup>-1</sup> AIB e 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. Starrantino e Caruso (1988) constataram que reguladores de crescimento aplicados no ponto de enxertia aumentam o potencial regenerativo dos tecidos, contribuindo para o incremento do índice de pegamento.

Para que a união entre porta-enxerto e microenxerto seja satisfatória, é necessário que haja compatibilidade anatômica e fisiológica entre eles (Paz; Pasqual, 1998). Pio et al. (2001) ressaltam que o tamanho e a forma das células e a consistência dos tecidos são fatores fundamentais para haver interação favorável entre microenxerto e porta-enxerto. Desse modo, considerando-se as peculiaridades anatômicas e fisiológicas dos tecidos, tanto o local de realização da microenxertia quanto o estágio de desenvolvimento dos porta-enxertos podem influenciar diretamente os resultados (Anselmini; Zanette, 2008). Pio et al. (2001), descrevendo a anatomia de porta-enxertos utilizados na microenxertia em Citrus, observaram que há diferenças anatômicas ao longo do porta-enxerto e que o grau de maturação e lignificação das células também é variável.

O estudo da regeneração de tecidos caulinares de porta-enxertos é importante para compreensão do processo de soldadura da microenxertia e pode fornecer subsídios para o aprimoramento da técnica. Vários trabalhos comprovam o efeito de fitorreguladores, especialmente auxinas e citocininas sobre a divisão celular e a regeneração de tecidos (HARTMANN, et al., 2004; TAIZ; ZEIGER, Taiz; Zeiger, 2004). Ribeiro (2006) descreveu anatomicamente o desenvolvimento da microenxertia, porém não existem trabalhos na literatura abordando o comportamento regenerativo de tecidos dos porta-enxertos.

A associação da aplicação de meio de cultura com fungicidas pode auxiliar no desenvolvimento e pegamento da microenxertia, já que contaminação fúngica afeta significativamente o sucesso da técnica. No trabalho de Londe et al. (2007), relata-se que a contaminação é um dos principais problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento in vitro de explantes, e a utilização de fungicidas no meio de cultura é uma maneira de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. A contaminação fúngica pode ocorrer nos microenxertos por vários motivos, como ambiente muito úmido, assepsia inadequada, entre outros.

O thiabendazol é um fungicida sistêmico que atua sobre sítios específicos, inibindo a polimerização da tubulina e mitose (TERAO et al., 2006). Em trabalhos utilizando fungicida no controle da podridão pós-colheita em frutos de meloeiro, o fungicida thiabendazol, na concentração de 30 (g i. a / 100 L), foi eficiente na redução da severidade e tamanho da lesão aos 12 e 15 dias (TERAO et al., 2006).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de meios de cultivo na regeneração de caules de porta-enxertos, do local de realização da microenxertia e do estágio de desenvolvimento do porta-enxerto, de doses de thiabendazol adicionadas à meio de cultivo e avaliar a eficiência da microenxertia na limpeza clonal de acessos de maracujazeiros azedo da Embrapa Cerrados.

## Material e Métodos

### Efeito de meios de cultura na Regeneração de tecidos caulinares de porta-enxertos

Os meios de cultura, conforme o tratamento descrito abaixo, foram aplicados sobre cortes transversais que seccionaram totalmente o caule dos porta-enxertos.

Tratamentos:

- A) Controle (sem meio de cultura).
- B) MS suplementado com 3% de sacarose; 1 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 e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel (meio básico).
- C) Meio básico suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB.
- D) Meio básico suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP.
- E) Meio básico suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Após 15 dias, a regeneração do caule foi avaliada pela escala de níveis de regeneração dos tecidos e desenvolvimento do caule acima da região seccionada (RIBEIRO et al., 2009). O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado na comparação dos resultados.

Caules submetidos à todos os tratamentos foram utilizados em avaliações anatômicas. O material foi fixado em FAA 50% e posteriormente conservado em álcool etílico 70%. Na região da soldadura, o caule foi seccionado transversalmente em micrótomo de mesa e os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 2% e corados com safranina e azul de toluidina para a confecção de lâminas semipermanentes (KRAUS; ARDUIM, 1997).

## Efeito da idade do porta-enxertos e do local de realização da microenxertia no porta-enxertos

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Anatomia Vegetal e Micropropagação da Universidade Estadual de Montes Claros. Os porta-enxertos foram produzidos a partir da geminação de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, variedade redondo amarelo (Topseed Premium). As sementes foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos, seguida de tríplice lavagem por dois minutos em água destilada. A semeadura foi realizada em copos de plástico com capacidade de 50 ml, contendo substrato comercial, previamente esterilizado em estufa a 150 °C, por 24 horas.

