

FACULDADE DE ENSINO SUPERIOR DO CENTRO DO PARANÁ
ENGENHARIA AGRONÔMICA

KELLY MILIOLI

LIMPEZA DO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic vírus*) EM
MARACUJAZEIRO-DOCE (*Passiflora alata* Dryand.) COM TERMOTERAPIA E
ELETROTERAPIA

PITANGA

2022

KELLY MILIOLI

**LIMPEZA DO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic vírus*) EM
MARACUJAZEIRO-DOCE (*Passiflora alata* Dryand.) COM TERMOTERAPIA E
ELETROTHERAPIA**

Trabalho De Curso apresentado ao Curso de Engenharia Agrônômica, Área das Ciências Agrárias da Faculdade UCP Faculdade de Ensino Superior do Centro do Paraná, como requisito à obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Professor Orientador: Daiane Secco.

PITANGA-PARANÁ

2022

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
6. REFERÊNCIAS	18

**LIMPEZA DO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic*) EM
MARACUJAZEIRO-DOCE (*Passiflora alata* Dryand.) COM
TERMOTERAPIA E ELETROTERAPIA**

**CLEANING OF CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic*) IN SWEET
PASSION FRUIT (*Passiflora alata* Dryand) WITH THERMOTHERAPY
AND ELECTROTHERAPY**

MILIOLI, Kelly.¹

SECCO, Daiane.²

PETRY, Henrique Belmonte.³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar protocolo básico de termoterapia e eletroterapia, na eliminação do vírus CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic vírus*), e avaliar a eliminação do vírus através do método de RT PCR em tempo-real, sobre as gemas de estacas contaminadas. O estudo foi realizado na Estação Experimental de Urussanga-EPAGRI. O material vegetativo utilizado foi obtido de matrizes cultivadas a campo. As estacas utilizadas foram cortadas com auxílio de tesoura de poda, com três nós (15 a 25 cm de comprimento). A termoterapia foi realizada em banho-maria em duas temperaturas. Em 47,5° C, as estacas foram tratadas por 5 min, 20 min, 35 min e 50 min (e uma testemunha). Já a 50°C, foram tratadas por 5 min, 10 min, 15 min e 20 min, além de uma testemunha. A eletroterapia foi realizada por 40 min, 50 min e 60 min, além de um tratamento testemunha. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento, e seis estacas por parcela. Para a aplicação da eletroterapia, as estacas foram separadas por tratamentos e colocadas em uma cuba de eletroforese, sob uma corrente elétrica de 100 mA, com uma solução de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 900 mM) em proporção de 10%. O plantio das estacas foi realizado em 23 de maio de 2022, em tubetes contendo casca de arroz carbonizada. Foram mantidas em ambiente protegido, com tela antiafídeos, aluminet 50%, sob nebulização intermitente (60 a 70% UR), por um período de 18 a 28 dias. Foi analisada a incidência do CABMV a partir da análise de RT-PCR em tempo real de gemas coletadas das estacas. Detecção do PCR: as amplificações foram realizadas através do protocolo de RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV em maracujazeiro. Utilizando o programa “Primer Express” desenharam-se os iniciadores e a sonda TaqMan baseados na região da CP do CABMV. As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador programado para 1 ciclo a 15 minutos, a 45 °C, seguido de 1 ciclos de 2 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 15 segundos, a 95° C, com uma extensão final de 45 segundos a 62° C. Os resultados do presente estudo demonstraram que em banho maria a 47,5°

¹ Kelly Milioli, acadêmica do Curso de Engenharia Agrônômica da Faculdade do Centro do Paraná, Pitanga, PR. E-mail: eng_kelly.milioli@ucpparana.edu.br

² Daiane Secco, docente do Curso de Engenharia Agrônômica da Faculdade do Centro do Paraná, Pitanga, PR. E-mail: prof_daianesecco@ucpparana.edu.br

³ Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Urussanga, SC. E-mail: henriquepetry@epagri.sc.gov.br

C teve limpeza do vírus mais deve ser melhor estudado os tempos para uma melhor sobrevivência das estacas, para a termoterapia a 50° C houve limpeza do vírus em diferentes tempos fazendo se assim uma alternativa para eliminação do vírus do CABMV em maracujazeiro, já para os tratamentos feitos com eletroterapia não indicou limpeza das estacas feito com corrente elétrica.

Palavras-chave: Eliminação de vírus. Propagação vegetativa. PCR.

