

PATRÍCIA SILVA FLORES

FILTRADO DE CULTURAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* E ÁCIDO FUSÁRICO NA SELEÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJAZEIRO AMARELO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F634f
2008

Flores, Patrícia Silva, 1975-

Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e ácido fusárico na seleção in vitro de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) / Patrícia Silva Flores. – Viçosa, MG, 2008. xiii, 88f.: il. (algumas col.); 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Cláudio Horst Bruckner.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 63-73.

1. Maracujá - Melhoramento genético. 2. Maracujá - Seleção. 3. *Passiflora edulis*. 4. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

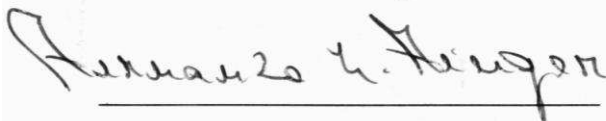
CDD 22.ed. 634.4252

PATRÍCIA SILVA FLORES

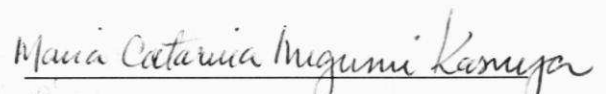
FILTRADO DE CULTURAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* E ÁCIDO FUSÁRICO NA SELEÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJAZEIRO AMARELO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de agosto de 2008.



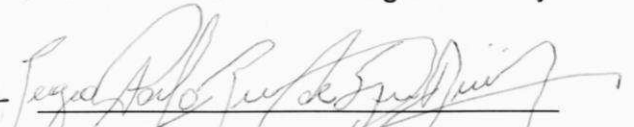
Prof. Fernando Luiz Finger



Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya



Prof. Olinto Liparini Pereira



Prof. Sérgio Paulo Severo de Souza Diniz



Prof. Cláudio Horst Bruckner

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus,

À minha família por me apoiar nos momentos mais difíceis, em especial a minha irmã Andréia Flores,

À Universidade Federal de Viçosa, através do curso em pós-graduação de Genética e Melhoramento, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao querido professor Dr. Cláudio Horst Bruckner pela orientação e paciência,

Aos conselheiros Profs. Drs. Wagner de Campos Otoni, Sérgio Motoike e Onkar Dhingra pelas sugestões e auxílio durante os experimentos,

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Diniz pelas análises dos filtrados, sugestões, fornecimento de bibliografias e pela enorme simpatia,

Ao pesquisador Dr. Francisco Laranjeira pelo fornecimento de um dos isolados fúngicos e pelas informações fornecidas,

À Profa. Dra. Marília Ventrella por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Vegetal para realização dos estudos histológicos,

À estagiária e antes de tudo amiga Brendinha Ribeiro, pela sua ajuda na realização dos experimentos, dedicação e carinho,

Aos colegas e amigos que tornaram esta importante fase da minha vida profissional menos árdua, em especial à Gilmara e Marcelo Pompelli, Marcelo Bastos Cordeiro, Cristiane, Patrícia e Elisa,

À Dona Tide pelo imenso carinho com que sempre me tratou,

Aos funcionários do Laboratório de Doenças de Plantas da UFV pela ajuda e ensinamentos durante a manipulação das culturas fúngicas,

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da Fruticultura,

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Murcha de <i>Fusarium</i>	04
2.2. Melhoramento do maracujazeiro visando a resistência a doenças ...	05
2.3. Seleção <i>in vitro</i>	08
2.4. Cultura de tecidos do maracujazeiro-amarelo	12
2.5. Indução de mutações no melhoramento genético de plantas	15
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material Vegetal	20
4.2. Obtenção e multiplicação de brotações em explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	20
4.3. Identificação de genótipos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e <i>P. alata</i> insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico, <i>in vitro</i>	21
4.3.1. Análises histológicas de plântulas germinadas em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ácido fusárico	23
4.4. Análise da patogenicidade de dois isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> a plantas de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i>	23
4.4.1. Análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica	25
4.4.1.1. Extração do ácido fusárico	25
4.4.1.2. Determinação quantitativa do ácido fusárico por CLAE	26
4.4.1.3. Determinação quantitativa do ácido fusárico por TCL	26
4.4.2. Avaliação da fitotoxicidade do filtrado da cultura de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> em genótipos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico	26
4.5. Avaliação da sensibilidade de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ao <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> , <i>in vivo</i>	27

4.6. Indução de mutações em segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	28
4.7. Obtenção e seleção <i>in vitro</i> de mutantes de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , insensíveis ao filtrado da cultura de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>passiflorae</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Obtenção e multiplicação de brotações em explantes de segmentos caulinares de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	30
5.2. Identificação de genótipos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e <i>P. alata</i> insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico, <i>in vitro</i>	33
5.3. Análises histológicas de plântulas germinadas em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ácido fusárico	40
5.4. Efeito fitotóxico de dois isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> a plantas de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i>	42
5.5. Análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica.....	48
5.6. Fitotoxicidade do filtrado da cultura de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>passiflorae</i> em genótipos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico	49
5.7. Sensibilidade de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ao <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> , <i>in vivo</i>	52
5.8. Indução de mutações em segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	55
5.9. Seleção <i>in vitro</i> de mutantes de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , insensíveis ao filtrado da cultura de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	60
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Cultura de isolados CLI 1423 (A) e 28B (B) de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> após 15 dias de incubação em meio de cultura BSA	24
Figura 2	Brotações em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo inoculados em meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com doses de BAP combinadas com água de coco. Barra= 1 cm	31
Figura 3	Germinação de sementes de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) suplementado com doses de ácido fusárico.	34
Figura 4	Plântulas de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> obtidas da germinação de sementes em meio de cultura Murashige & Skoog (1962): (A) sem adição de ácido fusárico, (B) suplementado com 0,20 mM de ácido fusárico. (Barra=0,5 cm)	35
Figura 5	Efeitos de doses de ácido fusárico sobre a senescência das folhas e sobre o desenvolvimento do sistema radicular de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> .	36
Figura 6	Efeitos de doses de ácido fusárico sobre a massa fresca e seca do sistema radicular de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> .	37

		Página
Figura 7	Seção longitudinal de raiz primária de plântulas de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> provenientes de sementes germinadas em meio MS (A) e meio MS suplementado com 0,10 mM de ácido fusárico (B-C): c=coifa; zm=zona meristemática; rl=raiz lateral; v=vasos. Barra=100 µm	40
Figura 8	Efeito de doses dos filtrados da cultura dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> (%) sobre a plantas de maracujazeiro-amarelo, <i>in vitro</i> : A – Plantas inoculadas com o filtrado do isolado CLI1423, B – Plantas inoculadas com o filtrado do isolado 28B. Barra = 5 cm	42
Figura 9	Efeito dos filtrados da cultura dos isolados (28B e CLI1423) de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> e do meio Richard sobre a porcentagem de folhas senescentes de plantas de maracujazeiro-amarelo, <i>in vitro</i> .	43
Figura 10	Efeito de níveis de meio Richard (%) adicionados ao meio de cultura MS sobre plantas de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> . Barra=5 cm	44
Figura 11	Efeito de níveis de meio Richard sobre raízes de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> . Letras iguais indicam médias que não diferem entre si pelo teste Tuckey a 5% de probabilidade. Barra = desvio padrão	45
Figura 12	Efeito de níveis de meio Richard sobre a massa fresca e seca de raízes de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> . Letras iguais indicam médias que não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barra = desvio padrão	46

		Página
Figura 13	Efeito do filtrado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> sobre o desenvolvimento radicular de plantas de maracujazeiro-amarelo, <i>in vitro</i> .	49
Figura 14	Efeito do filtrado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> sobre a massa fresca e seca radicular de plantas de maracujazeiro-amarelo, <i>in vitro</i> .	50
Figura 15	Plantas de maracujazeiro-amarelo inoculadas com suspensão de esporos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> : A - plantas sensíveis, B – plantas insensíveis.	52
Figura 16	Efeito de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> sobre o desenvolvimento de raízes de plantas de maracujazeiro-amarelo: A – genótipo sensível, B – genótipo insensível. Barra = 5 cm	53
Figura 17	Efeito de doses de radiação gama sobre a sobrevivência e número de brotações em explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg.L ⁻¹ BAP.	55
Figura 18	Efeito de doses de radiação gama sobre explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> . Barra = 5 cm	56
Figura 19	Efeitos de doses de raios gama sobre a massa fresca de brotações formadas sobre explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg.L ⁻¹ BAP.	56

		Página
Figura 20	Efeitos de doses de raios gama sobre a massa seca de brotações formadas sobre explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> , após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg.L ⁻¹ BAP.	57
Figura 21	Efeito de doses de radiação gama sobre a sobrevivência e número de brotações em explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> , após 30 dias da inoculação em meio MS com 1mg.L ⁻¹ BAP.	58
Figura 22	Efeito de doses de radiação gama sobre explantes de segmentos nodais de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> . Barra = 5 cm	58
Figura 23	Plantas de maracujazeiro-amarelo provenientes de explantes de segmentos nodais tratados com 20Gy, selecionadas com filtrado da cultura de <i>F. oxysporum f. sp. passiflorae</i> (50%). Barra=5 cm	60

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Cultivares de <i>Passiflora edulis</i> Simms f. <i>flavicarpa</i> Deg. incluídas no Registro Nacional de Cultivares durante o período de 01/01/1998 a 13/03/2008.	6
Tabela 2	Número de brotações em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo, após 60 dias em meio de cultura Murashige Skoog (1962) suplementado com doses de BAP e água de coco	30
Tabela 3	Peso da massa fresca e seca de brotações formadas em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo, cultivados em meio de cultura Murashige Skoog (1962) suplementados com BAP e água de coco	32
Tabela 4	Efeito do ácido fusárico sobre plantas de maracujazeiro-amarelo, após 15 dias em meio de cultura.	38
Tabela 5	Efeito do filtrado da cultura dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> (10%) sobre plântulas de maracujazeiro-amarelo, <i>in vitro</i> .	43
Tabela 6	Efeitos do filtrado da cultura de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> em genótipos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>in vitro</i> (média de todos os tratamentos).	50
Tabela 7	Efeitos da inoculação com <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i> sobre plantas de maracujazeiro-amarelo	53

RESUMO

FLORES, Patrícia Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2008. **Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e ácido fusárico na seleção *in vitro* de maracujazeiro amarelo.** Orientador: Cláudio Horst Bruckner. Co-orientadores: Wagner de Campos Otoni, Sérgio Motoike e Onkar Dhingra.

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de maracujá, a produtividade nacional é muito baixa. A incidência de várias doenças nos pomares de maracujá, aliada à inexistência de cultivares resistentes, tem contribuído para a redução da área plantada. Dentre as doenças que afetam a cultura, destaca-se a murcha de *Fusarium* que é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*. A seleção *in vitro* de plantas resistentes a espécies de *Fusarium* utilizando toxinas fúngicas como agentes seletivos tem sido descrita com êxito para várias espécies. Assim, no presente trabalho foram realizadas adaptações das metodologias de seleção *in vitro* utilizadas em outras espécies para obtenção de plantas de maracujazeiro-amarelo insensíveis à fusariose. Para tanto, foram estabelecidos protocolos para a micropropagação de plantas do maracujazeiro-amarelo através de explantes de segmentos nodais utilizando-se doses de BAP (1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) e água de coco (0, 5 e 10 % v/v) suplementados ao meio de cultura MS. Foram avaliados os efeitos de doses de ácido fusárico na germinação de sementes (0; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM) e no desenvolvimento de plantas (0,0; 0,10; 0,20 e 0,30 mM), *in vitro*. As plantas insensíveis ao ácido fusárico selecionadas foram então submetidas a doses do filtrado de um isolado do fungo (0, 20, 30, 40 ou 50 % (v/v)) para verificação da correlação das reações das plantas aos dois agentes seletivos. Após, as plantas selecionadas foram transferidas para substrato composto de areia autoclavada contendo a suspensão de esporos do fungo e mantidas em câmara de crescimento para avaliação da resistência das plantas *in vivo*. Foram testadas também doses de radiação gama (0, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 Gy) para obtenção de variantes em segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* sob condições *in vitro* e analisados os efeitos da radiação sobre o incremento da resistência de *P. edulis* f. *flavicarpa* ao fungo. O meio de cultura suplementado com 1 mgL⁻¹ de BAP foi o mais adequado para a

micropropagação de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* a partir de explantes de segmentos nodais. O ácido fusárico e o filtrado da cultura fúngica foram eficientes na seleção de genótipos de maracujazeiro-amarelo insensíveis ao fungo. Recomenda-se a dose de radiação gama de 20 Gy para obtenção de variantes mutantes de maracujazeiro-amarelo a partir de segmentos nodais. Através da radiação com raios gama foi possível obter plantas de maracujazeiro-amarelo insensíveis às toxinas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *in vitro*.

ABSTRACT

FLORES, Patrícia Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2008. **Filtrate of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* cultures and the fusaric acid in the *in vitro* selection of the yellow passionfruit plant.** Adviser: Cláudio Horst Bruckner. Co-Advisers: Wagner de Campos Otoni, Sérgio Motoike and Onkar Dhingra.

Although Brazil is the largest producer of passionfruit in world, the national productivity is very low. The incidence of several diseases in the passion fruit orchards, as well as the inexistence of resistant cultivars have been contributing for reduction in the planted area. Among the diseases affecting the crop, the *Fusarium* wilting caused by the *Fusarium oxysporum* fungus is distinguished. The *in vitro* selection of plants that are resistant to *Fusarium* species, by using fungous toxins as selective agents has been successfully described for several species. So, some adaptations were accomplished in the *in vitro* selection methodologies used in other species for obtainment of the yellow passionfruit plants that are tolerant to fusariosis. So, protocols for the micropropagation of the yellow passionfruit plants through explants of nodal segments, by using some BAP doses (1.0; 1.5 and 2.0 mg L⁻¹) and coconut water (0, 5 and 10% v/v) supplemented to the MS culture medium. The effects of the fusaric acid doses (0,0; 0,10; 0,20 and 0,30mM) were evaluated either on seed germination and the plant development *in vitro*. Then, the selected plants that were tolerant to the fusaric acid were submitted to filtrate doses of one isolate of the fungus (0, 20, 30, 40 or 50% (v/v)) in order to verify the correlation of the plant reactions to both selective agents. Following, the selected plants were transferred to the substratum composed by autoclaved sand containing the suspension of the fungus spores and were kept in growth chamber for evaluation of the resistance of the plants *in vivo*. The gamma-radiation doses (0, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 Gy) were also tested for obtaining the variants in nodal segments of *P. edulis* f. *flavicarpa* under *in vitro* conditions, and the effects from radiation on the increase of the *P. edulis* f. *flavicarpa* resistance to the fungus. The culture medium supplemented with 1 mgL⁻¹ BAP was most appropriate to micropropagation of the *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* plants from the

explants of nodal segments. The fusaric acid and the fungus culture filtrate were efficient in selecting the yellow passionfruit genotypes that were insensible to the fungus. The gamma radiation dose of 20 Gy is recommended for obtaining the mutants of the yellow passionfruit mutants from the nodal segments. Through radiation with gamma rays, it was possible to obtaining *in vitro* the yellow passionfruit plants that were insensible to the toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são conhecidas mais de 580 espécies de maracujazeiros. A maioria das espécies tem o centro de origem na América Tropical e Subtropical e grande parte delas é nativa do Brasil (Oliveira & Ruggiero, 2005). Os maracujazeiros pertencem a família Passifloraceae que é formada por 18 gêneros, dentre os quais, destaca-se o gênero *Passiflora*. No Brasil, são encontradas mais de 150 espécies de passifloras com propriedades alimentícias, medicinais ou ornamentais (Faleiro et al., 2005).

A espécie de maracujazeiro mais utilizada comercialmente é *Passiflora edulis* Sims. A espécie possui duas formas: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujazeiro-amarelo) e *Passiflora edulis* Sims f. *edulis* (maracujazeiro-roxo). O cultivo do maracujazeiro-amarelo é predominante no território nacional em detrimento ao cultivo do maracujazeiro-roxo, por aquele produzir frutos maiores e de polpa mais ácida e com maior rendimento de suco e ser mais vigorosa e produtiva (Faleiro et al., 2005).

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de maracujazeiro-amarelo, tendo cultivado 35.820 ha em 2005. O Estado de Minas Gerais produziu 44.025 toneladas de frutos, ficando em segundo lugar na produção nacional de maracujazeiro (AGRIANUAL, 2008).

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de maracujá, a produtividade nacional é muito baixa. Além disto, observa-se redução na área plantada no país. A incidência de várias doenças nos pomares de maracujazeiro, aliada à inexistência de cultivares resistentes, tem contribuído para a redução da área plantada (Meletti et al., 2005). O número limitado de produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle de doenças da cultura agrava mais ainda a situação dos pomares, a ponto de reduzir o tempo de exploração econômica da cultura, podendo até mesmo inviabilizar seu cultivo em determinadas regiões (Santos Filho & Laranjeira, 2004).

A murcha de *Fusarium* é a principal doença da cultura. A doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen f. sp. *passiflorae*, que permanece no solo por muitos anos na forma

de clamidósporo, inviabilizando o cultivo do maracujazeiro em algumas áreas (Liberato & Costa, 2001).

Atualmente, existem apenas medidas de prevenção à doença como o cultivo em áreas sem histórico de ocorrência da doença, o uso de material de propagação livre de patógenos e de plantas resistentes.

O melhoramento genético do maracujazeiro visando à resistência a doenças do sistema radicular tem sido dirigido à obtenção de híbridos interespecíficos com espécies silvestres resistentes. Problemas associados à biologia reprodutiva de *P. edulis* f. *flavicarpa* têm dificultado a introgressão destes genes de resistência silvestres em variedades comerciais de maracujazeiro-amarelo, por meio de cruzamentos convencionais (Meletti et al., 2005).

Apesar de controlar algumas doenças fúngicas, a enxertia com espécies resistentes não é utilizada no Brasil. Segundo Maldonado (1991) e Ruggiero & Oliveira (1998), a técnica de enxertia demanda maior trabalho e tempo da sementeira e o plantio no campo. Além destes fatores, o maior custo da produção da muda enxertada em comparação a muda obtida de semente ainda enfrenta resistência por parte dos produtores. Porta-enxertos resistentes e com a necessária qualidade para a cultura ainda não foram desenvolvidos.

As dificuldades observadas com a aplicação das técnicas anteriormente citadas fazem da seleção *in vitro* uma alternativa para a utilização de biotecnologias como ferramenta para auxiliar os programas de melhoramento genético.

A seleção *in vitro* de plantas resistentes a espécies de *Fusarium* utilizando toxinas fúngicas como agentes seletivos tem sido descrita com êxito para várias espécies (Svabová & Lebeda, 2005). Acredita-se que o ácido fusárico, toxina mais estudada do fungo, esteja envolvido no desenvolvimento da doença. O ácido fusárico foi utilizado com sucesso para seleção de plantas resistentes a fusariose em várias culturas. Assim, no presente trabalho foram realizadas adaptações das metodologias de seleção *in vitro* utilizadas em outras espécies para obtenção de plantas de maracujazeiro-amarelo insensíveis à fusariose.

Os métodos de seleção *in vitro* para resistência a doenças podem ser feitos a partir da resistência pré-existente em cultivares conhecidos ou a partir da variabilidade induzida (Hammerschlag et al., 1995; Mehlenbacher, 1995). A possibilidade de seleção dentro da espécie ainda não foi demonstrada, assim como a seleção de mutantes insensíveis. Foram testados também variantes mutantes induzidos de maracujazeiro-amarelo no incremento da resistência à fusariose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Murcha de *Fusarium*

Dentre as doenças que ocorrem no maracujazeiro, a murcha de *Fusarium* tem se destacado. Esta é a principal doença da cultura e é causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, que permanece no solo por muitos anos na forma de clamidósporo, inviabilizando o cultivo de maracujazeiro em algumas áreas (Liberato & Costa, 2001; Viana et al., 2003). A fusariose ocorre em diversas regiões produtoras de maracujá, podendo ocasionar grandes danos devido à morte das plantas, afetando a produtividade e reduzido a vida útil dos pomares (Liberato & Costa, 2001).

A doença pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta. As plantas com sintomas da doença normalmente são observadas em reboleiras, distribuídas ao acaso no pomar. A fusariose causa rápida perda de turgescência da parte aérea da planta, e posteriormente leva a falência de todos os órgãos, seguida de morte. Antes de murchar, as folhas mudam de coloração de verde brilhante para verde pálido ou verde amarelado (Viana & Costa, 2003).

