

CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO
DE GENÓTIPOS DE *Passiflora setacea* RESISTENTES AO *Cowpea
aphid-borne mosaic virus*

NAYARA NIELE SACOMAN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
OUTUBRO – 2013

CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO
DE GENÓTIPOS DE *Passiflora setacea* RESISTENTES AO *Cowpea
aphid-borne mosaic virus*

NAYARA NIELE SACOMAN

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
OUTUBRO - 2013

CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO
DE GENÓTIPOS DE *Passiflora setacea* RESISTENTES AO *Cowpea
aphid-borne mosaic virus*

NAYARA NIELE SACOMAN

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 04 de outubro de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia) – UFES

Prof. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A meu Deus, por me guiar e conceder tantas bênçãos e sabedoria.
Aos meus pais, pelo apoio de sempre, amor incondicional, carinho e
dedicação em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me abençoou durante essa jornada, que me presenteou com pessoas maravilhosas e me fortaleceu nos momentos mais difíceis.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade da realização do curso.

À Capes, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

À minha orientadora Virgínia Silva Carvalho, que, mesmo enfrentando momentos difíceis, superou as dificuldades e agiu com profissionalismo, me orientando da melhor forma possível. Muito obrigada pelas orientações e por permitir que eu fizesse parte dessa família que existe dentro do laboratório 112.

À minha conselheira Rosana Rodrigues, pela disponibilidade, sempre esclarecendo minhas dúvidas, aconselhando quando possível, e por disponibilizar o uso da câmara de crescimento para a realização deste trabalho.

Ao meu conselheiro Alexandre Pio Viana, por colocar a Eileen no meu caminho, pelos conselhos e por me ajudar nas análises estatísticas.

Ao Rodrigo Sobreira Alexandre, por aceitar o convite de participar da banca.

À Eileen Azevedo Santos, pela ajuda na condução do experimento, pela ajuda, conselhos, orações e amizade.

Ao secretário Daniel, sempre disponível a ajudar, aconselhar e incentivar.

À minha querida amiga Andressa, pelo companheirismo, sempre ao meu lado, ajudando nos experimentos e conversando sobre os fatos da vida.

À minha amiga Larissa, pelos momentos de estudos, sofrendo com a estatística e a genética, pela colaboração nos experimentos e pelas orações.

Às queridas Luciene e Monique, pelos momentos de descontração, conversas, amizade e ajuda.

À amável Beth, por me acolher tão bem com seu coração de mãe, sempre preocupada em ajudar a todos e manter o bem-estar do laboratório.

Aos graduandos Ramon, Renato e Naiara e à bolsista Léia, pela colaboração nos experimentos e pelos momentos de alegria no laboratório.

Ao Rafael, meu querido conterrâneo, que chegou ao final da minha jornada do mestrado, mas, com seu jeito carismático, me ajudou e vem se tornando um grande amigo.

À minha irmã, amiga e companheira Iana Carvalho, por abrir as portas do seu apartamento, me acolhendo como se me conhecesse há anos, por ser minha terapeuta nos diversos momentos difíceis que enfrentei neste período, por me defender como se fosse minha irmã, por aguentar minhas loucuras e ser um presente de Deus na minha vida.

Ao meu querido Maicon, uma pessoa especial que tive a sorte de encontrar, por alegrar meus dias, me levar à Universidade sempre que possível e ser esse ser humano tão especial que eu estou aprendendo a admirar a cada dia que passa.

Ao meu amigo e irmão de fé Jonis, pela ajuda na preparação de um dos experimentos, pelas orações e amizade.

À minha orientadora da graduação, Maurecilne Lemes, por ser a pessoa que mais me incentivou a fazer o mestrado e me indicou a UENF.

Aos meus irmãos e amigos Júnior Romano, Amanda e Tatiane, que, mesmo distantes, sempre estiveram me incentivando a seguir na batalha do mestrado, alegrando meus dias. Amo vocês!

À minha família e a meus pais Nivaldo e Maria Hilda, pelo apoio, incentivo, amor incondicional, conselhos, orações e por proporcionarem todas as condições para que eu realizasse o sonho de seguir os estudos após a graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1. GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> E CAPACIDADE MORFOGÊNICA DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Passiflora setacea</i>	5
3.1.1. INTRODUÇÃO	5
3.1.2. REVISÃO.....	6
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1.5. CONCLUSÕES	25
3.2. RESISTÊNCIA AO <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> EM PLANTAS ACLIMATIZADAS DE <i>Passiflora setacea</i>	26
3.2.1. INTRODUÇÃO	26
3.2.2. REVISÃO.....	27
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.2.5. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

SACOMAN, Nayara Niele; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Outubro de 2013; CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *in vitro* E IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Passiflora setacea* RESISTENTES AO *Cowpea aphid-borne mosaic virus*; Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Prof^a. Rosana Rodrigues e Prof. Alexandre Pio Viana.

Passiflora setacea é uma espécie silvestre pouco conhecida, que apresenta grande importância para o melhoramento genético, por já terem sido descritos alguns genótipos resistentes ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). O pouco conhecimento sobre a espécie dificulta a utilização de novas técnicas de propagação, bem como a elaboração de planos de manejo e conservação. Estudos com esta espécie possibilitarão o estabelecimento de protocolos para conservação *in vitro* dos genótipos resistentes. O presente estudo teve por objetivos: i) determinar o protocolo de desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *P. setacea*; ii) definir o protocolo de aclimatização de plântulas de *P. setacea* cultivadas *in vitro*; iii) estabelecer o protocolo de multiplicação e enraizamento de *P. setacea*; e iv) identificar os genótipos de *P. setacea* resistentes ao vírus do endurecimento dos frutos (CABMV). O experimento de desinfestação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial 3x3, em que foram utilizadas três concentrações de NaClO (0,00%; 0,25% e

0,50%), durante 5, 10 ou 15 minutos. Para a etapa de germinação de sementes *in vitro*, foi utilizado o DIC em um esquema fatorial 2 x 3 x 2, em que foram usados os meios MS completo e ½ MS, três concentrações de GA₃ (0,00; 1,44 e 2,88 µmol L⁻¹), ficando a metade dos tratamentos no escuro e a outra metade sob luz. A aclimatização foi feita utilizando os substratos Substrato I - areia, Substrato II - substrato Basaplant[®] Hortaliças e Substrato III substrato Basaplant[®] Hortaliças + areia (1:1 v/v). Para o estabelecimento de protocolo de multiplicação e enraizamento, foram utilizados como explantes segmentos nodais de plântulas cultivadas *in vitro*. Os segmentos nodais foram divididos em segmento basal, mediano e apical, e inoculados em meio ½ MS com diferentes concentrações de AIB e BAP, sendo avaliada a formação de brotações e raízes nos explantes. A identificação de genótipos de *P. setacea* resistentes ao CABMV foi feita em formato de DIC, tendo sido adotada uma escala de notas para avaliar a severidade da doença. As plantas assintomáticas foram submetidas ao teste sorológico PTA-ELISA. O melhor tratamento para desinfestação foi o de 0,25% de NaClO por 15 minutos. Para a germinação de sementes de *P. setacea*, não foi necessária a adição de GA₃. ½ MS e o MS completo não apresentaram diferença quando submetidos ao escuro, tendo ocorrido diferença entre a luz e o escuro na germinação das sementes. O melhor substrato para aclimatizar as plântulas de *P. setacea* foi a areia. Os reguladores de crescimento atuaram de forma independente na formação de brotações e raízes. Os tratamentos com BAP proporcionaram maior número de brotações, e o tratamento com 9,84 µmol L⁻¹ AIB proporcionou maior enraizamento. Dos 30 genótipos de *P. setacea* inoculados com CABMV e submetidos ao PTA-ELISA, 29 foram considerados resistentes. Esses estudos possibilitaram delinear estratégias para a conservação *in vitro* dos genótipos de *P. setacea* resistentes, que poderão ser utilizados no programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

ABSTRACT

SACOMAN, Nayara Niele; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; October 2013; CONSERVATION *in vitro* GERMOPLASM AND IDENTIFICATION OF *Passiflora setacea* RESISTANT TO *Cowpea aphid-borne mosaic virus*; Advisor: Professor Virginia Silva Carvalho; Committee members: Professor Rosana Rodrigues and Professor Alexandre Pio Viana.

The *Passiflora setacea* is a little known wild species, which has great importance for breeding, and some genotypes have been described as resistant to the virus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). The little knowledge about the species complicates the use of new propagation techniques, and the development of management plans and conservation. Studies of this kind allow the establishment of protocols for *in vitro* conservation of resistant genotypes. The present study aimed to: i) determine a disinfection protocol and a method for *in vitro* germination of seeds of *P. setacea* ii) define an acclimatization protocol of *P. setacea* iii) define a protocol for multiplication and rooting of *P. setacea in vitro* iv) identify genotypes of *P. setacea* resistant to fruit woodiness virus (CABMV) . The experiment was conducted in disinfection completely randomized design (DIC) in a 3x3 factorial design, in which were used three concentrations of NaClO (0,00 % , 0,25 % and 0,50 %) for 5 , 10 or 15 minutes. For the stage of *in vitro* seed germination was used a completely randomized design in a factorial 2 x 3 x 2, in which the means used were complete MS and ½ MS, three GA₃

concentrations (0,00; 1,44 and 2,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$), with half of the treatments in the dark and half-light. Acclimatization was performed using the substrates Substrate I – Sand, II - Basaplant[®], Substrate III - Basaplant[®] + Sand (1:1 v/v). To establish the protocol for multiplication and rooting, nodal segments of plantlets *in vitro* were used as explants. The nodal segments were divided into basal segment, median and apical and inoculated on $\frac{1}{2}$ MS medium with different concentrations of IBA and BA. The formation of shoots and roots were evaluated. The identification of genotypes of *P. setacea* resistant to CABMV was held in the form of a completely randomized design. A scale was adopted to assess the severity of the disease. Asymptomatic plants were subjected to serological PTA - ELISA. The best treatment for disinfection was to 0,25% NaClO for 15 minutes. *P. setacea* does not require addition of GA₃ for the seed germination. There is no difference between seeds germinated in MS and $\frac{1}{2}$ MS in the dark. The light interfere on seed germination. The sand was the best substrate for *P. setacea* seedlings acclimatization. Growth regulators acted independently in the formation of shoots and roots. BA yielded more shoots and treatment with 9,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of IBA provided greater rooting. Of the 30 genotypes of *P. setacea* inoculated with CABMV and submitted to PTA - ELISA, 29 were resistant. These studies outline possible strategies for *in vitro* conservation of genotypes of *P. setacea* resistant to CABMV, which can be used in the breeding program of the passion fruit of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence ao gênero *Passiflora* e faz parte da família Passifloraceae, que compreende 18 gêneros com, aproximadamente, 630 espécies catalogadas (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004; Bernacci et al., 2008). O gênero *Passiflora* tem aproximadamente 400 espécies, a maioria originária da América Tropical, 120 nativas do Brasil, considerado o centro de diversidade do gênero (Bernacci et al., 2003).

Diante da ampla utilização e aceitação no mercado mundial, a cultura do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) apresenta grande importância no setor agrícola (Meletti, 2011). O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com uma produção estimada de 923.035 t/ano (IBGE, 2011).

Com o aumento da área cultivada do maracujazeiro-azedo no Brasil, também houve aumento das doenças que acometem essa cultura e afetam a planta desde a fase de sementeira até a planta adulta, prejudicando raízes, caule, folhas, flores e frutos (Santos Filho e Santos, 2003).

A cultura do maracujazeiro-azedo pode ser infectada por diversas viroses, porém o vírus do endurecimento dos frutos é o que predomina e o que causa os maiores prejuízos. Este vírus está presente nas principais áreas produtoras do Brasil e vem sendo relacionado à infecção com o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV). O CABMV é uma espécie do gênero *Potyvirus*, transmitido por pulgões e mecanicamente (Barbosa et al., 2006; Narita, 2007).

Passiflora edulis, espécie mais utilizada na produção comercial, tem sido relatada como altamente suscetível ao vírus do endurecimento dos frutos (Fonseca, 2008; Cavichioli et al., 2011).

As espécies silvestres vêm apresentando importante potencial em programas de melhoramento genético do maracujazeiro, por apresentarem alelos de resistência a doenças. Estudos sugerem que, por meio de cruzamentos artificiais, podem ser obtidos híbridos férteis e promissores para o melhoramento do maracujazeiro (Junqueira et al., 2005; Santos, 2013).

A espécie silvestre *Passiflora setacea* D.C. apresenta resistência a diversas doenças, incluindo o vírus CABMV, e grande variabilidade genética, mostrando boas perspectivas para o seu uso em programas de melhoramento (Fonseca, 2009; Cerqueira-Silva et al., 2012a). Porém, algumas características fisiológicas indesejáveis, como dormência das sementes e dificuldade de enraizamento, prejudicam a utilização de técnicas convencionais de propagação para esta espécie (Melletti et al., 2002; Santos et al., 2005).

O aumento da porcentagem de germinação e enraizamento da *Passiflora setacea* pode ser obtido utilizando o cultivo *in vitro*, importante metodologia na tentativa de resolver problemas de dormência das sementes e dificuldade de enraizamento (Melletti et al., 2002; Fonseca, 2009). A conservação de germoplasma *in vitro* desta espécie é uma alternativa atrativa que pode ser empregada para reduzir os custos de manutenção e tornar o processo de conservação da coleção mais eficiente (Lima et al. 2004b).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para cultivo *in vitro* de *Passiflora setacea* e identificar genótipos resistentes ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), visando à conservação *in vitro* dos acessos resistentes, que serão utilizados no programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

2. OBJETIVOS

4.1. Geral

Estabelecer plantas de *Passiflora setacea in vitro* e identificar plantas resistentes ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), visando à conservação *in vitro* dos acessos resistentes, que serão utilizados no programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.2. Específicos

- Determinar um protocolo de desinfestação para germinação *in vitro* de sementes de *P. setacea*.
- Definir um protocolo para germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de *P. setacea*.
- Determinar um protocolo de aclimatização de plântulas de *P. setacea* cultivadas *in vitro*.
- Verificar a capacidade morfogênica de segmentos nodais de *P. setacea*.

- Testar genótipos de *P. setacea* aclimatizadas, inoculando o vírus CABMV.
- Identificar os genótipos de *P. setacea* resistentes ao vírus do endurecimento dos frutos (CABMV).

3. CAPÍTULOS

3.1. GERMINAÇÃO *in vitro* E CAPACIDADE MORFOGÊNICA DE SEGMENTOS NODAIS DE *Passiflora setacea*

3.1.1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) é uma planta perene, mas, em pomares comerciais, em virtude da alta incidência de doenças como o vírus do endurecimento dos frutos, bacterioses, murcha do fusário e antracnose, a cultura vem sendo replantada anualmente (Kudo, 2004; Junqueira et al., 2005; Narita, 2007).

Estudos confirmam que a espécie silvestre *Passiflora setacea* apresenta resistência a diversas doenças, incluindo o vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), mostrando boas perspectivas para seu uso em programas de melhoramento da espécie cultivada (Fonseca, 2009; Cerqueira-Silva et al., 2012a). No entanto, características fisiológicas indesejáveis dificultam a utilização de novas técnicas de propagação, como a dormência das sementes e a dificuldade de enraizamento (Melletti et al., 2002; Santos et al., 2005).