ABSTRACT

The objective of this work was to test a basic protocol of thermotherapy and electrotherapy, in the elimination of the CABMV virus (Cowpea aphid-borne mosaic virus), and to evaluate the elimination of the virus through the RT-PCR method in real-time, on the buds of contaminated cuttings. The study was carried out at the Urussanga-EPAGRI Experimental Station. The vegetative material used was obtained from matrices cultivated in the field. The cuttings used were cut with the aid of pruning shears, with three nodes (15 to 25 cm in length). Thermotherapy was performed in a water bath at two temperatures. At 47.5° C, the cuttings were treated for 5 min, 20 min, 35 min and 50 min (and a control). At 50°C, they were treated for 5 min, 10 min, 15 min and 20 min, in addition to a control. Electrotherapy was performed for 40 min, 50 min and 60 min, in addition to a control treatment. The experimental design used was completely randomized (DIC), with three replications per treatment and six cuttings per plot. For the application of electrotherapy, the cuttings were separated by treatments and placed in an electrophoresis vat, under an electric current of 100 mA, with a TBE buffer solution (Tris-Boric Acid 900 mM) in a proportion of 10%. The cuttings were planted on May 23, 2022, in tubes containing carbonized rice husks. They were kept in a protected environment, with anti-aphid screen, 50% aluminet, under intermittent nebulization (60 to 70% RH), for a period of 18 to 28 days. The incidence of CABMV was analyzed based on real-time RT-PCR analysis of buds collected from cuttings. PCR detection: amplifications were performed using the real-time RT-PCR protocol for the detection of CABMV in passion fruit. Using the “Primer Express” program, primers and the TaqMan probe were designed based on the CP region of CABMV. PCR amplifications were performed in a thermal cycler programmed for 1 cycle at 15 minutes at 45 °C, followed by 1 cycle of 2 minutes at 95 °C, 40 cycles at 15 seconds at 95 °C, with a final extension of 45 seconds at 62° C. The results of the present study demonstrated that in a water bath at 47.5° C the virus was cleaned, but the times for better survival of the cuttings should be better studied, for thermotherapy at 50° C there was cleaning of the viruses at different times, thus becoming an alternative for eliminating the CABMV virus in passion fruit, as for treatments carried out with electrotherapy, it did not indicate cleaning of the cuttings with electric current.

Keywords: Virus elimination. Vegetative propagation. PCR.

1. INTRODUÇÃO

As plantas pertencentes ao gênero *Passiflora*, da família Passifloraceae, são reconhecidas como maracujazeiros. É um gênero bastante diversificado, com cerca de 520

espécies distribuídas principalmente nas Américas (CERQUEIRA – SILVA *et al.*, 2014). O maracujá é produzido em todos os estados brasileiros (PETRY *et al.*, 2018). A área plantada no Brasil, no ano de 2020, foi de 46,500 hectares, e a produção total estimada em 690.364 toneladas, com um rendimento médio de 14.867 kg ha⁻¹, onde teve aproximadamente R\$ 1,3 bilhões de reais no valor da produção (IBGE; EMBRAPA, 2020).

O maracujá é uma fruta de clima tropical podendo ser consumida *in natura* como também em polpa concentrada, utilizada como base para sucos (LINDEN, 2007). As espécies predominantes no Brasil são *Passiflora edulis* conhecido como maracujá-azedo sendo responsável por mais de 80% da produção mundial da fruta e o *Passiflora alata* o maracujá-doce. No Brasil, mais de 95% das lavouras comerciais são representadas por pomares de maracujazeiros-azedo devido à qualidade dos frutos, vigor, produtividade e rendimento de suco dos frutos (MELETTI, 2011).

A propagação do maracujazeiro pode ser feita de forma sexuada, por meio de sementes, sendo a mais utilizada na produção de novas mudas da espécie, por sua facilidade de produção (OLIVEIRA JÚNIOR *et.al.*, 2010). No entanto, são comuns relatos de desuniformidade na formação do estande, devido a fatores associados à baixa germinação, além de possível dormência, que dificulta a formação de mudas uniformes e de qualidade (PEREIRA; DIAS, 2000).

Também pode ser feita de forma assexuada ou vegetativa, pela utilização de estaquias, enxertias ou culturas de tecidos. A propagação assexuada baseia-se na reprodução de extratos vegetais a partir de plantas, a fim de obter material genético de alta qualidade, como a planta-mãe, pois não ocorre modificação genética, devido ao uso de fragmentos vegetativos como caules, folhas ou raízes (FERRARI *et al.*, 2004). A propagação vegetativa a partir da clonagem de matrizes selecionadas promove a produção de plantas precoces e produtivas, com alta uniformidade e frutos de alta qualidade (RIBEIRO, 2006).