As condições que favorecem a doença são temperaturas de 20 a 25 °C associadas à umidade elevada (Viana & Costa, 2003). O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* é disseminado pelo contato direto entre raízes, através da água e principalmente pelo transporte de sementes e mudas contaminadas (Pio-Ribeiro & Mariano, 1997). O fungo penetra nas plantas nas raízes primárias ou secundárias por aberturas naturais ou ferimentos (Viana & Costa, 2003). Em seguida, o fungo atinge o xilema bloqueando os vasos, impedindo o transporte da seiva para outros tecidos (Miranda, 2000). Nesta fase, é possível observar o escurecimento dos tecidos do xilema em cortes no caule (Viana & Costa, 2003).

As murchas vasculares causadas por *F. oxysporum* são de difícil controle. Em solos contaminados com o patógeno, culturas suscetíveis não podem ser cultivadas durante anos ou décadas. Segundo Ploetz (2006), o controle químico pode ser útil contra murchas causadas por *Fusarium* em culturas anuais, mas é ineficaz em culturas perenes uma vez que os

patógenos recolonizam o solo tratado rapidamente. O uso de material de propagação livre de patógenos e o cultivo de variedades resistentes são as principais medidas de controle nestes casos (Viana & Costa, 2003). Para prevenção, recomenda-se principalmente evitar o plantio em áreas ricas em matéria orgânica e mal drenadas; tratar o solo das sementeiras, procurando impedir o desenvolvimento do fungo e controlar os nematóides. Caso a doença já esteja instalada, recomenda-se a erradicação dos maracujazeiros afetados (Miranda, 2000).

2.2. Melhoramento do maracujazeiro visando resistência a doenças

O maracujazeiro é uma planta alógama com autoincompatibilidade esporofítica-gametofítica (Suassuna et al., 2003), o que confere grande variabilidade genética dentro da espécie. Esta variabilidade genética natural observada no maracujazeiro-amarelo, para as diversas características da planta e do fruto, define um significativo potencial de exploração por seleção massal, podendo-se encontrar algumas populações selecionadas e cultivares.

Antes do lançamento das primeiras cultivares, os pomares de maracujazeiro eram compostos apenas por plantas provenientes de seleções locais, sendo muitas das quais, realizadas por produtores (Meletti et al., 2005). Nos últimos anos, foram incluídas onze cultivares de maracujazeiro-amarelo no Registro Nacional de Proteção de Cultivares, as quais foram desenvolvidas por instituições de pesquisa, como o Instituto Agrônomo de Campinas e EMBRAPA (Tabela 1) (MAPA, 2008).

Tabela 1. Cultivares de *Passiflora edulis* Simms f. *flavicarpa* Deg. incluídas no Registro Nacional de Cultivares durante o período de 01/01/1998 a 13/03/2008.

Cultivar	Responsável pela manutenção	Data
BRS Gigante Amarelo	EMBRAPA	23/04/2007
BRS Ouro Vermelho	EMBRAPA	23/04/2007
BRS Sol do Cerrado	EMBRAPA	23/04/2007
CP MSC	EMBRAPA	30/11/2007
CPATU- Casca Fina	EMBRAPA	16/01/2002
CPGA	EMBRAPA	30/11/2007
CPMGA2	EMBRAPA	04/12/2007
CPMR	EMBRAPA	04/12/2007
IAC-273 - Monte Alegre	IAC	17/01/2002
IAC-275 - Maravilha	IAC	17/01/2002
IAC-277 - Jóia	IAC	17/01/2002

Os principais objetivos dos programas de melhoramento genético do maracujazeiro no Brasil estão relacionados com o aumento na produtividade e da qualidade dos frutos. Atualmente, a tolerância aos principais patógenos tem sido incorporada aos programas de melhoramento, tendo em vista a redução das áreas cultivadas causadas principalmente por moléstias em que o controle químico disponível não é satisfatório (Meletti et al., 2005).

O melhoramento genético visando variedades de maracujazeiro-amarelo resistentes às doenças do sistema radicular tem sido dirigido à obtenção de híbridos interespecíficos com espécies silvestres resistentes. A resistência a *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, principal patógeno da cultura do maracujazeiro, foi encontrada em *P. giberti*, *P. nitida*, *P. macrocarpa*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. alata* e *P. caerulea* (Junqueira et al., 2005). Problemas associados à biologia reprodutiva do maracujazeiro-amarelo têm dificultado a introgressão dos genes de resistência silvestres em variedades comerciais por meio de cruzamentos convencionais. A maioria dos híbridos interespecíficos apresenta problemas de desenvolvimento, macho-esterilidade, baixa viabilidade polínica e dificuldade em florescer (Meletti et al., 2005). Entretanto, segundo Junqueira et al. (2005), *P. setacea* utilizada como genitor feminino ou masculino cruza bem com o maracujazeiro-amarelo, produzindo frutos com muitas sementes férteis. Segundo este

autor, utilizando *P. caerulea* como genitor masculino nos cruzamentos com *P. edulis* f. *flavicarpa* é possível obter sementes F1 férteis, sendo necessário o uso do maracujazeiro-amarelo comercial como recorrente e genitor masculino na geração RC2 para manter a produção de sementes.

Apesar de já terem sido obtidos muitos híbridos interespecíficos com Passifloraceae, observa-se alta variação morfológica nos frutos, os quais são normalmente intermediários entre as duas espécies e sem características comerciais desejáveis (Meletti & Bruckner, 2001). Assim, são necessárias muitas gerações de retrocruzamento com o progenitor comercial para recuperar o vigor natural das plantas e as características interessantes para comercialização, tornando o programa de melhoramento demasiadamente longo (Meletti & Bruckner, 2001).

Alternativamente ao melhoramento genético, estudos com porta-enxertos resistentes aos patógenos de solo têm sido realizados. Apesar de controlar algumas doenças fúngicas, a enxertia com espécies resistentes não é utilizada no Brasil. Segundo Maldonado (1991) e Ruggiero & Oliveira (1998), a técnica de enxertia demanda maior trabalho e tempo da semeadura e o plantio no campo, e as plantas de pé franco são mais vigorosas do que as provenientes de enxertia. Outro problema enfrentado é a pequena disponibilidade de sementes das espécies selvagens a serem utilizadas como porta-enxerto, o que impede a obtenção de material de propagação em quantidade suficiente (Meletti et al., 2005). Segundo estes autores, a desuniformidade na germinação, a ocorrência de dormência e a falta de informações sobre o período de viabilidade das sementes das espécies selvagens resistentes, causa uma irregularidade na produção tornando inviável a aplicação da enxertia em escala comercial. Entretanto, a possibilidade de obtenção de mudas resistentes a patógenos de solo com o uso de porta-enxertos resistentes justificaria o seu uso a despeito de todos os entraves observados. Programas de melhoramento de porta-enxertos de maracujazeiro e estudos sobre o manejo das sementes das espécies selvagens são necessários para viabilizar a adoção da enxertia para a cultura.

Os métodos de melhoramento convencionais podem ser complementados com técnicas de biotecnologia. Alguns trabalhos têm

descrito a aplicação de técnicas como a hibridação somática e a transformação genética em maracujazeiro na obtenção de plantas com características agrônomicas desejáveis e resistentes a doenças (Braz, 1999; Takahashi, 2002; Alfenas et al., 2005; Castro, 2005; Monteiro, 2005; Trevisan et al., 2007). No entanto, estas técnicas têm algumas limitações como a instabilidade na expressão das características dos híbridos somáticos em campo e o número limitado de genes identificados em maracujazeiro para aplicação da transformação genética.

2.3. Seleção *in vitro*

As desvantagens observadas com a aplicação das técnicas anteriormente citadas fazem da seleção *in vitro* uma alternativa na utilização de biotecnologias como ferramenta para auxiliar em programas de melhoramento genético. A seleção *in vitro* de plantas utilizando toxinas fúngicas como agentes seletivos tem sido realizada com êxito para resistência a várias espécies de *Fusarium* (Svabová & Lebeda, 2005).

A seleção *in vitro* apresenta uma particular importância na obtenção de variedades resistentes a patógenos de solo, tendo em vista que o controle químico não é eficiente como é o caso de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Ploetz, 2006). A seleção *in vitro* também é vantajosa para plantas em que a seleção para resistência em condições de campo ou casa de vegetação é dificultada por questões climáticas ou por aspectos ligados ao patógeno. Na seleção para resistência a doenças a campo, as flutuações naturais da quantidade de inóculo e dos fatores climáticos que influenciam na dispersão do patógeno, infecção, desenvolvimento e expressão da doença tornam o sistema muito dependente das variáveis ambientais, além de demandar muito tempo (Predieri, 2001). Neste sentido, a adequação de protocolos seria promissora para seleção *in vitro*, de genótipos de maracujazeiro resistentes a fusariose, e assim contribuir para o melhoramento da cultura.

A seleção *in vitro* depende da disponibilidade de sistemas eficientes de regeneração e de propagação clonal, juntamente com a disponibilidade de um agente seletivo efetivo (Predieri, 2001). Para que o agente seletivo

seja eficiente, é necessário que haja correlação entre as resistências a doença e ao agente (Lemos, 2003). Existem vários exemplos na literatura em que houve correlação positiva entre a sensibilidade ao agente seletivo *in vitro* e a resposta de resistência das plantas *in vivo* ao fungo *Fusarium oxysporum*, por exemplo, em batata, aspargo, cravo, gladiolo e grão-de-bico (Svabová & Lebeda, 2005).

Pela utilização de toxinas como agentes seletivos é possível selecionar plantas resistentes a patógenos em estágios iniciais de desenvolvimento, bem como em nível gametofítico (Pontaroli et al., 2000; Pontaroli & Camadro, 2001). Este aspecto traz vantagens por acelerar o processo de seleção.

Uma das maiores vantagens da seleção *in vitro* é que novos genótipos podem ser selecionados a partir de grandes populações de células fisiologicamente uniformes sob condições definidas, dentro de um espaço limitado, e em um curto período de tempo (Hammerschlag et al., 1995). Além desta vantagem, Brisset et al. (1998) observaram que a inoculação de *Erwinia amylovora* em plantas de pêra *in vitro*, causou superexpressão da susceptibilidade ao patógeno, quando comparada com respostas a campo, permitindo assim apenas a seleção de indivíduos com altos níveis de resistência. Donovan et al. (1994), comparando métodos de seleção *in vitro* e seleção *in vivo* de genótipos de plantas *Malus* resistentes a *Erwinia amylovora*, observaram que as plantas em condições *in vitro* sofrem maior pressão de seleção. Outras vantagens incluem a facilidade de expor a cultura de células a mutagênicos e a agentes seletivos e a disponibilidade de células haplóides para a seleção de caracteres recessivos (Hammerschlag et al., 1995).

Dentre as toxinas produzidas por *F. oxysporum*, o ácido fusárico é o metabólito secundário tóxico mais estudado (Svabová & Lebeda, 2005). Apesar de a sua função ainda não estar completamente elucidada, acredita-se que há o envolvimento da toxina no desenvolvimento da doença.

O baixo peso molecular apresentado por esta micotoxina favorece o seu deslocamento via xilema, chegando às folhas do hospedeiro, onde atuam rompendo a permeabilidade das membranas celulares e prejudicando

a capacidade destas em controlar a perda de água pela transpiração (Marley & Hillocks, 1993).

Em baixas concentrações, o ácido fusárico induz a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a ativação de proteínas que regulam a morte celular programada e de outros elementos de resposta de hipersensibilidade em plantas. Isto indica que a toxina em níveis reduzidos pode induzir resposta de defesa na célula vegetal (Samadi & Behboodi, 2006).

As reações observadas com a exposição das plantas à toxina em ambiente controlado, a semelhança do que ocorre a campo em plantas atacadas por *Fusarium*, resultam na murcha da parte aérea e posterior colapso da planta. Isto é um indicativo da participação do ácido fusárico na manifestação dos sintomas da doença em plantas a campo.

O ácido fusárico foi utilizado com sucesso para seleção de plantas resistentes a diversas *formae specialis* de *F. oxysporum* em cultivares de bananeira (Matsumoto et al., 1995), gladiolo (Pathania & Misra, 2003; Nasir & Riazuddin, 2006), tomate (Shahin & Spivey, 1986) e cevada (Chawla & Wenzel, 1987). Matsumoto et al. (1995) selecionaram plantas de bananeira insensíveis a *F. oxysporum cubense* raça 1 com o uso do ácido fusárico. As respostas foram confirmadas em ensaios realizados em casa de vegetação com a aplicação do fungo nas plantas selecionadas.

Apesar do potencial de utilização do ácido fusárico como agente seletivo para plantas resistentes à fusariose, é recomendável que mais de um metabólito seja adicionado ao meio seletivo na seleção *in vitro*. De acordo com McLean (1996), normalmente mais de um metabólito fúngico está envolvido na patogênese. Por isto, uma estratégia interessante para obtenção de um agente seletivo apropriado, é a utilização do filtrado da cultura do fungo isolado de plantas com sintomas da doença a campo para inoculação no genótipo de interesse, sob condições *in vitro*. Assim, a seleção estaria sendo direcionada, à medida que o isolado retirado diretamente da planta infectada, apresentaria interação compatível com o genótipo do hospedeiro utilizado, resultando no fenótipo suscetível.

Fungos do gênero *Fusarium* produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos em cultura (Lemos, 2003). Existem vários trabalhos

em que a seleção *in vitro* utilizando-se o filtrado da cultura de diferentes *formae specialis* de *F. oxysporum* consistiu em um método eficiente na obtenção de plantas resistentes ao patógeno. Dentre as culturas selecionadas, citam-se: pimenta-do-reino (Lemos, 2003), bananeira (Companiononi et al., 2003; 2005; 2006), cravo (Thakur et al., 2002), gladiolo (Pathania & Misra, 2003), aspargo (Pontaroli et al., 2000; Pontaroli & Camadro, 2001), grão-de-bico (Hamid & Strange, 2000; Rao & Padmaja, 2000; Singh et al., 2003) e gengibre (Prachi-Sharma & Singh, 2002).

O uso combinado do ácido fusárico e o filtrado da cultura do fungo poderia ser útil tanto para estabelecimento de metodologias de seleção de plantas resistentes ao patógeno, como para estudos da interação patógeno hospedeiro e as moléculas envolvidas nesta interação.

Um aspecto relevante para o sucesso da técnica é a necessidade de avaliar a escolha de órgãos e tecidos que resultem em respostas confiáveis. Segundo Predieri (2001), nem todos os tecidos de plantas são apropriados para a seleção *in vitro*. De acordo com Witsenboer et al (1988), a seleção *in vitro* pode ser feita com protoplastos, suspensão celular, calos, discos foliares, mas é preferencialmente feita em suspensão celular ou protoplastos, uma vez que há maior uniformidade na ação do agente seletivo. De acordo com estes autores, a seleção de brotações a partir de discos foliares é vantajosa quando a regeneração de plantas a partir da suspensão celular ou protoplastos é problemática. Malepszy & El-kazzaz (1990) observaram que a suspensão celular de *Cucumis sativus* é mais sensível ao filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* que culturas de calos. No entanto, segundo Hammerschlag et al. (1995), a resistência à doença expressada na planta inteira, pode não ser expressa em nível celular. Células *in vitro* perdem ou não manifestam determinados tipos de respostas características da planta infectada, o que é especialmente pertinente quando a infecção ou a resposta da planta está restrita aos tecidos vasculares (Matthysse, 1983 apud Duval, 1998).

Witsenboer et al. (1988), observaram que adicionando toxinas de *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* em discos foliares de plantas de tomateiro não ocorreu necrose, mas quando adicionadas em plantas as toxinas inibiram o crescimento de raiz e a produção de brotações. Estes

autores também verificaram que em calos, suspensão celular e protoplastos, as toxinas inibiram o crescimento tanto em genótipos resistentes como em genótipos suscetíveis, gradativamente conforme foi aumentada a concentração. Os autores atribuíram a não diferenciação de fenótipo resistente e/ou suscetível nestes tecidos, devido ao fato de que o alvo destas toxinas é a enzima aspartato carbamoil transferase localizada nos cloroplastos. Resultados semelhantes foram observados por Harelimana et al. (1997). De acordo com estes autores, em *Musa* spp., a sensibilidade à toxina de *Mycosphaerella fijensis* deve ser avaliada apenas em tecidos fotossintéticos.

Pontaroli et al. (2000) e Pontaroli & Camadro (2001) relataram que a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico de aspargo foram afetados pelo filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *in vitro* e *in vivo*.

2.4. Cultura de tecidos de maracujazeiro-amarelo

Várias técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas ao maracujazeiro-amarelo com diversas finalidades (Vieira & Carneiro, 2004).

Existe um grande número de trabalhos publicados sobre a regeneração *in vitro* de espécies de *Passiflora*. Apesar disto, o assunto está longe de ser esgotado (Passos & Bernacci, 2005).

O amarelecimento das brotações tem sido um problema grave na cultura de tecidos de maracujazeiro, e este amarelecimento tem sido atribuído a toxidez provocada pelo acúmulo de etileno produzido durante o cultivo *in vitro* (Barbosa et al., 2001; Reis et al., 2003; Dias, 2005). Alguns autores têm relacionado a produção de etileno em plantas de maracujazeiro-amarelo *in vitro* com a suplementação de 6-benzilaminopurina (BAP) ao meio de cultura e com a condição de luz (Couceiro, 2002).

Além dos problemas acima citados, é observada grande variação nas respostas na cultura de tecidos do maracujazeiro-amarelo (Passos & Bernacci, 2005). A maioria das espécies de *Passiflora* apresenta grande variabilidade genética e devido a isto, a repetição dos resultados muitas vezes é dificultada. A variabilidade nas respostas se acentua conforme o

explante utilizado, ambiente de cultivo, dentre outros (Passos & Bernacci, 2005).

Algumas das variações observadas em trabalhos com micropropagação de plantas de maracujazeiro-amarelo referem-se à fonte de explante mais apropriada para indução de brotações. No estabelecimento *in vitro* de plantas de maracujazeiro-amarelo, várias fontes de explantes podem ser utilizadas, tais como: discos foliares (Otaola, 2000; Bacerra et al., 2004; Trevisan & Mendes, 2005), ápices caulinares (Reis et al., 2003; Isutsa, 2004); entrenó (Biasi et al., 2000), segmentos nodais (Cancino et al., 1998) e hipocotiledonares (Couceiro, 2002).

Segundo Apezato-da-Glória et al. (2005), o maracujazeiro-amarelo possui alta determinação para diferenciar estruturas foliares *in vitro*, mas muitas destas não se alongam. A superioridade do potencial de regeneração dos explantes hipocotiledonares em relação aos explantes foliares de maracujazeiro-amarelo tem sido demonstrada em alguns trabalhos (Hall et al., 2000; Couceiro, 2002; Fernando et al., 2007). A baixa regeneração de brotações observadas em explantes foliares de maracujazeiro-amarelo deve-se à falta de definição da camada epidérmica e das camadas subepidérmicas das áreas meristemáticas formadas, o que estaria interferindo na regeneração completa das gemas (Fernando et al., 2007). Segundo estes autores, as áreas meristemáticas formadas no explante hipocotiledonar possuem contorno bem delimitado e apresentam potencial para regenerar mais de uma gema adventícia na sua superfície. Nos explantes foliares, no decorrer da cultura, os autores observaram que estas áreas não apresentam contorno bem delimitado.

O meio de cultura utilizado na maioria dos trabalhos de cultura de tecido de maracujazeiro tem sido o meio MS integral ou o com a metade da concentração dos sais (MS 50%). Porém, Monteiro-Hara et al. (2000), ao utilizarem discos foliares em meio MS para micropropagação do maracujazeiro-amarelo, observaram deficiências nutricionais nas plantas regeneradas. Ribas (2002) observou que quando utilizou o meio MS suplementado com as vitaminas do meio B5 para regenerar plantas de maracujazeiro-amarelo a partir de explantes cotiledonares, ocorreu uma

maior quantidade de explantes regenerativos e maior número de gemas produzidas por explante.

Apesar das divergências com relação à composição do meio de cultura, segundo Appezzato-da-Glória et al. (2005), de maneira geral, os tecidos de passifloráceas são bastante responsivos à ação da citocinina BAP. Em *P. edulis*, a regeneração de brotações ocorre na faixa de concentração de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, podendo ocorrer direta ou indiretamente (Passos & Bernacci, 2005).

A utilização de auxina para indução de brotações em explantes de maracujazeiro-amarelo juntamente com BAP no meio de cultura foi relatada por alguns autores (Faria & Segura, 1997a; Faria & Segura, 1997b; Kawata et al., 1995). O uso de auxinas na cultura de tecidos de maracujazeiro tem sido direcionado mais freqüentemente para a indução do sistema radicular nas brotações. No entanto, a formação de raízes pode ocorrer mediante tratamento com auxinas como o ácido α -naftalenoacético (ANA) e também na ausência de fitoreguladores em meio de cultura com baixa concentração de sais e compostos orgânicos (Vieira et al., 2005). Para alongamento e enraizamento das brotações, Dornelas & Vieira (1994) utilizaram o meio MS50%.