Foram selecionadas plântulas com cotilédones presentes, em três estádios de desenvolvimento: fase 1 (epicótilo com aproximadamente 0,5 cm de comprimento sem folhas definitivas expandidas); fase 2 (uma folha definitiva) e fase 3 (duas folhas definitivas). A microenxertia foi realizada conforme procedimento desenvolvido por Ribeiro et al. (2009). As plantas microenxertadas foram cobertas com sacos de polietileno e mantidas sob temperatura ambiente em câmara clara, ajustada para fotoperíodo de 16 horas de luz, com irradiância de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Aos sete dias após a microenxertia, as plantas foram avaliadas quanto à ocorrência de brotações adventícias.

Aos 30 dias após a realização da microenxertia, as plantas foram avaliadas em relação ao percentual de microenxertos com folhas expandidas decorrentes do desenvolvimento do ápice caulinar enxertado. O experimento foi estabelecido em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial  $2 \times 3$ , com seis tratamentos (dois locais de realização da microenxertia associados a três estádios de desenvolvimento dos porta-enxertos) e cinco repetições, constituídas por 10 plantas por parcela, totalizando 300 plantas microenxertadas.

Para avaliação do efeito dos tratamentos sobre as brotações adventícias do porta-enxerto, foram utilizados escala de avaliação (RIBEIRO et al., 2009) e teste de Kruskal-Wallis. Para variável percentual de microenxertos com folha expandida, foi utilizada a transformação dos dados no modelo arco seno  $(x/100)^{0,5}$ . Os dados foram submetidos à

análise de variância e, quando constatada significância pelo teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o SAS -1990.

As avaliações anatômicas foram realizadas nas mesmas regiões dos porta-enxertos e nos estádios de desenvolvimento descritos anteriormente. Foram feitas secções transversais em material fresco com auxílio de micrótomo de mesa, com 20 repetições para cada associação do local e idade do porta-enxerto. As secções foram submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio a 5%, por 10 minutos, lavadas em água e submetidas à coloração com azul de Astra e Safranina. Foram montadas lâminas semipermanentes em gelatina glicerínada (KRAUS; ARDUIM, 1997), examinadas em microscópio óptico marca Olympus AX70 e fotografadas com câmera digital Evolution LC.

### **Efeito do thiabendazol associado a meio de cultura**

Os porta-enxertos foram produzidos conforme descrito no experimento anterior e a microenxertia ocorreu conforme descrito por Ribeiro et al. (2009).

Os tratamentos utilizados no experimento foram constituídos por: ausência de aplicação de meios de cultura, apenas a adição de solução antioxidante considerado como grupo controle; sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados com 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, 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, com pH ajustado para 5,8 (daqui em diante referido como meio MS); e meio MS acrescido de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (RIBEIRO et al., 2008) associados a concentrações de 10, 50, 100, 500 ppm de fungicida Thiabendazol (tecto).

O meio de cultura utilizado como adjuvante foi preparado conforme recomendações de Torres et al. (2001) e autoclavado a 121 °C por 20 min. Uma gota do meio foi aplicada com auxílio de uma seringa de 20 mL, aplicando-se uma gota sobre o local da enxertia. A aplicação dos meios procedeu-se por sete dias ininterruptos, e, ao terceiro dia, foi realizada uma avaliação para examinar se o ápice estava presente,

pois, como nos primeiros dias não há ainda uma soldadura completa entre ápice e porta-enxerto, o ápice pode ser perdido ao se colocar os meios. Aos 3, 15 e 30 dias após a realização da microenxertia, foram avaliadas quanto ao desenvolvimento do microenxerto em função da concentração de fungicida thiabendazol, conforme escala de avaliação (RIBEIRO et al., 2009). Aos 30 dias, foi avaliado o efeito do fungicida associado ao meio MS acrescido de vitaminas sobre o pegamento da microenxertia. O experimento foi estabelecido no delineamento em blocos casualizados, com seis tratamentos (controle, 0, 10, 50, 100, 500 ppm de fungicida associados ao meio) e seis repetições, cada uma constituída por dez microenxertos.

Para avaliação do nível de desenvolvimento dos microenxertos, utilizou-se escala de avaliação (RIBEIRO et al., 2009) e os dados foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Quanto à avaliação da percentagem de microenxertos com folha expandida e do número médio de folhas, os dados foram submetidos à análise de variância e, quando constatada significância pelo teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para o percentual de microenxertos com folha expandida, foi utilizada a transformação dos dados no modelo arco seno  $(x/100)^{0,5}$  e, para o número de folhas emitidas por microenxerto, foi utilizada a transformação dos dados no modelo  $x^{0,5}$ .