Uma das limitações da propagação vegetativa por estaquia ou enxertia em maracujazeiro é a disseminação de doenças etiológicas virais, principalmente a doença do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO *et al.*, 2004), é uma das mais importantes doenças do maracujazeiro, sendo transmitida por pulgões (afídeos), ferramentas de poda e mudas contaminadas. O vírus se espalhou amplamente pelo país, causando sérios problemas de produtividade e qualidade dos frutos (RIBEIRO, 2006).

Os sintomas desta virose em maracujazeiro incluem deformação, endurecimento e espessamento do pericarpo dos frutos, manifestando-se como redução do tamanho, baixo rendimento de polpa e redução do número de sementes. Os sintomas foliares são induzidos

antes da produção dos frutos e podem se manifestar como manchas cloróticas, mosaicos, formação de bolhas, deformações e redução da área foliar. O vírus também prejudica o desenvolvimento da planta, resultando em crescimento reduzido devido ao encurtamento dos entrenós (COLARICCIO *et al.*, 2018).

Assim, o processo de limpeza clonal é utilizado em diversas espécies vegetais propagadas vegetativamente, como citros, maçã, morango, abacate, cana-de-açúcar, entre outros, para eliminar patógenos do material propagado vegetativamente (ANDRADE *et al.*, 2010). O objetivo é desenvolver mudas saudáveis, livres de doenças (principalmente vírus), que sejam mais produtivas no campo, vivam mais e possam ser distribuídas em viveiros como substratos sem o risco de disseminação de patógenos para outras áreas. Existem várias maneiras de eliminar o vírus, sendo as mais comuns a cultura de ponta de broto, microenxertia, quimioterapia, crioterapia, termoterapia e eletroterapia (ANDRADE *et al.*, 2010, BADARAU *et al.*, 2014; RIBEIRO, 2006; SOUZA, 2019).

Segundo Vieira (2015) a eletroterapia é um método de tratamento baseado na aplicação de corrente elétrica ou campos magnéticos em um tecido vegetal ou sementes. Com a utilização deste método muitos resultados positivos foram alcançados em termos de restauração do vigor das sementes, estimulação do crescimento e resistência a pragas.

Os métodos baseados em termoterapia podem ser utilizados em tecido vegetal que são tratadas termicamente e depois submetidas a um determinado procedimento. Em geral, quanto maior a temperatura e quanto maior a duração da exposição, maior é a frequência de erradicação do vírus. A escolha de um regime de termoterapia deve permitir que a planta tratada sobreviva e ao mesmo tempo inative o vírus, resultando na produção de plantas livres de vírus (WANG *et al.*, 2018).

No entanto, estudos que relatam a real eficiência da termoterapia e eletroterapia para eliminação de vírus em maracujazeiro-doce são escassos na literatura. Existem apenas relatos de estudos de termoterapia *ex vitro* em maracujazeiro-azedo.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar protocolo básico de termoterapia e eletroterapia, na eliminação do vírus CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), e avaliar a eliminação do vírus através do método de RT PCR em tempo-real, sobre as gemas de estacas contaminadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Urussanga – EEUr da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, localizada nas coordenadas geográficas (-28°32'01,36" S, -49°18' 57,54" W e altitude de 50 m), Santa Catarina. O material vegetativo utilizado foi obtido de matrizes cultivadas a campo com alta incidência do endurecimento-dos-frutos do maracujazeiro (VEFM). As estacas utilizadas foram cortadas com auxílio de tesoura de poda, com três nós (15 a 25 cm de comprimento), para as estacas tratadas com termoterapia foram mantidas a última folha apical com redução de 80% da área foliar. As estacas tratadas com eletroterapia tiveram retiradas todas suas folhas. Imediatamente após a retirada e a eliminação do excesso de folhas, as estacas foram colocadas dentro de um saco plástico, com um jornal umedecido para manter a umidade e evitar a desidratação das estacas.

A termoterapia foi realizada em banho-maria em duas temperaturas. Em 47,5° C, as estacas foram tratadas por 5 min, 20 min, 35 min e 50 min (e uma testemunha). Já a 50°C, foram tratadas por 5 min, 10 min, 15 min e 20 min, além de uma testemunha. A eletroterapia foi realizada por 40 min, 50 min e 60 min, além de um tratamento testemunha. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento, e seis estacas por parcela.