Uma alternativa para melhorar a porcentagem de germinação e enraizamento destas plantas é o cultivo *in vitro*, que se mostrou eficiente na

germinação e propagação de várias espécies de *Passiflora* já estudadas, porém há necessidade de serem expandidos os estudos nessa área com espécies silvestres (Koch e Zanette, 2000; Melletti et al., 2002; Dias et al., 2003; Zonta et al., 2005; Alexandre et al., 2009; Fonseca, 2009; Junghans et al., 2010; Santos et al., 2010).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo promover a germinação das sementes e verificar a capacidade morfogênica *in vitro* de segmentos nodais da espécie *Passiflora setacea*, visando à conservação *in vitro* dos acessos multiplicados, que serão utilizados no programa de melhoramento de maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Origem e botânica do maracujazeiro

A origem da família Passifloraceae segue um cenário biogeográfico proposto para vários grupos de plantas, originando-se na África, cruzando a Europa e a Ásia e chegando ao Novo Mundo por meio de pontes de terra. Os ancestrais das passifloras chegaram à América Central e se diversificaram rapidamente, com muitos eventos de dispersão de longa distância (Muschner et al., 2012). A América é o principal centro de diversificação do gênero *Passiflora*, com aproximadamente 95% das espécies (Lima et al., 2004b).

O maracujazeiro pertence ao gênero *Passiflora* e faz parte da família Passifloraceae, que compreende 18 gêneros, com, aproximadamente, 630 espécies catalogadas (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004; Bernacci et al., 2008). O gênero *Passiflora* tem aproximadamente 400 espécies, a maioria originária da América Tropical, 120 delas nativas do Brasil, sendo este o centro de diversidade genética do gênero (Bernacci et al., 2003).

O maracujazeiro é uma planta perene, mas, em pomares comerciais, em virtude da alta incidência de doenças como o vírus do endurecimento dos frutos, bacterioses, murcha do fusário e antracnose, a cultura vem sendo replantada

anualmente. A cultura era cultivada por pelo menos três anos consecutivos antes da grande incidência de doenças (Kudo, 2004; Junqueira et al., 2005; Narita, 2007).

É uma planta trepadeira, robusta, sublenhosa, podendo atingir 10 m de comprimento. O caule é semiflexível, lenhoso na base e herbáceo no ápice (Urashima, 1985; Silva e São José, 1994; Ruggiero et al., 1996; Vanderplank, 2000).

O sistema radicular do maracujazeiro pode ser do tipo pivotante ou axial, variando conforme a espécie. Há maior concentração de raízes na profundidade entre 15 e 45 cm do solo. As raízes médias, nesta profundidade, são responsáveis pela sustentação da planta, enquanto as pequenas têm a função de absorção de água e nutrientes. Portanto, o solo deve ser permeável para proporcionar adequada distribuição das raízes, evitar o encharcamento e permitir a melhor fixação em áreas sujeitas a ventos (Carvalho-Okano e Vieira, 2000; Meletti, 2000).

As folhas são alternadas, geralmente simples, inteiras ou lobadas, de formas variáveis, raramente compostas e de margem inteira ou serrilhada, normalmente com três ou cinco nervuras (Silva e São José, 1994; Feuillet e Macdougall, 2007).

As gavinhas são modificações foliares que têm a função de prender a planta a suportes, frequentemente, solitárias nas axilas das folhas. As glândulas nectaríferas ocorrem no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha, sendo esta característica taxonômica importante na separação entre espécies e grupos (Cunha et al., 2004; Nunes e Queiroz, 2007).

As flores são hermafroditas, actinomorfas, geralmente isoladas ou aos pares nas axilas das folhas, sendo protegidas na base por brácteas foliáceas. Além disso, apresentam vários mecanismos que impedem a autofecundação, entre eles, o sistema de autoincompatibilidade do tipo esporofítico (Suassuna et al. 2003).

A polinização natural do maracujazeiro é comumente feita por mamangavas, abelhas do gênero *Xylocopa*, que, pelo seu grande porte, ao visitarem a flor do maracujazeiro, encostam seu dorso nos estames, coletando os grãos de pólen, levando-os para os estigmas de outras flores, fazendo a polinização. Nesse caso, o percentual de pegamento dos frutos depende do

número de mamangavas presentes no pomar e da frequência das aplicações de inseticidas agrícolas. A polinização manual tem um efeito positivo no pegamento de frutos de maracujazeiro, alcançando 76% de pegamento em flores cruzadas e polinizadas manualmente (Junqueira et al., 2001; Sanábio, 2001).

O fruto do maracujazeiro é classificado como baga, tem forma ovoide ou globosa, raramente fusiforme, com polpa mucilagínosa e carnosas. A casca é coriácea, quebradiça e lisa, protegendo o mesocarpo, no interior do qual estão as sementes (Melletti e Maia, 1999; Cunha et al., 2004).

As sementes do maracujazeiro apresentam germinação epígea, são classificadas como ortodoxas ou ortodoxas intermediárias. Apresentam forma oval, sendo comprimidas, numerosas, com testa endurecida, faveolada ou estriada, providas de arilo saciforme, carnosos ou membranosos, sendo o endosperma carnosos (Carvalho-Okano e Vieira, 2000).

3.1.2.2. Importância econômica do maracujazeiro

As passifloras têm uso diversificado, podendo ser utilizadas *in natura*, como plantas ornamentais e medicinais e na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentar. A maior parte da produção do maracujazeiro é destinada ao consumo de frutas frescas, sendo o restante destinado às agroindústrias de processamento. O suco é o principal produto das passifloras (Meletti, 2011). As passifloras são utilizadas para a ornamentação devido ao fato de suas flores terem uma beleza exótica, com formas e cores peculiares, que chamam a atenção, o que possibilita sua inserção e utilização no mercado ornamental (Abreu et al., 2009; Santos et al., 2012). Além da ornamentação, as passifloras também entram no mercado medicinal por suas folhas, flores, raízes e frutos serem utilizados para fins medicinais para combater várias doenças (Costa e Tupinanbá, 2005).

Diante da ampla utilização e aceitação no mercado mundial, a cultura do maracujazeiro apresenta grande importância no setor agrícola (Meletti, 2011). O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com uma produção de 923.035 t/ano. A Região Nordeste é a que mais produziu nos últimos anos, sendo responsável por mais da metade da produção nacional, com 671.421 t/ano. Os

Estados que mais produzem a fruta são Bahia, Ceará, Espírito Santo, Sergipe, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Amazônia, Pernambuco e Goiás, destacando-se a Bahia, maior Estado produtor, com 410.078 t/ano (IBGE, 2011).

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) e o maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) são as espécies de maior importância econômica no Brasil. O cultivo do maracujazeiro-azedo é responsável por 95% dos plantios no País (Meletti et al., 2011). Além dessas espécies, outras espécies do gênero *Passiflora*, como 'maracujá-melão' (*Passiflora quadrangularis* L.), 'maracujá-suspiro' (*Passiflora nítida* HBK), 'maracujá-azul' (*Passiflora caerulea* L.), 'maracujá-peroba' (*Passiflora laurifolia* L.), 'maracujá-do-mato' (*Passiflora cincinnata* Mast) e 'maracujá-do-sono' (*Passiflora setacea* DC), são também importantes. Entretanto, estas espécies são comercializadas apenas em algumas regiões (Meletti et al., 2005).

A *Passiflora setacea* se destaca por apresentar tolerância a doenças como o vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), mostrando boas perspectivas para uso em programas de melhoramento (Fonseca, 2009; Cerqueira-Silva et al., 2012a; Santos, 2013). Porém, algumas características fisiológicas indesejáveis, como dormência das sementes e dificuldade de enraizamento, prejudicam a utilização de técnicas convencionais de propagação para esta espécie (Meletti et al., 2002; Santos et al., 2005).

3.1.2.3. Cultivo *in vitro* e conservação do maracujazeiro

As técnicas de cultura de tecidos têm contribuído para melhor entender os eventos da diferenciação celular e para potencializar a exploração das plantas cultivadas, sendo uma alternativa que permite a realização de pesquisas de apoio às diferentes áreas da biologia ou agrárias, auxiliando na obtenção de materiais vegetais que apresentam dificuldades de regeneração (Lima et al., 2004a; Cid e Teixeira, 2010).

Portanto, uma alternativa para melhorar a porcentagem de germinação e enraizamento de plantas de *P. setacea* é a cultura de tecidos vegetais, que se mostrou eficiente na germinação e propagação de várias espécies de *Passiflora* já estudadas. Sob esta perspectiva, há necessidade de se expandirem estudos

nessa área com espécies silvestres, que vêm apresentando resistência a doenças, nos trabalhos já desenvolvidos (Biasi et al., 2000; Melletti et al., 2002; Dias et al., 2003; Isutsa, 2004; Ribeiro et al., 2006; Alexandre et al., 2009; Fonseca, 2009; Santos et al., 2010, Garcia et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012).

No gênero *Passiflora*, apenas 3% das espécies foram cultivadas *in vitro*, sendo que a espécie mais cultivada foi a *Passiflora edulis*. Os estudos relativos à cultura de tecidos em *Passiflora* incluem várias áreas de aplicação desta técnica (Lima et al., 2004a; Passos e Bernacci, 2005).

A propagação seminífera *in vitro* é uma técnica de cultura de tecidos utilizada em espécies de *Passiflora* por ser uma alternativa para resolver problemas como a dormência das sementes (Passos et al., 2004; Santos et al., 2010; Barros et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Soares et al., 2012).

Um dos métodos usados para quebra de dormência *in vitro* de espécies de *Passiflora* é o tratamento mecânico, escarificando ou retirando totalmente o tegumento das sementes antes da inoculação em diversos meios de cultura (Zonta et al., 2005; Junghans et al., 2010; Santos et al., 2010; Carvalho et al., 2012).

Outra opção para germinação de sementes de *Passiflora* é o uso de reguladores de crescimento, sendo o ácido giberélico (GA_3) o mais usado. Carvalho et al. (2012), ao trabalharem com germinação de *Passiflora gibertii*, utilizando GA_3 nas concentrações de 28,87; 57,74; 86,61 e 115,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e Hunhoff et al. (2011), com *Passiflora quadrangularis*, usando 1,44 e 2,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 no meio de cultura, não verificaram influência deste regulador de crescimento na germinação *in vitro* destas espécies. Já Passos et al. (2004), estudando *Passiflora nitida*, observaram que a concentração de GA_3 mais adequada para germinação foi a de 2.880 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados mostram a diversidade de concentrações de GA_3 usadas para plantas do gênero *Passiflora*, indicando a necessidade de estabelecer protocolos de cultivo *in vitro* para as mais diversas espécies desse grupo de plantas.

Além da propagação seminífera *in vitro*, outro método utilizado para propagar as passifloras é a micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro*, que compreende a maioria dos trabalhos desenvolvidos com a cultura do maracujazeiro (Kawata et al., 1995; Biasi et al., 2000; Koch e Zanette, 2000; Lima

et al., 2004a; Passos e Bernacci, 2005; Santos et al.; 2010; Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Soares et al., 2012).

A micropropagação em algumas espécies tem mostrado importantes vantagens em comparação com os sistemas convencionais de propagação (Passos e Bernacci, 2005; Guerra e Nodari, 2006). No gênero *Passiflora*, a micropropagação foi descrita pela primeira vez por Moran-Robles (1978) e, posteriormente, por Kantharajah & Dodd (1990) e Dornelas & Vieira (1994). O potencial propagativo em *Passiflora* varia de acordo com cada espécie e com a origem do explante (Lima et al., 2004a).

Busilacchi (2008), trabalhando com *Passiflora caerulea*, e Gómez e Gonzáles (2010), trabalhando com *Passiflora edulis* e *Passiflora quadrangularis*, obtiveram sucesso na micropropagação destas espécies utilizando diferentes concentrações de 6-benzil amino purina (BAP).

Protocolos de propagação seminífera *in vitro* e micropropagação são ferramentas importantes para a conservação *in vitro* do gênero *Passiflora* (Passos e Bernacci, 2005). A conservação de germoplasma *in vitro* de espécies de *Passiflora* é uma alternativa atrativa para reduzir os custos de manutenção e tornar o processo de conservação da coleção mais eficiente (Lima et al., 2004b).

Faria et al. (2006), trabalhando com *Passiflora giberti*, comprovaram ser possível conservar esta espécie sob crescimento lento *in vitro*. Nesse estudo, microplantas de maracujazeiro foram cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose.

Contudo, ainda são escassos os trabalhos de conservação *in vitro* com passifloras. Há necessidade de avanços nos estudos básicos para estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* adequados para conservar espécies deste gênero (Faleiro et al., 2012).

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) e na câmara de crescimento do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias

Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.1.3.1. Descrição do germoplasma

O material vegetal utilizado foi constituído de sementes do genótipo UESC365 cultivado no Colégio Agrícola Antônio Sarlo, no Município de Campos dos Goytacazes, Região Norte do Estado do Rio de Janeiro. O genótipo UESC365 é proveniente de sementes doadas pelo Banco Ativo de Germoplasma da UESC (BAG-Passifloras), localizado no *campus* da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

3.1.3.2. Desinfestação

Para desenvolver o protocolo de desinfestação de sementes, foi feito um ensaio no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial 3 x 3, em que as sementes foram tratadas com três diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) (0,00; 0,25 e 0,50 %) durante 5, 10 ou 15 minutos, respectivamente, com nove repetições. Cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio com 10 mL de meio de cultura e uma semente.

Foram retirados os tegumentos das sementes antes da desinfestação e inoculação (Alexandre et al., 2009). O procedimento de desinfestação foi feito em câmara de fluxo laminar com imersão das sementes sem tegumento em álcool 70 % por 30 segundos, nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, e enxaguadas quatro vezes em água desionizada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas em meio MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração dos sais minerais, acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, e cultivadas por 30 dias em luz (fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia) com irradiância de 25 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro) e temperatura de 27± 2°C. Após 30 dias, o material foi avaliado pela contagem do número de sementes germinadas e pelo número de contaminações.

Os dados em percentagem foram analisados pela estatística descritiva, utilizando o desvio padrão. O melhor tratamento de desinfestação de sementes sem tegumento de *P. setacea* foi utilizado no experimento de germinação *in vitro*.

3.1.3.3. Germinação *in vitro*

Para a etapa de germinação das sementes *in vitro*, o delineamento utilizado foi o DIC, em um esquema fatorial 2 x 3 x 2, em que foram usados os meios MS completo e com a metade da concentração de sais minerais e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e três concentrações de GA₃ (0,00; 1,44 e 2,88 μmol L⁻¹), ficando metade dos tratamentos no escuro e a outra metade em luz (fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 25 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro) e temperatura de 27± 2 °C, com 50 repetições. Cada repetição foi constituída por um tubo de ensaio com 10 mL de meio de cultura e uma semente sem tegumento.

Para inoculação, foi retirado o tegumento das sementes (Alexandre et al., 2009), e estas foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito a 0,25% por 15 minutos, enxaguadas quatro vezes em água desionizada e autoclavada. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, o material foi avaliado pela contagem do número de sementes que emitiram radícula e se desenvolveram em uma plântula completa.

Os dados em percentagem foram analisados pela estatística descritiva, utilizando o desvio padrão.