### **Avaliações em acessos da Embrapa Cerrados**

Os porta-enxertos com 5 cm a 7 cm de comprimento, possuindo as folhas cotiledonares e uma ou duas folhas definitivas, foram submetidos à desinfestação superficial por meio de pulverização com solução de hipoclorito de sódio 1% e, após 5 minutos, lavadas com água destilada. Os porta-enxertos foram apoiados sobre recipientes de acrílico tipo Gerbox e fixados com fita crepe aplicada sobre as folhas e caule. A seguir, foram feitas incisões na região hipocotiledonar com uma seringa plástica com agulha de calibre de 0,3 mm, até a obtenção de uma abertura retangular no caule. Após a retirada dos tecidos da epiderme, foi aplicado ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 1A).

Foram utilizados os acessos CPMR, CPMGA e CPF1SSBR, genitores das cultivares BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho. Ápices caulinares que apresentavam sintomas da doença foram coletados de mudas do campo experimental, desbastados com estiletes até aproximadamente 3 cm de comprimento, submetidos à desinfestação superficial por imersão em solução de 0,25% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, seguida por tríplice lavagem em água destilada. O segmento apical foi fixado por fita crepe em recipientes plásticos, tratado com ácido ascórbico ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e desbastado até a obtenção do ápice com aproximadamente 0,2 mm a 0,4 mm de comprimento, este foi transportado e depositado na base da abertura no porta enxerto (Figura 1B). As plantas microenxertadas foram protegidas com um canudo dobrado e cobertas por um saco plástico de polietileno e mantidas em casa de vegetação (Figura 1C).

Aos 40 dias após a microenxertia, foi realizada uma análise qualitativa e quantitativa das plantas para avaliar quanto ao pegamento da enxertia, desenvolvimento do ápice microenxertado, presença de brotações e contaminações. Para a indexação, o RNA total das amostras foi extraído de folhas completamente expandidas dos microenxertos e usado como molde para a RT-PCR.



Fotos: Solange Rocha  
M. de Andrade

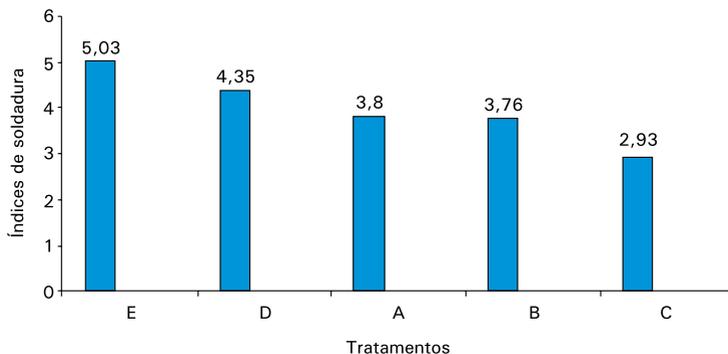
**Figura 1.** Etapas da microenxertia. (A) Preparo do porta enxerto; (B) ápice depositado no porta enxerto; (C) plântulas enxertadas na casa de vegetação.

## Resultados e Discussão

### Efeito dos meios de cultura na regeneração de tecidos caulinares de porta-enxertos

Verificou-se diferença entre os tratamentos com melhores resultados no tratamento E (meio MS básico suplementado com  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e piores no tratamento C (meio MS básico suplementado

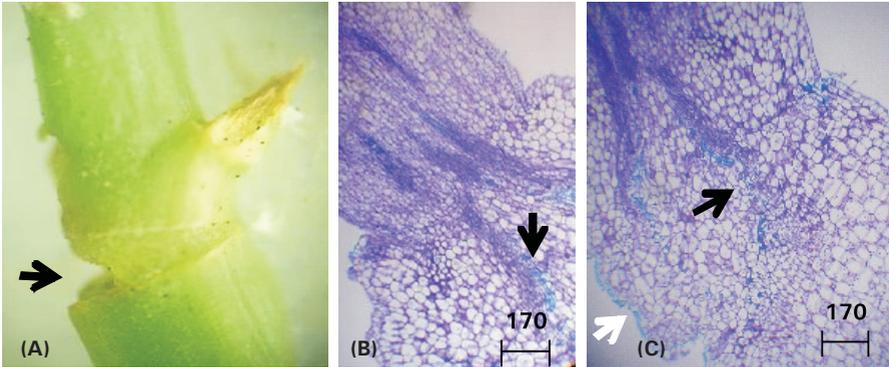
com  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB ), que apresentou quase metade do índice de soldadura do tratamento E (Figura 2). Desse modo, constata-se que a interação AIB e BAP aumenta o potencial de soldadura dos enxertos. As auxinas são os principais fitorreguladores associados à regeneração vascular, mas tem sido relatada a ocorrência de interação e de efeito sinérgico entre auxinas e citocininas (HARTMANN et al ., 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).