Para a aplicação da eletroterapia, as estacas foram separadas por tratamentos e colocadas em uma cuba de eletroforese (tamanho 30 x 22 x 5,5 cm), sob uma corrente elétrica de 100 mA, com uma solução de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 900 mM) em proporção de 10%.

O plantio das estacas foi realizado em 23 de maio de 2022, em tubetes contendo casca de arroz carbonizada, com um corte horizontal na base e em bisel na extremidade superior. Posteriormente, foram mantidas em ambiente protegido, com tela antiafídeos, aluminet 50%, sob nebulização intermitente (60 a 70% UR), por um período de 18 a 28 dias para que houvesse uma diminuição da evapotranspiração das estacas.

Foram avaliados a porcentagem de sobrevivência (PS), porcentagem de estacas com gemas (PEG), números de gemas por estacas (NGE), porcentagem de estacas calejadas (PEC), porcentagem de estacas enraizadas (PER) e porcentagem de estacas positivas (PEP).

A avaliação dos experimentos de termoterapia da PS, PEG, NGE, PEC e PER foram feitas aos 18 dias após o plantio. Nos experimentos de eletroterapia, o PS, PEG, NGE, PEC e PER foram feitos aos 28 dias após o plantio.

A verificação do PEC e PER foi realizada após o arranquio. Foram realizadas duas aplicações nas estacas com óleo de Neem/Decis e Niphokam após 15 dias.

Foi analisada a incidência do CABMV a partir da análise de de RT-PCR em tempo real de gemas coletadas das estacas sobreviventes de cada tratamento. A coleta foi realizada aos 28 dias após o plantio para o experimento de eletroterapia e aos 18 dias nos experimentos de termoterapia. As gemas de cada estaca foram coletadas separadamente, identificadas e armazenadas em tubo eppendorf a uma temperatura de -23° C. As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal no departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

As amostras foram extraídas com a adição de 100 microlitros (µl) do tampão PBS por amostra (eppendorf), seguido do esmagamento das gemas com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Outros eppendorfs foram identificados e adicionado 495 µl do mesmo tampão PBS com auxílio de uma micropipeta, logo após as gemas serem esmagadas foi colocado 0,5µl da mistura da gema esmagada com o tampão no eppendorf correspondente que continha os 495µl e levado para congelar. Após 24 horas as amostras foram descongeladas para o preparo da PCR.

Detecção: as amplificações foram realizadas através do protocolo de RT-PCR em tempo real para a detecção do CABMV em maracujazeiro. Utilizando o programa “Primer Express” desenharam-se os iniciadores e a sonda TaqMan baseados na região da CP do CABMV, foram realizados utilizando o master mix AgPath-ID™ One Step RT-PCR, 0,2 µM de cada iniciador e 0,1µM de sonda em volume final de 10 µl (8µl master mix e 2 µl amostra). As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador programado para 1 ciclo a 15 minutos, a 45 °C, seguido de 1 ciclo de 2 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 15 segundos, a 95° C, com uma extensão final de 45 segundos a 62° C.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através do teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade, com auxílio do software computacional SigmaPlot 12.0.