3.1.3.4. Aclimatização

A aclimatização foi conduzida em um delineamento inteiramente casualizado, em que foram utilizados os substratos SI - areia, SII - Basaplant® Hortaliça e SIII - Basaplant® Hortaliça + areia (1:1 v/v), com 25 repetições cada.

As plântulas de *P. setacea* germinadas *in vitro* foram aclimatizadas em copos plásticos descartáveis com capacidade de 200 mL e mantidas em câmara

de crescimento com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados em 26 ± 2 °C, 80% e 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Os substratos foram esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm durante uma hora, por três vezes, com um intervalo de 24 horas entre cada autoclavagem.

A avaliação do experimento de aclimatização foi feita pela contagem de plantas sobreviventes.

Os dados em percentagem foram analisados pela estatística descritiva, utilizando o desvio padrão.

3.1.3.5. Morfogênese

O material vegetal utilizado como fonte de explantes para enraizamento e multiplicação foi constituído de segmentos nodais de plântulas cultivadas *in vitro*. Para a etapa de obtenção das plântulas, foram utilizados os sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e vitaminas de White.

Após a retirada do tegumento (Alexandre et al., 2009), as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 0,25% por 15 minutos e enxaguadas quatro vezes em água desionizada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Em seguida, foram inoculadas 10 sementes por frasco contendo 40 mL de meio. Os frascos foram levados para a sala de crescimento com temperatura controlada em 27 ± 2 °C, ficando inicialmente no escuro. Após sete dias no escuro, o material foi transferido para luz (fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro), permanecendo nessas condições por 60 dias.

Para inoculação dos segmentos nodais provenientes das plântulas germinadas *in vitro*, o experimento foi conduzido na forma de DIC em um esquema fatorial 5 x 4 x 3, sendo usadas cinco concentrações de AIB (0,00; 1,23; 2,46; 4,92 e 9,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$), quatro concentrações de BAP (0,00; 1,11; 2,22 e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e três tipos de segmentos nodais em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com a metade da concentração de sais minerais, acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e vitaminas de White, com 10 repetições.

Cada repetição foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e todos os segmentos nodais de uma plântula.

Os segmentos nodais das plântulas inoculados em câmara de fluxo laminar foram divididos em segmento basal, mediano e apical (Figura 1). Cada plântula foi considerada uma repetição. Após a inoculação, os frascos foram levados para a sala de cultivo com temperatura controlada em 27 ± 2 °C e luz fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro.

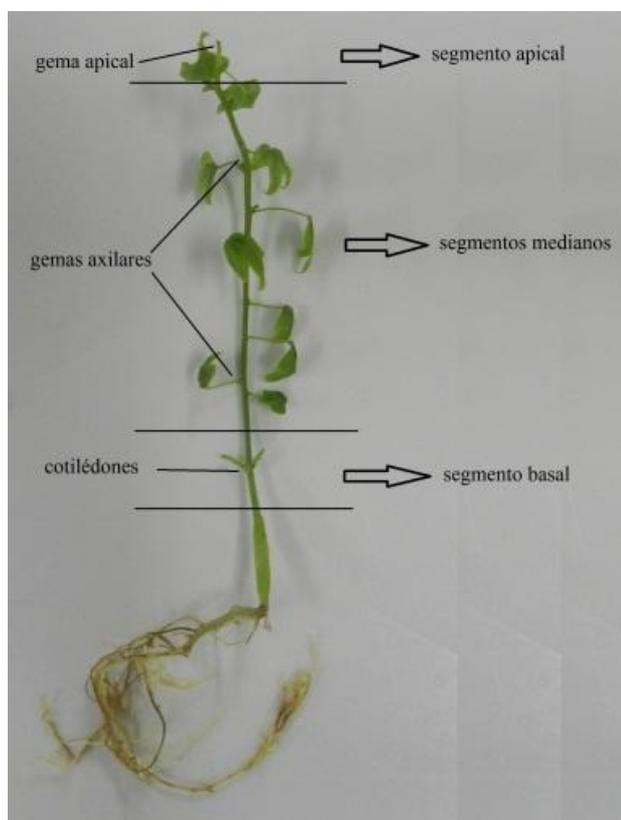


Figura 1. Divisão da plântula para inoculação em meio MS contendo diferentes concentrações de AIB e BAP. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

A avaliação do experimento foi feita após 30 dias, quando foram contadas a quantidade de brotações por segmento e a quantidade de segmentos nodais que enraizaram.

Os dados do número de brotações foram submetidos à ANOVA e, em seguida, ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott, com auxílio do programa computacional Genes (Cruz, 2013).

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Desinfestação

Houve baixa porcentagem de contaminação em todos os tratamentos, não ocorrendo qualquer tipo de contaminação, seja por fungos ou bactérias, em mais de 90% dos tratamentos com NaClO, Figura 2, constatando, assim, que o protocolo de desinfestação foi eficiente. Portanto, as diferentes concentrações de NaClO mostraram semelhante capacidade germicida, não se distinguindo entre si. Possivelmente, a baixa taxa de contaminação tenha sido favorecida pela retirada do tegumento, o que aumentou a eficiência do processo de desinfestação.

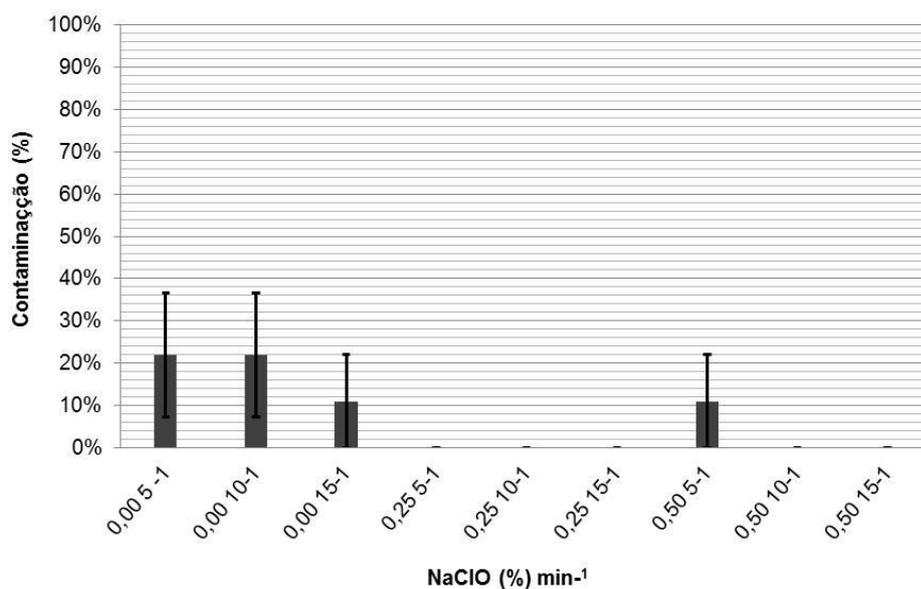


Figura 2. Contaminação (%) de sementes sem tegumento de *Passiflora setacea* *in vitro*. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Segundo Cid e Zimmermann (2006), o hipoclorito de sódio (NaClO) apresenta como uma das vantagens a fácil solubilidade em água, sendo, portanto, de fácil remoção, o que evita efeitos residuais tóxicos que possam provocar oxidação nos explantes. O NaClO é o produto mais utilizado na assepsia dos explantes para inoculação *in vitro*, sendo empregado em diversas

concentrações, variando de 0,1% a 2,5%, entre 5 a 30 min. No que diz respeito a esse experimento, a utilização de 0,25 e 0,5% de NaClO foi eficiente para a desinfestação dos explantes.

Em sementes de *P. alata* D., o hipoclorito de sódio a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% foi eficiente na desinfestação, ao contrário do uso apenas do álcool 70% (Zucoloto et al., 2006). Esses resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho, em que as maiores taxas de contaminação foram verificadas em tratamentos sem NaClO.

O menor percentual de contaminação (0%), Figura 2, e o maior de germinação (100%), Figura 3, corresponderam ao critério empregado para selecionar o protocolo de desinfestação (0,25% de NaClO por 15 minutos) para as sementes sem tegumento de *P. setacea*.

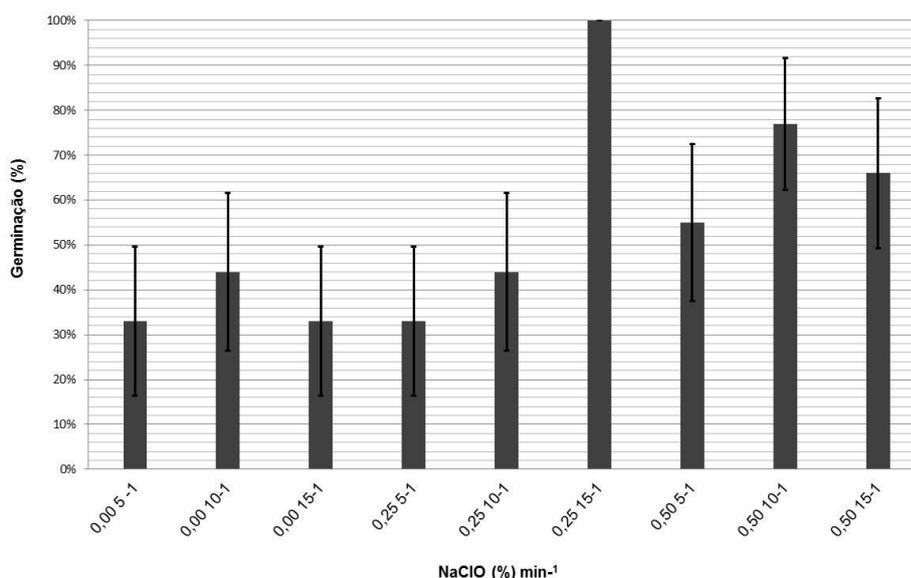


Figura 3. Germinação (%) de sementes sem tegumento de *Passiflora setacea* *in vitro* do experimento de desinfestação. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

3.1.4.2. Germinação

Aos 30 dias de inoculação das sementes de *P. setacea* sem tegumento, houve crescimento das plântulas nos diferentes tratamentos (Figura 4).

Em passifloras, a retirada total do tegumento das sementes para o cultivo *in vitro* é um tratamento físico eficiente, pois estudos mostram que sementes com

tegumento não germinam eficientemente, levando a acreditar que há algum tipo de dormência induzida pelo tegumento, que pode estar relacionada aos mecanismos de controle de entrada de água para o interior das sementes ou de substâncias inibidoras do crescimento presentes nos envoltórios da semente (Dias et al., 2003; Alexandre et al., 2009).

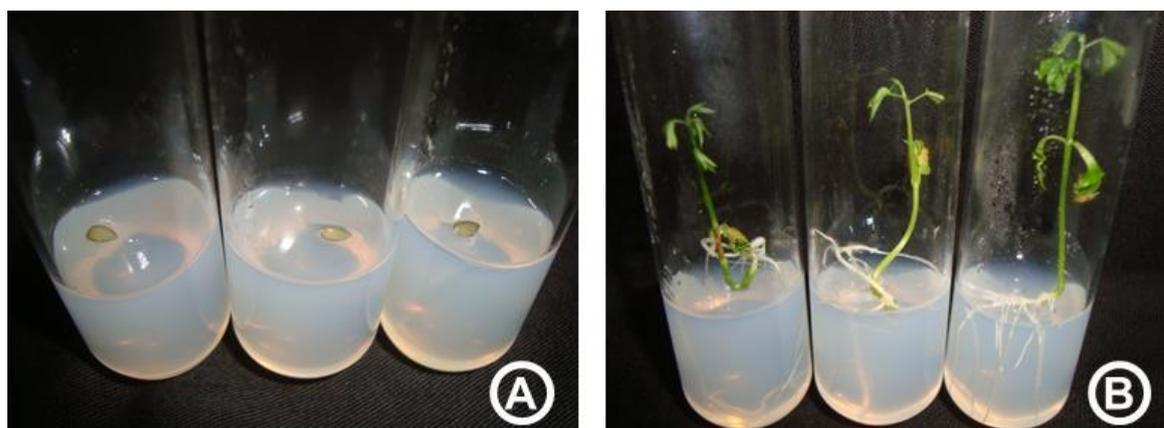


Figura 4. A) Sementes sem tegumento de *Passiflora setacea* inoculadas *in vitro*. B) Plântulas de *P. setacea* crescidas, apresentando raízes e parte aérea. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Os melhores resultados para a taxa de germinação das sementes de *P. setacea* sem tegumento foram proporcionados pelos tratamentos $\frac{1}{2}$ MS – luz (66%), $\frac{1}{2}$ MS – escuro (68%) e MS – escuro (68%) sem GA₃ (Figura 5). Com base nesses resultados, pode-se inferir que não há necessidade de adição de GA₃ para germinação de sementes sem tegumento de *P. setacea*. O $\frac{1}{2}$ MS e o MS não apresentaram diferença quando submetidos ao escuro, contudo, na luz, houve diferença entre as duas concentrações dos meios de cultura.

Carvalho et al. (2012), ao empregarem GA₃ na germinação de *Passiflora gibertii*, e Hunhoff et al. (2011), de *Passiflora quadrangularis*, não verificaram influência da giberelina na germinação *in vitro* destas espécies, assemelhando-se aos resultados obtidos neste trabalho.

Entretanto, Passos et al. (2004), ao estudarem o uso de GA₃ na germinação de sementes de *Passiflora nitida*, observaram que a concentração de 2,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi a mais adequada. Estes trabalhos mostram a diversidade de concentrações de GA₃ usadas para as plantas do gênero *Passiflora*, indicando que para cada espécie deste gênero é necessário o estabelecimento de um

protocolo de germinação *in vitro*, pois cada espécie pode responder de diferentes formas às diversas concentrações de GA₃.

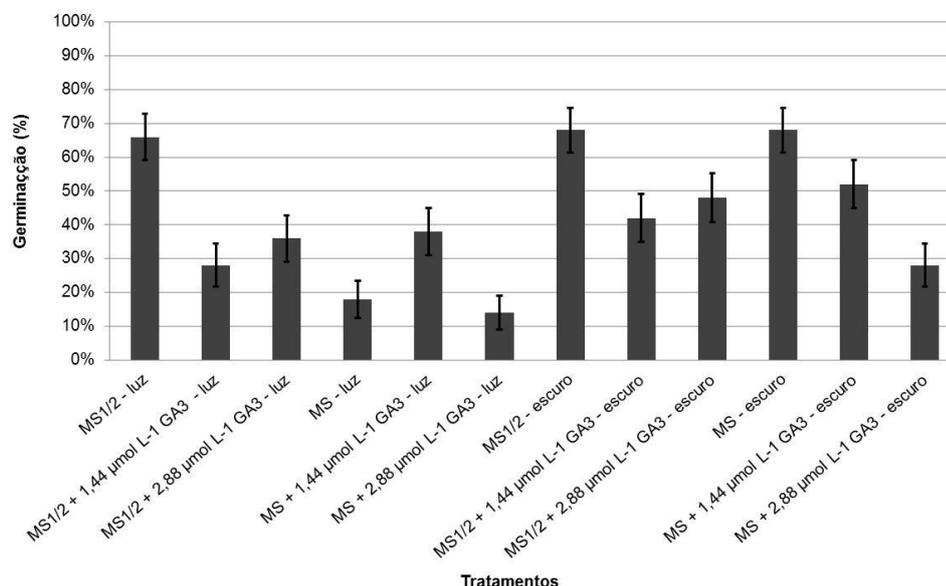


Figura 5. Germinação (%) de sementes sem tegumento de *Passiflora setacea* em meio MS, com diferentes concentrações de GA₃. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

A propagação semínifera *in vitro* utilizando reguladores de crescimento é comum em espécies de *Passiflora*, sendo, em alguns casos, uma alternativa para aumentar a taxa de germinação das sementes e resolver problemas como dormência, característica presente em várias espécies de passifloras (Passos et al., 2004; Santos et al., 2010; Barros et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Soares et al., 2012). Neste estudo, a utilização de GA₃ não foi eficiente para aumentar a taxa de germinação, já que as melhores taxas foram obtidas nos tratamentos que não continham regulador de crescimento.