**Figura 2.** Índices de soldadura do caule de *P. edulis* em função dos tratamentos

Fonte: Ribeiro et al., 2009.

As avaliações morfoanatômicas evidenciaram que a regeneração dos tecidos inicia-se com o calejamento que ocupa a região seccionada, a partir do terceiro dia (Figura 3A). A regeneração da vascularização do caule inicia-se com 7 dias da secção, com a diferenciação de elementos traqueais e células parenquimáticas a partir de células do calo (Figura 3B). Aos 15 dias, observou-se que a conexão vascular já estava restabelecida e que havia diferenciação da epiderme. O trabalho de Ribeiro (2006) com a microenxertia de *P. edulis* evidenciou que houve intenso calejamento no porta-enxerto na região da incisão e que o processo de vascularização inicia-se com o desenvolvimento do procâmbio dos primórdios foliares do microenxerto, porém não foi possível avaliar a contribuição dos tecidos do porta-enxerto no processo de conexão vascular. No presente trabalho, foi possível verificar que existe significativo potencial de regeneração dos tecidos do porta-enxerto, o que sugere que esse deve ter também papel importante no estabelecimento da conexão vascular.



Fotos: Leonardo Ribeiro

**Figura 3.** Caule de porta-enxerto de *P. edulis* seccionado e tratado com meio básico suplementado com 0,1 mg/L de AIB e 1 mg/L de BAP. (A) Caule após 7 dias da secção apresentando calejamento (seta). (B) Corte histológico do caule, após 10 dias da secção, evidenciando diferenciação de vascularização (seta). (C) Corte histológico do caule, após 15 dias evidenciando regeneração dos vasos condutores (seta negra) e diferenciação da epiderme (seta branca).

## Efeito da idade do local de realização da microenxertia no porta-enxerto

As microenxertias realizadas no epicótilo apresentaram maior índice de brotações adventícias do porta-enxerto (Tabela 1). Observamos que a quantidade de brotações diminui com a idade do porta-enxerto, isto é, quanto mais desenvolvido menor a quantidade de brotos que são formados. Desse modo, infere-se que a capacidade de organogênese do caule dos porta-enxertos decai com o avanço da diferenciação dos tecidos. Ribeiro (2006), em trabalhos com microenxertia em maracujazeiro-azedo, observou que o índice de brotações adventícias apresentou correlação negativa com o índice de desenvolvimento do microenxerto, havendo efeito deletério das brotações adventícias sobre a microenxertia. Esse fato também foi observado em Citrus (NAVARRO et al., 1975) e em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (MNENEY; MATELL, 2001). Com isso, sugerimos utilizar porta-enxertos na fase 3 de desenvolvimento, já com as duas folhas definitivas.

**Tabela 1.** Efeito do local de realização da microenxertia e do estágio de desenvolvimento do porta-enxerto sobre o índice de brotações adventícias do porta-enxerto na microenxertia em maracujazeiro-azedo aos 7 dias.

Local da microenxertia	Fase de desenvolvimento do porta-enxerto	Índice de brotações adventícias
Epicótilo	1	1,67
Epicótilo	2	1,42
Epicótilo	3	1,24
Hipocótilo	1	1,18
Hipocótilo	2	1,12
Hipocótilo	3	1,0
p		0,000300

As microenxertias realizadas no hipocótilo e epicótilo apresentaram respectivamente 25,33% e 16% de microenxertos com folha expandida ( $p=0,0187$ ). Anselmini e Zanette (2008), em trabalhos com *Araucaria angustifolia*, observaram que houve uma maior porcentagem de pegamento de microenxertos com fenda aberta quando a microenxertia *in vitro* foi realizada no hipocótilo e consideraram que esse fato pode estar associado a sua estrutura anatômica.

Não houve efeito do estágio de desenvolvimento dos porta-enxertos sobre o percentual de microenxertos com folha expandida ( $p=0,152$ ). Esse resultado difere daqueles observados por outros autores na microenxertia *in vitro*. Navarro et al. (1975), em *Citrus*, constataram que porta-enxertos com duas semanas de idade proporcionaram melhores resultados que aqueles mais jovens ou mais velhos. Anselmini e Zanette (2008) observaram que porta-enxertos de *Araucaria angustifolia* com dois meses se mostraram mais adequados, com maior percentual de sobrevivência e índice nulo de microenxertos mortos, quando comparados a porta-enxertos com 6 e 12 meses. Neste trabalho, como as fases escolhidas estavam mais próximas quanto ao desenvolvimento, provavelmente o grau de diferenciação dos tecidos não foi suficiente para proporcionar efeito significativo no resultado da microenxertia.