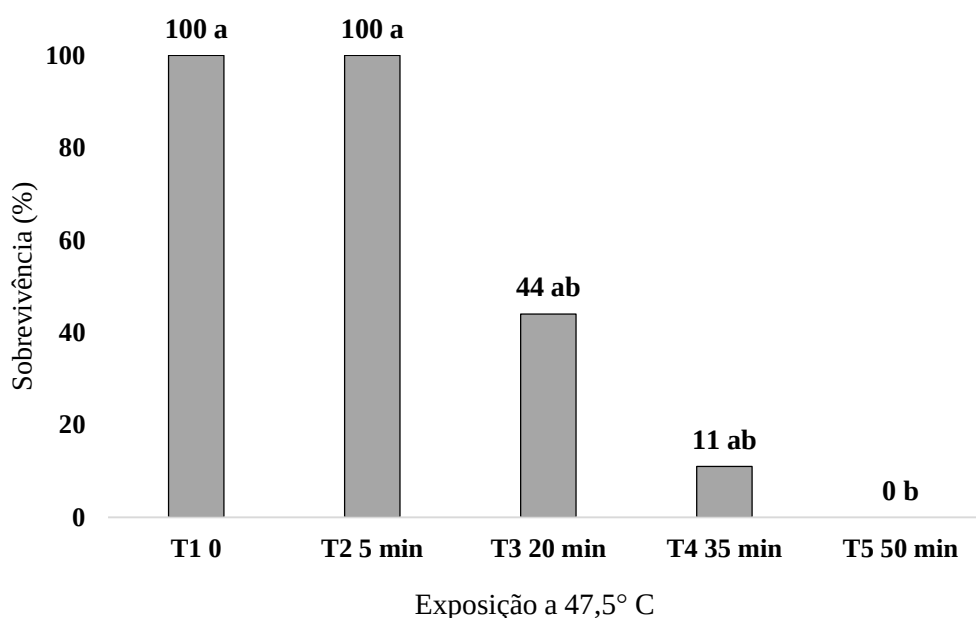
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento com termoterapia realizado a 47,5 °C, observou-se na análise de variância que para as médias de porcentagem de sobrevivência (PS), porcentagem de estacas calejadas (PEC), houve diferenças significativas entre os tratamentos (Gráfico 1 e 2). Para as médias da porcentagem de estacas com gemas (PEG), número de gemas por estaca (NGE),

porcentagem de estacas enraizadas (PER) e porcentagem de estacas positivas (PEP), não apresentaram diferença estatística.

Os resultados obtidos pelo acompanhamento de sobrevivência da termoterapia a 47,5 °C estão apresentados no (Gráfico 1). Os tratamentos que tiveram diferença significativa foram o T1 (testemunha) e T2 (47,5 °C) se diferiram do tratamento T5 (47,5 °C a 50 min), T1 (testemunha) não se diferiu significativamente do T2 (5 min), do T3 (20 min) e do T4 (35 min).

Gráfico 1: Médias da porcentagem de sobrevivência a 47,5 °C com termoterapia em estacas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) ao final dos 18 dias de avaliação. Urussanga-SC, 2022.



Fonte: Do autor (2022).

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,05$).

O tratamento T1 testemunha e T2 (5 min) apresentaram 100% de sobrevivência aos 18 dias após o plantio, o T3 (20 min) apresentou 44,4%, o tratamento T4 (35 min) apresentou 11% de sobrevivência, enquanto o tratamento T5 (50 min) teve 0% de sobrevivência ao final dos 18 dias, fazendo se assim que estacas de maracujazeiro-doce suportam temperatura como de 47,5 °C mais não por longos períodos de tempo.

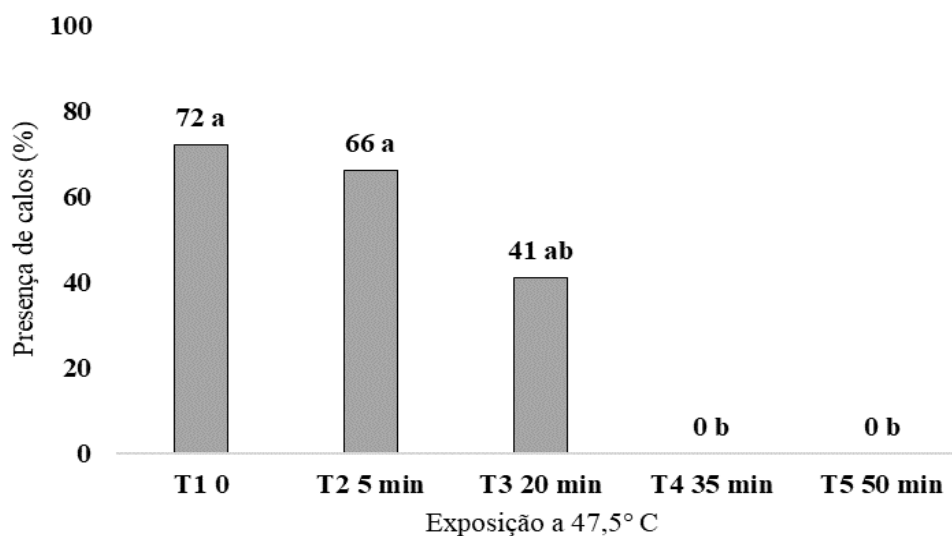
As avaliações da PEG aos 18 dias não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. A média geral do índice foi igual a 48,6% de estacas com gemas entre os tratamentos T1, T2, T3 e T4, para o tratamento T5 (50 min) a média de estacas com gemas foi de 0%. As estacas mortas apresentavam-se necrosadas, com coloração marrom e frequentemente atacados por fungos. Salomão *et al.* (2002) com estudos feitos por estaquia em

maracujazeiro doce e amarelo notaram em várias estacas apicais do maracujazeiro-doce, observaram podridão-aquosa, iniciando indistintamente pela base ou pelo ápice, mas a causa não foi identificada. Embora se tenha suspeitado de excesso de umidade associado à baixa luminosidade, isso pareceu pouco provável, uma vez que o problema não foi observado nos demais tipos de estaca.