No que se refere à luminosidade para a germinação de sementes de *P. setacea* sem tegumento, Figura 5, foi constatada diferença entre a luz e o escuro na germinação das sementes, para a maioria dos tratamentos (Figura 5). Em todos os tratamentos no escuro, as médias foram superiores às da luz, podendo as sementes de *P. setacea* ser classificadas como fotoblásticas negativas. Estes resultados divergem do trabalho desenvolvido por Passos et al. (2004), em que a luz e o escuro não apresentaram diferença significativa na germinação das

sementes de *Passiflora nitida*, mostrando ser esta característica dependente da espécie.

3.1.4.3. Aclimatização

A figura 6 mostra, para o experimento de aclimatização, a porcentagem de sobrevivência das plântulas de *P. setacea* em diferentes substratos. Os resultados do experimento indicam que a maior porcentagem de crescimento das plântulas de *P. setacea* ocorreu no substrato composto apenas por areia, quando comparada aos substratos com Basaplant[®] Hortaliças e Basaplant[®] Hortaliças + areia, que apresentaram baixa taxa de sobrevivência (Figura 6).

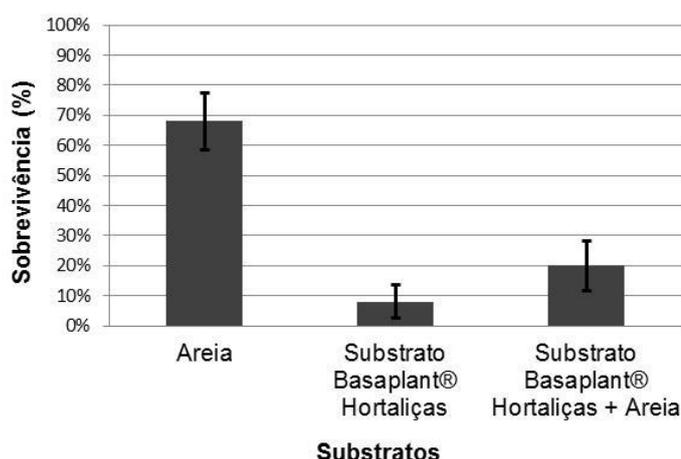


Figura 6. Sobrevivência (%) das plântulas de *P. setacea* após a aclimatização. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Mendonça et al. (2006), ao trabalharem com maracujazeiro-azedo, usaram dois tipos de substratos, A (composto orgânico + areia + solo na proporção de 1:1:3 em volume) e B (Plantmax[®] + areia + solo na proporção de 1:1:3 em volume), e constataram que o substrato A proporcionou maior número de folhas e comprimento e matéria seca da raiz.

Lopes et al. (2007) observaram, em plântulas obtidas de sementes de frutos murchos com arilo do maracujazeiro-azedo, uma velocidade de emergência semelhante, quando semeadas na areia e no substrato areia + terra + esterco.

Como observado nos trabalhos acima, os substratos que continham areia na sua composição apresentaram os melhores resultados, sugerindo que as

passifloras necessitam de substratos leves e com boa aeração e drenagem durante a aclimatização das mudas. A areia, por suas características, confere condições adequadas de substrato, como porosidade, que permite o movimento de água e ar no substrato (Nogueira et al., 2003).

3.1.4.4. Morfogênese *in vitro*

Para número de brotações, os segmentos basais apresentaram maior número (3,8) por segmento nodal para o tratamento AIB (0,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$), que não se diferenciou significativamente dos tratamentos AIB (0,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$); AIB (0,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$); AIB (1,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$); AIB (2,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e AIB (4,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 1).

De modo geral, com aumento da concentração dos reguladores de crescimento AIB e BAP, houve diminuição no número de brotações, tendo sido os segmentos apicais os que reagiram menos aos efeitos dos reguladores de crescimento (Tabela 1).

O que também pôde ser verificado é que o uso concomitante de AIB e BAP no meio de cultura não é interessante para obter o maior número de brotações, indicando que o uso desses reguladores deve ser feito separadamente para obter melhores resultados. No segmento apical, os melhores tratamentos foram os AIB (0,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP (1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$), Tabela 1, indicando que os tratamentos com BAP agiram de forma eficiente quando não continham AIB. Estes resultados podem ser devidos ao maior nível endógeno de auxina nos segmentos apicais. O mesmo não ocorreu para os segmentos basais e medianos.

Tabela 1. Média do número de brotações por segmento de *Passiflora setacea*. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

AIB + BAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	¹SA	²SM	³SB	⁴MTS
0,00 + 0,00	0.3b*	0.5b	0.5b	0.4b
0,00 + 1,11	1.6a	1.2a	3.8a	2.2a
0,00 + 2,22	1.0a	1.4a	3.0a	1.8a
0,00 + 4,44	1.0a	1.1a	2.9a	1.6a
1,23 + 0,00	0.6b	0.8b	1.3b	0.9b
1,23 + 1,11	0.5b	0.6b	0.8b	0.6b
1,23 + 2,22	0.5b	1.0a	1.8b	1.1b
1,23 + 4,44	0.5b	1.1a	2.8a	1.4a
2,46 + 0,00	0.5b	0.7b	1.2b	0.8b
2,46 + 1,11	0.5b	0.8b	1.6b	0.9b
2,46 + 2,22	0.6b	1.2a	2.2a	1.3a
2,46 + 4,44	0.6b	1.2a	0.9b	0.9b
4,92 + 0,00	0.1b	0.4b	0.7b	0.4b
4,92 + 1,11	0.6b	0.4b	1.1b	0.7b
4,92 + 2,22	0.4b	0.6b	1.3b	0.7b
4,92 + 4,44	0.4b	0.7b	2.3a	1.1b
9,84 + 0,00	0.2b	0.1b	0.0b	0.1b
9,84 + 1,11	0.4b	0.7b	1.5b	0.8b
9,84 + 2,22	0.0b	0.4b	1.0b	0.4b
9,84 + 4,44	0.6b	1.0a	1.1b	0.9b
C.V.	134.4	83.4	95.9	77.0

*Médias seguidas pela mesma letra constituem grupo estatisticamente homogêneo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ¹SA = segmento apical; ²SM = Segmento mediano; ³SB = segmento basal ⁴MTS = média total dos segmentos.

A porcentagem de enraizamento nos segmentos basais foi de 10% para os tratamentos AIB ($0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($1,23 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($1,23 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($2,46 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($4,92 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($4,92 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$); AIB ($9,84 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($1,11 \mu\text{mol L}^{-1}$) e AIB ($9,84 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$) e de 30% para o tratamento AIB ($9,84 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAP ($0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo que os demais tratamentos não promoveram enraizamento adventício (Figura 7). Nos segmentos medianos e apicais, não foi observada nenhuma formação de raízes. Embora a taxa de enraizamento tenha sido baixa, esse resultado mostra que o AIB influenciou positivamente no enraizamento das plantas como esperado, indicando que o AIB agiu independentemente do BAP.

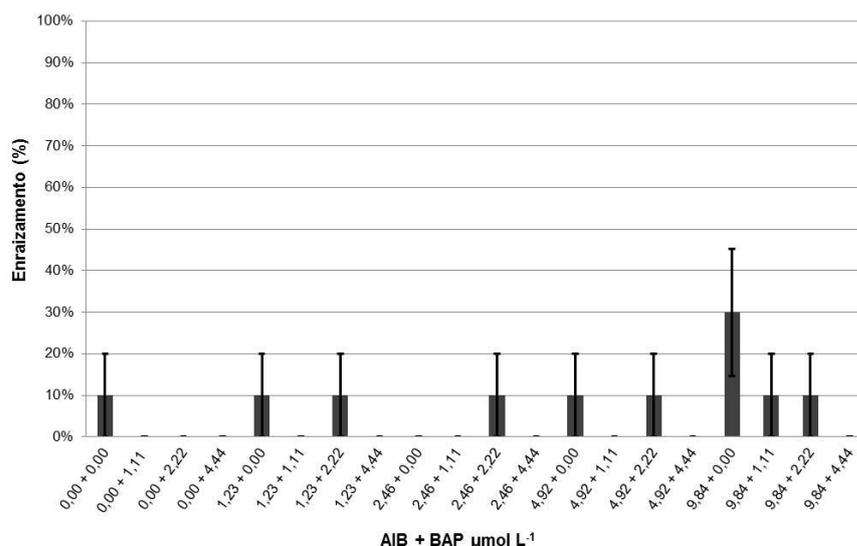


Figura 7. Enraizamento (%) dos segmentos nodais basais de *Passiflora setacea* em meio $\frac{1}{2}$ MS com diferentes concentrações de AIB e BAP. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

A maioria das passifloras são alógamas por terem mecanismos de autocompatibilidade esporofítica e gametofítica que impedem a autofecundação, gerando efeito segregante (Braga et al., 2006), que pode explicar a baixa taxa de enraizamento da *P. setacea*, sendo que algumas plantas apresentam maior predisposição genética ao enraizamento do que outras. Outro fator que pode ter influenciado a taxa de enraizamento da *Passiflora setacea* é a dificuldade de enraizamento da espécie (Melletti et al., 2002; Santos et al., 2005).

Santos et al. (2010), ao trabalharem com *Passiflora setacea* utilizando diferentes tipos de meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento, não verificaram presença de raízes e de brotações laterais em todos os tratamentos, comprovando sua dificuldade para enraizar.

Os resultados para enraizamento e brotação de *Passiflora setacea* indicam que o AIB e o BAP devem ser usados separadamente para enraizar e obter maior número de brotações, respectivamente, por apresentarem melhores resultados.

Koch e Zanette (2000), ao usarem AIB e BAP em *Passiflora actinia*, verificaram melhor desempenho quando empregados separadamente, pois houve intensa formação de brotos utilizando somente o BAP e alta taxa de enraizamento utilizando somente o AIB, porém quando os dois reguladores de crescimento

foram empregados juntos houve diminuição na quantidade de brotações e enraizamento dos segmentos nodais.

Os segmentos nodais basais proporcionaram a melhor média de brotações, Tabela 1, e a melhor taxa de enraizamento, Figura 7, destacando-se entre os segmentos apical e mediano.

A Figura 8 A mostra as brotações em segmento nodal basal em meio MS suplementado com BAP e a Figura 8 B, o segmento nodal basal enraizado em meio MS suplementado com AIB.

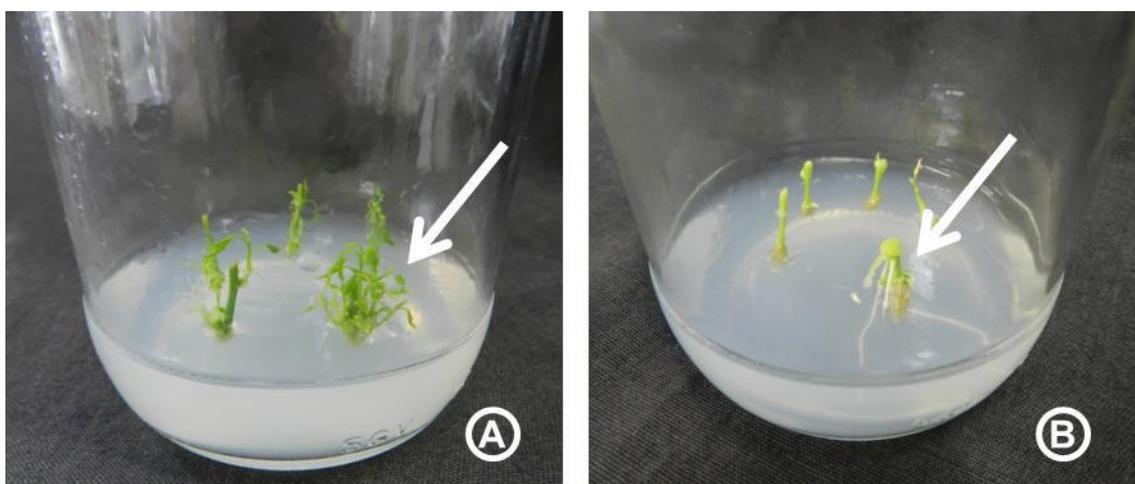


Figura 8. Segmentos nodais de *Passiflora setacea* cultivada *in vitro* com adição de reguladores de crescimento (AIB e BAP). A) Segmento nodal basal com brotações; B) Segmento nodal basal enraizado. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

O uso de segmentos de plântulas cultivadas *in vitro* foi um fator importante para o sucesso do experimento, pois, segundo Dias et al. (2003), a utilização de plântulas germinadas *in vitro*, como fonte de segmentos de hipocótilo, é bastante promissora, visto a contaminação ser eliminada ao desinfestar as sementes. Além disso, segmentos de plântulas são importantes pelo fato de sua juvenildade proporcionar explantes que apresentam alta resposta morfogênica nos cultivos *in vitro*.

A concentração e o tempo de exposição ao AIB e BAP utilizados foram eficientes para multiplicação dos explantes e indução do enraizamento. Esse tempo influenciou os tecidos cultivados de forma positiva, levando-os a desenvolver raízes e brotações.

Acredita-se que um tempo maior que 35 dias de exposição dos segmentos nodais aos reguladores de crescimento seria prejudicial, visto que a partir dos 30 dias os segmentos começaram a perder o vigor, sendo que alguns morreram. Sendo assim, foi necessário realizar a troca dos segmentos para meio contendo os sais do MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e vitaminas de White. Após essa troca, foi observado que, em aproximadamente dois meses, os segmentos que não enraizaram quando expostos aos reguladores desenvolveram raízes, mostrando uma boa perspectiva para utilizar essa metodologia para enraizamento de *Passiflora setacea*.

Estes estudos mostram boas perspectivas para o futuro da conservação *in vitro* de *P. setacea*, pois o estabelecimento de protocolos de desinfestação, germinação e multiplicação *in vitro* corresponde aos primeiros passos para que se tenham explantes disponíveis para futuros experimentos de conservação *in vitro*, utilizando a técnica de meio de cultivo mínimo.

3.1.5. CONCLUSÕES

O melhor tratamento para desinfestação de sementes sem tegumento de *P. setacea* foi com hipoclorito de sódio (0,25%) por 15 minutos.

Não há necessidade de adição de GA₃, e o escuro é o melhor tratamento para a germinação de sementes sem tegumento de *P. setacea*, sendo as sementes desta espécie classificadas como fotoblásticas negativas. Os meios de cultura ½MS e MS não diferem entre si no escuro.