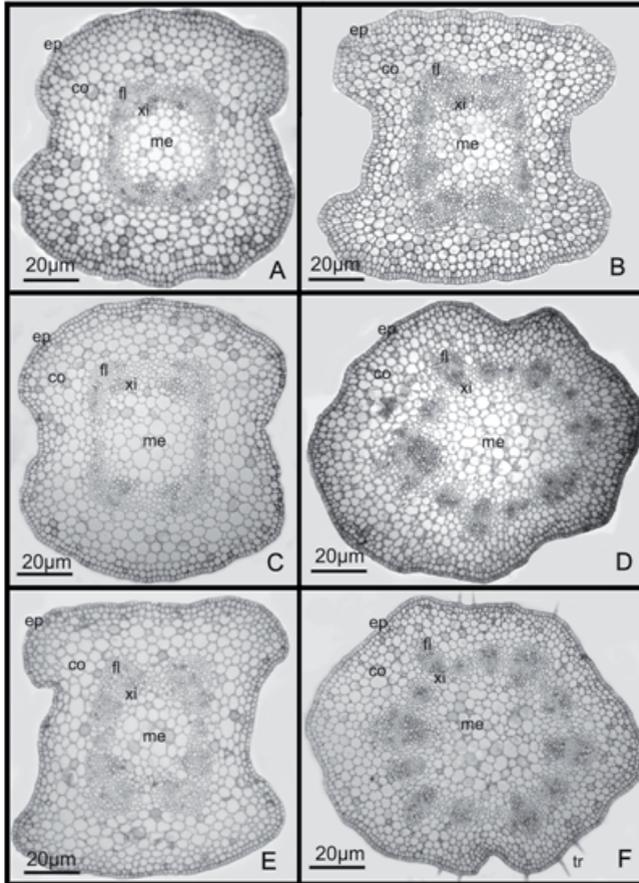
A avaliação anatômica da região do hipocótilo revelou, em todas as fases, epiderme unisseriada, uma única camada de colênquima, células

corticais aproximadamente circulares em secção, com parede celular delgada e pequenos espaços intercelulares (Figura 4, letras A; C; e E). O sistema vascular é do tipo eustélico. Não foi observada a presença de feixes de fibras floemáticas lignificadas na fase 1 (Figura 4A), sendo evidenciados quatro feixes nas fases 2 e o início da lignificação na fase 3 (Figura 4, letras C e E). Segundo Mayer et al. (2006), a presença de calotas de fibras no floema primário pode reduzir a capacidade de organogênese em videira (*Vitis* sp.). Neste estudo, foi possível observar que as calotas de fibras são pouco proeminentes e não oferecem dificuldade à execução da microenxertia e ao estabelecimento da conexão vascular entre porta-enxerto e ápice. Esses dados corroboram a ausência de diferença estatística no estabelecimento dos enxertos em todas as idades dos porta-enxertos testados neste trabalho, indicando que a enxertia pode ocorrer nas diferentes fases de desenvolvimento do porta-enxertos.

Na região do epicótilo, as secções transversais da fase 1 (Figura 4B) apresentaram contorno com duas regiões opostas abauladas evidenciando lobos, ligados por duas regiões planas (Figura 4). A epiderme unisseriada, formada por células tabulares, apresentou cutícula pouco espessada. Nas fases 2 e 3 (Figura 4, letras D e F), observaram-se alterações no contorno, com o abaulamento tornando-se mais agudo nas extremidades da secção e com o desaparecimento das regiões planas. Nessas fases, detectou-se a presença de tricomas unicelulares (Figura 4F). É possível constatar que tanto o contorno irregular, quanto a presença de tricomas no epicótilo, acrescentam dificuldades à execução da abertura para a deposição do ápice, em relação ao hipocótilo.

O córtex no epicótilo (Figura 4, letras B; D; e F) apresentou células alongadas radialmente, com paredes finas e pequenos espaços intercelulares, comuns em todas as fases. A espessura da região cortical é irregular, o que contrasta com o hipocótilo, que apresentou também células mais volumosas na região. A maior espessura da região cortical é uma das características que podem explicar o maior número de microenxertos com folha expandida na região do hipocótilo. Ao se realizar a abertura no porta-enxerto, é retirada a epiderme e parte

das camadas celulares corticais. Nesse sentido, um maior número de camadas celulares no córtex facilitaria a execução da microenxertia e ainda diminuiria a possibilidade de se atingir e danificar a região dos feixes vasculares no momento da incisão.