A suplementação do meio de cultura com água de coco é outro procedimento controverso no cultivo *in vitro* do maracujazeiro. Há autores que mencionam que sua adição é necessária (Hall et al., 2000; Dornelas & Vieira, 1994; Kantharajah & Dodd, 1990) e outros indicam que não é necessária para organogênese (Kawata et al., 1995). Dornelas & Vieira (1994) observaram que a suplementação de até 10 % (v/v) de água de coco no meio de cultura resultou no aumento da produção de matéria seca.

De maneira geral, substâncias complexas como água de coco possuem composições variáveis de uma fonte para outra, o que dificulta a reprodução dos resultados. Quando se consegue a resposta desejada em meio definido, o controle do processo pode ser estudado mais facilmente. Por isto, em estudos com cultura de tecido de plantas, substâncias complexas estão deixando de ser utilizadas gradativamente, apesar de que em alguns trabalhos terem sido constatados aumentos das respostas *in vitro*

com seu uso (Kantharajah & Dodd, 1990; Dornelas & Vieira, 1994; Hall et al., 2000).

A obtenção de um protocolo otimizado de regeneração de plantas de maracujazeiro é imprescindível para viabilizar manipulações *in vitro* em que se necessita de explantes vegetativos. Provavelmente, adotando-se parâmetros de avaliação que possibilitem melhores comparações entre os trabalhos e a utilização de meios de cultura de composição definida é possível diminuir as divergências observadas na literatura referentes à cultura de tecidos do maracujazeiro-amarelo.

2.5. Indução de mutações no melhoramento genético de plantas

Os métodos de seleção para resistência de plantas a doenças podem ser feitos a partir da variabilidade induzida ou, quando possível, a partir da resistência pré-existente em cultivares (Hammerschlag et al., 1995; Mehlenbacher, 1995).

Através do melhoramento de plantas por indução de mutações, mais de 1.800 cultivares foram obtidas direta ou indiretamente em plantas propagadas por sementes, como trigo, arroz, cevada, trigo, amendoim e feijão (Ahloowalia & Maluszynski, 2001). Em plantas propagadas vegetativamente, 465 mutantes foram liberados, sendo a maioria plantas ornamentais e pouco em fruteiras (maçã, pêra japonesa, toranja, banana, abacaxi, tâmara, dentre outras) (Ahloowalia & Maluszynski, 2001). Características como tamanho da planta, época de florescimento e amadurecimento dos frutos, cor do fruto, auto-compatibilidade e resistência a patógenos foram introduzidas em fruteiras por meio de mutações induzidas (Predieri, 2001)

As mutações são alterações que envolvem a eliminação, adição ou substituição de um ou poucos nucleotídeos da fita de DNA (mutações de ponto) (Alberts et al., 2004) e transmitida entre gerações.

Apesar de ser possível a utilização de vários materiais vegetais na indução de mutações, o maior sucesso da técnica ocorre quando a planta é regenerada de uma única célula, tendo em vista que a mutação é um evento unicelular (Tulmann Neto et al., 1998). Quando estruturas multicelulares são

tratadas com mutagênicos, durante as divisões celulares vão sendo formadas linhagens de células mutadas e outras não, gerando tecidos somáticos geneticamente distintos na mesma planta (quimeras). Neste sentido a cultura de tecidos representa uma ferramenta importante para auxiliar na obtenção e recuperação de mutantes uniformes. Culturas de protoplastos, suspensões celulares, e cultura de anteras são técnicas da cultura de tecidos indicadas para obtenção de mutantes uniformes (Tulmann Neto et al., 1998). Calos embriogênicos também podem ser utilizados como material a ser tratado para obtenção de mutantes. Na maior parte das vezes, os embriões são de origem unicelular, mas também podem ter origem multicelular, dependendo do explante utilizado e das condições de cultivo (Moura, 2007). Através desta via de regeneração, quando de origem unicelular, há maiores chances de sucesso na regeneração de mutantes quando comparada à via organogênica. O sistema de regeneração por embriogênese somática ainda oferece a vantagem de apresentar a formação de uma estrutura bipolar que leva a regeneração de plântulas completas (Guerra et al., 1998). Porém, esta via de regeneração pode não ser viável para espécies recalcitrantes à embriogênese somática (Tulmann Neto et al., 1998), como é o caso do maracujazeiro-amarelo.

A partir de gemas adventícias é possível obter mutantes sólidos em diversas espécies em que foi comprovada a origem unicelular dessas gemas (Tulmann Neto et al., 1998). Quando não é possível evitar a formação de quimeras, é possível isolar os setores mutantes mediante sucessivas multiplicações *in vitro* para aumentar a probabilidade de seleção do mutante (Predieri, 2001).

Outra característica dos eventos mutacionais é a aleatoriedade com que ocorrem. Não é possível, durante a indução de mutação direcionar o tratamento para a obtenção de um tipo mutante específico. A seleção é que deve ser dirigida para a busca do mutante procurado de acordo com o objetivo do trabalho (Tulmann Neto & Latado, 1999). Através da seleção *in vitro*, é possível tratar de um grande número de propágulos aplicando uma pressão de seleção (fitotoxinas, sais, dentre outros) no material irradiado, direcionando assim a seleção dos mutantes insensíveis a fatores bióticos e abióticos específicos (Mohan Jain, 2002). Os indivíduos selecionados podem

então ser multiplicados em grande escala para avaliação em casa de vegetação e em campo (Mohan Jain, 2002).

Na indução de mutações podem ser utilizados agentes químicos ou físicos. Os mutagênicos químicos compreendem uma série de produtos químicos e os físicos incluem diferentes tipos de radiação, tais como raios-x, gama, nêutrons e ultravioleta. (Tulmann Neto & Latado, 1999). A radiação gama tem sido o mutagênico mais utilizado na indução de mutações em plantas visando o melhoramento genético (Ahloowalia et al., 2004, Predieri, 2001). Os mutagênicos químicos, ao contrário dos físicos, podem apresentar baixa penetrabilidade nos tecidos e exigem maiores cuidados na manipulação durante e após os tratamentos (Tulmann Neto & Latado, 1999).

A determinação da sensibilidade ao agente mutagênico é uma etapa essencial na aplicação da mutagênese. As recomendações para a escolha das doses dos mutagênicos *in vitro* seguem os princípios estabelecidos para mutagênese *in vivo*, onde estas correlações foram estudadas (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1977 citado por Tulmann Neto et al., 1998). Os parâmetros a serem avaliados são empíricos, pois não há comprovação da correlação entre estes e as freqüências de mutação. *In vitro*, a dose ideal do mutagênico pode ser baseada em características como altura da planta, sobrevivência (DL50), número de brotações produzidas, dentre outros.

Para a escolha da dose de radiação nas sementes de maracujazeiro-amarelo *in vitro*, Otahola (1999) considerou a sobrevivência, a altura da planta e o número de folhas por planta. A dose de radiação escolhida pelo autor não reduziu em 50 % os valores para todas as características analisadas, com relação ao controle. A avaliação apenas da sobrevivência pode não ser suficiente para determinação da dose, pois as plantas sobreviventes podem apresentar problemas no crescimento e desenvolvimento e assim, as doses utilizadas podem não resultar em diferenças na sobrevivência, mas em outro parâmetro (Tulmann Neto et al., 1998).

As diferenças na radiosensibilidade entre as várias partes da planta refletem a reação de um determinado tipo celular, que vai depender das condições fisiológicas da mesma, do tempo de irradiação, bem como das

condições de pré e pós-irradiação. A decisão sobre a dose deve ser feita de acordo com a parte a ser irradiada, do estado de desenvolvimento da mesma, do conhecimento prévio do comportamento da espécie e dos objetivos do programa (Otahola et al., 2001). A sensibilidade aos mutagênicos físicos é inversamente proporcional ao grau de diferenciação dos tecidos, à fase do ciclo celular e ao teor de água na célula, visto que a molécula de água é o mais freqüente alvo primário da radiação ionizante (Montalván, 1999; Predieri, 2001). Observa-se maior sensibilidade das células aos mutugênicos durante as fases do ciclo celular que antecedem à duplicação do DNA (Predieri, 2001).

Para indução de mutação em sementes de várias espécies de plantas, são utilizadas doses de 60 a 700 Gy, enquanto que para material cultivado *in vitro*, a dose é muito menor, variando de 5 a 100 Gy, dependendo da espécie de planta, cultivar ou tipo de material inicial (Ahloowalia & Maluszinsky, 2001). Otahola (1999) relatou que a DL₅₀ para porcentagem de explantes de segmentos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* com formação de brotações está entre 15 e 20 Gy e, para sementes, a DL₅₀ se encontra ao redor de 150 Gy. Entretanto, Torne & Desai (1975) observaram que a DL₅₀ em sementes de *P. edulis* ficou entre 100 e 125 Gy. Marval (1998) citado por Otahola (1999) obteve uma DL₅₀ em sementes de maracujazeiro com uma dose de radiação por volta de 50 a 100 Gy.

3. OBJETIVOS

- Estabelecer protocolos para a micropropagação de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* através de explantes de segmentos nodais;
- Verificar a eficiência do ácido fusárico e o filtrado da cultura fúngica na seleção *in vitro* de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* insensíveis ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*;
- Estabelecer a dose de radiação gama mais adequada para obtenção de variantes em segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* sob condições *in vitro*;
- Analisar os efeitos da radiação gama sobre o incremento da resistência de *P. edulis* f. *flavicarpa* ao fungo *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos referentes às técnicas *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. As irradiações do material foram realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, localizado em Piracicaba, São Paulo. A análise do teor de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica foi realizada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica - NEPRON (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

4.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido de plantas de *Passiflora edulis* com sintomas de fusariose, provenientes da área experimental do Setor de Fruticultura, localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa.

4.2. Obtenção e multiplicação de brotações em explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*

Em câmara de fluxo laminar, sementes provenientes de frutos maduros de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram imersas em etanol 70 % durante 1 minuto e, após, em solução de hipoclorito (2% de cloro ativo) durante 20 minutos e, em seguida, enxaguadas com água destilada autoclavada por três vezes. Com auxílio de bisturi, as sementes foram escarificadas, com uma incisão na região distal da semente. As sementes foram semeadas em frascos com capacidade de 300 mL contendo 30 mL de meio básico constituído de sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de inositol; 1,0 mg L⁻¹ de tiamina-HCl; 0,05 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl; 0,05 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 2,0 mg L⁻¹ de glicina; e 8 g L⁻¹ de ágar. Após 2 meses da germinação, as plântulas foram seccionadas com o auxílio de um bisturi, para a obtenção dos explantes de segmentos nodais de aproximadamente

1,5 cm contendo uma gema axilar. Os explantes foram inoculados verticalmente com a secção proximal em contato com o meio de cultura. O meio utilizado para indução e multiplicação de brotações foi o meio MS suplementado com 1,0; 1,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP combinado com 0,5 ou 10 % (v/v) de água de coco. A água de coco, obtida de frutos maduros, foi filtroesterilizada em câmara de fluxo laminar e adicionada aos meios de cultura autoclavados.

Os frascos contendo as culturas foram mantidos em sala de crescimento, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas à densidade de fluxo luminoso de 32 µmol m⁻² s⁻¹, à temperatura de 27 ± 2°C. Após 60 dias, foi avaliado o número de brotações por explante, massa fresca e seca das brotações.

Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo seis explantes. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da variância com o auxílio do programa estatístico SAEG. As médias foram comparadas pelo teste Tukey. Quando necessário os dados foram transformados para raiz(x+1).

4.3. Identificação de genótipos de *P. edulis* f *flavicarpa* insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico, *in vitro*

Neste experimento, foram utilizadas sementes de *P. edulis* f *flavicarpa* como genótipo suscetível e de *P. alata*, utilizado como genótipo resistente à fusariose, conforme mencionado na literatura. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em solução de etanol 70 % durante 1 minuto e após, em solução de hipoclorito (2% de cloro ativo) durante 20 minutos. Após, as sementes foram então enxaguadas em água destilada autoclavada e escarificadas com uma incisão na parte distal da semente com auxílio de um bisturi. As sementes foram semeadas em placas de Petri contendo 30 mL de meio básico constituído de sais minerais MS, 100 mg L⁻¹ de inositol; 1,0 mg L⁻¹ de tiamina-HCl; 0,05 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl; 0,05 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 2,0 mg L⁻¹ de glicina; e 8 g L⁻¹ de Agar,

suplementados ou não com 0,10; 0,20; 0,30 ou 0,40 mM de ácido fusárico (Sigma Co), e com pH 5,7.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas à densidade de fluxo luminoso de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa contendo seis sementes. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes. Foi considerada germinação quando observada a emissão da radícula e as folhas cotiledonares. Os pré-requisitos para o teste paramétrico foram verificados. Os dados de germinação foram transformados em $\text{Log}_{10}(G+1)$, sendo G a porcentagem de germinação. Os dados foram submetidos à análise da regressão, utilizando-se o programa SAEG 9.1.

Em um ensaio seguinte, as sementes não germinadas no meio com a menor dose da toxina (0,10 mM) e plântulas obtidas da germinação das sementes no meio de cultura suplementado com a maior dose de ácido fusárico (0,40 mM), foram transferidas para meio MS onde permaneceram por 30 dias. As plântulas obtidas foram multiplicadas conforme metodologia descrita no item 4.2 utilizando meio básico suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Após 60 dias, as brotações foram individualizadas e transferidas para meio MS isento de citocininas para alongamento e enraizamento. As plantas obtidas foram utilizadas em uma seleção adicional utilizando meio básico contendo 0,0; 0,10; 0,20 ou 0,30 mM ácido fusárico, sem adição de ágar.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas à densidade de fluxo luminoso de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída de três frascos com capacidade de 300 mL contendo 30 mL de meio de cultura com duas plantas. As plântulas tiveram seu sistema radicular seccionado para fins de padronização das amostras. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados. Foi avaliado o número de folhas senescentes, número, comprimento, massa fresca e seca das raízes. Os dados foram submetidos à análise da regressão com o auxílio do programa estatístico SAEG 9.1. Os dados de comprimento e de número raízes foram transformados para $\text{raiz}(x+1)$. Os dados de massa

fresca e seca foram transformados em raiz(x+0,5). Para comparação entre os genótipos insensível e sensível foi utilizada análise da variância.

4.3.1. Análises histológicas de plântulas germinadas em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ácido fusárico

Os efeitos do ácido fusárico na morfologia de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* germinadas em meio contendo a toxina foram analisadas através de cortes histológicos.

Plântulas com uma semana da germinação em meio contendo 17,90 mg L⁻¹ de ácido fusárico foram fixadas em FAA₅₀ (formol: ácido acético: álcool etílico_{50%}, na proporção de 5: 5: 90) onde permaneceram por 48 horas, e estocadas em etanol 70%, conforme descrito por Johansen (1940). O material foi incluído em historesina conforme metodologia de Carmello-Guerreiro (1995) e posteriormente seccionado longitudinalmente em secções de 6 µm de espessura em micrótomo rotativo. O material foi corado em azul de toluidina. Foram realizados registros fotográficos com o auxílio de fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo, em aumento que possibilitasse a visualização das estruturas.

4.4. Análise da patogenicidade de dois isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* a plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro*

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, CLI 1423 e 28B, utilizados neste experimento, foram fornecidos pela Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV e pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, respectivamente. Os isolados foram cultivados em BSA (batata-sacarose-ágar) por duas semanas (Figura 1).

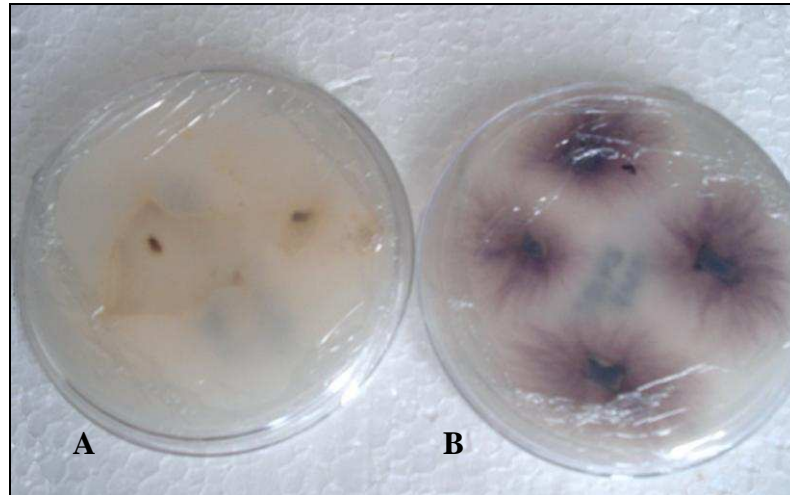


Figura 1. Cultura de isolados CLI 1423 (A) e 28B (B) de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* após 15 dias de incubação em meio de cultura BSA.

Um disco de 1 cm de meio contendo micélios do fungo foi transferido para erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio Richard. As culturas foram mantidas em agitador orbital à 70 rpm por 30 dias. Após este período, as culturas foram filtradas em papel filtro e as hifas foram secas em estufa até peso constante e pesadas para avaliação da matéria seca. O material fúngico do isolado CLI 1423 e 28B pesaram 379 mg e 311 mg, respectivamente.

O filtrado da cultura foi centrifugado a 3493 g por 10 minutos. O sobrenadante contendo material fúngico remanescente foi descartado e o líquido restante foi esterilizado com membrana estéril com poro de 0,22 µm, com auxílio de uma bomba de vácuo.

Após a esterilização, os filtrados das culturas dos isolados foram mantidos à -5 °C, até o momento da utilização.

Foi avaliada a fitotoxicidade dos filtrados dos isolados de *F. oxysporum*, CLI 1423 e 28B em plantas de maracujazeiro-amarelo com 3 meses da germinação, *in vitro*. Foram testadas as concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v) dos filtrados dos isolados, em meio MS líquido. As plântulas tiveram o sistema radicular seccionado para fins de padronização das amostras e, então cada planta foi transferida para frasco com capacidade de 300 mL, contendo 30 mL de meio. Adicionalmente, foi realizado um ensaio para a verificação de possíveis efeitos tóxicos do meio Richard sobre as

culturas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*. Para tanto, alíquotas do meio Richard foram adicionadas em meio MS líquido nas mesmas concentrações testadas com os filtrados dos isolados fúngicos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, à densidade de fluxo luminoso de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi avaliado o número de folhas senescentes, número, comprimento, massa fresca e seca das raízes.

Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída de três frascos com capacidade de 300 mL contendo 30 mL de meio de cultura com duas plantas. As plântulas tiveram seu sistema radicular seccionado para fins de padronização das amostras. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da regressão com o auxílio do programa estatístico SAEG 9.1.

4.4.1. Análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica

A análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica foi realizada em Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) e através da Técnica de Cromatografia em Camada Delgada (TLC), de acordo com metodologia desenvolvida por Diniz (1999).

4.4.1.1. Extração do ácido fusárico

Três amostras de 5 ml do filtrado da cultura fúngica do isolado 28B foram liofilizadas e homogeneizadas com 100 ml de solução de metanol: HK_2PO_4 a 1 %, pH 3,0, centrifugadas a 10000 g por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi ajustado para pH 3,0 com HCl a 2 Mol L^{-1} . Procedeu-se à extração por três vezes com 80 ml de cloreto de metileno. O extrato resultante teve o volume reduzido para 40 ml em rotavapor. A seguir adicionou-se 25 ml de uma solução aquosa de NaHCO_3 a 5 % e realizou-se nova extração por duas vezes. Foi descartada a fração que continha cloreto de metileno e a fração aquosa contendo NaHCO_3 foi ajustada para pH 3,0

com HCl a 5 Mol L⁻¹. Por duas vezes mais procedeu-se à extração com cloreto de metileno, quando, finalmente, o cloreto de metileno foi removido sob vácuo à 40 °C em rota-vapor. O resíduo obtido foi ressuspenso no sistema móvel para ser usado em CLAE.

4.4.1.2. Determinação quantitativa do ácido fusárico por CLAE

A análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica mediante CLAE foi realizada conforme o método descrito por Bacon et al. (1996), com modificações.

A fase móvel foi constituída de água: metanol: solução ligante (5:3:2 v; v; v), conforme Bacon et al. (1996). A solução ligante foi preparada com 2,5-4-dodecildietenetriamina, 100 g de acetato de amônia e 897,5 mL de acetato de zinco 0,01 M, ajustando-se a solução para pH 7,3. Foi usada a coluna RP 18 com 10 cm, ajustando-se o detector de UV para 271 nm. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min à 25 °C e absorvância de 65,0. Foi utilizado cromatógrafo líquido CG modelo CG-480C, equipado com integrador e processador CG-300 e Detector de UV CG-435.