A areia foi o melhor substrato para aclimatizar plântulas de *P. setacea*.

Os reguladores de crescimento atuaram separadamente na formação de raízes e de brotações neste tipo de explante de *P. setacea*, tendo sido o tratamento sem AIB + 1,11 µmol L⁻¹ BAP o mais indicado para a multiplicação e o 9,84 µmol L⁻¹ AIB + sem BAP o mais indicado para o enraizamento, devendo ser utilizados para o estabelecimento de explantes de *P. setacea in vitro* a serem conservados.

O segmento nodal basal apresentou melhor desempenho na formação de brotos e raízes.

3.2. RESISTÊNCIA AO *Cowpea aphid-borne mosaic virus* EM PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *Passiflora setacea*

3.2.1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro tem grande importância no setor agrícola em função de sua ampla utilização e aceitação no mercado mundial (Meletti, 2011). O Brasil é o maior produtor mundial de maracujazeiro-azedo, com uma produção de 923.035 t/ano (IBGE, 2011). Entretanto, tem sido registrada uma redução na produtividade e na longevidade desta cultura, principalmente em decorrência das doenças, que são consideradas fatores limitantes para a manutenção e expansão da passicultura. Essas doenças afetam a planta desde a fase de sementeira até a planta adulta, prejudicando raízes, caule, folhas, flores e frutos (Santos Filho e Santos, 2003).

Entre as doenças que acometem a passicultura, em todos os Estados produtores, a virose do endurecimento dos frutos é considerada a mais importante economicamente (Kitajima et al., 1986; São José et al., 2011). Esta doença está presente nas principais áreas produtoras do Brasil e é causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). O CABMV é uma espécie do gênero *Potyvirus* que pode ser transmitido por pulgões e mecanicamente por meio de extrato foliar tamponado e por enxertia (Barbosa et al., 2006; Narita, 2007).

As espécies silvestres vêm apresentando importante potencial em programas de melhoramento genético do maracujazeiro por apresentarem

características importantes para o melhoramento, como a resistência a doenças. Estudos comprovam que, dependendo da espécie, por meio de cruzamentos artificiais, podem ser obtidos híbridos férteis e promissores para o melhoramento (Junqueira et al., 2005; Santos, 2013).

A *Passiflora setacea* se destaca por apresentar resistência a diversas doenças, sendo utilizada em cruzamentos interespecíficos com a espécie cultivada para a transferência de resistência ao CABMV (Fonseca, 2008; Santos 2013).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar plantas de *P. setacea* resistentes ao CABMV, visando à conservação *in vitro* dos genótipos resistentes, que serão utilizados no programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Doenças do maracujazeiro

O Brasil é considerado o maior centro de diversidade genética do gênero *Passiflora* e o maior produtor mundial de maracujazeiro-azedo, porém, tem sido registrada uma redução na produtividade e na longevidade desta cultura, principalmente em decorrência das doenças, que são consideradas fatores limitantes para a manutenção e expansão da passicultura (Junqueira et al., 2006).

O maracujazeiro pode ser acometido por várias doenças causadas por diversos fitopatógenos, como fungos, bactérias e vírus, que causam sérios problemas à cultura. Entre as principais doenças que acometem o maracujazeiro no Brasil, presentes nas principais áreas produtoras, estão a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Fischer et al., 2007; Medeiros e Peruch, 2012); a verrugose (*Cladosporium cladosporioides*) (Faria, 2008; Santos et al., 2008); a bacteriose (*Xanthomonas axonopalis* pv. *passiflorae*) (Junqueira et al., 2003; Miranda, 2004; Boro et al., 2011); a murcha do fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) (Junqueira et al., 2006; Flores et al., 2012); e a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo vírus *Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus*

(CABMV) (Nascimento et al., 2004; Junqueira et al., 2005; Nascimento et al., 2006).

3.2.2.1.2. Virose do endurecimento dos frutos

O vírus causador do endurecimento dos frutos (CABMV) é considerado a virose economicamente mais importante da cultura do maracujá (Kitajima et al., 1986; São José et al., 2011).

A virose do endurecimento dos frutos foi descrita pela primeira vez na Austrália (Shukla e Ward, 1988). Posteriormente, no continente americano (Chagas et al., 1981) e africano (Meckern et. al., 1994). No Brasil, foi identificada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá-azedo, no Estado da Bahia, no final da década de 70 (Yamashiro e Chagas, 1979). Nas décadas seguintes, foi descrita nos demais estados, estando presente nas principais áreas produtoras do Brasil (Barbosa e Bragança, 2006; Narita, 2007).

A doença do endurecimento dos frutos foi inicialmente relacionada ao vírus *Passionfruit Woodness Virus* (PWV), considerado o único causador da doença (Kitajima et al., 1986; Shukla e Ward, 1988). Estudos, por meio de análise molecular, mostram que alguns isolados de vírus que causam o endurecimento dos frutos do maracujazeiro nas principais regiões produtoras do Brasil pertencem à espécie CABMV. Por meio de caracterização molecular, foi comprovada a identidade de alguns isolados coletados em Pernambuco, Paraíba e Recife, como sendo estirpes do CABMV, considerando-o a principal espécie do *Potyvirus* causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil. Até o momento, nenhum isolado brasileiro sequenciado pertence à espécie PWV (Nascimento et al., 2004; Zerbini et al., 2005; Nascimento et al., 2006; Moreira, 2008; Cerqueira-Silva et al., 2008; Barros et al., 2011; Silva, 2012).

Os sintomas das plantas infectadas pelo CABMV são mosaico comum, em alguns casos, enrugamento, deformações e bolhas no limbo foliar e o pericarpo espesso e duro. A intensidade dos sintomas foliares pode diminuir ou quase desaparecer em algumas folhas da haste e, posteriormente, retornar nas folhas mais novas, sendo esse fator dependente da estirpe do vírus e das condições ambientais (Barbosa e Bragança, 2006).

A transmissão do vírus CABMV no campo pode ser feita por diversas espécies de afídeos, entre eles, *Aphis fabae Scopoli*, *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, *Aphis gossypii Glover*, *Myzus nicotianae Blackman* e *Myzus persicae Sulzer* (Narita et al., 2011). O vírus também pode ser transmitido facilmente via extrato foliar tamponado e enxertia (Zerbini et al., 2005; Di Piero et al., 2006). A relação vírus-vetor é do tipo não persistente, isto é, durante as picadas de prova, a aquisição e a inoculação do vírus pelo inseto são rápidas. Assim, o vírus não circula no inseto e, para continuar disseminando, o inseto precisará alimentar-se novamente de uma planta infectada para adquirir o vírus (Yuki et al., 2006).

Não existe controle químico para vírus do endurecimento dos frutos, e a técnica da pré-imunização não se mostrou viável para o maracujazeiro. Plantas pré-imunizadas são facilmente infectadas em condições de campo por estirpes mais virulentas. Alternativas de combate e controle ao agente etiológico do endurecimento dos frutos estão sendo pesquisadas, porém a maioria delas apenas ameniza o problema, e até o momento nenhuma se mostrou eficaz para a erradicação da doença (Melletti et al., 2005).

Como medidas preventivas, têm sido recomendadas a erradicação das plantas sintomáticas; evitar o trânsito de mudas para diferentes regiões; eliminação de pomares velhos ou abandonados antes do início da nova plantação; cuidados nas operações de poda e desbrota para evitar a transmissão mecânica do vírus; uso de irrigação localizada; e plantios em locais isolados. Estas medidas resultam na redução do potencial de transmissão do inóculo regional, evitando maiores perdas em relação à produtividade de genótipos de maracujazeiro-azedo infectados com o CABMV (Sampaio et al., 2008).

Uma alternativa que pode ser utilizada para erradicação do vírus do endurecimento dos frutos é o desenvolvimento de plantas resistentes por meio do silenciamento gênico pós-transcricional. Estudos utilizando esta metodologia mostraram que a maioria das plantas utilizadas não promove o silenciamento gênico para todos os isolados de CABMV a que foram submetidas (Alfenas et al., 2005; Trevisan e Mendes, 2006). Monteiro-Hara et al. (2011), com o intuito de desenvolver plantas resistentes ao CABMV, obtiveram 118 plantas transgênicas resistentes, porém, não foram realizados experimentos para avaliar essas plantas em campo. Embora o silenciamento gênico seja umas das alternativas mais

promissoras para a erradicação do CABMV, a transgenia tem limitações, especialmente quanto ao risco de escape do transgene para parentes silvestres (Torres, 2003).

A hibridação interespecífica também pode ser uma alternativa para obter plantas resistentes aos vírus CABMV, já que espécies silvestres vêm apresentando importante potencial em programas de melhoramento genético do maracujazeiro por apresentarem resistência a doenças (Fonseca, 2008; Santos, 2013). Porém, novos estudos são essenciais para encontrar uma solução eficaz de combate e controle à virose do endurecimento dos frutos em maracujazeiros.

3.2.2.3. Melhoramento visando à resistência a doenças e conservação do maracujazeiro

O melhoramento utilizando espécies silvestres de passifloras é uma área promissora para o desenvolvimento de plantas com resistência a diversas doenças. As espécies silvestres constituem um importante potencial para programas de melhoramento, por terem características como longevidade, melhor adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para indústria farmacêutica e cosmética e resistência a doenças, sendo este último um dos principais objetivos dos programas de melhoramento com maracujazeiros no Brasil (Bruckner, 2002; Junqueira et al., 2005; Meletti et al., 2005).

Programas de melhoramento visando à obtenção de plantas resistentes a doenças utilizam espécies silvestres do gênero *Passiflora* para cruzamentos interespecíficos por apresentarem resistência a diversas doenças e compatibilidade com a espécie *P. edulis*. (Braga et al., 2005; Junqueira et al., 2005).

Pesquisas com o objetivo de identificar a compatibilidade genética entre espécies de maracujazeiro cultivadas e silvestres mostraram a capacidade de obter híbridos férteis e promissores para o melhoramento. As espécies silvestres *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. glandulosa*, *P. mucronata* e *P. galbana* foram usadas como genitoras femininas ou masculinas em cruzamento com a espécie cultivada

P. edulis, produzindo grande número de sementes férteis (Junqueira et al., 2005; Borges et al., 2003; Faleiro et al., 2004, Santos, 2013).

Estudos relatam que as espécies silvestres apresentam alto grau de resistência a doenças e, por isso, têm sido utilizadas em programas de melhoramento. Entre estas espécies, estão as *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* (Junqueira et al., 2006). Entre as espécies citadas acima, a *Passiflora setacea* D.C. destaca-se por sua elevada resistência a várias doenças, entre elas, a morte precoce (*Nectria haematococca*) (Fischer, 2003), murcha e podridão de fusário (*Fusarium solani*) (Oliveira et al., 1994), podridão do colo (Meletti e Bruckner, 2001), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Junqueira et al., 2005) e à virose do endurecimento de frutos (CABMV) (Fonseca 2008; Fonseca et al., 2009).

Maciel et al. (2009) realizaram um *screening* com 16 espécies de passifloras silvestres, objetivando verificar sua reação à infecção com quatro isolados brasileiros do CABMV, por meio de inoculação mecânica e avaliação em condições de casa de vegetação. Entre as 16 espécies, a *P. suberosa* destacou-se por apresentar resistência aos quatro isolados de CABMV testados e a *P. setacea*, por ser resistente ao isolado de CABMV do Rio de Janeiro. Estes resultados indicam a possibilidade de utilizar estas espécies em programas de melhoramento do maracujazeiro-azedo, visando à resistência ao vírus CABMV.

Embora a *P. suberosa* tenha apresentado bom desempenho ao ser submetida a diferentes inóculos do CABMV, dificuldades poderão ser encontradas nos cruzamentos desta espécie com a *P. edulis* por pertencerem a distintos subgêneros (*Decaloba* e *Passiflora*, respectivamente) e terem números de cromossomos diferentes ($2n = 24$ e $2n = 18$, respectivamente) (Otoni et al., 1996; Ulmer e MacDougal, 2004).

A *P. setacea* se destaca, em relação à *P. suberosa*, por haver relatos da transferência de resistência ao CABMV desta espécie para a *P. edulis*, conseqüentemente, mostrando ser uma espécie promissora para obtenção de plantas resistentes (Fonseca, 2008; Santos 2013).

Os programas de melhoramento, além de objetivarem a resistência a doenças, precisam conservar os genótipos que se mostram potenciais fontes para o melhoramento do maracujazeiro. Assim, é importante ressaltar que, para o êxito

de um programa de melhoramento, é necessária a conservação do germoplasma silvestre, que, por sua vez, ainda é pouco conhecido e estudado e precisa ser bem documentado, caracterizado e avaliado. Desta forma, é indispensável a realização de atividades de pré-melhoramento destas espécies silvestres, principalmente no que se refere à caracterização molecular para estudos de diversidade (Aukar et al., 2002; Viana et al., 2003).

A etapa seguinte às atividades de pré-melhoramento é a conservação do germoplasma propriamente dita, que pode seguir várias vertentes. A conservação do germoplasma das passifloras no Brasil na maioria das vezes é feita em condições de campo, conservação *ex situ*, e a Embrapa Mandioca e Fruticultura tem um dos maiores Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) de *Passiflora* spp. (Ferreira, 1999; Lima et al., 2004b).

Embora a maior parte da manutenção de germoplasma do maracujazeiro no Brasil seja feita por conservação *ex situ*, este tipo de conservação exige áreas extensas para o plantio, tornando a proteção contra patógenos e pragas difícil, inviabilizando este tipo de coleções em alguns casos. Por estes motivos, a conservação *in vitro* de algumas espécies é uma alternativa para reduzir os custos de manutenção e tornar o processo de conservação da coleção mais eficiente (Lima et al., 2004b).

Faria et al. (2006), ao trabalharem com *Passiflora giberti*, comprovaram ser possível conservar sob crescimento lento, por quatro meses, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose.

Contudo, ainda são escassos os trabalhos de conservação *in vitro* com *Passiflora*, sendo necessários avanços nos estudos básicos para estabelecimento de protocolos de meios de cultura adequados para conservar espécies do gênero *Passiflora* (Faleiro et al., 2012).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Germoplasma e obtenção das plantas para inoculação do CABMV

O germoplasma foi constituído de genótipos de *Passiflora edulis* (UENF - programa de seleção recorrente do maracujazeiro) provenientes do programa de seleção recorrente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e de genótipos de *Passiflora setacea* oriundos de diferentes procedências (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição da procedência do germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Germoplasma	Procedência
<i>P. setacea</i> – BA	Banco de Germoplasma - UESC
<i>P. setacea</i> – RJ	Banco de Germoplasma - UENF
<i>P. setacea</i> - MG	Nova Porteirinha (MG)
<i>P. edulis</i> – UENF	Programa de seleção recorrente do maracujazeiro

O experimento foi realizado no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) e na câmara de crescimento do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Para obtenção das plântulas, foi retirado o tegumento das sementes e utilizados o meio MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol.

Após a retirada do tegumento, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 0,25% por 15 minutos e enxaguadas quatro vezes em água desionizada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Em seguida, foram inseridas 10 sementes por frasco contendo 40 mL de meio MS. Os frascos foram levados para a sala de crescimento com temperatura controlada em 27± 2 °C, ficando inicialmente no escuro. Após sete dias no escuro, o material foi transferido para luz (fornecida por lâmpadas

fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro), permanecendo nessas condições por aproximadamente 100 dias.