Os tratamentos não influenciaram significativamente o aparecimento de gemas adventícias com média geral do índice igual a 0,8 de número de gemas por estacas.

O índice de estacas calejadas apresentou diferença significativa (Gráfico 2), o tratamento T1 apresentou uma média de 72% de estacas que apresentaram calos ao final de 18 dias de avaliação com maior média, o tratamento T2 apresentou média de 67% de estacas calejadas, seguida pelo tratamento T3 com média de 42%. Já no tratamento T4 e T5, obteve-se menor porcentagem de estacas calejadas com 0%.

Gráfico 2: Médias da porcentagem de estacas calejadas em temperatura de 47,5 °C em estacas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) com avaliação ao final dos 18 dias após o plantio. Urussanga-SC, 2022.



Fonte: Do autor (2022).

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,05$).

Para a porcentagem de estacas enraizadas os tratamentos não influenciaram significativamente apresentam assim médias de 0% de estacas enraizadas.

Em relação a porcentagem de estacas positivas (PEP) feito com o RT-PCR em tempo real, o tratamento T1 testemunha obteve 100% das gemas contaminadas com o vírus, o tratamento T2 (47,5 °C a 5 min) apresentou apenas 72% de gemas positivas detectadas pelo PCR, fazendo se assim que 47,5 °C a 5 min pode ser significativo na limpeza do vírus, o T3

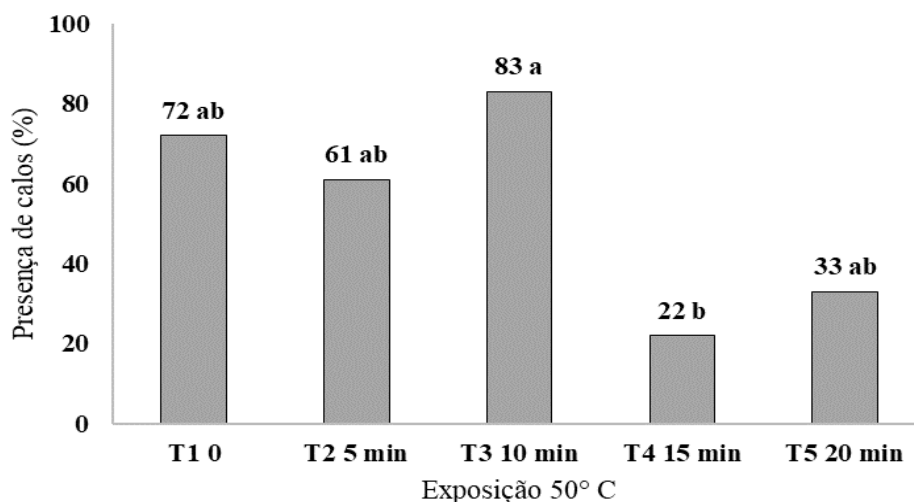
obteve 100% de gemas contaminadas na segunda repetição com apenas duas gemas avaliadas as demais repetições do tratamento T3 não obteve gemas para serem avaliadas, os tratamentos T4 e T5 não obtiveram estacas com gemas, assim não podendo ser feitas as análises das gemas com detecção do PCR. Em vista disso, deve ser estudado que estacas de maracujazeiro-doce podem sobreviver a longos períodos em banho maria a 47,5 °C, mas não inibem as brotações. Portanto, os métodos de termoterapia devem ser aprimorados estudando os efeitos do tamanho e da idade das estacas, do tempo de exposição e da temperatura para assegurar a limpeza clonal da matriz.