Fotos: Lorena Melo Vieira

**Figura 4.** Secções anatómicas em plântulas de maracujazeiro-azedo em duas regiões e três estádios de desenvolvimento. (A, C e E) Hipocótilo; (B, D e G) epicótilo. (A e B) Fase 1 (apenas folhas cotiledonares); (C e D) fase 2 (folhas cotiledonares e uma folha permanente) e (E e F) fase 3 (folhas cotiledonares e duas folhas permanentes). Legenda: co: córtex; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; fv: feixe vascular; me: medula; tr: tricoma; e xi: xilema.

Observou-se desenvolvimento secundário com atividade do cambio vascular em ambas as regiões em todas as fases. Zaccaro et al. (2006) considera a possível participação do cambio na formação do calo, que se estabelece após a incisão e é responsável pela junção inicial entre o ápice e o porta-enxerto. Abreu et al (2003) relataram, na caracterização anatômica da microenxertia em macieira, a diferenciação de células vasculares a partir do cambio do porta-enxerto, o que indica a possível participação do tecido na formação da conexão vascular entre microenxerto e porta-enxerto.

### **Efeito do thiabendazol associado a meio de cultura**

Após três dias de realização da microenxertia, não houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p = 0,344$ ) quanto ao desenvolvimento do microenxerto (Tabela 2). Segundo Abreu et al. (2003), o primeiro estágio da união entre enxerto e porta-enxerto ocorre em poucos dias. Esse estágio é caracterizado pela morte de camadas celulares da interface do enxerto e pela formação de células do calo. Essas células preenchem a fenda no ponto de enxertia constituindo uma associação com a região vascular da copa e do porta-enxerto. O fato de não ter havido efeito dos tratamentos aos três dias após a microenxertia pode ter sido ocasionado por não haver uma soldadura completa entre ápice e porta-enxerto e pela baixa incidência de contaminação fúngica.

Aos 15 dias após a realização da microenxertia, foram evidenciadas diferenças entre os tratamentos ( $p = 0,002$ ) (Tabela 2). Os tratamentos SM (apenas antioxidante) e o O (apenas o meio MS sem acréscimo de fungicida) proporcionaram as maiores médias ( $m = 4,158$  e  $m = 3,936$ ) respectivamente quanto ao desenvolvimento do microenxerto. O tratamento com 500 ppm de fungicida thiabendazol ofereceu a menor média ( $m = 3,054$ ), e pode ter causado fitotoxicidade ao microenxerto, provocando necrose. Carvalho et al. (2004) demonstraram, em trabalho testando concentrações de fungicidas no milho para controle do fungo *Stenocarpella maydis*, que houve redução do tamanho das plântulas com o aumento da dosagem de thiabendazol evidenciando efeito fitotóxico. Os resultados indicaram que a aplicação do fungicida thiabendazol associado ao meio de cultura suplementado com vitaminas

não aumenta a capacidade de desenvolvimento dos microenxertos, já que os tratamentos em que o fungicida estava ausente apresentaram as maiores médias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Média dos índices de desenvolvimento do microenxerto em função da concentração de fungicida aos 3, 15 e 30 dias, conforme Ribeiro et al., 2009.

Parâmetro	Concentração de fungicida thiabendazol (PPM)	Dias (média)		
		3	15	30
Desenvolvimento do microenxerto	SM (antioxidante)	3,45	4,15	5,54
	0	3,41	3,93	5,49
	10	3,51	3,16	5,08
	50	3,25	3,50	5,19
	100	3,28	3,37	4,92
	500	3,19	3,19	5,09

Após 30 dias da enxertia, a análise estatística do desenvolvimento da microenxertia não evidenciou diferenças significativas entre os tratamentos apresentando valor de  $p = 0,144$  (Tabela 2). Em relação ao percentual de pegamento das microenxertias, aos 30 dias, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p = 0,053$ ;  $cv = 63,36$ ;  $m = 13,06$ ). O mesmo verificou-se em relação ao número de folhas expandidas aos 30 dias ( $p = 0,6096$ ).

A aplicação dos meios usados como tratamento durante sete dias pode contribuir para nutrição do ápice até que ocorra o processo de soldadura, uma vez que o ápice caulinar não é vascularizado (RAVEN et al., 2007; ZACCARO et al., 2006). Segundo Caldas et al. (1998), os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o desenvolvimento *in vitro*. As associações de meios nutritivos a fungicidas podem auxiliar no pegamento e desenvolvimento das plantas microenxertadas e contribuir para diminuição da contaminação fúngica.