A aclimatização das plântulas de *P. setacea* e *P. edulis* germinadas *in vitro* foi feita acondicionando as plântulas em câmara de crescimento com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados em 26 ± 2 °C, 80% e 16 horas de luz e 8 horas de escuro, respectivamente. Para a aclimatização, foram utilizados como recipientes copos plásticos descartáveis com capacidade de 200 mL, e o substrato foi inicialmente areia, esterilizada em autoclave a 120 °C, 1 atm durante uma hora, por três vezes, com um intervalo de 24 horas entre cada autoclavagem. Após 15 dias, foi feita a substituição da areia pelo substrato Basaplant® Hortaliça.

3.2.3.2. Avaliação da resistência ao (CABMV)

Para avaliar a resistência ao CABMV, foram utilizadas 30 plantas de cada acesso (Tabela 1). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

Como fonte de inóculo, foi utilizado um isolado de CABMV obtido de plantas de maracujazeiro-azedo com sintomas de mosaico, bolhas e deformações foliares, coletadas na área experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes - RJ. Esse isolado foi caracterizado por meio de RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), com iniciadores desenhados para o anelamento na porção genômica de *Potyvirus* correspondente à proteína de inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) (Ha et al., 2008) e *Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (PTA-Elisa) (Santos, 2013). Para uma constante produção de inóculo, o isolado está sendo mantido em plantas de maracujazeiro suscetíveis cultivadas em câmara de crescimento.

As plantas foram inoculadas mecanicamente, após quatro semanas de aclimatização, com extrato preparado de amostras foliares coletadas de plantas de maracujazeiro-azedo exibindo sintomas graves de infestação pelo CABMV como mosaico, bolhas e deformações foliares. O inóculo para transmissão mecânica foi preparado em almofariz por meio de maceração do material foliar infectado, na proporção de 1 g de tecido (folha) para 10 ml de solução tampão

fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, utilizando-se carborundum (600 mesh) como abrasivo. Quarenta e oito horas após a primeira inoculação, as plantas foram reinoculadas para evitar a incidência de escapes. Em cada inoculação, foram infectadas as folhas mais jovens completamente expandidas. Como controle, uma planta de cada genótipo foi tratada apenas com solução tampão.

Os resultados foram avaliados por meio de observações diárias de sintomas locais e sistêmicos durante um período de 30 dias a partir da primeira inoculação. A severidade dos sintomas foliares foi avaliada visualmente por meio de uma escala de notas de acordo com os sintomas observados, referente à classificação proposta por Novaes e Rezende (1999): 1 = sem sintomas; 2 = mosaico leve sem deformações foliares; 3 = mosaico severo sem deformação foliar; e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares (Figura 1).

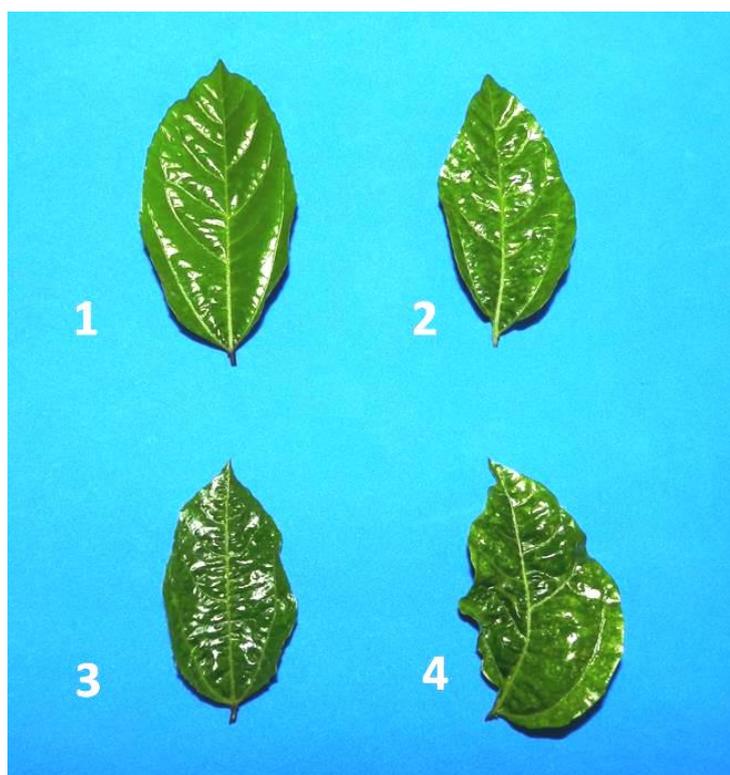


Figura 1. Folhas de *P. edulis* classificadas de acordo com a escala de notas: 1 = sem sintoma; 2 = mosaico leve sem deformações foliares; 3 = mosaico severo sem deformação foliar; 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Os dados obtidos por meio da escala de notas supracitada foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença

(AACPD) (Campbell & Madden, 1990) para cada genótipo avaliado, conforme a expressão:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} (T_{i+1} - T_i)$$

em que:

Y_i = proporção da doença na i -ésima observação;

T_i = tempo em dias da i -ésima observação; e

n = número de observações.

Os valores obtidos com o cálculo da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa Genes (Cruz, 2013), seguindo o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

μ = constante geral;

G_i = efeito do genótipo (NID, 0, T_G^2); e

e_{ij} = erro aleatório (NID, 0, T^2).

Tabela 2. Modelo genético-estatístico com as esperanças dos quadrados médios utilizados na análise de variância dos valores do cálculo da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

FV	GL	QM	E(QM)
Genótipo	$r - 1$	QMG	$\delta^2 + r\delta_G^2$
Erro	$g - 1$	GME	δ^2
TOTAL	$g(r-1)$		

A partir da análise de variância da AACPD, foram obtidas as estimativas de esperança do quadrado médio. Os parâmetros estimados foram:

a) Variância ambiental (δ_a^2):

$$\delta_a^2 = \frac{QME}{r}$$

b) Variância fenotípica (δ_f^2):

$$\delta_f^2 = \frac{\delta^2}{r} + \delta_g^2$$

c) Variância genotípica (δ_g^2):

$$\delta_g^2 = \frac{QMG + QME}{r}$$

d) Coeficiente de variação genotípica (CV_g):

$$CV_g = \frac{100 \cdot \sqrt{\delta_g^2}}{\bar{X}}$$

e) Coeficiente de variação do experimental (CV_e):

$$CV_e = \frac{100 \cdot \sqrt{\delta_e^2}}{\bar{X}}$$

f) Índice de variação (IV):

$$IV = \frac{CV_g}{CV_e}$$

g) Herdabilidade (h^2):

$$h^2 = \frac{\delta_g^2}{\delta_f^2} = \frac{\delta_g^2}{\delta_g^2 + \delta^2}$$

Após a avaliação visual e identificação dos genótipos assintomáticos de *Passiflora setacea*, foi feito o PTA-ELISA, em 30 genótipos sem sintomas, com o objetivo de confirmar a resistência ao CABMV. O teste sorológico PTA-ELISA foi feito na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Instituto Biológico (Unidade Laboratorial de Referência em Fitossanidade). Devido ao grande número de plantas assintomáticas, foram selecionadas 10 plantas de cada procedência que apresentavam maior quantidade de folhas, suficientes para fazer o PTA-ELISA.

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1. Estimativa de parâmetros genéticos para AACPD

Houve diferença significativa para AACPD, indicando a existência de variabilidade entre os genótipos testados (Tabela 3). O coeficiente de variação foi considerado de baixa magnitude, indicando boa precisão experimental durante a condução do experimento (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para a variável AACPD para os genótipos testados para resistência ao CABMV. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

FV	GL	QM
Genótipo	3	23324,40**
Erro	116	11,72**
Média	119	42,94
CV (%)		7,97

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, QM = quadrado médio. **Significativo a 1% (P<0,01) pelo teste F.

A variância ambiental também foi considerada baixa, indicando pouca influência do ambiente na expressão da resistência ao CABMV, como esperado,

uma vez que as plantas foram submetidas a condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo dentro da câmara de crescimento (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros genéticos obtidos a partir da AACPD para *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Parâmetros genéticos	Valores
Variância ambiental (σ_a^2)	0,39
Variância fenotípica (σ_f^2)	777,48
Variância genotípica (σ_g^2)	777,08
Coeficiente de variação genotípica (CV_g)	64,91
Índice de variação (IV)	8,14
Herdabilidade (h^2)	99,94

As estimativas de σ_g^2 e CV_g , Tabela 4, foram consideradas de alta magnitude, revelando a existência de uma ampla variabilidade genética entre as espécies. Este resultado contribui para o melhoramento do maracujazeiro, uma vez que é possível selecionar plantas resistentes ao CABMV.

A herdabilidade na população avaliada foi considerada alta (99,94%). Isso pode ser devido a uma alta variância genética e baixa influência ambiental, indicando que a resistência ao CABMV para esta população é exclusivamente genética, possivelmente governada por poucos alelos.

A AACPD é comumente utilizada para avaliar a severidade dos sintomas causados pelo vírus CABMV durante um período de tempo, e tem sido empregada em diversos trabalhos com maracujazeiro, mostrando-se eficaz em distinguir os genótipos em suscetíveis e moderadamente resistentes (Viana, 2007; Coimbra, 2010; Melo, 2010). Variáveis patométricas, como o índice de doença foliar global (IDFG) e produção de frutos, também foram utilizadas no Sudoeste da Bahia para avaliar o grau de resistência de genótipos de maracujazeiro-azedo, sendo possível distinguir genótipos moderadamente resistentes, suscetíveis e extremamente suscetíveis (Cerqueira-Silva et al., 2008; Cerqueira-Silva et al., 2012b).

Neste estudo, não foi possível discriminar plantas moderadamente resistentes, já que todos os genótipos de *P. setacea* foram altamente resistentes e os *P. edulis*, altamente suscetíveis. Isso pode ser facilmente observado pelo alto valor da herdabilidade, Tabela 4, comprovando que tanto a resistência em *P. setacea* quanto a suscetibilidade em *P. edulis* foram características altamente herdáveis para esta população avaliada.

3.2.4.2. Severidade dos sintomas com base na análise visual e na AACPD

Ao longo do período de avaliação, pôde-se observar ampla variação dos sintomas nos diferentes indivíduos, desde plantas assintomáticas até plantas com sintomas severos como mosaico bolhoso e deformação foliar.

Todos os genótipos de *P. edulis* apresentaram sintomas característicos da infecção pelo CABMV, como mosaico bolhoso e deformação foliar, e receberam nota 4 ao final da avaliação (Figura 3). Em contrapartida, não foi constatada presença dos sintomas do CABMV nas plantas de *P. setacea* (Figura 2), conseqüentemente, todos os genótipos receberam nota 1 ao final dos 30 dias de avaliação.



Figura 3. Genótipos de *Passiflora edulis*. A) Genótipo com sintomas severos do vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. B) Genótipo não inoculado. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.



Figura 2. Plantas de *Passiflora setacea*. A) Planta inoculada com o vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus*; B) Planta controle que não foi inoculada. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.



Figura 4. Plantas de *Passiflora edulis* com sintomas do vírus do endurecimento dos frutos. A) Planta com 9 dias de inoculação recebendo nota 2 conforme a escala de notas; B) Planta com 11 dias de inoculação recebendo a nota 4 conforme a escala de notas.

Para os genótipos de *P. edulis*, houve diferença na severidade dos sintomas do CABMV entre os indivíduos até o 28º dia de avaliação. No 30º e último dia de avaliação, todas as plantas obtiveram nota 4.

Tabela 5. Valores da AACPD e classificação dos genótipos com base na avaliação visual dos sintomas causados pelo vírus CABMV. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Genótipos	Valor	Classificação¹	Genótipos	Valor	Classificação¹
<i>PsMG 1</i>	29	R	<i>PsRJ 1</i>	29	R
<i>PsMG 2</i>	29	R	<i>PsRJ 2</i>	29	R
<i>PsMG 3</i>	29	R	<i>PsRJ 3</i>	29	R
<i>PsMG 4</i>	29	R	<i>PsRJ 4</i>	29	R
<i>PsMG 5</i>	29	R	<i>PsRJ 5</i>	29	R
<i>PsMG 6</i>	29	R	<i>PsRJ 6</i>	29	R
<i>PsMG 7</i>	29	R	<i>PsRJ 7</i>	29	R
<i>PsMG 8</i>	29	R	<i>PsRJ 8</i>	29	R
<i>PsMG 9</i>	29	R	<i>PsRJ 9</i>	29	R
<i>PsMG 10</i>	29	R	<i>PsRJ 10</i>	29	R
<i>PsMG 11</i>	29	R	<i>PsRJ 11</i>	29	R
<i>PsMG 12</i>	29	R	<i>PsRJ 12</i>	29	R
<i>PsMG 13</i>	29	R	<i>PsRJ 13</i>	29	R
<i>PsMG 14</i>	29	R	<i>PsRJ 14</i>	29	R
<i>PsMG 15</i>	29	R	<i>PsRJ 15</i>	29	R
<i>PsMG 16</i>	29	R	<i>PsRJ 16</i>	29	R
<i>PsMG 17</i>	29	R	<i>PsRJ 17</i>	29	R
<i>PsMG 18</i>	29	R	<i>PsRJ 18</i>	29	R
<i>PsMG 19</i>	29	R	<i>PsRJ 19</i>	29	R
<i>PsMG 20</i>	29	R	<i>PsRJ 20</i>	29	R
<i>PsMG 21</i>	29	R	<i>PsRJ 21</i>	29	R
<i>PsMG 22</i>	29	R	<i>PsRJ 22</i>	29	R
<i>PsMG 23</i>	29	R	<i>PsRJ 23</i>	29	R
<i>PsMG 24</i>	29	R	<i>PsRJ 24</i>	29	R
<i>PsMG 25</i>	29	R	<i>PsRJ 25</i>	29	R
<i>PsMG 26</i>	29	R	<i>PsRJ 26</i>	29	R
<i>PsMG 27</i>	29	R	<i>PsRJ 27</i>	29	R
<i>PsMG 28</i>	29	R	<i>PsRJ 28</i>	29	R
<i>PsMG 29</i>	29	R	<i>PsRJ 29</i>	29	R
<i>PsMG 30</i>	29	R	<i>PsRJ 30</i>	29	R

Cont. Tabela 5

Genótipos	Valor	Classificação¹	Genótipos	Valor	Classificação¹
<i>PsBA 1</i>	29	R	<i>Pe 1</i>	75,5	S
<i>PsBA 2</i>	29	R	<i>Pe 2</i>	75,5	S
<i>PsBA 3</i>	29	R	<i>Pe 3</i>	88,5	S
<i>PsBA 4</i>	29	R	<i>Pe 4</i>	87,5	S
<i>PsBA 5</i>	29	R	<i>Pe 5</i>	72,5	S
<i>PsBA 6</i>	29	R	<i>Pe 6</i>	86,5	S
<i>PsBA 7</i>	29	R	<i>Pe 7</i>	85,5	S
<i>PsBA 8</i>	29	R	<i>Pe 8</i>	84,5	S
<i>PsBA 9</i>	29	R	<i>Pe 9</i>	90,5	S
<i>PsBA 10</i>	29	R	<i>Pe 10</i>	84,5	S
<i>PsBA 11</i>	29	R	<i>Pe 11</i>	86,5	S
<i>PsBA 12</i>	29	R	<i>Pe 12</i>	86,5	S
<i>PsBA 13</i>	29	R	<i>Pe 13</i>	77,5	S
<i>PsBA 14</i>	29	R	<i>Pe 14</i>	90,5	S
<i>PsBA 15</i>	29	R	<i>Pe 15</i>	90,5	S
<i>PsBA 16</i>	29	R	<i>Pe 16</i>	90,5	S
<i>PsBA 17</i>	29	R	<i>Pe 17</i>	87,5	S
<i>PsBA 18</i>	29	R	<i>Pe 18</i>	88,5	S
<i>PsBA 19</i>	29	R	<i>Pe 19</i>	59,5	S
<i>PsBA 20</i>	29	R	<i>Pe 20</i>	90,5	S
<i>PsBA 21</i>	29	R	<i>Pe 21</i>	82,5	S
<i>PsBA 22</i>	29	R	<i>Pe 22</i>	88,5	S
<i>PsBA 23</i>	29	R	<i>Pe 23</i>	85,5	S
<i>PsBA 24</i>	29	R	<i>Pe 24</i>	78,5	S
<i>PsBA 25</i>	29	R	<i>Pe 25</i>	88,5	S
<i>PsBA 26</i>	29	R	<i>Pe 26</i>	88,5	S
<i>PsBA 27</i>	29	R	<i>Pe 27</i>	87,5	S
<i>PsBA 28</i>	29	R	<i>Pe 28</i>	87,5	S
<i>PsBA 29</i>	29	R	<i>Pe 29</i>	88,5	S
<i>PsBA 30</i>	29	R	<i>Pe 30</i>	88,5	S

¹R = resistente e S = suscetível.