No experimento com termoterapia a 50 °C, verificou-se que na análise de variância entre os tratamentos para as médias de PS, PEG, NGE e PER, não houve diferença significativa entre os tratamentos, e para as médias de PEC e PEP, indicou diferença significativa entre os tratamentos. Embora a termoterapia para limpeza clonal de plantas seja usada principalmente em conjunto com outras técnicas, também são comuns relatos de mudas livres de patógenos obtidas após o tratamento. Os viveiros de cravos do sul de França submetem as suas plântulas para a ser tratado numa estufa a 40°C durante um mês, a fim de produzir plântulas saudáveis (ANDRADE *et al.*, 2010).

Para a porcentagem de sobrevivência com 50 °C a média foi de 96% de sobrevivência. A vantagem dessa metodologia, além de ser mais barata, é que apresenta maior índice de sobrevivência após o tratamento (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ, 2009). Com relação ao índice de estacas com gemas a média foi de 54%. O resultado da avaliação de número de gemas foi de 1 gema por estaca.

As avaliações das estacas calejadas aos 18 dias revelaram diferenças significativas entre os tratamentos (Gráfico 3). O tratamento T3 (50°C a 10 min) apresentou 83% de estacas calejadas ao final de 18 dias de avaliação com maior média, que se diferenciou do tratamento T4 (50°C a 15 min), que obteve menor porcentagem de calos com 22%. O tratamento T1 (testemunha) não se diferenciou dos demais tratamentos.

Gráfico 3: Médias de porcentagem de estacas calejadas com tratamento de termoterapia a 50° C, em propagação do tipo estaquia em maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*), com avaliações ao final dos 18 dias após o plantio. Urussanga-SC, 2022.



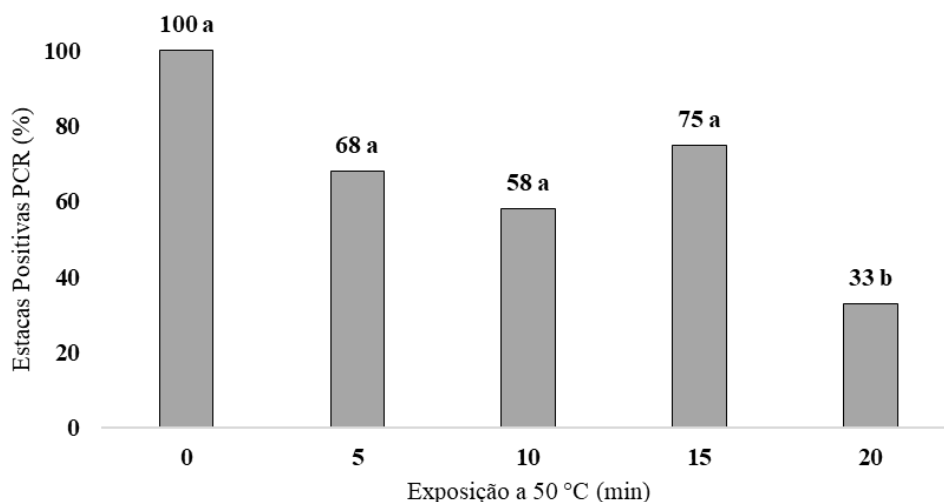
Fonte: Do autor (2022).

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,05$).

Em relação porcentagem de estacas enraizadas em termoterapia a 50°C também não se obteve resultados, apresentando-se assim média de 0%. Salomão *et al.* (2002) realizaram estaquia em maracujazeiro-amarelo e maracujazeiro-doce em câmara de nebulização com a utilização de estacas mediada e basal permitiu obter porcentagens de enraizamento que variaram de 93 a 96%, em 50 dias, nas duas espécies. No presente estudo podemos notar que a não obtenção de enraizamento nas estacas foi a questão de número de dias que as estacas ficaram implantadas nos tubetes, comparado esse trabalho que mais dias tiveram para a obtenção do enraizamento das estacas.

Para o PCR porcentagem de estacas positivas (Gráfico 4), os tratamentos se diferenciaram significativamente, para o tratamento T1 (testemunha), não houve nenhuma estaca com gemas limpas, para o tratamento T2 a média foi de apenas 68% de estacas positivas, o T3 teve média de 58%, T4 com 75% e o T5 com média de 33%. Para essa variável de porcentagem de estacas positivas devemos levar em consideração o número de gemas avaliadas por tratamento, a termoterapia a 50 °C pode ser viável para a limpeza de vírus, mais devemos observar, dias do aparecimento das gemas e ter maior uniformidade de estacas brotadas para maiores análises possíveis das gemas que surgirem.

Gráfico 4: Médias de porcentagem de estacas positivas análises feito com PCR em tempo real em estacas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) tratadas com termoterapia a 50° C. Urussanga-SC, 2022.