4.4.1.3. Determinação quantitativa do ácido fusárico por TCL

Os padrões de ácido fusárico nas concentrações de 1000, 500, 250, 100 µg mL⁻¹, foram aplicadas em placas de sílica (20 x 20 cm) em base de alumínio (Whatman ALSILG). O sistema eluente possuía a seguinte composição: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico (50:40:20 v; v; v). Os cromatogramas foram revelados com uma solução de ácido rubeânico a 0,1 % em acetona (Bacon et al., 1996).

4.4.2. Avaliação da fitotoxicidade do filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico

Plantas insensíveis e plantas sensíveis ao ácido fusárico, identificadas conforme metodologia descrita no item 4.3, foram utilizadas neste

experimento. Após serem multiplicadas em meio MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, as plantas foram transferidas para meio MS isento de fitorreguladores para alongamento e enraizamento das brotações. Para fins de padronização das plantas as mesmas tiveram os sistemas radiculares seccionados.

As plantas foram inoculadas em frascos com capacidade de 300 mL, contendo 30 mL de meio MS líquido suplementado com 0, 20, 30, 40 ou 50 % (v/v) do filtrado do isolado 28B.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas à densidade de fluxo luminoso de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 27 \pm 2 °C. Foram avaliados o número de folhas senescentes, número, comprimento, massa fresca e seca das raízes.

Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída de três frascos com capacidade de 300 mL contendo 30 mL de meio de cultura com duas plantas. As plântulas tiveram seu sistema radicular seccionado para fins de padronização das amostras. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da regressão com o auxílio do programa estatístico SAEG 9.1. Quando necessário os dados foram transformados para raiz(x+1).

4.5. Avaliação da sensibilidade de *P. edulis* f. *flavicarpa* ao *F.oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *in vivo*

Genótipos insensíveis e genótipos sensíveis ao filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, identificados conforme descrito no item 3.4.3, foram utilizados para a avaliação da resistência ao fungo em condições *ex vitro*. Para tanto, após aclimatizadas, as plantas foram transferidas para magentas (300 mL) contendo areia lavada e autoclavada por 30 minutos a 121 °C. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento. Durante uma semana foi fornecida às plantas uma solução nutritiva constituída de sais MS (50 %). Após este período, as plantas foram inoculadas com suspensão de esporos do fungo proveniente de culturas fúngicas mantidas em meio BSA.

A calibração da concentração de inóculo na suspensão de esporos foi ajustada para 4×10^7 esporos mL^{-1} com auxílio de hemacitômetro tipo Neubauer.

Foram avaliadas a porcentagem de plantas sobreviventes, comprimento, massa fresca e seca das raízes. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados sendo cada bloco composto de 5 plantas. Foram utilizados 5 blocos, totalizando 25 plantas por genótipo. Os dados de porcentagem de plantas sobreviventes e comprimento das raízes foram submetidos a análise da variância. Foram amostradas 10 plantas para análise do massa fresca e seca das raízes. As médias foram submetidas ao teste-t para verificar a existência de diferenças entre os genótipos para estes parâmetros. A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico SAEG 9.1. Os dados foram transformados para raiz $(x+1)$.

4.6. Indução de mutações em segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*

Neste experimento, foi avaliada a radio-sensitividade de segmentos nodais contendo gemas axilares de *P. edulis* f. *flavicarpa* a diferentes doses de radiação gama a partir da fonte ^{60}Co de “Gammacell”, com taxas de dose que variaram de 0,709 a 0,711 kGy h^{-1} .

Para avaliação da radio-sensitividade dos segmentos nodais, 10 explantes foram inoculados em cada placa de Petri contendo 30 mL de meio MS. Os explantes foram inicialmente irradiadas à 0, 15, 30, 45 ou 60 Gy e posteriormente à 0, 10, 15, 20 ou 25 Gy. Para cada dose testada, foram irradiadas 4 placas de Petri contendo 10 gemas. Após as irradiações, os segmentos nodais foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 1 mg L^{-1} de BAP. Após 30 dias, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência, o número e massa seca e fresca das brotações.

As culturas de segmentos nodais foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, à temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, sendo cada parcela constituída de 10 tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura com m segmento nodal. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da regressão com o auxílio do programa estatístico SAEG 9.1.

4.7. Obtenção e seleção *in vitro* de mutantes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, insensíveis ao filtrado da cultura de *F. oxysporum* f.sp. *passiflorae*

Segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio MS e irradiados à 20 Gy. Foram irradiadas 20 gemas por placa totalizando 2000 gemas. Após as irradiações, os segmentos nodais foram transferidos para meio de cultura MS contendo 1 mg L⁻¹ de BAP. Após quatro subcultivos, as brotações foram transferidas para meio MS isento de citocinina para o alongamento e enraizamento e, então, transferidas para meio de cultura MS líquido contendo 40 % de filtrado da cultura fúngica do isolado 28B de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. As plantas foram mantidas neste meio durante 15 dias e então, as plantas sobreviventes foram transferidas para meio de cultura MS isento do filtrado. Após 30 dias, estas plantas foram submetidas a um segundo ciclo de seleção em meio de cultura MS líquido contendo 50 % de filtrado da cultura fúngica. Após 15 dias, foi avaliada a porcentagem de plantas sobreviventes. Plantas de maracujazeiro-amarelo provenientes da germinação *in vitro* foram utilizadas como controle, sendo submetidas às mesmas condições que as plantas obtidas das gemas irradiadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e multiplicação de brotações em explantes de segmentos caulinares de *P. edulis f. flavicarpa*

A produção de brotações ocorreu através de organogênese direta sobre as gemas pré-existentes dos segmentos nodais. Couceiro (2002) observou organogênese direta no extremo distal de explantes de hipocótilo, quando estes foram cultivados em posição vertical, independente da composição do meio de cultura. No presente trabalho, os explantes de segmentos nodais foram inseridos verticalmente com o extremo distal em contato com o meio de cultura, ocorrendo organogênese direta em todos os tratamentos testados.

Dentre as doses de BAP testadas no meio de cultura, a dose de 1 mg L⁻¹ resultou na maior produção de brotações (Tabela 2, Figura 2). A partir desta dose, esta citocinina parece ter exercido efeito prejudicial sobre o número de brotações formadas. Este efeito inibidor do BAP em concentrações maiores de 1 mg L⁻¹ tem sido observado em alguns trabalhos na propagação *in vitro* de maracujazeiro-amarelo sendo esta, considerada a dose limite na maioria dos trabalhos (Couceiro, 2002; Fernando, 2005).

Tabela 2. Número de brotações em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo, após 60 dias em meio de cultura Murashige Skoog (1962) suplementado com doses de BAP e água de coco

BAP (mg L ⁻¹)	Água de coco (%)			Médias para níveis de BAP
	0	5	10	
1,0	24,7	27,7	12,2	21,5a
1,5	12,9	13,9	8,7	11,8b
2,0	15,7	16	11,3	14,3b
Médias para níveis de água de coco	17,8a	19,2a	10,7b	
				CV(%) 22,8

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

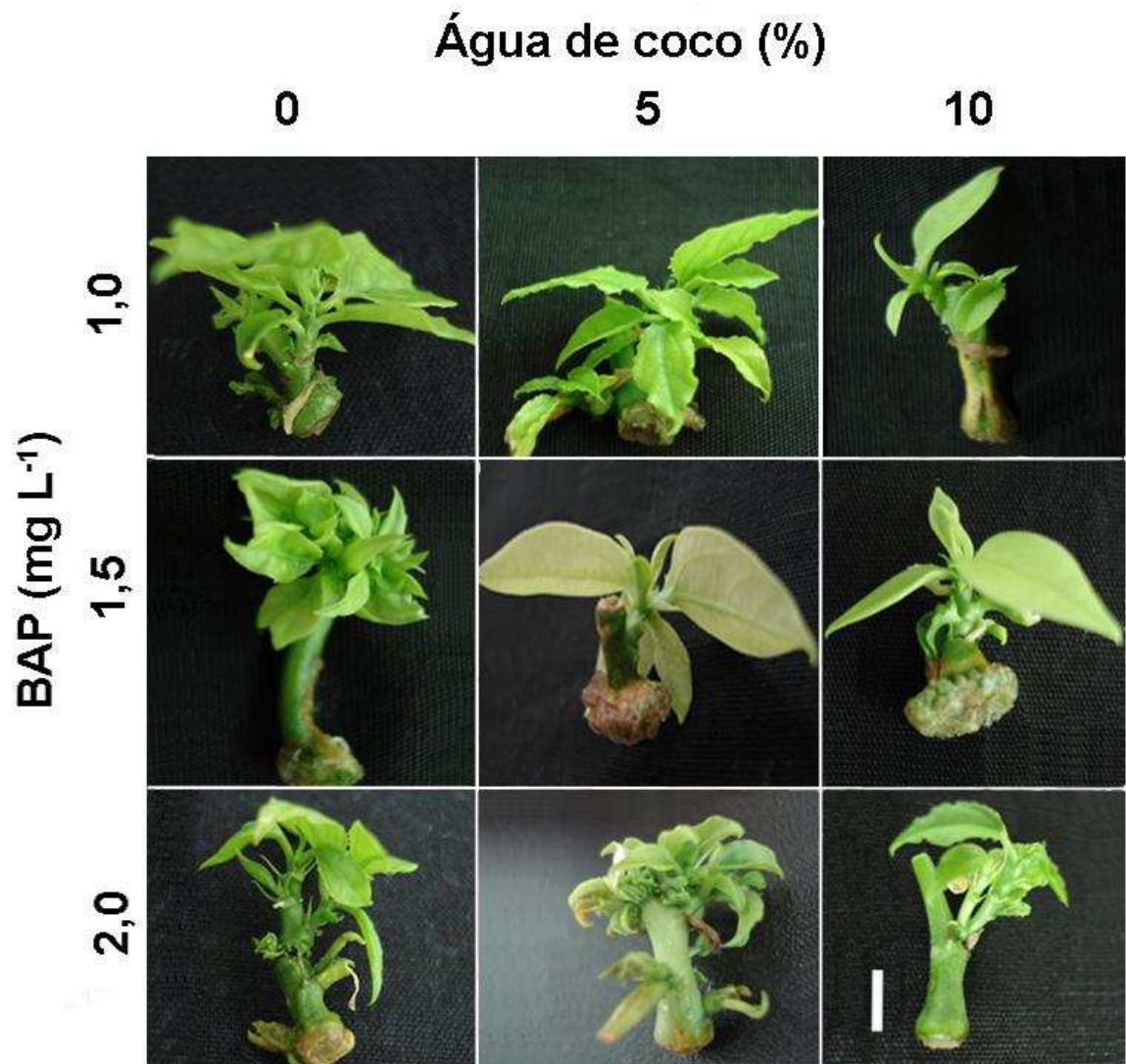


Figura 2. Brotações em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo inoculados em meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com doses de BAP combinadas com água de coco. Barra= 1 cm

A suplementação do meio de cultura com água de coco não proporcionou o aumento no número de brotações nos explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo, não havendo diferença entre o tratamento com a dose de 5 % e o tratamento-testemunha (Tabela 2, Figura 2). Com a suplementação de 10 % de água de coco ao meio de cultura, foi observada redução na produção de brotações quando comparada com os demais tratamentos (Tabela 2, Figura 2). Com esta dose de água de coco também foi observada a redução na massa fresca e seca das brotações formadas sobre os explantes (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com Kawata et al. (1995), que mencionam que a água de coco não é

necessária para organogênese de maracujazeiro-amarelo. Dornelas & Vieira (1994) observaram que a suplementação de até 10 % (v/v) de água de coco ao meio de cultura resultou no aumento da produção de matéria seca. A partir desta dose, os autores observaram efeito inibitório. Tendo em vista que a produção de brotações e o incremento da massa fresca e seca foram inibidos com 10 % água de coco e a suplementação com 5 % não diferiu do tratamento testemunha, infere-se que o uso de água de coco no meio de cultura não foi necessário para a micropropagação do maracujazeiro-amarelo, nas condições experimentais do presente trabalho.

Tabela 3. Peso da massa fresca e seca de brotações formadas em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo, cultivados em meio de cultura Murashige Skoog (1962) suplementados com BAP e água de coco

	Água de coco (%)	BAP (mg L ⁻¹)			Médias para água de coco	CV(%)
		1,0	1,5	2,0		
Massa fresca (mg)	0	188,9	250,8	153,2	148,2a	3,69
	5	203,6	202,0	183,8	148,6a	
	10	92,9	70,5	159,8	83,3c	
Massa seca (mg)	0	15,11	21,32	13,0	12,4a	0,43
	5	17,31	17,17	15,6	13,8a	
	10	7,91	5,99	13,4	9,4c	

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

Comparando os resultados obtidos com aqueles encontrados na literatura consultada, conclui-se que as metodologias aqui utilizadas foram apropriadas para obtenção de propágulos de maracujazeiro-amarelo *in vitro*. Couceiro (2002), utilizando segmentos hipocotiledonares em meio de cultura MS suplementado com 0,7 mg L⁻¹ de BAP, obteve 18,38 estruturas/explante. Hall et al. (2000) obtiveram a maior taxa de multiplicação (12,1 estruturas/explante), inoculando explantes cotiledonares de *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa* em meio MS suplementado com 2,25 mg L⁻¹ de BAP. No presente trabalho, com a suplementação do meio de cultura com 1 mg L⁻¹ foram obtidos os maiores números de brotações.

5.2. Identificação de genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata* insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico, *in vitro*

A espécie *P. alata* apresentou baixa porcentagem de germinação *in vitro* quando comparada à espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo de 65 e 95 % no tratamento testemunha, respectivamente. Um baixo potencial germinativo das sementes de *P. alata* também foi observado por Passos et al (2002). Estes autores obtiveram o valor máximo de 53 % de germinação de sementes de *P. alata* em meio de cultura MS (50 %) provenientes de frutos com 60 dias após a coleta. Foi observada a porcentagem máxima de germinação de 52,9 % por Rosseto et al. (2000), após terem submetido sementes de *P. alata* a pré-embebição em solução com ácido giberélico. Barros et al. (2006) obtiveram maior porcentagem de germinação de sementes de *P. alata* (10 %) *in vivo*, utilizando técnicas para total retirada do arilo e amolecimento do tegumento. Apesar da baixa porcentagem de germinação de *P. alata* em relação ao valor observado para *P. edulis* f. *flavicarpa* no presente trabalho, o valor obtido foi superior àqueles encontrados na literatura citada.

As sementes de *P. alata* germinaram apenas no meio isento de ácido fusárico, enquanto que as sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* germinaram em todos os tratamentos, mesmo que em menores valores nos tratamentos em que foram utilizadas as maiores doses da toxina. *P. alata* é descrita como resistente ao fungo *F. oxysporum* (Junqueira et al., 2005). Porém, foi observada grande sensibilidade das sementes da espécie ao ácido fusárico durante a germinação. O ácido fusárico é produzido por muitas espécies do gênero *Fusarium* e é uma toxina não específica, causando sintoma de murcha em diferentes espécies de plantas (Matsumoto et al., 1995). Os resultados sugerem que a resistência de *P. alata* à fusariose relatada na literatura pode não estar relacionada ao ácido fusárico.

Os dados de porcentagem de germinação de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* em função das doses de ácido fusárico podem ser descritos através de uma equação linear negativa (Figura 3). A dose letal média (DL₅₀) de ácido fusárico suplementado em meio MS, para a inibição da germinação de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, portanto está entre 0,20 e 0,30 mM.

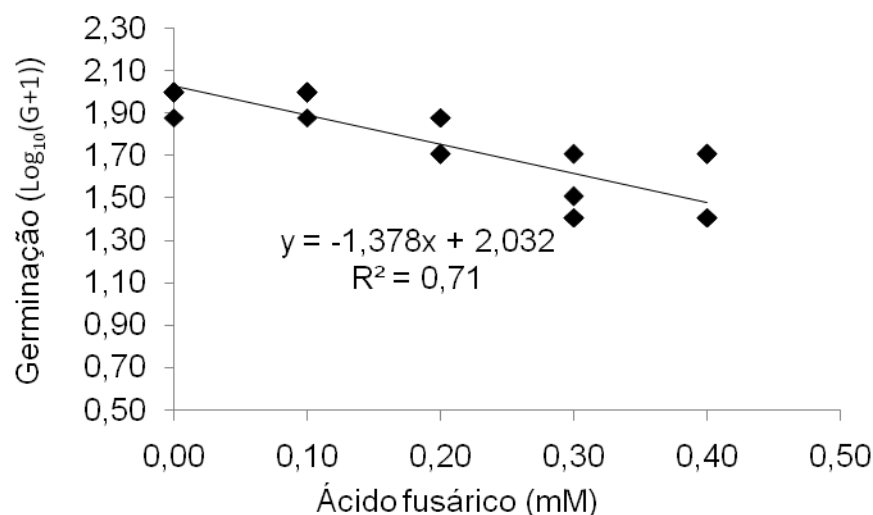


Figura 3. Germinação de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) suplementado com doses de ácido fusárico.

Idris et al. (2003) observaram a inibição da germinação de sementes de *Striga* spp. inoculadas em papel filtro umedecido com ácido fusárico. A DL_{50} ficou próximo de 0,001 mM. Telles-Pupulin et al. (1996) observaram que à concentração de 0,5 mM, o ácido fusárico não inibiu a germinação de sementes de milho, mas a partir de 1,0 mM os efeitos inibitórios da toxina foram mais evidentes. Isto demonstra que as concentrações de ácido fusárico que induzem efeitos tóxicos nas plantas variam conforme a espécie. Entretanto, segundo Bouizgarne et al. (2006), na maioria dos estudos com ácido fusárico são relatados efeitos tóxicos a partir da concentração de 0,001 mM. No presente trabalho, a DL_{50} de ácido fusárico para a inibição da germinação de sementes ficou entre 0,20 e 0,30 mM, indicando tolerância de *P. edulis f. flavicarpa* à toxina.

Algumas das sementes de *P. edulis f. flavicarpa* germinadas nos meios com ácido fusárico, resultaram em plântulas intumescidas na região do hipocótilo próxima da raiz e com diferenciação de grande número de raízes laterais, provavelmente como efeito do ácido fusárico (dados não computados) (Figura 4). Diniz (1999) observou o encurtamento da região de alongamento da raiz de plântulas de milho, aumento do diâmetro da raiz e uma grande produção de raízes próxima ao ápice radicular, quando utilizou

ácido fusárico em concentrações partir de 0,20 mM. O autor atribuiu tal fato ao efeito da toxina sobre a aceleração do metabolismo básico da célula resultando no encurtamento da região de alongamento da raiz.

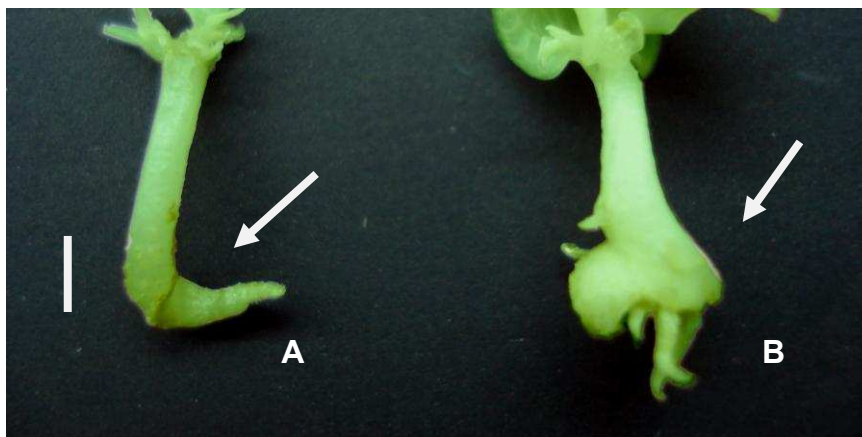


Figura 4. Plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* obtidas da germinação de sementes em meio de cultura Murashige & Skoog (1962): (A) sem adição de ácido fusárico, (B) suplementado com 0,20 mM de ácido fusárico. (Barra=0,5 cm)

Após 30 dias da transferência das sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* e de *P. alata* que não germinaram no meio contendo a toxina, foi observou-se a germinação e desenvolvimento das plântulas, confirmando o efeito inibitório do ácido fusárico na germinação de sementes dessas espécies.

Após 15 dias da transferência das plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* sobreviventes ao tratamento com a maior concentração de ácido fusárico para meio de cultura MS suplementado com 0,0; 0,10; 0,20 ou 0,30 mM foi observado o efeito da toxina sobre a senescência das folhas e sobre o sistema radicular (Figura 5).