A AACPD variou de 59,5 a 90,5 para os genótipos de *P. edulis*. O menor valor foi obtido para o genótipo *Pe* 19, e os maiores valores, para os genótipos *Pe* 9, 14, 15, 16 e 20, Tabela 5, considerados altamente suscetíveis. Por outro lado, os genótipos de *P. setacea* obtiveram os menores valores para a AACPD. Todos os genótipos tiveram o mesmo valor (29) (Tabela 5).

Resultados semelhantes ao obtido neste trabalho para *P. edulis* e *P. setacea* também foram observados por Fonseca (2008), Fonseca et al. (2009) e Maciel et al. (2009).

Os resultados obtidos, para análise visual dos genótipos de *P. setacea* com base na AACPD, também foram consonantes com os obtidos por Santos (2013). A autora avaliou a presença de sintomas do CABMV em plantas de *P. edulis* e *P. setacea* e verificou a suscetibilidade e a resistência, respectivamente, nestas espécies.

É importante mencionar que neste trabalho foi avaliada a reação de genótipos de *P. edulis* e *P. setacea* a um isolado que incide em Campos dos Goytacazes, considerada a maior cidade produtora de maracujazeiro-azedo do Estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2011). Maciel et al. (2009) verificaram a reação de 16 espécies de *Passiflora* à infecção com quatro isolados brasileiros do CABMV e observaram que a *P. setacea* foi resistente ao isolado CABMV-RJ.

3.2.4.3. Confirmação da resistência ao CABMV pelo teste PTA-ELISA

Após a avaliação visual e identificação de genótipos assintomáticos de *Passiflora setacea*, foi feito o PTA-ELISA, com o intuito de confirmar a resistência ao CABMV. Para isto, foram selecionados 30 genótipos, 10 de cada procedência, compreendendo plantas mais vigorosas e com maior número de folhas.

Das 30 amostras analisadas, apenas o genótipo *PsRJ* 4 reagiu com o antissoro específico para o CABMV. As amostras foram consideradas positivas quando a média das leituras de absorvância (405nm) foi três vezes superior à obtida para o controle negativo. Assim, os resultados confirmaram a resistência dos genótipos *PsRJ* 3, *PsRJ* 5, *PsRJ* 7, *PsRJ* 10, *PsRJ* 11, *PsRJ* 13, *PsRJ* 14, *PsRJ* 17, *PsRJ* 18, *PsBA* 6, *PsBA* 11, *PsBA* 12, *PsBA* 13, *PsBA* 14, *PsBA* 15, *PsBA* 16, *PsBA* 17, *PsBA* 21, *PsBA* 22, *PsMG* 2, *PsMG* 8, *PsMG* 9, *PsMG* 11,

PsMG 12, PsMG 13, PsMG 14, PsMG 18, PsMG 19 e PsMG 24 ao CABMV (Tabela 6).

Tabela 6. Genótipos, valores de absorvância para PTA/ELISA e avaliação final de 30 genótipos de *Passiflora setacea* avaliados quanto à resistência ao CABMV. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Genótipos	Absorvância	ELISA¹	Avaliação Final²
<i>PsMG2</i>	0,19	-	R
<i>PsMG8</i>	0,16	-	R
<i>PsMG9</i>	0,21	-	R
<i>PsMG11</i>	0,16	-	R
<i>PsMG12</i>	0,19	-	R
<i>PsMG13</i>	0,19	-	R
<i>PsMG14</i>	0,33	-	R
<i>PsMG18</i>	0,21	-	R
<i>PsMG19</i>	0,20	-	R
<i>PsMG24</i>	0,20	-	R
<i>PsBA6</i>	0,17	-	R
<i>PsBA 11</i>	0,16	-	R
<i>PsBA 12</i>	0,15	-	R
<i>PsBA 13</i>	0,14	-	R
<i>PsBA 14</i>	0,14	-	R
<i>PsBA 15</i>	0,16	-	R
<i>PsBA 16</i>	0,19	-	R
<i>PsBA 17</i>	0,18	-	R
<i>PsBA 21</i>	0,17	-	R
<i>PsBA 22</i>	0,19	-	R
<i>PsRJ 3</i>	0,20	-	R
<i>PsRJ 4</i>	0,80	+	S
<i>PsRJ 5</i>	0,19	-	R
<i>PsRJ 7</i>	0,22	-	R
<i>PsRJ 10</i>	0,13	-	R
<i>PsRJ 11</i>	0,18	-	R
<i>PsRJ 13</i>	0,15	-	R
<i>PsRJ 14</i>	0,17	-	R
<i>PsRJ 17</i>	0,16	-	R
<i>PsRJ 18</i>	0,17	-	R
<i>P. edulis</i> (+)	1,54	+	S
<i>P. edulis</i> (-)	0,23	-	R
Controle negativo (tampão)	0,08	-	-

¹(+) = Reação positiva a presença do vírus; (-) = reação negativa à presença do vírus. ²R = resistência; S = suscetibilidade.

O genótipo PsRJ 4, descrito como resistente pela avaliação visual, foi considerado suscetível pelo PTA-ELISA. Possivelmente, essa planta necessitaria de um tempo maior para expressar os sintomas. Para confirmar essa hipótese, é necessário avaliar por um período maior e repetir o teste sorológico. Santos (2013), ao verificar a resistência ao CABMV em híbridos interespecíficos de *Passiflora* (*P. edulis* x *P. setacea*), observou que alguns genótipos considerados resistentes pela análise visual foram apontados como suscetíveis pelo teste PTA-ELISA.

Diante dos resultados obtidos pela avaliação visual e pelo teste PTA-ELISA, considera-se viável este teste para confirmar a resistência ao vírus CABMV em genótipos de *P. setacea* assintomáticos, uma vez que os genótipos considerados resistentes na avaliação visual podem não expressar os sintomas do vírus CABMV e serem um falso negativo.

3.2.5. CONCLUSÕES

Dos 30 genótipos de *P. setacea* inoculados com CABMV, submetidos ao PTA-ELISA, 29 foram considerados resistentes. Esses genótipos podem ser conservados *in vitro* e, posteriormente, utilizados no programa de melhoramento genético do maracujazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aukar, A.P.A., Lemos E.G.M. Oliveira J.C. (2002) Variação genética entre espécies de maracujá, utilizando marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24:738-740.
- Abreu, P.P., Sousa, M.M., Santos, E.A., Pires M.V., Pires M.M., Almeida A.A.F. (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil. *Euphytica*,166: 307–315.
- Alfenas, P.F., Braz, A.S.K., Torres, L.B., Santana, E., Nascimento, V.S., Carvalho, M.G., Otoni, W.C., Zerbini, F.M. (2005) Transgenic passion fruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passion fruit woodiness disease. *Fitopatologia Brasileira*, 30:33-38.
- Alexandre, R.S., Couto, F.A.A., Dias, J.M.M., Otoni, W.C., Cecon, P.R., Gomes, S.B.S. (2009) Factors affecting *in vitro* germination of passion fruit seeds. *Plant Cell Culture e Micropropagation*, 5(1): 27-35.
- Barbosa, C.J. e Bragança, C.A.D. (2006) Endurecimento dos frutos do maracujazeiro. Publicação On Line – número 30. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 1-2.

- Barros, F.L.S., Zucoloto, M., Torres, F.J.B., Schimildt, E.R. (2011) Germinação *in vitro* de maracujá amarelo em diferentes concentrações de sacarose e ao tratamento físico no tegumento. *X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação* – Universidade do Vale do Paraíba.
- Bernacci, L.C., Vitta, F.A., Bakker, Y.V. (2003) Passifloraceae. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giuliatti, A.M., Melhem, T.S. (Ed.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. 3: 247-274.
- Bernacci, L.C., Soares-Scott, M.D., Junqueira, N.T.V., Passos, I.R.S., Meletti, L.M.M. (2008) Revisão de *Passiflora edulis* Sims : the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 566–576.
- Biasi, L.A., Falco, M.C., Rodriguez, A.P.M., Mendes, B.M.J. (2000) Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agricola*, 57(4):661-665.
- Borges, T.A., Junqueira, N.T.V., Lage, D.A.C., Almeida, D.A., Silva, D. M., Peixoto, J. R., Fialho, J.F. (2003) Índices de cruzabilidade do maracujazeiro-azedo comercial (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) com espécies de passifloras silvestres e progênies de retrocruzamentos, visando à obtenção de resistência a doenças e autocompatibilidade. *Anais do Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília*, 9, Brasília, p. 20-22.
- Boro, M.C., Beriam, L.O.S., Guzzo, S.D. (2011) Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. *Tropical Plant Pathology*, 36(2):74–80.
- Braga, M.F., Santos, E.C., Junqueira, N.T.V., Sousa, A.A.T.C., Faleiro, F.G., Rezende, L.N., Junqueira, K.P. (2006) Enraizamento de estacas de três

espécies silvestres de *Passiflora*. *Revista Brasileira Fruticultura*, 28(2): 284-288.

Braga, M.F., Batista, A.D., Junqueira, N.T.V., Junqueira, K.P., Vaz, C.F., Santos, E.C., Santos, F.C. (2005) Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Pinto, A.C.Q., Sousa, E.S., *IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 86-90.

Bruckner, C.H., Melletti, L.M., Otoni, W.C., Junior, F.M.Z. (2002) Maracujazeiro. In: Bruckner, C.H., *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa: UFV, p. 373-410.

Busilacchi, H., Severin, C., Gattuso, M., Aguirre, A., Di Sapio, O., Gattuso, S. (2008) Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(5): 257-263.

Campbell, C.D. e Madden, L.V. (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. New York: John Willey, 532p.

Carvalho-Okano, R.M., Vieira, M.F. (2001) Morfologia externa e taxionomia. In: Bruckner, C.H., Picanço, M.C. (eds) *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 33-49.

Carvalho, M.A.F., Paiva, R., Vargas, D.P., Porto, J.M.P., Herrera, R.C., Stein, V.C. (2012) Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(3): 1027-1032.

Cavichioli, J.C., Corrêa, L.S., Narita, N., Kasai, F.S. (2011) Incidência e severidade do vírus do endurecimento dos frutos em maracujazeiros enxertados em pé-franco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial: 411-414.

- Cerqueira-Silva, C.B.M., Moreira, C.N., Figueira, A.R., Corrêa, R.X., Oliveira, A.C. (2008) Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. *Genetics and Molecular Research*, 7 (4):1209-1216.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Santos, E.S.L., Conceição, L.D.H.C.S., Cardoso-Silva, C.B., Pereira, A.S., Oliveira, A.C., Corrêa, R.X. (2012a) Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 731-738.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Melo, J.R.F., Corrêa, R.X., Oliveira, A.C. (2012b) Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3):489–495.
- Chagas, C.M., Rezende, J.A.M., Colariccio, A., Piza Jr C.T., Lopes, L.C., Galetti, S.R., Ferrari, J.T., Belluzi, B.M. (1992) Ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 14:187-190.
- Cid, L.P.B. e Zimmermann, M.J. (2006) A contaminação *in vitro* de plantas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 122, Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 20p.
- Cid, L.P.B. e Teixeira, J.B. (2010) Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, L.P.B. Ed. *Cultivo in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-50.
- Coimbra, K.G. (2010) *Desempenho agrônomo de progênies de maracujazeiro-azedo no Distrito Federal*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Brasília – DF, Universidade de Brasília, 125p.
- Costa, A.M., Tupinambá, D.D. (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (Eds).

Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 474-501.

Cruz, C. D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3):271-276.

Cunha, M.A.P., Barbosa, L.V., Faria, G.A. (2004) Maracujá: produção e qualidade na passicultura. In: Lima, A.A. e Cunha M.A.P., *Botânica*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 13-36.

Di Piero, R.M., Rezende, J.A.M., Yuki, V.A., Pascholati, S.F. Delfino M.A. (2006) Transmissão do *Passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology*, 35(1):139-140.

Dias, J.M.M., Couceiro, M.A., Ventura, G.M., Siqueira, D.L., Lima, J.C. (2003) Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes do maracujazeiro. *Revista Ceres*, Viçosa, 50(291): 549-564.

Dornelas, M.C., Vieira, M.L.C. (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36:211-217.

Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Belon, G., Kralh, L.L., Anjos, J.R.N., Peixoto, J.R., Braga, M.F., Rezende, A.M. (2004) Utilização de marcadores moleculares em retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro-azedo a múltiplas doenças. *Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, 36, Gramado, p. S325.

Faleiro, F.G., Oliveira, E.J., Andrade, S.R.M., Costa, A.M., Junqueira, N.T.V. (2012) Biotecnologia na cultura do maracujazeiro. In: Cançado, G.M.A., Londe, L.N. (eds) Biotecnologia aplicada à agropecuária. Caldas: EPAMIG Sul de Minas – Laboratório de Biotecnologia Vegetal, p. 401-440.