Entretanto, pode ocorrer o efeito inverso, pois o procedimento de colocar os meios implica na retirada do saco de polietileno que

forma uma câmara úmida, o que pode afetar o desenvolvimento do microenxerto, pois aumenta a exposição ao ambiente externo diminuindo a umidade e aumentando o ressecamento do enxerto. Para diminuir a contaminação fúngica, é necessário que haja assepsia no momento da realização da microenxertia, como desinfestação do material vegetal, uso de seringas descartáveis e ambiente limpo e ventilado, no entanto ainda assim são observados frequentemente a presença de fungos associados ao microenxerto. Esse aparecimento de fungos pode estar associado à umidade dentro da câmara úmida (saco de polietileno) ou assepsia não eficiente.

Tavares et al. (2004), em trabalhos com mamoeiro, relataram que fungicidas do grupo benzimidazóis (tiofanato metílico e thiabendazol) mostraram-se ineficientes no controle micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e também apresentaram menor inibição da germinação dos esporos na dosagem de 100 ppm. Silva et al. (2001) observaram que thiabendazol não foi eficaz na concentração de 480 mg de i.a/l quando comparado a testemunha utilizado no controle de *C. gloeosporioides*, agente etiológico da podridão-peduncular-no-mamoeiro.

### **Avaliações em acessos da Embrapa Cerrados**

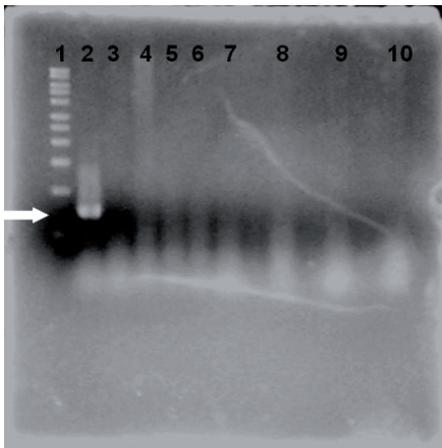
O pegamento dos enxertos aos 40 dias foi 50% para CPMR, 27% para CPMGA e 0% para CPF1SSBR (Figura 5). Trabalhos iniciais realizados com maracujazeiro-azedo têm evidenciado taxa de pegamento média de 27%, quando a microenxertia é realizada no hipocótilo e de 32 % quando realizada no epicótilo (RIBEIRO et al., 2008). 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). Essa diferença encontrada no percentual de pegamento do trabalho atual pode ser devida às fatores genéticos inerentes a cada genótipo ou aos distintos modos de manipulação de cada executor.

Fotos: Solange Rocha  
M. de Andrade

**Figura 5.** Pegamento dos enxertos após 40 dias em casa de vegetação.

O método, embora eficiente, precisa ser aprimorado, por exemplo, avaliando se há diferença nas taxas de pegamento utilizando câmara de crescimento ou casa de vegetação após a microenxertia. Também podemos aperfeiçoar a técnica aprofundando os estudos da adição de meio de cultura, pois experimentos utilizando a adição de meio de cultura em microenxertos realizados no epicótilo demonstraram um aumento da taxa de pegamento de 27% para 53% (RIBEIRO et al., 2008).

Aos 100 dias após a microenxertia, foram realizadas avaliações por RT-PCR que indicaram 100% de limpeza dos microenxertos obtidos (Figura 6). Estudos anteriores com indexação por Elisa evidenciaram taxa de eliminação de vírus superior a 90% com a utilização da técnica (RIBEIRO et al., 2008), demonstrando que a técnica é eficiente para eliminação de CAMBV.



Fotos: Aline Rabello

**Figura 6.** RT-PCR para detecção de potyvírus. (1) Marcador de peso molecular; (2) folha sintomática de Passiflora; (3) folha microenxerto cmMR1; (4) folha microenxerto CPMR1; (5) folhamicroenxerto CPMR2; (6) folha microenxerto CPMR3; (7) folha microenxerto CPMR4; (8) folha microenxerto CPMGA1; (9) folha microenxerto CPMGA2; (10) folha microenxerto CPMGA3. Seta indica fragmento correspondente à amplificação de potyvírus (1700 pb).

## Conclusões

A metodologia é eficiente para limpeza clonal de genótipos elite, que posteriormente poderão ser propagados por estaquia para multiplicação massal e restauração dos campos experimentais ou mesmo comerciais.

Embora a técnica tenha demonstrado eficiência para a limpeza clonal, são necessários maiores estudos para aprimoramento da técnica.