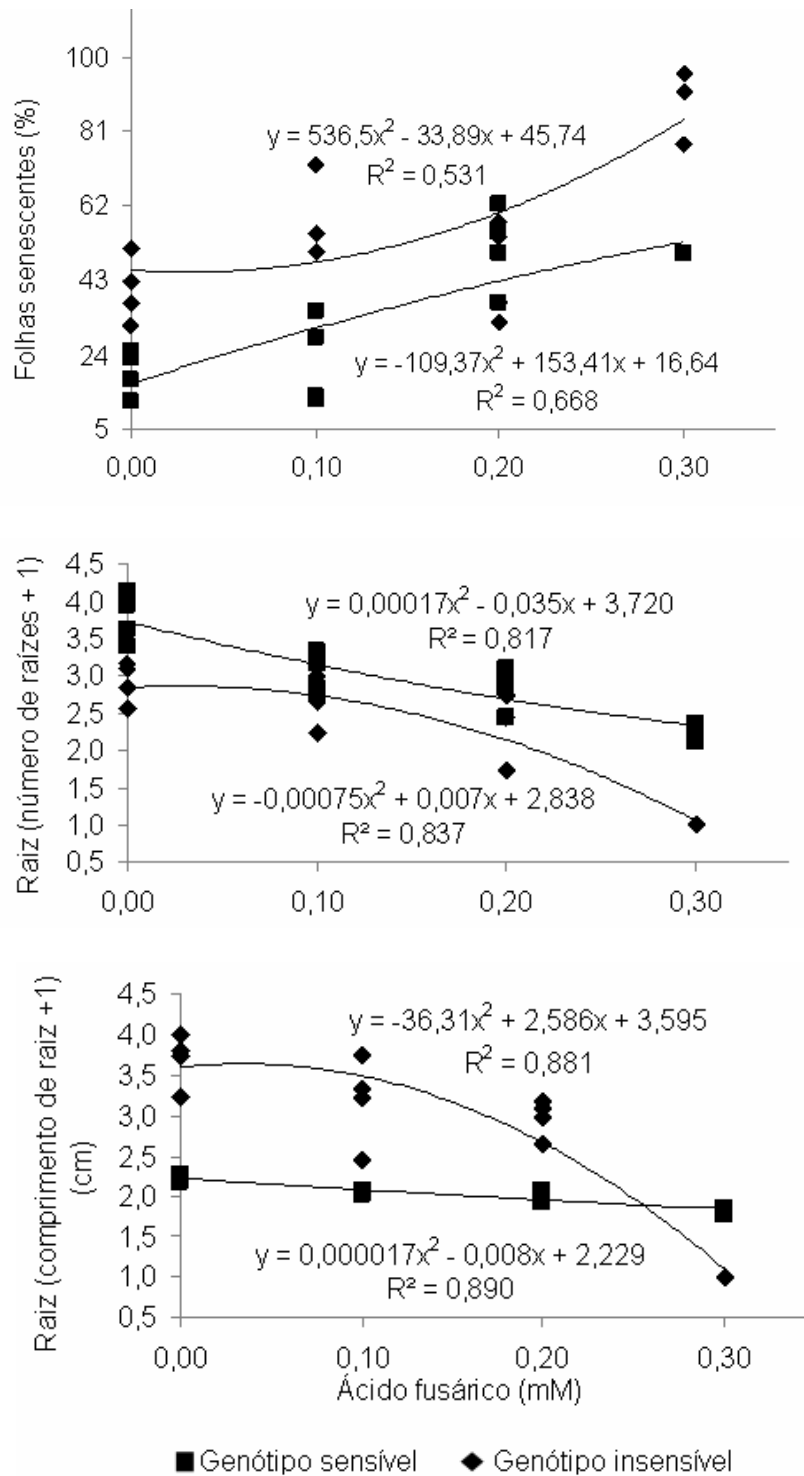


Figura 5. Efeitos de doses de ácido fusárico sobre a senescência das folhas e o desenvolvimento do sistema radicular de *P. edulis f. flavicarpa*, *in vitro*.

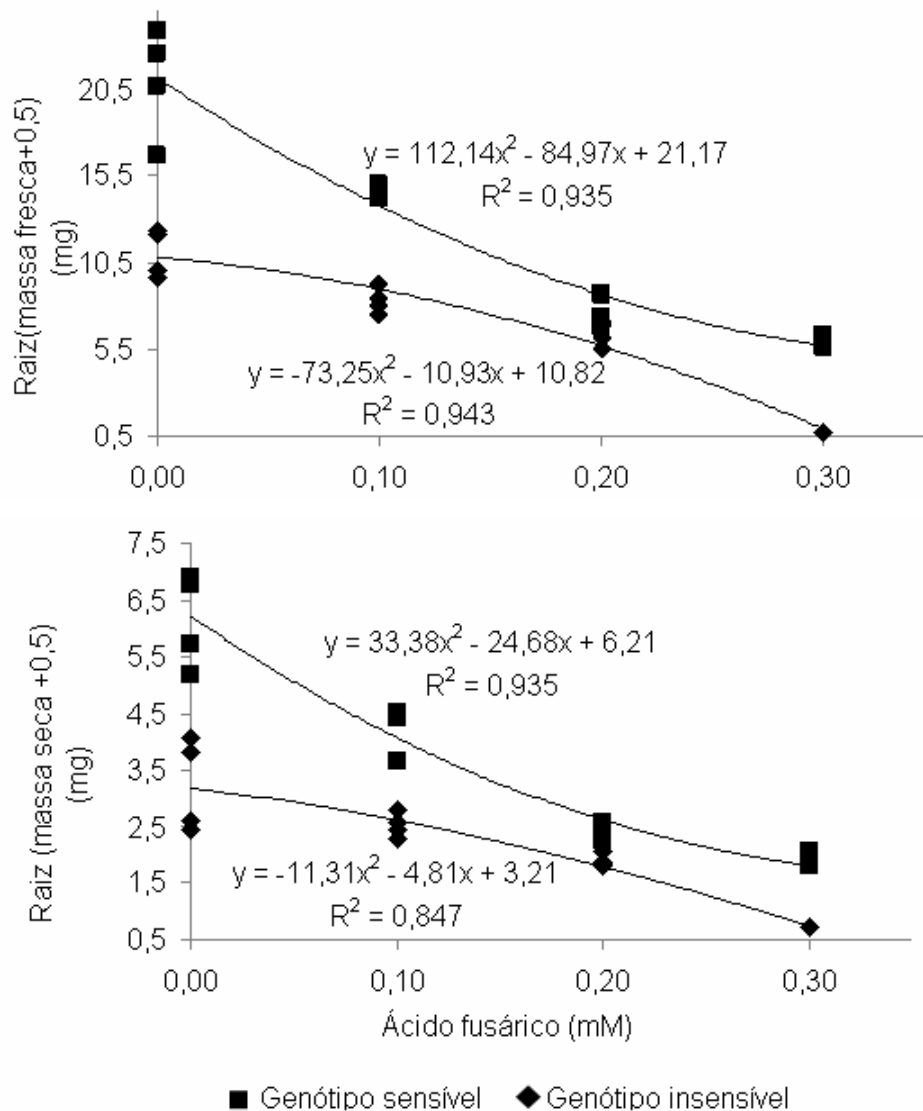


Figura 6. Efeitos de doses de ácido fusárico sobre a massa fresca e seca do sistema radicular de *P. edulis f. flavicarpa*, *in vitro*.

Como esperado, observou-se maior tolerância à toxina no genótipo insensível quando avaliada a porcentagem de folhas senescentes e produção de raízes (Figura 5 e 6, Tabela 4). Na maior dose de ácido fusárico, foi observado 50 % de folhas senescentes nos genótipos insensíveis e aproximadamente 90 % nas plantas sensíveis (Figura 5).

Tabela 4. Efeito do ácido fusárico sobre plantas de maracujazeiro-amarelo, após 15 dias em meio de cultura.

Genótipo	Folhas senescentes (%)	Raiz			
		Número	Comprimento (cm)	Massa Fresca (mg)	Masa Seca (mg)
Sensível	59,44a	4,41b	7,48b	58,17b	4,84b
Insensível	35,82b	8,16a	9,33a	188,47a	16,02a
CV(%)	19,56	11,13	10,04	13,96	15,99

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F à 5% de probabilidade.

A dose de 0,30 mM inibiu totalmente o desenvolvimento de raízes nas plantas sensíveis, enquanto que nesta mesma dose foi observada uma produção média de 4,25 raízes nas plantas insensíveis (Figura 5).

A reação das plantas de maracujazeiro-amarelo ao ácido fusárico correspondeu a reação na fase de semente. As plantas provenientes de sementes germinadas em meio contendo ácido fusárico se mostraram mais insensíveis a toxina, com relação as plantas originadas de sementes não germinadas.

A função do ácido fusárico nas doenças causadas por *Fusarium* ainda não foi completamente elucidada (Svabova & Lebeda, 2005). Segundo Bouizgarne et al. (2006), altas concentrações de ácido fusárico causa a alteração na permeabilidade da membrana, na atividade mitocondrial e a inibição da síntese de ATP. Em raízes de plantas de milho, Telles-Pupulin et al. (1996) observaram que o ácido fusárico diminui a atividade respiratória da mitocôndria necessária para o suprimento de ATP das raízes causando a redução no crescimento das mesmas. A germinação das sementes depende, dentre outros, da intensidade da respiração das células que ocorre em taxas mais elevadas que em qualquer outro processo fisiológico das plantas (Marcos Filho, 2005). Assim, pode ser que o modo de ação do ácido fusárico na inibição da germinação das sementes também esteja relacionado com a diminuição da atividade respiratória nos tecidos. Telles-Pupulin et al. (1996) observaram que a inibição do crescimento da raiz ocorreu utilizando

ácido fusárico em concentrações próximas àquelas que inibiram a germinação das sementes (1,0 mM). No presente trabalho, o ácido fusárico inibiu o desenvolvimento das raízes e senescência das folhas nas plantas em concentrações semelhantes àquelas necessárias para a inibição da germinação das sementes (Figuras 3 e 5).

Os resultados demonstram que é possível identificar genótipos de maracujazeiro-amarelo quanto à resistência ao ácido fusárico em estádios iniciais de desenvolvimento. A expressão da resistência em fases iniciais de desenvolvimento pode ser muito vantajosa por acelerar o processo de seleção.

5.3. Análises histológicas de plântulas germinadas em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ácido fusárico

Uma intensa atividade meristemática nas células localizadas na região de alongamento da raiz pode ser observada nas seções longitudinais das raízes das plântulas obtidas da germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo, em meio suplementado com ácido fusárico (Figura 7).

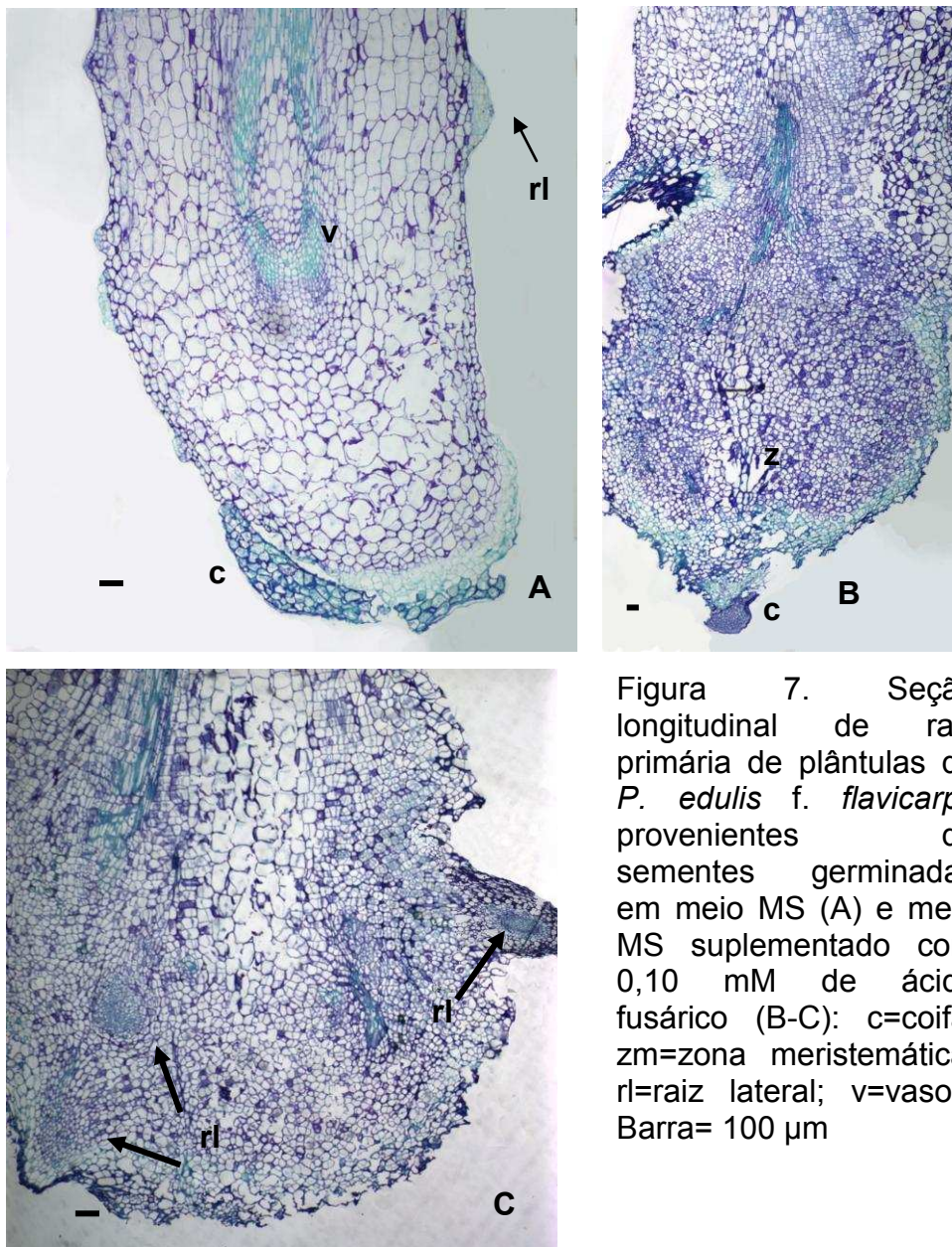


Figura 7. Seção longitudinal de raiz primária de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* provenientes de sementes germinadas em meio MS (A) e meio MS suplementado com 0,10 mM de ácido fusárico (B-C): c=coifa; zm=zona meristemática; rl=raiz lateral; v=vasos. Barra= 100 μ m

A zona de alongamento da raiz primária é a região onde ocorre rápido e extensivo alongamento celular, sendo normalmente, a taxa de divisão das células neste local praticamente nula (Taiz & Zeiger, 2004). Nas seções longitudinais das raízes primárias das plântulas provenientes da germinação em meio MS isento de ácido fusárico, foi possível observar que a atividade meristemática foi restrita à região logo acima da coifa (Figura 7A). Nas plantas submetidas ao ácido fusárico, foi observada uma desorganização da região meristemática apical da raiz bem como da coifa, dificultando a identificação dessas regiões da raiz através das secções (Figura 7B).

Poucos trabalhos envolvendo o efeito do ácido fusárico em tecidos vegetais foram realizados. Diniz (1999) observou a inibição do desenvolvimento de plântulas de milho com a utilização de 0,2 mM de ácido fusárico. Segundo o autor, a redução no comprimento da raiz primária das plântulas está relacionada com a diferenciação precoce das células, resultando na redução da região de alongamento e diferenciação de um grande número de raízes laterais próximas ao ápice. No presente trabalho, foi observada intensa atividade meristemática acompanhada da formação da diferenciação de grande número de raízes laterais próximo ao ápice radicular (figura 7C). Esta intensa atividade meristemática contribuiu para o aumento no diâmetro das raízes em resposta à toxina. Diniz (1999) atribuiu o aumento no diâmetro da raiz ao aumento no número de camadas de células e diâmetro das células da região. Segundo Siqueira (1963), plantas afetadas por fungos causadores de murchas manifestam respostas de crescimento como hiperplasia do parênquima próxima aos vasos infectados e formação de várias raízes adventícias, tais como as respostas à aplicação de reguladores sintéticos. A fusicocina, uma fitotoxina produzida pelo fungo *Fusicoccum amygdale*, causa a hiperpolarização, a extrusão de prótons e acidificação da parede celular em tecidos de plantas, semelhante às auxinas (Taiz & Zeiger, 2004). A transiente hiperpolarização de membranas por ativação da H⁺-ATPase também é um fenômeno observado na ação do ácido fusárico sobre os tecidos das plantas (Bouizgarne et al., 2006). Assim, acredita-se que um dos efeitos desta toxina seja um estímulo transiente ao crescimento tendo em vista a intensa atividade meristemática observada nas plântulas de maracujazeiro-amarelo tratadas com a toxina.

5.4. Efeito fitotóxico de dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* a plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro*

Em ambos os isolados, os efeitos fitotóxicos dos filtrados das culturas fúngicas foram significativos com o aumento no volume de filtrado adicionado ao meio de cultura. Após 30 dias da inoculação das plantas nos meios de cultura contendo o filtrado fúngico, foi observado intenso amarelecimento das folhas e redução no desenvolvimento do sistema radicular (Figura 8, Tabela 5).

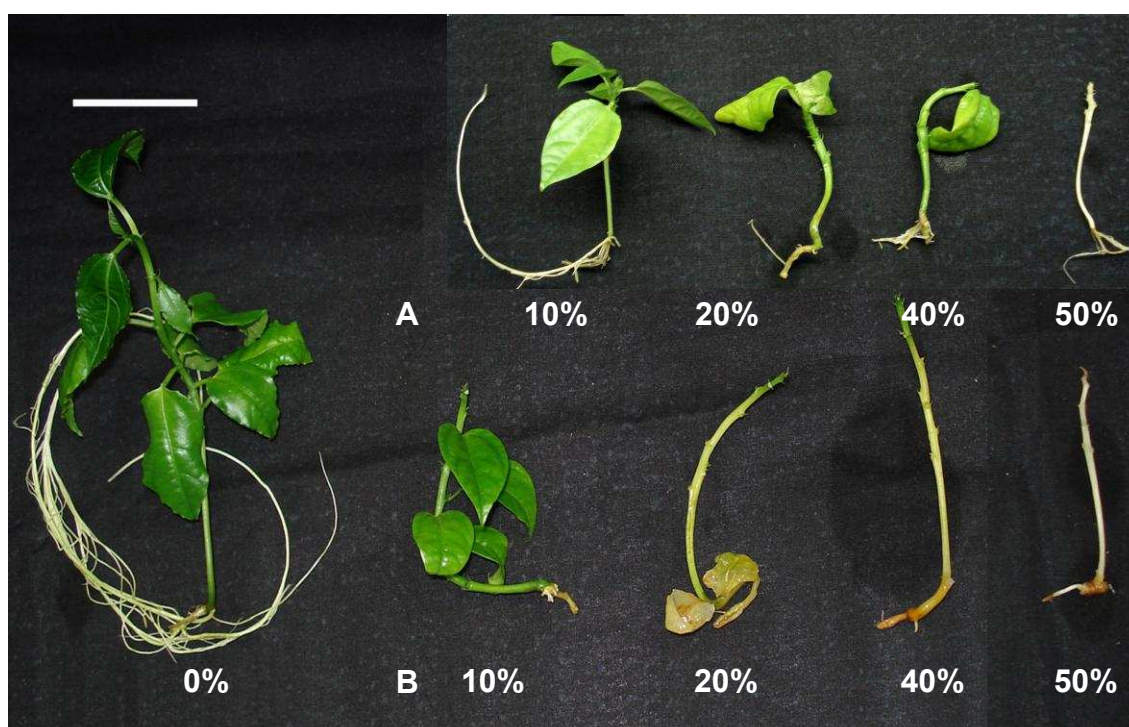


Figura 8. Efeito de doses dos filtrados da cultura dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (%) sobre as plantas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*: A – Plantas inoculadas com o filtrado do isolado CLI1423, B – Plantas inoculadas com o filtrado do isolado 28B. Barra = 5 cm

Tabela 5. Efeito do filtrado da cultura dos isolados de *Fusarium oxysporum* f sp. *passiflorae* (10%) sobre plântulas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*.

	Folhas senescentes (%)	Raiz			
		Número	Comprimento (cm)	Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
Testemunha	27,15b	3,25a	10,49a	157,0a	22,0a
Isolado CLI 1423	55,63a	2,67a	0,10b	88,0b	14,0b
Isolado 28B	70,00a	1,00b	0,75b	99,00b	7,9b
CV(%)	28,11	24,27	25,96	19,40	24,52

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

A adição dos filtrados no meio de cultura resultou no aumento da senescência das folhas das plantas quando comparados com o tratamento testemunha. Apesar do isolado 28B ter ocasionado maior porcentagem de folhas senescentes, não houve diferença significativa dos valores observados com a utilização do isolado CLI 1423 (Figura 9, Tabela 5).