- Faria, A.M., Costa, M.A.P.C., Junghans, T.G., Ledo, C.A.S., Souza, A.S.S. (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal SP, 28(2): 267-270.
- Faria, S.E.S. (2008) *Seleção de maracujazeiro (Passiflora edulis) para resistência à cladosporiose (Cladosporium herbarum)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 25p.
- Ferreira, F.R. (1999) Recursos genéticos de fruteiras tropicais e subtropicais no Brasil. In: Ferreira, F.R., Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas no Brasil. *Anais do Workshop para Curadores de Bancos de Germoplasma de Espécies Fruteiras*, Brasília: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 9-27.
- Feuillet, C., Macdougall, J.M. (2007) Passifloraceae. In: Kubitzki, K. The Families and Genera of Vascular Plants. *Springer*, 9: 270-281.
- Fischer, I.H. (2003) *Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da morte prematura do maracujazeiro, causada por Nectria hematococca e Phytophthora parasitica*. Dissertação (Mestrado). Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, 48p.
- Fischer, I.H., Arruda, M.C., Almeida, A.M., Garcia, M.J.M., Jeronimo, E.M., Pinotti R.N., Bertani, R.M. de A. (2007) Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29:254-259.
- Flores, P.S., Otoni, W.C., Dhingra, O.D., Diniz, S.P.S.S., Santos, T.M., Bruckner, C.H. (2012) *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to fusarium vascular wilt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(1):37-45.
- Fonseca, K.G. (2008) *Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Brasília – DF, Universidade de Brasília – UnB, 96p.

- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., Vaz, C.F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira Fruticultura*, 31(1):145-153.
- Garcia, R., Pacheco, R., Falcão, E., Borges, G., Mansur, E. (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106:47–54.
- Guerra, M.P.; Nodari, R.O. (2006) Introdução ao conceito de Biotecnologia. *Apostila de biotecnologia* - CCA/UFSC. Santa Catarina: Edição da Steinmacher, 41p.
- Gómez, V.A.O. e Gonzáles, M.J.D. (2010) Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1): 23-28.
- Hunhoff, V.L., Pereira, S.L.S., Silva, G.M., Silva, A.B. (2011) Germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora quadrangularis* L. submetidas a tratamento físico do tegumento. *Congresso de Iniciação Científica*, 4, Cáceres: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PRPPG, Cód. 6041. ISSN ONLINE 2237-9258. CDROM 2178-7492.
- Isutsa, D.K. (2004) Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 99:395–400.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011) Produção Agrícola Municipal 2011. Rio de Janeiro, v. 38, 94p.
- Junghans, T.G., Viana, A.J.C., Junghans, D.T. (2010) Armazenamento e tratamento mecânico na emergência de plântulas de *Passiflora gibertii*.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 45), p. 1-16.

Junqueira, N.T.V., Veras, M.C.M., Nascimento, A.C., Chaves, R.C., Matos, A.P., Junqueira, K.P. (2001) A importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 18.

Junqueira, N.T.V., Anjos, J.R.N. Dos, Silva, A.P.D.O., Chaves, R.D.C., Gomes, A.C. (2003) Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(8):1005-1010.

Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F.; Faleiro, F.G.; Peixoto, J.R.; Bernacci, L.C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V. e Braga, M.F., *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 341-358.

Junqueira, N.T.V., Lage, D.A.C., Braga, M.D., Peixoto, J.R., Borges, T.A., Andrade, S.R.M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *Passiflora* silvestre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1):97-100.

Kantharajah, A.S. e Dodd, W. A. (1990) *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). *Annals of Botany*, 65(3): 337-339.

Kawata, K., Ushida, C., Kawai, F., Kanamori, M., Kuriyama, A. (1995) Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. *Journal Plant Physiology*, 147: 281-284.

Kitajima, E.W., Chagas, C.M., Crestani, O. A. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 409-432.

- Koch, R.C., Zanette, F. (2000) Propagação vegetativa de *Passiflora actinia* Hooker por meio da micropropagação e da estaquia semilenhosa. *Scientia Agraria*, 1:75-82.
- Kudo, A.S. (2004) *Reação de genótipos de maracujazeiro azedo a Septoria passiflorae e a Cladosporium herbarum*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Brasília - DF – Universidade de Brasília – UnB, 83p.
- Leão, R.M.K., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Resende, R.O., Mattos, J.K.A., Melo, B. (2006) Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV) em casa de vegetação. *Bioscience Journal*, 22:87-92.
- Lima, A.A., Kobayashi, A.K., Trindade, A.V., Noronha, A.C.S., Ribeiro, A.E.L., Borges, A.L. (2004a) Cultura de Tecidos em Maracujazeiros. In: Lima, A.A.; Cunha, M.A.P., *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 95-106.
- Lima, A.A., Cunha, M.A.P. (2004b) Práticas culturais. In: Lima, A.A.; Cunha, M.A.P., *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 169-178.
- Lopes, J.C., Bono, G.M., Alexandre, R.S., Maia, V.M. (2007) Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro amarelo em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. *Ciência e Agrotecnologia*., 31(5): 1340-1346.
- Maciel, S.C., Nakano, D.H., Rezende, J.A.M., Vieira, M.L.C. (2009) Screening of *passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. *Scientia Agricola*, 66(3):414-418.
- McKern, N.M., Strike, P.M., Barnett, O.W., Dijkstra, J., Shukla, D.D., Ward, C.W. (1994) Cowpea aphid-borne mosaic virus-Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, 136:207-217.

- Medeiros, A.M. e Peruch, L.A.M. (2012) Fungicidas e argila silicatada no controle da antracnose do maracujá amarelo. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(5):1803–1808.
- Meletti, L. M. M. e Maia, M.L. (1999) *Maracujá: Produção e comercialização*. Campinas: Instituto Agronômico, Boletim técnico, 64p.
- Meletti, L. M. M. (2000) Maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.) In: Meletti, L.M.M., *Propagação de frutíferas tropicais*. Guaíba: Agropecuária Ltda. p. 186-204.
- Meletti, L.M.M., Brückner, C.H. (2001) Melhoramento genético. In: Brückner, C.H., Picanço, M.C. (Eds.) *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.345-385.
- Melletti, L.M.M., Furlani, P.R.F., Álvares, V., Soares-Scott M.D., Bernacci, L.C., Azevedo Filho, J.A. (2002) Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. *Agrônomo*, 54(1): 30-33.
- Melletti, L.M.M., Soares-Scott, M.D., Bernacci, L.C., Passos, I.R.S. (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F., *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrado, p. 55-78.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*, 33: 83-91.
- Melo, J.R.F. (2010) *Patossistema Cowpea Aphid-Borne Mosaic Vírus (CABMV)/maracujazeiro-amarelo: infectividade e invasão sistêmica de isolados e caracterização molecular*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 105p.
- Mendonça, V., Orbes, M.Y., Abreu, N.A.A., Ramos, J.D., Teixeira, G.A., Souza, H.A. (2006) Qualidade de mudas de maracujazeiro-amarelo formadas em

substratos com diferentes níveis de lithothamnium. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(5): 900-906.

Milward-de-Azevedo, M.A., Baumgratz, J.F.A. (2004) *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia*, 55(85): 17-54.

Miranda, J.F. (2004) Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura 'Luís de Queiroz', 22p.

Monteiro-Hara, A., Jadão, A.S., Mendes, B.M.J., Rezende, J.A.M., Trevisan, F., Mello, A.P.O.A., Vieira, M.L.C., Meletti, L.M.M., Piedade, S.M. de S. (2011). Genetic Transformation of passion flower and evaluation of R 1 and R 2 generations for resistance to Cowpea aphid borne mosaic virus. *Plant Disease*, 95(8):1021–1025.

Moran-Robles, M.J. (1978) Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. molissima* Bailey. *Fruits*, 33(10):693-699.

Moreira, C.N. (2008) Caracterização de isolados virais associados ao endurecimento de frutos do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) provenientes de Livramento de Nossa Senhora, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 30p.

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.

Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1036–1043.

- Narita, N. (2007) *Epidemiologia do "Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus" (CABMV) em maracujazeiro na região produtora da alta paulista, SP*. Tese (Doutor em Agronomia) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp - Campus de Botucatu, 65p.
- Narita, N.Y., Valdir A., Pavan, M.A. (2011). Não transmissibilidade do CABMV do maracujazeiro por sementes. *Summa Phytopathologica*, 37(4):221.
- Nascimento, A.V.S., Souza, A.R.R., Alfenas, P.S., Andrade, G.P., Carvalho, M.G., Pio-Ribeiro, G., Zerbini, F.M. (2004) Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29(4):378-383.
- 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. (2006) *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passion fruit in Brazil and causes passion fruit woodiness disease. *Archives of Virology*, 161: 21-24.
- Nunes, T.S., Queiroz, L.P. (2007) Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 21(2): 499-502.
- Nogueira, R.J.M.C., Albuquerque, M.B., Silva Sunior, J.F. (2003) Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(1):15-18.
- Novaes, Q.S., Rezende, J.A.M. (1999) Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao 'Passionfruit Woodiness Virus'. *Fitopatologia Brasileira*, 24:76-79.
- Oliveira, J.C., Nakamura, K., Mauro, A.O., Centurion, M.A.P.C. (1994) Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: São Jose, A.R. (Ed.). *Maracujá: produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB, p.27-37.

- Otoni, W.C., Casali, V.W.D., Power, J.B., Davey, M.R. (1996) Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. *Revista Ceres*, 43:157-164.
- Passos, I.R.S., Matos, G.V.C., Melletti, L.M.M., Scott, M.D.S., Bernacci, L.C., Vieira, M.A.R. (2004) Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* KUNTH germinadas *in vitro*. *Revista Brasileira Fruticultura*, 26(2): 380-381.
- Passos, I.R.S. e Bernacci, L.C. (2005) Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). *In: Faleiros F, Junqueira N & Braga M (Org.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 1ª ed. Planaltina, EMBRAPA Cerrados, p.361-383.
- Pinto, P.H.D., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Resende, R.O., Mattos, J.K.A., Melo, B. (2008). Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV). *Bioscience Journal*, 24(2):19-26.
- Ribeiro, L.M., Peixoto, J.R., Andrade, S.R.M, Simões, M.O.M., Fonseca, R.S., Vieira, L.M. (2006) Organogênese *in vitro* em acessos de maracujazeiro amarelo infectados pelo vírus CABMV. *Unimonetes cinetífica*, 8(1): 87-98.
- Rosa, Y.B.C.J. e Dornelas, M.C. (2012) *In vitro* plant regeneration and differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 108:91–99.
- Ruggiero, C., São José, A.R., Volpe, C.A., Oliveira, J.C., Durigan, J.F., Baungartner, J.G., Silva, J.R., Nakamura, K., Ferreira, M.E., Kavati, R., Pereira, V.P. (1996). Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: MAARA, SDR, 64p.
- Sampaio, A.C., Scudeller, N., Fumis, T.F., Almeida, A.M., Pinotti, R.N., Garcia, M.J.M., Pallamin, M.L. (2008) Manejo cultural do maracujazeiro-amarelo em

ciclo anual visando à convivência com o vírus do endurecimento dos frutos: um estudo de caso. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(2): 343-347.

Sanábio, D. (2001) Polinização manual do maracujazeiro. Informação Tecnológica – EMATER – MG, 4p.

Santos Filho, H.P., Santos, C.C.F. (2003) Doenças causadas por fungos. In: Santos Filho, H. P.; Junqueira, N. T. V., Frutas do Brasil: maracujá – fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 12-21.

Santos, F.C., Ramos, J.D., Santos, F.C., Lima, L.C.O., Junqueira, F.P.; Rezende, J.C. (2005) Características físico-químicas do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Pinto, A.C.Q., Sousa, E.S., *IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro*. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 143-146.

Santos, C.E.M., Pissioni, M.L.L., Morgado, M.A.D., Cruz, C.D., Bruckner, C.H. (2008) Estratégias de seleção em progênies de maracujazeiro amarelo quanto ao vigor e incidência de verrugose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(2):444–449.

Santos, F.C., Ramos, J.D., Pasqual, M., Rezende, J.C., Santos, F.C., Villa, F. (2010) Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. *Revista Ceres*, 57(1): 112-117.

Santos, E.A., Souza, M.M., Abreu, P.P., da Conceição, L.D.H.C.S., Araújo, I.S., Viana, A.P., Almeida, A.A.F., (2012) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica*, 184(3):389–399.

Santos, E.A. (2013) Melhoramento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) visando à resistência ao Cowpea aphid-borne mosaic vírus. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos

Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 178p.

São José, A.R., Bomfim, M.P., Hojo, R.H., Angel, D.N., Pires, M.M. (2011) Doenças do maracujazeiro. *In*: Pires, M.M., São José, A.R., Conceição, A.O. (orgs) Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade. Ilhéus: Editus, p. 115-146.

Shukla, D.D., Ward, C.W. (1988) Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 69:2703-2710.

Silva, L.A., Garcêz, R.M., Levi, A., Chaves, R., Colariccio, A., Eiras, M. (2012) Transmissão experimental revela novos potenciais reservatórios do *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Summa Phytopathologica*, 38(2): 168–169.

Silva, L.A. (2012) Cowpea aphid-borne mosaic virus na cultura do maracujazeiro: avaliação da tolerância de acessos avançados e efeito nutricional. Dissertação (Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - São Paulo - SP, Instituto Biológico, 76p.

Silva, A.C.; São José, A.R.S. (1994) Classificação botânica do maracujazeiro. *In*: São José, A.R.S. (ed) Maracujá: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p. 1-5.

Soares, W.S., Rêgo, M.M., Rêgo, E.R., Barroso, P.A., Nascimento, K.S., Ferreira, K.T. (2012) Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14: 138-142.

Suassuna, T.M.F., Bruckner, C.H., Carvalho, C.R., Borém, A. (2003) Self-incompatibility in passion fruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 298-302.

- Torres, L.B. (2003) Avaliação de risco de plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) resistentes ao CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): fluxo gênico em *Passiflora* sp. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 43p.
- Trevisan, F. e Mendes, B.M.J. (2006) Resistance to Passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. *Plant Disease*, 90(8):1026-1030.
- Ulmer, T., MacDougal, J.M. (2004). *Passiflora: Passionflowers of the World*. 276p.
- Urashima, A. S. (1985) Aspectos fenológicos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). Dissertação (Mestrado Agronomia) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 83p.
- Vanderplank, J. (2000) *Passion flowers*. 3ª ed. Cambridge: The MIT Press. 224p.
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Souza, M.M., Aldonado, J.F.M., Amaral Jr, A.T. (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(3):489-493.
- Viana, C.A.S. (2007). Resistência de genótipos de maracujá-azedo à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae*) e à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Brasília - DF, Universidade de Brasília, 230p.
- Vieira, M.L.C. (2000) Conservação de germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 18-20.
- Yamashiro, T. e Chagas, C.M. (1979) Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 5, Pelotas: SBF, p. 915-917.

- Yuki, V.A., Mizote, F.A., Narita, N., Hojo, H., Hojo, H., Delfino, M.A., Oliveira, D.A. (2006) Epidemiologia do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 32:19.
- Zerbini, F.M., Nascimento, A.V.S., Alfenas, P.F., Torres, L.B., Braz, A.S.K., Santana, E.N., Otoni, W.C., Carvalho, M.G. (2005) Transformação genética do maracujazeiro para resistência a doenças. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 589-597.
- Zonta, J.B., Silva, I.C., Dias, M.A., Côrrea, N.B., Lopes, J.C. (2005) Germinação de sementes do maracujazeiro (*Passiflora alata* Dryand) submetidas a tratamentos físicos no tegumento e a pré-embebição em ácido giberélico (GA₃). IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba.
- Zucoloto, M., Torres, F.J.B., Santos, J.G., Oliveira, R.B., Barros, F.L.S., Schimit, E.R. (2006) Influência de diferentes concentrações de solução desinfestante no estabelecimento *in vitro* de sementes de maracujá doce. X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – *Universidade do Vale do Paraíba*.