Constatou-se efeito favorável do fitorregulador BAP associado ao fitorregulador AIB na regeneração dos tecidos.

A conexão vascular e a diferenciação do parênquima e da epiderme ocorreram após 15 dias da secção.

O epicótilo apresenta um maior número de brotações adventícias que o hipocótilo.

As microenxertias realizadas no hipocótilo apresentam maior percentual de microenxertos com folhas expandidas.

As fases de desenvolvimento dos porta-enxertos não afetaram o percentual de microenxertos com folhas expandidas.

O epicótilo apresenta secções de contorno irregular, menor espessura da região cortical e menor desenvolvimento secundário, o que dificulta a execução e prejudica os resultados da microenxertia.

Não foi observado efeito em relação ao desenvolvimento do microenxerto com a aplicação do fungicida thiabendazol associado ao meio MS.

## Referências

ABREU, M. F.; NUNES, J. C. O.; SANTOS, M.; PEDROTTI, E. L. Estudos histológicos preliminares de plantas microenxertadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n.1, 2003.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; Microenxertia e sua caracterização em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 967-973, 2008.

BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. flavicarpa Degener e *Passiflora amethystine* Mikan. **Euphytica**, v. 98, n. 121, p. 121-127, 1997.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data de publicação de *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 355-356. 2003.

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

ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting an its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. **Hortscience**, v. 7, p. 118-119, 1972.

CARVALHO, M. G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, M. Análise filogenética de Potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.378-383, 2004.

CHAVES, R. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; MANICA, I.; PEIXOTO, J. R.; PEREIRA, A. V.; FIALHO, J. F. Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloráceas nativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, 2004.

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* sp). **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 317-327, 2002.

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**, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.

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

HARTMANN, H. T. KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation, principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

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: 02/07/2010

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 198 p.

LARANJEIRA, F. F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.161-184.

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

LIMA, D. M.; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de técnicas de biotecnologia á cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 359-363, 2000.

LONDE, L. N.; SOUSA, C. S.; VIEIRA, C. U.; BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio ms para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 94-100, july/sept. 2007.

MAYER, J. L. S.; BIASI, L. A.; BONA, C. Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de Vitis L. (Vitaceae) relacionada com os aspectos anatômicos. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 563-568, 2006.

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

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 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 Poty vírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 378-383, 2004.

NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIORIBEIRO, 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.

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

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

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

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-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p.147-159.

- PIO, R.; CASTRO, E. M. de; RAMOS, J. D.; GAVILANES, M. L.; RIBEIRO, W. G. Características anatômicas de porta-enxertos de citrus para microenxertia em diferentes alturas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 848-852, 2001.
- RAVEN, P. H.; EVERTY, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2007. p.567-619.
- RIBEIRO, L. M. **Técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro visando a eliminação do Cowpea aphid borne mosaic vírus em maracujazeiro-azedo**. 85 f. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília.
- RIBEIRO, L. M.; ANDRADE, S. R. M.; VIEIRA, L. M.; PEREIRA, W. V. S. **Microenxertia ex-vitro visando à eliminação de vírus em maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 28 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 242)
- 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 CABMV em maracujá azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 589-594. 2008.
- 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, BA: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-280.
- SANTOS, F. C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* D.C)**. 65 f. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, mg.
- SILVA, F. A. N.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O.; RESENDE, M. L. V. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por colletotrichum gloeosporioides. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 3, p. 519-524, mai/jun. 2001.
- STARRANTINO, A.; CARUSO, A. The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. **Acta Horticulture**, v. 227, p. 101-103, 1988.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004. 719 p.
- TAVARES, G. M.; SOUZA, P. S. Efeito de fungicidas no controle de *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (carica papaya). **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan/fev. 2005.
- TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; VIANA, F. M. P.; ROSSETTI, A. G.; SOUZA, C. C. M. Integração de fungicidas à refrigeração no controle de podridão em frutos de meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.089-093. 2006.
- TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 2001, 20 p. (Embrapa Hortaliças.Circular Técnica, 24)
- VASCONCELLOS, M. A. S.; SILVA, A.C.; SILVA, A. C. REIS, R. S. Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: In FALEIRO, F. G.;

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 297-313.

VERDIAL, M. F.; LIMA, M. S.; NETO, J. T.; DIAS, C. T. S.; BARBANO, M. T. Métodos de formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 795-798, 2000.

ZACCARO, R. P.; DONALDIO, L. C.; LEMOS, E. G. M.; Microenxertia em cultivares de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 533-535, 2006.

**Embrapa**

---

*Cerrados*

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