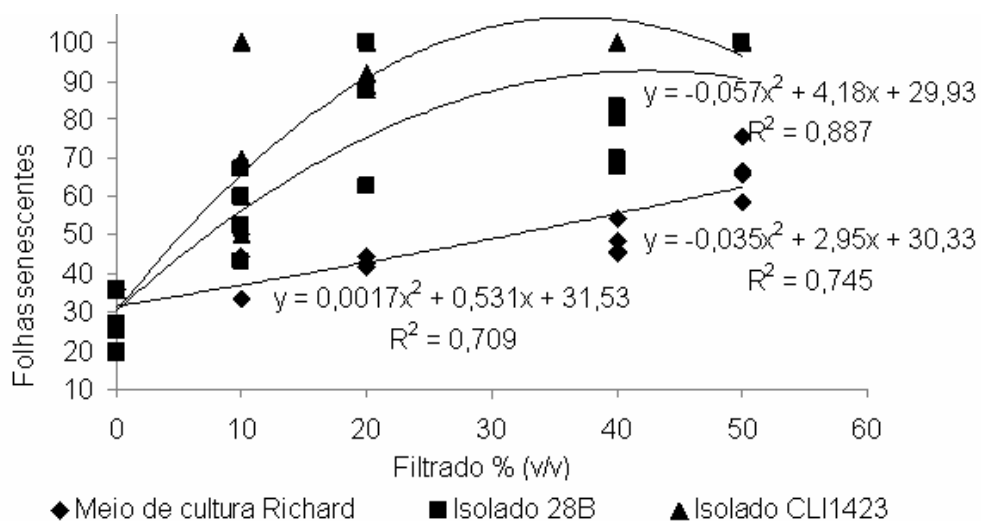


Figura 9. Efeito dos filtrados da cultura dos isolados (28B e CLI1423) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e do meio Richard sobre a porcentagem de folhas senescentes de plantas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*.

O efeito dos filtrados sobre o desenvolvimento radicular foi semelhante entre os dois isolados. Na menor dose de filtrado testada (10 %) houve drástica redução no desenvolvimento radicular quando comparada à testemunha (Tabela 5). Entretanto, a redução do número de raízes produzidas foi superior quando utilizado o filtrado do isolado 28B. A partir da concentração de 10 % de filtrado, não foi verificada a formação de raízes.

Houve efeito crescente do meio Richard sobre o percentual de folhas senescentes. Com a adição do filtrado fúngico, entretanto, foi marcante o percentual de folhas senescentes (Figuras 9 e 10).



Figura 10. Efeito de níveis de meio Richard (%) adicionados ao meio de cultura MS sobre plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro*. Barra=5 cm

Os efeitos do meio Richard sobre a senescência das folhas de plantas de maracujazeiro-amarelo, provavelmente se devem a deficiências nutricionais. O meio de cultura MS, amplamente utilizado na cultura de tecidos de plantas, é constituído de macro e micronutrientes, vitaminas e carboidratos, sendo utilizado para a grande maioria das espécies de plantas (Caldas et al., 1998). A composição do meio de cultura Richard, formulada para atender as exigências nutricionais de fungos, não possui algumas das substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e desenvolvimento das plantas *in vitro*, como micronutrientes e vitaminas, e possui teores de nitrogênio extremamente baixos quando comparado com o meio MS. Na maioria das plantas deficientes em nitrogênio, as folhas tornam-se amarelas (cloróticas) e caem (Taiz & Zeiger, 2004).

No desenvolvimento de raízes, apesar da redução nos valores de alguns parâmetros com a adição do meio Richard, esta redução não foi dose-dependente. Com a adição de 40 % de meio Richard no meio de cultura foi observado o aumento do número das raízes com relação à testemunha (Figura 11).

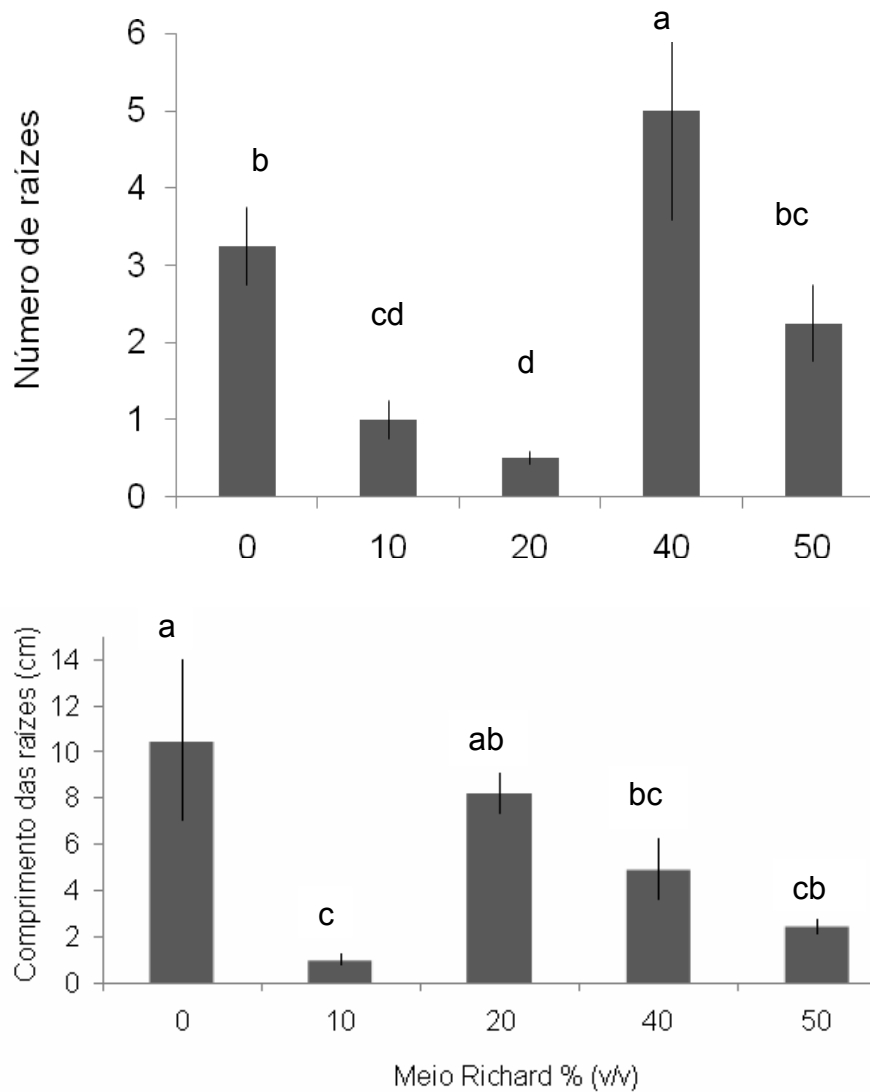


Figura 11. Efeito de níveis de meio Richard sobre raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro*. Letras iguais indicam médias que não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Barra = desvio padrão

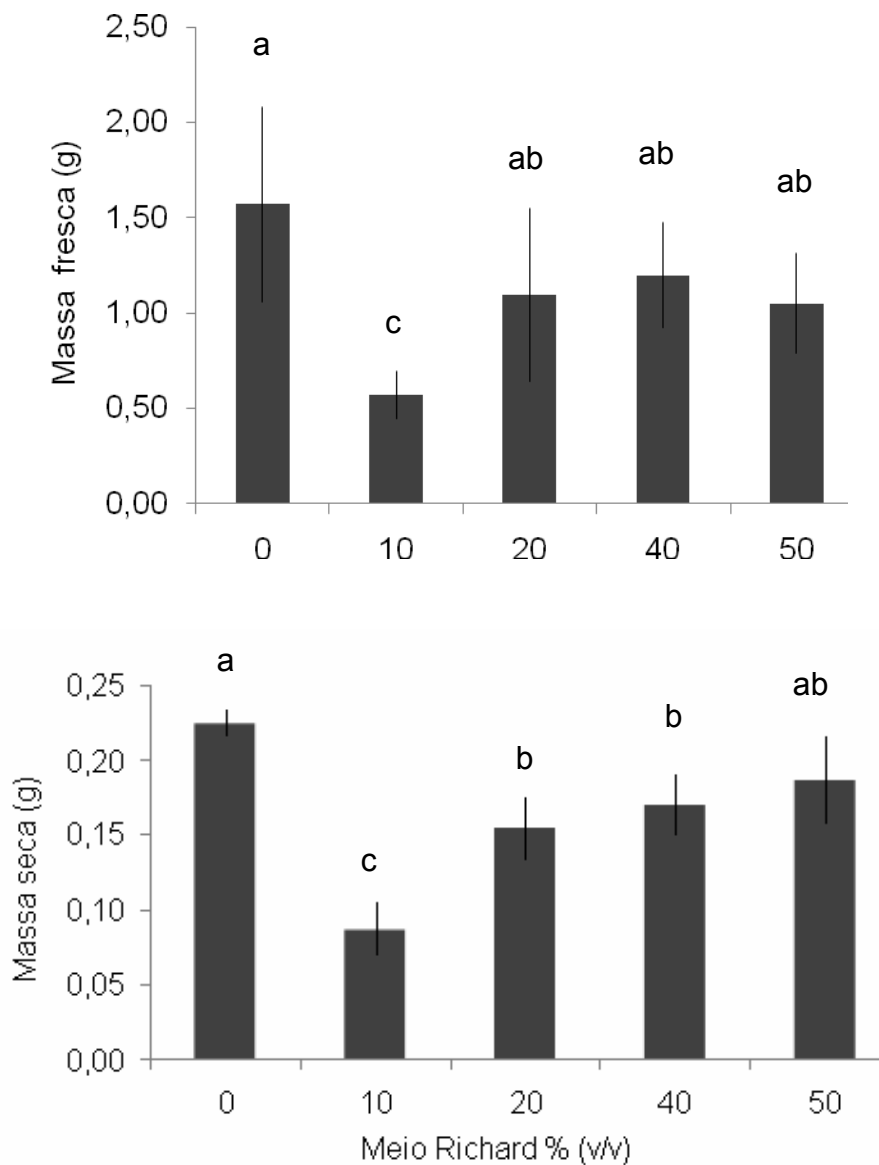


Figura 12. Efeito de níveis de meio Richard sobre a massa fresca e seca de raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro*. Letras iguais indicam médias que não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Barra = desvio padrão

Não foi observada a redução da massa fresca e seca das raízes com o aumento dos níveis do meio Richard no meio de cultura (Figura 12). Assim, não foi possível estabelecer um efeito do meio Richard sobre o desenvolvimento de raízes das plantas de maracujazeiro-amarelo *in vitro*. Vale salientar que, adicionando o filtrado da cultura dos isolados de

Fusarium em concentrações acima de 10 % ao meio de cultura, ocorreu a inibição total no desenvolvimento de raízes. Com a suplementação do meio de cultura com o meio Richard acima desta concentração, foi observada a formação de raízes.

Telles-Pupulin et al. (1996) observaram que o ácido fusárico, fitotoxina produzida por patógenos do gênero *Fusarium*, reduz a atividade respiratória nas mitocôndrias da raiz, germinação das sementes e crescimento de plântulas de milho. Segundo os autores, o efeito mais pronunciado foi no desenvolvimento de raízes as quais apresentaram reduzido número e comprimento. Haikal (2008) observou que o filtrado da cultura de *F. culmorum* reduziu o comprimento e a massa seca de raízes de plantas de soja. Witsenboer et al. (1988), não observaram a presença de necrose em discos foliares de plantas insensíveis enquanto que sobre o crescimento de raiz e, em brotações, a toxina exerceu efeito inibitório.

De acordo com os resultados, dentre os parâmetros analisados, o desenvolvimento de raízes foi considerado o critério mais apropriado para avaliar a sensibilidade de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao filtrado do fungo, tendo em vista que a concentração de 10 % de filtrado resultou na redução total no desenvolvimento das raízes.

5.5. Análise da concentração de ácido fusárico no filtrado da cultura fúngica

Foi constatada a presença de ácido fusárico no filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* de acordo com as análises em TCL (Rf 0,83) e CLAE (1mM). A produção da toxina foi considerada intermediária quando comparada com as concentrações encontradas por outros autores. Em *F. oxysporum* f. sp. *lilii*, Curir et al. (2000) observaram a produção máxima de 1,71 mM de ácido fusárico após 30 dias de cultivo em meio Czapek-Dox, sob agitação. Segundo esses autores, esta concentração foi bastante elevada considerando que em vários trabalhos é relatado que este fungo produz cerca de 1 mM de ácido fusárico, em cultura. Venter & Steyn (1998) observaram que isolados virulentos de *F. oxysporum* provenientes de plantas de batata com sintomas de fusariose, produziram de 0,20 a 0,30 mM ácido fusárico, após 20 dias de cultivo. Estes autores observaram que nas culturas dos isolados não virulentos a produção de ácido fusárico foi menor (0,10 a 0,15 mM).

As quantidades de toxinas produzidas em condições artificiais são variáveis e dependem do tempo e condições de cultivo, bem como do fungo (Duarte & Archer, 2003). Segundo Notz et al. (2002), os meios Czapek Dox e Richard favorecem a produção de ácido fusárico por *F. oxysporum*. O meio Richard é o mais indicado para o cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* de acordo com Laranjeira (comunicação pessoal). Este meio possui altas concentrações de carbono em detrimento ao nitrogênio. Segundo Diniz (1999), a biossíntese do ácido fusárico por *Fusarium* é regulada pela disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, sendo a relação ideal entre C:N de 5:1 para o início da síntese da micotoxina. A disponibilidade de nitrogênio na sinalização da produção da toxina explicaria a preferência dos organismos em infectarem tecidos em senescência do que tecidos jovens (Sarhan et al, 1982). No presente trabalho, foi observada a produção de ácido fusárico superior àquelas observadas por Venter & Steyn (1998) em isolados de *F. oxysporum* virulentos em batata. Assim, acredita-se que o ácido fusárico desempenhe função fundamental no desenvolvimento da fusariose em plantas de maracujazeiro-amarelo.

5.6. Fitotoxicidade do filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* insensíveis e sensíveis ao ácido fusárico

A reação das plantas de maracujazeiro-amarelo ao filtrado fúngico, correspondeu a reação observada anteriormente ao ácido fusárico (Figura 13 e 14 e Tabela 6).

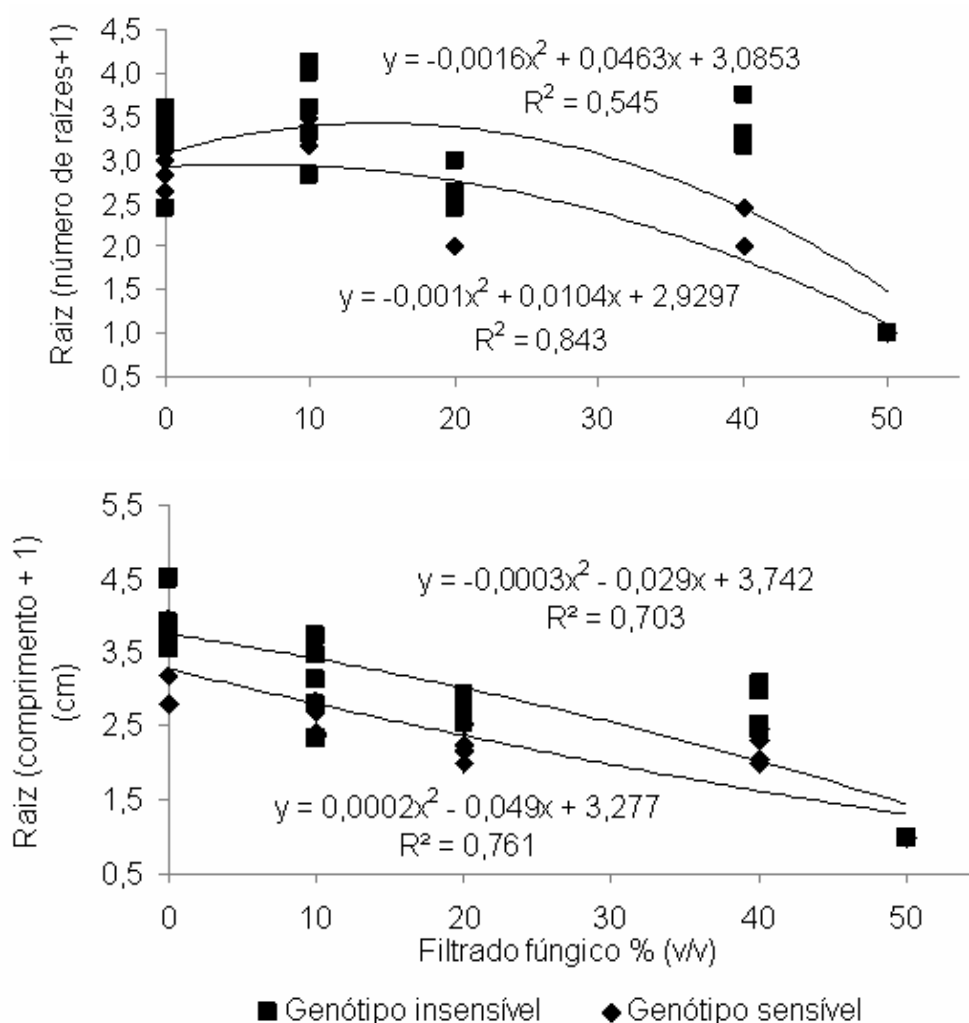


Figura 13. Efeito do filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* sobre o desenvolvimento radicular de plantas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*.

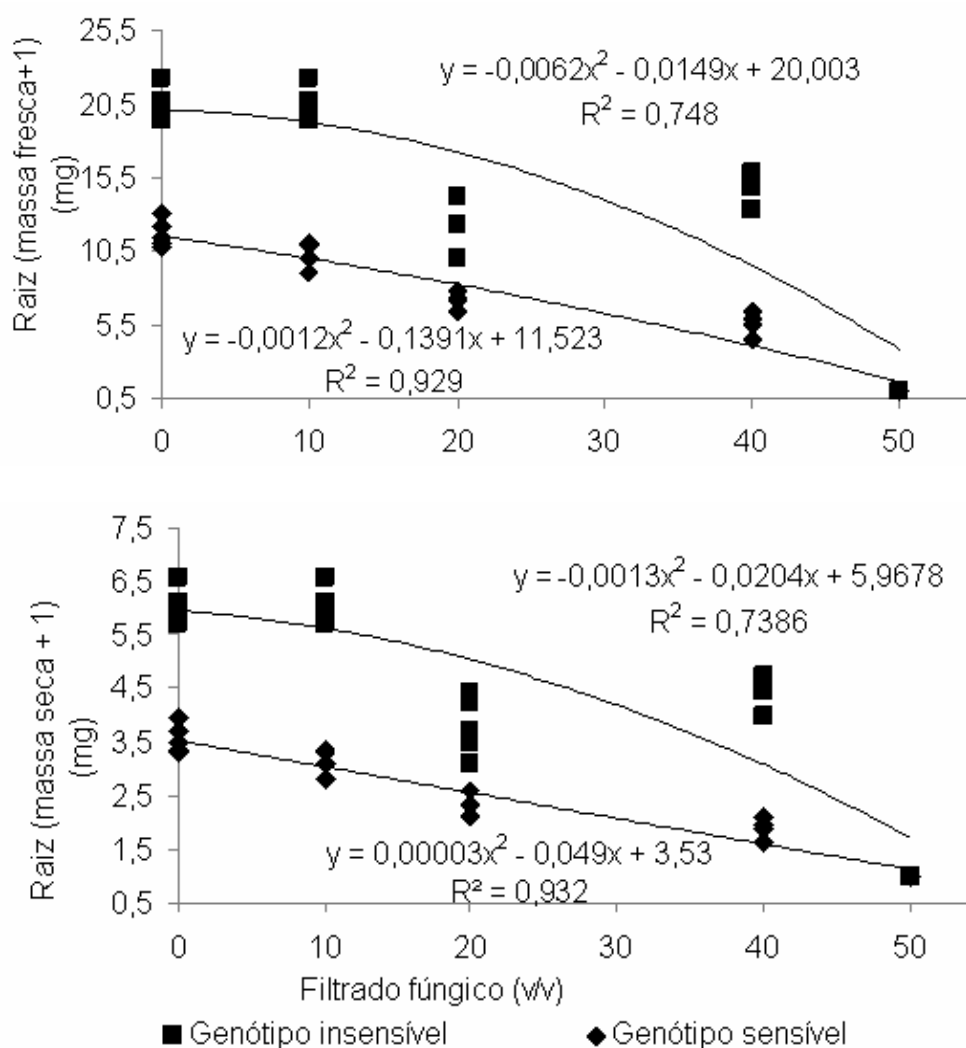


Figura 14. Efeito do filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* sobre a massa fresca e seca radicular de plantas de maracujazeiro-amarelo, *in vitro*.
Tabela 6. Efeitos do filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *in vitro* (média de todos os tratamentos).

Raízes				
Genótipo	Número	Comprimento (cm)	Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
Sensível	5,00b	1,626b	32,16b	2,732b
Insensível	7,56a	1,874a	49,36a	4,18a
CV (%)	28,77	28,66	27,74	28,04

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Observou-se que o efeito do filtrado sobre o sistema radicular foi diferenciado entre os genótipos. Nas plantas dos genótipos sensíveis ao ácido fusárico houve efeito inibitório no desenvolvimento radicular com relação às plantas insensíveis (Figuras 13 e 14, Tabela 6).

Com o aumento das doses de filtrado, foi observada gradativa redução no valor das características analisadas, inclusive no genótipo insensível ao ácido fusárico (Figuras 14 e 15). Nos sistemas biológicos, durante a infecção dos tecidos do hospedeiro, os fungos produzem toxinas em menores concentrações que aquelas normalmente produzidas em meio de cultura (Curir et al., 2000). Durante o cultivo, são fornecidas condições para máxima produção de toxinas, principalmente ao que se refere à composição nutricional do meio (Duarte & Archer, 2003). Possivelmente, a quantidade de toxinas fornecidas com a adição de doses elevadas do filtrado ao meio de cultura foram maiores que aquelas produzidas pelo patógeno nos tecidos de plantas de maracujazeiro-amarelo insensíveis em condições naturais, resultando no efeito inibitório. Curir et al. (2000) observaram que o ácido fusárico em doses acima de 1 mM inibiu a atividade da enzima polifenol oxidase tanto em cultivares de lírio suscetíveis ao *F. oxysporum* como em cultivares resistentes. A polifenol oxidase catalisa a conversão de fenóis para quinonas que estão envolvidas na morte celular e limitação do sítio de infecção, indisponibilizando proteínas através da alquilação ou promovendo a formação de barreiras contra entrada de patógenos (Melo, 2005). Curir et al. (2000) verificaram apenas traços de ácido fusárico em tecidos de lírio infectados com *F. oxysporum*, *in vivo*.

Uma observação não esperada foi a produção de raízes nos meios de cultura contendo acima de 10 % de filtrado em ambos os genótipos, contrariando os resultados observados durante a avaliação da patogenicidade dos isolados. Vale salientar que as plantas utilizadas durante aquela avaliação não passaram por meio de cultura contendo ácido fusárico. Alguns autores mencionam que o ácido fusárico, em baixas concentrações, pode induzir a resistência de plantas a fungos do gênero *Fusarium* (Curir et al., 2000; Samadi & Behboodi, 2006; Bouizgarne et al., 2006). De acordo com Bouizgarne et al. (2006), o ácido fusárico induz inicialmente uma hiperpolarização transiente de membranas das células nas raízes

semelhante ao que ocorre durante a resposta de defesa de plantas a patógenos. Assim, o ácido fusárico utilizado nas avaliações anteriores pode ter induzido à tolerância das plantas de maracujazeiro-amarelo ao filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

5.7. Sensibilidade de *P. edulis* f. *flavicarpa* ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *in vivo*

Foram observadas diferenças na reação dos genótipos à inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, exceto na porcentagem de sobrevivência entre as plantas insensíveis e as plantas sensíveis (Figura 15, Tabela 7).

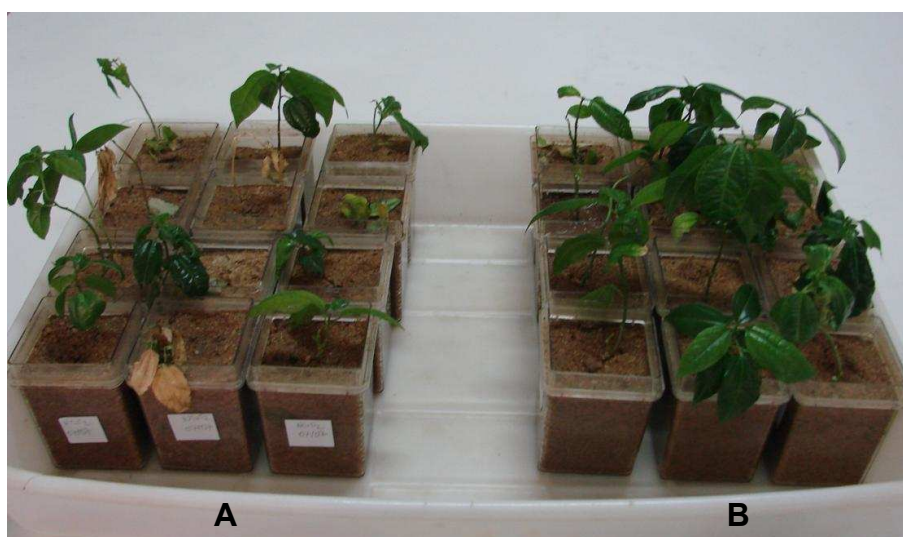


Figura 15. Plantas de maracujazeiro-amarelo inoculadas com suspensão de esporos de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* : A - plantas sensíveis, B – plantas insensíveis.

Tabela 7. Efeitos da inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* sobre plantas de maracujazeiro-amarelo

Genótipo	Sobrevivência (%)	Comprimento das raízes (cm)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
Insensível	56a	6,8a	278a	83,4a
Sensível	52a	3,93b	122b	15,86b
CV(%)	34,87	12,66		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5 % de probabilidade pelo teste F para sobrevivência e comprimento de raízes e pelo teste-T para massa fresca e seca das raízes.

O efeito da suspensão de esporos foi mais pronunciado sobre o sistema radicular. O comprimento das raízes, massa fresca e seca foram maiores nas plantas insensíveis (tabela 7, figura 16). Nas avaliações anteriores, o desenvolvimento do sistema radicular foi o parâmetro mais afetado pelas toxinas produzidas por *F. oxysporum*. O menor comprimento das raízes, massa fresca e seca nas plantas sensíveis a toxina, quando inoculadas com a suspensão dos esporos, confirmaram o fato de as raízes serem o alvo primário do fungo.

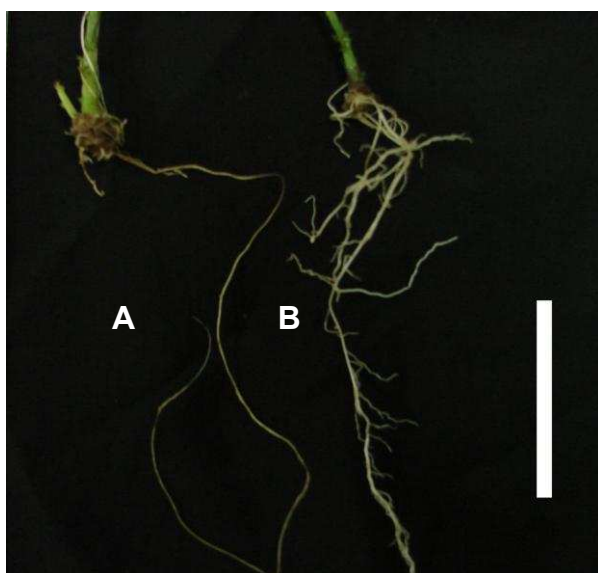


Figura 16. Efeito de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* sobre o desenvolvimento de raízes de plantas de maracujazeiro-amarelo: A – genótipo sensível, B – genótipo insensível. Barra = 5 cm

Telles-Pupulin et al (1996) observaram que o ácido fusárico apresenta efeito pronunciado no desenvolvimento de raízes, reduzindo o número e comprimento das mesmas. Haikal (2008) e Witsenboer et al. (1988) observaram efeito semelhante sobre o comprimento de raízes de plantas inoculadas com toxinas de *Fusarium*.

Foi observado também o escurecimento das raízes das plantas de maracujazeiro-amarelo inoculadas com a suspensão de esporos do fungo. Este fenômeno foi mais freqüente nas plantas sensíveis ao fungo, provavelmente correspondendo a necrose normalmente observada em raízes de plantas infectadas pelo fungo em condições de campo (dados não mensurados).

A seleção *in vitro* de plantas resistentes a diversas *formae specialis* de *F. oxysporum* por meio de toxinas foi utilizado com sucesso em várias culturas. Dentre as culturas selecionadas, citam-se: pimenta-do-reino (Lemos, 2003), bananeira (Companiononi et al., 2003; 2005; 2006; Matsumoto et al., 1995), cravo (Thakur et al 2002), gladiolo (Pathania & Misra, 2003; Nasir & Riazuddin, 2006), aspargos (Pontaroli et al., 2000; Pontaroli & Camadro, 2001), grão-de-bico (Rao & Padmaja, 2000; Hamid & Strange, 2000; Singh et al., 2003), gengibre (Prachi-Sharma & Singh, 2002), tomate (Shahin & Spivey, 1986) e cevada (Chawla & Wenzel, 1987). Na maioria destes trabalhos, as respostas foram confirmadas em ensaios realizados em casa de vegetação ao serem inoculadas as suspensões com o fungo nas plantas selecionadas.

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, a seleção *in vitro* por meio de toxinas fúngicas é uma técnica adequada para identificação de plantas de maracujazeiro-amarelo insensíveis ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Entretanto, devido ao fato de que a técnica de seleção *in vitro* propicia uma interação ambiental mínima, é indispensável a confirmação da estabilidade genética da característica em campo (Mohan Jain, 2001; Predieri, 2001).

5.8. Indução de mutações em segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*

As doses de radiações gama entre 0 e 60 Gy, afetaram significativamente a sobrevivência e a produção de brotações sobre os explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo (Figura 17 e 18). De acordo com os dados, a dose de radiação que reduziu os valores destes parâmetros em cerca de 50 % ficou situada entre as menores doses testadas (15 e 30 Gy) (Figura 17).

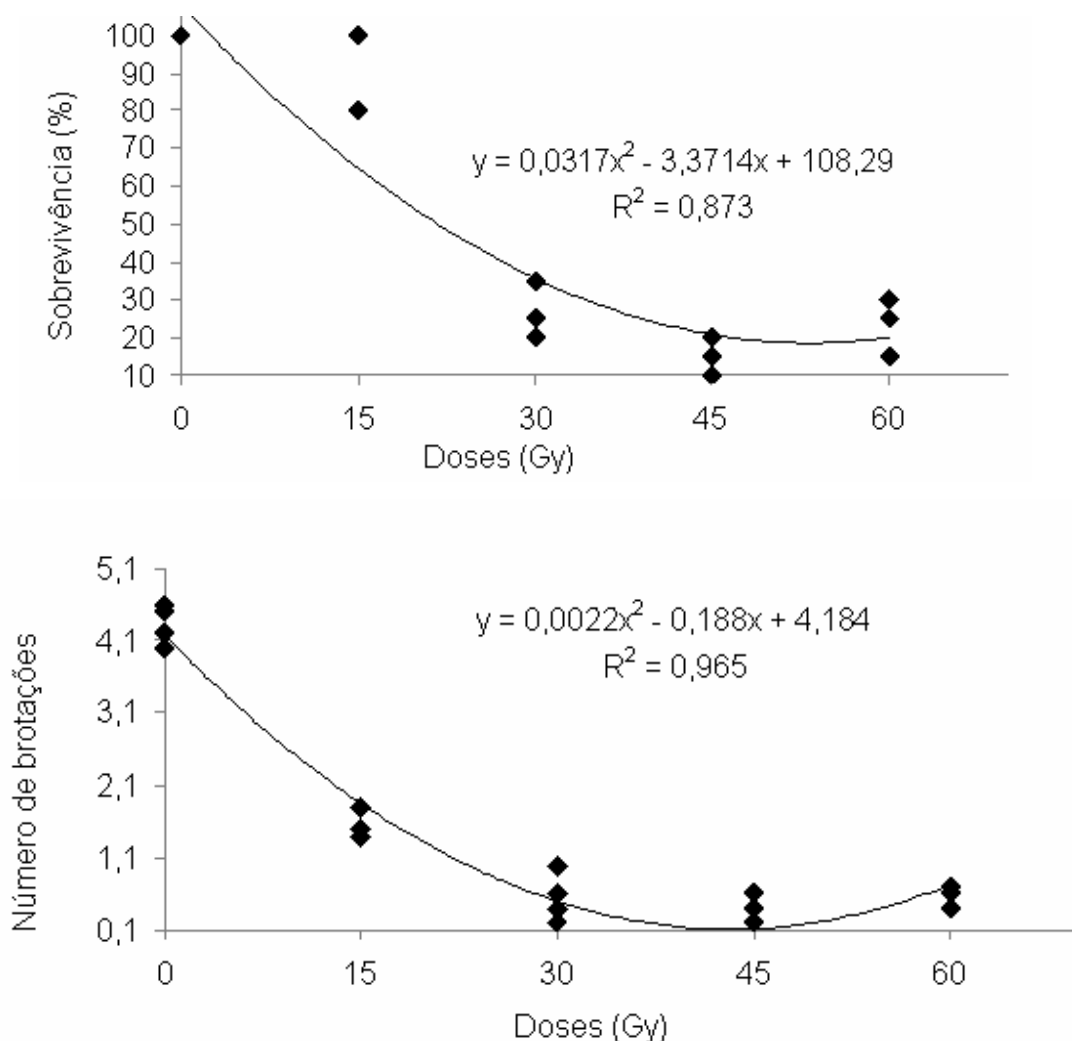


Figura 17. Efeito de doses de radiação gama sobre a sobrevivência e número de brotações em explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*, após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg L⁻¹ BAP.



Figura 18. Efeito de doses de radiação gama sobre explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Barra = 5 cm

As doses de radiação gama testadas não reduziram drasticamente a massa fresca e seca das brotações, comparando-se com a porcentagem de sobrevivência e produção de brotações. A dose de raios gama para redução dos valores destes parâmetros a 50 % ficou situada entre 45 e 60 Gy (Figura 19 e 20).

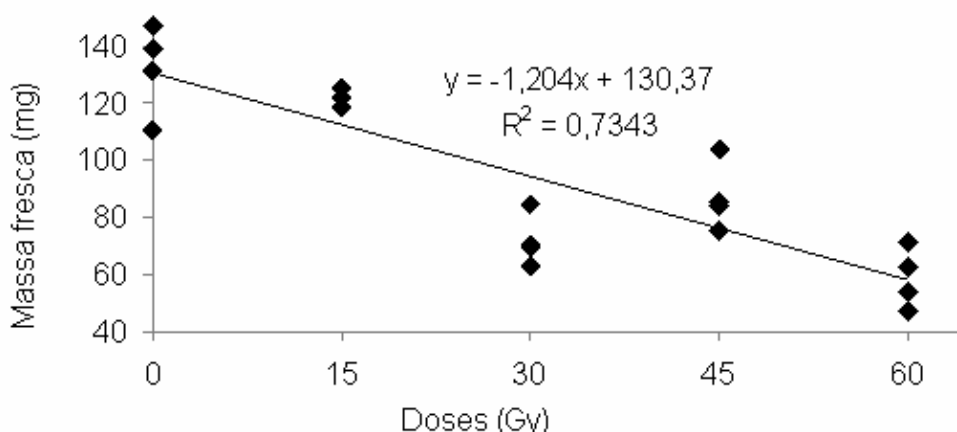


Figura 19. Efeitos de doses de raios gama sobre a massa fresca de brotações formadas sobre explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*, após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg L⁻¹ BAP.

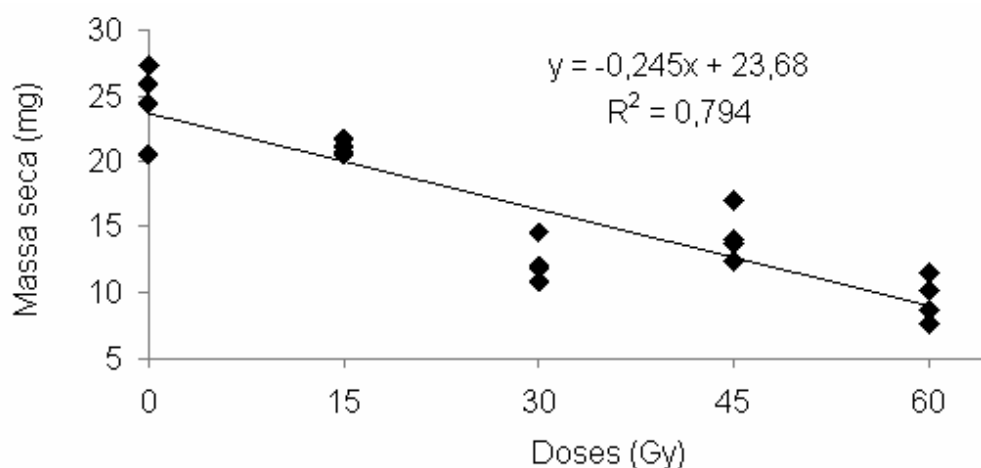


Figura 20. Efeitos de doses de raios gama sobre a massa seca de brotações formadas sobre explantes de segmentos nodais de *P. edulis f. flavicarpa*, após 30 dias da inoculação em meio MS suplementado com 1mg L^{-1} BAP.

Com base nos resultados, foi realizado outro ensaio com doses de raios gama de 10 a 25 Gy para uma maior aproximação à dose letal média (DL_{50}) e a dose para redução do desenvolvimento de 50 % (GR_{50}). Após 30 dias em meio MS suplementado com BAP, foi confirmada a DL_{50} (sobrevivência) e a GR_{50} para a produção de brotações próxima de 20 Gy (Figuras 21 e 22).

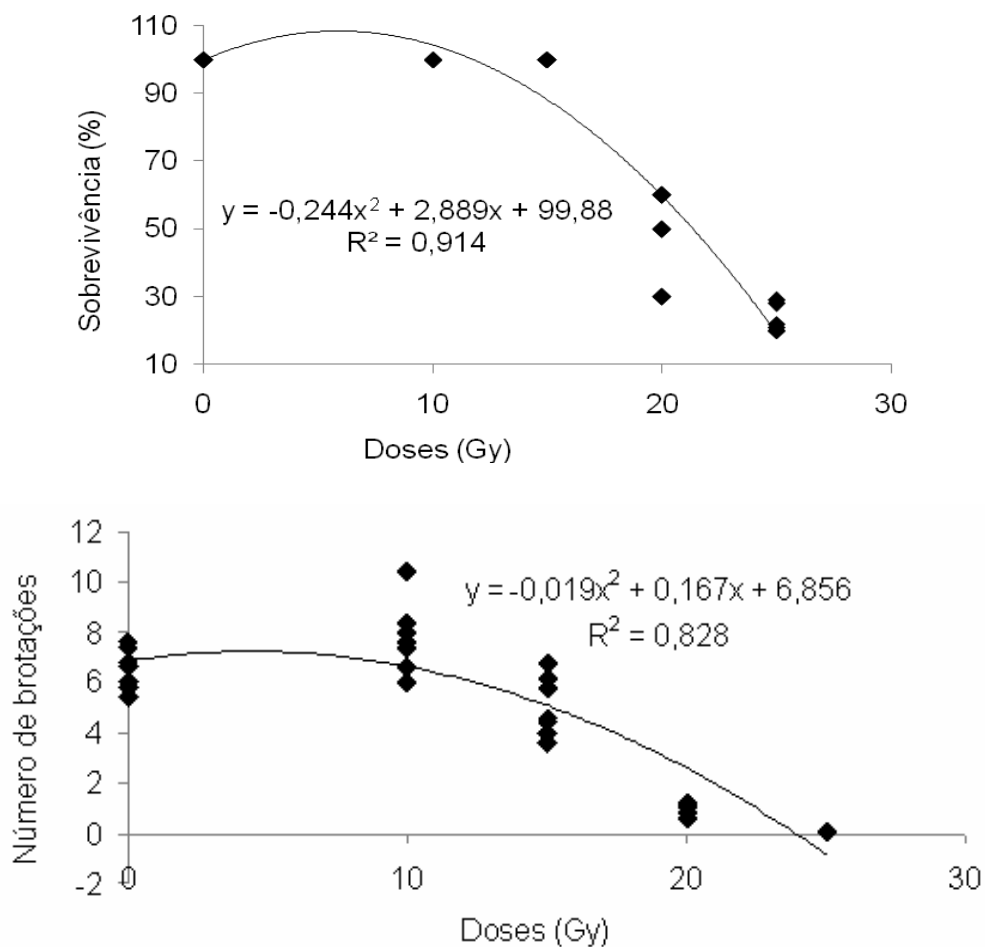


Figura 21. Efeito de doses de radiação gama sobre a sobrevivência e número de brotações em explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*, após 30 dias da inoculação em meio MS com 1mg L^{-1} BAP.



Figura 22. Efeito de doses de radiação gama sobre explantes de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Barra = 5 cm

Segundo Mandal (2000), diferenças na radiosensibilidade são normalmente observadas entre genótipos de uma mesma espécie. Apesar da grande variabilidade genética encontrada na espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, os dados foram consistentes com os observados por Otahola (1999). Segundo este autor, a DL_{50} para a porcentagem de explantes de segmentos foliares de maracujazeiro-amarelo com brotações foi observada próxima de 20 Gy.

O número de brotações formadas sobre os explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo no tratamento com radiação gama de 10 Gy foi superior ao número de brotações produzidos no tratamento testemunha. Resultados semelhantes foram observados por Kido (2003). Este autor observou que raios gama na dose de 10 Gy estimularam o aumento no número de brotações em explantes de gemas axilares de bananeira. Este aumento no número de brotações em explantes tratados com baixas doses de agentes mutagênicos também foi observado por Bhagwat & Duncan (1998) e Srivastava et al. (2002).

Os resultados obtidos com os tratamentos com radiação gama sobre segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo nas doses de 10 à 25 Gy confirmaram o efeito da radiação observado nas avaliações anteriores (15 à 60 Gy). Com o aumento da radiação houve redução nos valores das características avaliadas, ficando a DL_{50} para porcentagem de sobrevivência e GR_{50} número de brotações em torno de 20 Gy. Assim, com base nestes dados, a dose recomendada para induzir mutações em explantes de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo não deve ultrapassar 20 Gy.

5.9. Seleção *in vitro* de mutantes de *P. edulis* f. *flavicarpa*, insensíveis ao filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*

As irradiações dos segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* à 20 Gy resultaram na sobrevivência de 1.326 gemas após 30 dias da transferência para meio MS. Este resultado confirmou as estimativas de sobrevivência dos ensaios preliminares com a dose de radiações gama de 20 Gy. No entanto, durante os subcultivos no meio MS suplementado com BAP foi observada a necrose de vários explantes. Ao final da fase de enraizamento, foram selecionadas 700 plantas para serem utilizadas no primeiro ciclo de seleção em meio de cultura suplementado com 40 % de filtrado.

Após 15 dias, observou-se que todas as plantas de maracujazeiro-amarelo obtidas da germinação de sementes, utilizadas como controle, não sobreviveram ao meio contendo 40 % do filtrado. As plantas provenientes dos tratamentos com radiação gama apresentaram maior tolerância ao filtrado. A porcentagem de sobrevivência destas plantas no meio seletivo foi de 31 %.

Após 15 dias do segundo ciclo de seleção em meio de cultura MS líquido contendo 50 % de filtrado, foi observado 17,05 % de sobrevivência o que correspondeu a 37 plantas. Nas plantas selecionadas observou-se intensa formação de raízes e alto vigor vegetativo (figura 23).



Figura 23. Plantas de maracujazeiro-amarelo provenientes de explantes de segmentos nodais tratados com 20 Gy, selecionadas em meio de cultura contendo 50 % de filtrado da cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Barra=5 cm.

A mutagênese associada a seleção *in vitro* utilizando-se fitotoxinas possibilita a aplicação de uma pressão de seleção sobre um grande número de propágulos e assim, direcionar a seleção dos mutantes específicos (Mohan Jain, 2002). Dentre as culturas selecionadas para resistência a *F. oxysporum* por meio destas técnicas, citam-se: pimenta-do-reino (Lemos, 2003) e a bananeira (Matsumoto et al., 1995)

A escolha da dose de 20 Gy parece ter sido apropriada para a obtenção de mutantes insensíveis ao filtrado da cultura do fungo. Com esta dose foi observada sobrevivência de 66,3 % dos explantes. Segundo Bhagwat & Duncan (1998), no melhoramento por meio de mutações é geralmente aceito que a freqüência de mutações aumenta com a dose do mutagênico, porém a sobrevivência e a capacidade de regeneração decrescem com o aumento das doses, reduzindo a eficiência do processo de seleção. Apesar de o tratamento dos explantes com 20 Gy ter resultado em mais de 50% de sobrevivência, as irradiações com esta dose possibilitaram a obtenção de um número relativamente alto de plantas insensíveis ao filtrado, para serem analisados com relação a resistência ao fungo em condições *in vivo*.

De acordo com os resultados de sobrevivência, a radiação gama pode ter interferido em genes que contribuíram para maior resistência às toxinas produzidas *in vitro* pelo fungo.

A partir destes resultados, as plantas selecionadas serão avaliadas quanto a resistência ao fungo em casa de vegetação e em seguida a campo para avaliação da resistência e aspectos reprodutivos. Após avaliações *in vivo* será possível determinar se o material selecionado poderá ser usado para o aumento da resistência de plantas de maracujazeiro-amarelo ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*.

6. CONCLUSÕES

- O meio de cultura MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP é adequado para a micropropagação de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* a partir de explantes de segmentos nodais.
- O ácido fusárico e o filtrado da cultura fúngica são eficientes para seleção *in vitro* de genótipos de maracujazeiro-amarelo insensíveis ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*;
- A dose de radiação gama de 20 Gy é a ideal para obtenção de variantes mutantes a partir de segmentos nodais de *P. edulis* f. *flavicarpa* sob condições *in vitro*;
- A irradiação de segmentos nodais de maracujazeiro-amarelo com raios gama é eficiente para a obtenção de plantas insensíveis às toxinas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e comércio, 2008. 388p.

AHLOOWALIA , B. S.; MALUSZINSKY, M. Induced mutations: a new paradigm plant breeding. **Euphytica**, v.119, p. 67-173, 2001.

AHLOOWALIA, B. S.; MALUSZYNSKI, M.; NICHTERLEIN, K. Global impact of mutation-derived varieties. **Euphytica**, v.135, n.2, p.187-204. 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, A. **Biologia molecular da célula**. 4ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584p.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S. do; CARVALHO, M. G.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.33-38, 2005.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A., MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, 1ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.387-407.

BACERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.87-90, 2004.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P. et al. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.11, p.4039-4043, 1996.

BARBOSA, W. M.; OTONI, W. C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v.7, n.1, p.47-54, 2001.

BARROS, F. L. S.; SARTORE, E. A. P. F.; REGIANI, R. S., LOPES, J. C. Germinação de sementes de maracujá doce submetidas a métodos de extração de mucilagem e ao envelhecimento precoce. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 6., 2006, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Univap, 2006. p.1056-1060.

BHAGWAT, B.; DUNCAN, E. J. Mutation breeding of highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using gamma irradiation. **Euphytica**, v.101, p.143-150, 1998.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogênese em segmentos internodais de maracujazeiro amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1996. p.323.

BOUIZGARNE, B.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; MADIONA, K.; BILIGUI, B.; MONESTIEZ, M.; PENNARUN, A. M.; AMIAR, Z.; RONA, J. P.; OUHDOUCH, Y.; EL HADRAMI, I.; BOUTEAU, F. A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobanche ramosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, n.5, p.550-556, 2006.

BRAZ, A. S. K. **Clonagem e seqüenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes.** 1999. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

BRISSET, M. N., PAULIN, J. P.; DURON, M. Feasibility of rating fire blight susceptibility of pear cultivars (*Pyrus communis*) on *in vitro* microcuttings. **Agronomie**, v.8, p.707-710, 1988.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CBAB, v.1, 1998. p. 87-132.

CANCINO, G. O.; DAVEY, M. R.; LOWE, K. C.; POWER, J. B. Shoot regeneration from leaf and root explants of *Passiflora mollissima*. **Journal of Experimental Botany**, v.49 (Suppl.), n.65 (Abstract), 1998.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Técnica de inclusão de material vegetal em historesina. In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1, 1995, Rio Claro. **Apostila...** Rio Claro: UNESP, 1995. 7p.

CASTRO, A. P. **Resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo via expressão da proteína heteróloga Atacina A.** 2005. 151 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2005.

CHAWLA, H. S.; WENZEL, G. *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants. **Plant Breeding**, v.99: p.159-163,1987.

COMPANIONI, B.; MORA, N.; DÍAZ, L.; PÉREZ, A.; ARZOLA, M.; ESPINOSA, P.; HERNÁNDEZ, M.; VENTURA, J. L. C.; PÉREZ, M. C.; SANTOS, R.; LORENZO, J. C. Differentiating resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* strain 1 culture filtrates in banana leaves. **Biotechnologia Aplicada**, v.23, n.2, p.153-156, 2006.

COMPANIONI, B.; MORA, N.; DÍAZ, L.; PÉREZ, A.; ARZOLA, M.; ESPINOSA, P.; HERNÁNDEZ, M.; VENTURA, J.; PÉREZ, M. C.; SANTOS, R.; LORENZO, J. C. Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture filtrates. **Plant Breeding**, v.124, p.79-85, 2005.

COMPANIONI, B.; ARZOLA, M.; RODRÍGUEZ, Y.; MOSQUEDA, M.; PÉREZ, M. C.; BORRÁS, O.; LORENZO, J. C.; SANTOS, R. Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non-destructive in vitro differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. **Euphytica**, v. 130, p.341-347, 2003.

COUCEIRO, M. A. **Organogênese in vitro em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 2002, 103f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

CURIR, P.; GUGLIERI, L.; DOLCI, M.; CAPPONI, A.; AURINO, G. Fusaric acid production by *Fusarium oxysporum* in the lily basal rot disease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p.849–856, 2000.

DIAS, L. L. C. **Influência do etileno e poliaminas sobre a morfogênese in vitro de maracujá (*Passiflora* sp.)**. 2005, 76f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

DINIZ, S. P. S. S. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do ácido fusárico, seus efeitos na anatomia vegetal e controle de *Fusarium* sp. pelo bálsamo de copaíba**. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 1999.

DONOVAN, A. M.; MORGAN, R.; VALOMBRA-PIAGNANI, C.; RIDOUT, M. S.; JAMES, D. J.; GARRETT, C. M. E. Assessment of somaclonal variation in apple. I. Resistance to the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. **Journal of Horticultural Science**, v.69, p.105-113, 1994.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p211-217, 1994.

DUARTE, M. L. R.; ARCHER, S. A. *In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Fitopatologia brasileira**, v.28, n.3, p.229-235, 2003.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1.ed. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. p.45-67.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.187-210.

FARIA, J. L. C., SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, n.7, p. 276- 1277, 1997a.

FARIA, J. L. C., SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explantes of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.33, p. 209-212, 1997b.

FERNANDO, J. A. Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. 2005. 98f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C. ; MACHADO, S. R. ; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, n.1, p.37-44, 2007.

GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, 1998. v.2, p.533-568.

HAIKAL, N. Z. Effects of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. **Journal of Applied science Research**, v.4, n.1, p.48-52, 2008.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGINS, C. M.; DIETZGEN, R. G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v.48, p.673-680, 2000.

HAMID, K.; STRANGE R. N. Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) L'abr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.56, p.235–244, 2000.

HAMMERSCHLAG, F.; RITCHIE, D.; WERNER, D.; HASHMIL, G.; KRUSBERG, L.; MEYER, R.; HUETTEL, R. *In vitro* selection of disease resistance in fruit trees. **Acta Horticulturae**, v.392, p.19-26, 1995.

HARELIMANA, G.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, H.; MOURICHON, X. Use of *Mycosphaerella fijensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black leaf streak. **Euphytica**, v.96, p.125-128, 1997.

IDRIS, A. E.; ABOUZEID, M. A.; BOARI, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Identification of phytotoxic metabolites of a new *Fusarium* sp. inhibiting germination of *Striga hermonthica* seeds. **Phytopathol. Mediterr.** v.42, p.65-70p, 2003.

ISUTSA, D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v.99, n.3, p.395-400, 2004.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiros como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.81-108.

KANTHARAJAH, A. S., DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, p.337-339, 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.281-284, 1995.

KIDO, L. M. H. **Irradiação de gemas axilares, suspensão celular e protoplastos de bananeira cv. Maçã (*Musa* spp.), visando a seleção de mutantes resistentes à salinidade**. 2003, 136f. Tese (Doutorado) - CENA, Piracicaba, SP, 2003.

LEMOS, O. F. de **Mutagenese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003, 159f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

LIBERATO, J. R.; COSTA, H. Doenças fúngicas, bacterianas e fitonematóides. In: BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M. C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001. p.243-245.

MALDONADO, J. F. M. Utilização de porta-enxertos do gênero *Passiflora* para maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n.2, p.51-54, 1991.

MALEPSZY, S.; EL KAZZAZ, A. *In vitro* culture of *Cucumis sativus*. XI. Selection of resistance to *Fusarium oxysporum*. **Acta Horticulturae**, v.280, p.455-458, 1990.

MANDAL, A. K. A.; CHAKRABARTY, D.; DATTA, S. K. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p.33-38, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço nacional de proteção de cultivares. **Registro nacional de cultivares – inclusões**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/snpc_06_164.htm>. Acesso em 22 ago. 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARLEY, P. S.; HILLOCKS, R. J. The role of phytoalexins in the resistance to *Fusarium* wilt in pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Plant Pathology**, v.42, p.212-218,1993.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA; M. L.; SOUZA, L. A. C.; TEIXEIRA, J. B. Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. **Euphytica**, v.84, p.67-71, 1995.

McLEAN, M., The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: an update since 1989. **Mycopathologia**, v.133, p.163-179, 1996.

MEHLENBACHER, S. A . Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut Crops for disease resistance. **HortScience**, v.30, p.466-477, 1995.

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

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001. p.345-385.

MELO, G. A. **Purificação da enzima polifenol oxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese do seu primeiro substrato, o ácido clorogênico**. 2005, 98 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRP, 1993, 277p.

MIRANDA, I. R. **Características morfofisiológicas e polimorfismo de DNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* no Nordeste do Brasil**. 2000, 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia dos Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2000.

MOHAN JAIN, S. A review of induction of mutation in fruit of tropical and subtropical regions. **Acta Horticultural**, v.575, p.295-302, 2002.

MOHAN JAIN, S. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.

MONTALVÁN, R. Mutação induzida In: DESTRO , D.; MONTALVÁN, R. (Eds.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL,1999. p.39-56.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá-amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2005. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for definition of inorganic médium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cell, Development Biology**, v.36, p.527-531, 2000.

MOURA, E. F. **Embriog nese somática em maca ba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007, 66f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n.3, p. 473- 497, 1962.

NASIR, I. A.; RIAZUDDIN, S. *In vitro* selection for *Fusarium* wilt resistance in gladiolus, **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, n.5, p. 601-612, 2008.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species*: a illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.

NOTZ, R.; MAURHOFER, M.; DUBACH, H.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-Diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p. 2229-2235p, 2002.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agronômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.55-78.

OTAHOLA, G. V. A.; ARAY M.; ANTOIMA Y. Inducción de mutantes para color de flor en crisantemos mediante radiaciones gamma. **Revista UDO Agrícola**, v.1, n.1, p.56-63, 2001.

OTAHOLA, G., V. A. **Radiosensibilidad de las semillas y diferentes tipos de explantes en cultivo "in vitro" de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) a radiaciones gamma.** 1999, 155f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Centro de Estudios de Post-grado del Núcleo Monagas, Monagas, Venezuela, 1999.

OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**. v.12, p.71-74, 2000.

PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.) In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.361-382..

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; BAZZO, M. C. Z.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D.S.; BERNACCI, L. C. Estabelecimento *in vitro*, por meio de sementes, de cinco espécies de maracujá (*Passiflora edulis* Sims, *Passiflora nitida* Kunth, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora cincinnata* Mast e *P. setacea* DC. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p.121- 123.

PATHANIA, N. S.; MISRA, R. L. *In vitro* mutagenesis studies in *gladiolus* for induction of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. **Acta Horticulturae**, v. 624, p.487-494, 2003.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R. L. R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed). **Manual de fitopatologia.** 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. cap. 50, p.525-534.

PLOETZ, R. C. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, v. 96, p.648-652, 2006.

PONTAROLI, A. C. & CAMADRO, E. L. Increasing resistance to *Fusarium* crown and root rot in asparagus by gametophyte selection. **Euphytica** v.122, p.343–350, 2001.

PONTAROLI, A. C.; CAMADRO, E. L.; BABINECC, F. J.; RIDAO, A. Responses of *Asparagus officinalis* pollen to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Asparagi*. **Scientia Horticulturae**. v.84, p.349-356, 2000.

PRACHI-SHARMA, T. R.; SINGH, B. M. Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.31-39, 2002.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.185-210, 2001.

RAO, S.; PADMAJA, M. Selection of chickpea cell lines resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Phytomorphology**, v.50, p.41-46, 2000.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; PICOLI, E. A. T.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursors and inhibitors. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.39, p.618-622, 2003.

RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.237-241, 2002.

ROSSETO, C. A. V.; CONEGLIAN, R. C. C.; NAKAGAWA, J.; SHIMIZU, M. K.; MARIN, V. A. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n.1, p.247-252, 2000.

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. de. Enxertia do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP/FCAV, 1998. p.70-92.

SAMADI, L.; BEHBOODI, B. S. Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. **Planta**, v.225, p.223-234, 2006.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. de A.; CUNHA, M. A. P. da. (Eds.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p.241-280.

SARHAN, A. R. T.; BARNA, B.; KIRALY, Z. Effect of nitrogen nutrition on *Fusarium* wilt of tomato plants. **Annals of Applied Biology**, v.101, p.245-250, 1982.

SIQUEIRA, L. Growth regulators in the plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.1, p. 5-30, 1963.

SHAHIN, E. A.; SPIVEY, R. A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.73, p.164-169, 1986.

SINGH, R.; SINDHU, A.; SINGAL, H. R.; SINGH, R. Biochemical basis of resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against *Fusarium* wilt. **Acta Phytopathol Entomol Hung**, v.38, p.13-19, 2003.

SRIVASTA, R.; DATTA, S. K.; SHARMA, S. C.; ROY, R. K. Gamma rays induced genetic variability in bouganvillea. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v. 31, p.28-36, 2002.

SUASSUNA, T. M. F.; BRUCKNER, C. H.; CARVALHO, C. R.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.298-302, 2003.

SVABOVA, L.; LEBEDA, A. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.153, n.1, p.52-64, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 127p.Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TELLES-PUPULIN, A. R.; DINIZ, S. P. S. S.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of fusárico acid on respiration in maize root mitochondria. **Biologia Plantarum**, v.38, n.3, p.421-429, 1996.

THAKUR, M.; SHARMA, D. R.; SHARMA, S. K. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.825–828, 2002.

TORNE, S. G.; DESAI, N. P. R. Effect of ionizing radiation on seed germination of *Passiflora* species. **Current Science**. v.44, n.4, p.112-113, 1975.

TREVISAN F.; MENDES B. M. J.; MACIEL S. C.; REZENDE J. A. M.; VIEIRA M. L. C.; MELETTI L. M. M. Resistance to Passion Fruit Woodiness Virus in transgenic plants of the yellow passion fruit expressing the viral coat protein gene, **Acta horticultrae**, v.738, p.495-499, 2007.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v.62, p.346-350, 2005.

TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. Indução e seleção de mutações para o melhoramento de ornamentais e as perspectivas de sua utilização no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.1, n.15, p.1-11, 1999.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Progressos na indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, v.1, 1998. p. 459-508.

VENTER, S. L.; STEYN, P. J. Correlation between fusaric acid production and virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* that causes potato dry rot in South Africa. **Potato Research**, v. 41, p. 289-294, 1998.

VIANA, F. M. P.; COSTA, A. F. da Doenças do maracujazeiro. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 269-322p.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. Principais doenças do maracujazeiro na região nordeste e seu controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. p.1-11 (**Comunicado técnico 86**).

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. Passifloraceae *Passiflora* spp. Passionfruit. In: Richard Litz. (Org.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Orfordshire: CAB International, 2004, p. 436-453.

VIEIRA, M. L. C.; JORGE de OLIVEIRA, E.; MATTA, F. de P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.55-78.

WITSENBOER, H. M. A.; SCHAIK, C. E. VAN; BINO, R. J.; LÖFFLER, H. J. M.; NIJKAMP, H. J. J.; HILLE, J. Effects of *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* toxins at different levels of tomato plant cell development. **Plant Science**, v.56, p.253-260, 1988.

8. ANEXOS

1. Composição (g) do meio de cultura Richard:

KNO ₃	10
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5
FeCl	0,02
sacarose	50

2. Composição (mg.L⁻¹) do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962):

Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650,0
	KNO ₃	1900,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ .7H ₂ O	22,3
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	KI CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Fonte de ferro	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitaminas e compostos orgânicos	Tiamina HCl	0,1
	Piridoxina HCl	0,5
	Ácido nicotínico	0,5
	Glicina	2,0
	Mioinositol	100,0
Ágar		6000
Fonte de carbono	Sacarose	30000