Fonte: Do autor (2022).

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,05$).

Um estudo desenvolvido para limpeza clonal em Damasco mostrou que o tratamento com fotoperíodo de 16 horas de 37 °C na luz e 35 °C escuro por 45 dias foi suficiente para obter mudas livres de vírus. A vantagem desse método, além de ser mais barata, tem uma porcentagem maior de sobrevivência após o tratamento (KRIZAN e ONDRUSKOVÁ, 2009).

Andrade *et al.* (2010) desenvolveram estudos para o uso de termoterapia *ex vitro* em maracujazeiro-azedo para a eliminação do vírus-do-endurecimento-dos-frutos e concluíram que o maracujazeiro *ex vitro* pode indicar uma diminuição na quantidade do inóculo do vírus pela termoterapia, apesar da limpeza clonal não ter sido totalmente efetiva.

A hipótese relativa à eficácia da termoterapia especulam que a replicação viral é inibida em temperaturas subletais em plantas, mas que a atividade metabólica viral é interrompida em temperaturas acima de 40°C, mas pode ser recuperada pelas plantas hospedeiras. Por outro lado, alguns autores argumentam que o movimento de partículas virais em plantas infectadas é reduzido. Contudo, os pesquisadores estão avaliando a hipótese de que a termoterapia reduz a infecção e altera a translocação viral, seja por meio do silenciamento de RNA ou afetando as relações planta-vírus para reduzir a infecção em brotos produzidos durante o tratamento (PANATTONI e TRIOLO, 2010).

Portanto, é necessário melhorar os tratamentos de termoterapia, examinando os efeitos do tamanho e da idade das estacas, do tempo de exposição e da temperatura para assegurar a limpeza clonal da matriz. Além disso, é necessário avaliar a eficácia da termoterapia em combinação com outras técnicas, tais como a enxertia dos ápices caulinares de plantas tratadas ou a propagação por estacas de plântulas tratadas. Também podem ser associadas técnicas de

propagação de tecido meristemático e pontas de caule para multiplicação de brotações. Após o desenvolvimento das plântulas, devem ser realizados novos indicadores para confirmar a limpeza clonal eficaz destas plantas, bem como RT-PCR (RT-PCR em tempo real) para monitorar a expressão dos sintomas e quantificar a presença do vírus (ANDRADE *et al.*, 2010).

Para avaliações no experimento de eletroterapia aos 28 dias não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. A média geral do índice de porcentagem de sobrevivência (PS), foi de 73% de estacas vivas.

Os tratamentos não influenciaram significativamente a porcentagem de estaca com gemas, com um valor médio de 38%. Com relação ao número de gemas por estacas a média geral do índice foi igual a 1,3, neste estudo foi observado que os tratamentos com eletroterapia apresentaram menor (NGE) em relação a testemunha. Lima *et al.* (2009), com estudos de concentrações de AIB em estacas de *Passiflora edulis*, notou se que a testemunha apresentou maior número em relação aos outros tratamentos. Demonstrando assim que estacas de maracujazeiros não são influenciadas com algum tipo de tratamento para a indução de gemas e brotações.

Em relação a porcentagem de estacas calejadas a média foi de 15,8 %, nessa variável a testemunha obteve maior média de PEC, mas não apresentou diferença em relação aos outros tratamentos. Lima *et al.* (2009), também notou em seu trabalho que estacas sem concentrações de reguladores de crescimento tiveram maior porcentagem de estacas com calos.

Para a porcentagem de estacas enraizadas não se obtiveram estacas enraizadas ficando com 0% de enraizamento em todos os tratamentos. Em qualquer caso, este tipo de estudo só deve ser utilizado se for possível detectar a limpeza de qualquer vírus que possa prejudicar as mudas do maracujazeiro a campo e aumentar a taxa de enraizamento. Da mesma forma, Fabro *et al.* (2021) demonstraram em seu trabalho que estacas de maracujazeiro que o uso de AIB não influência para a porcentagem de enraizamento. Podemos notar que estacas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) não se adapta a qualquer tipo de tratamentos para a formação de novas mudas através de estaca.

Para a porcentagem de estacas positivas feita com o PCR em tempo real a média foi de 100% das estacas positivas. O sucesso da eletroterapia na produção de plantas livres de vírus depende da velocidade com que a planta se reproduz e do próximo passo no desenvolvimento da planta. Normalmente, esse indicador depende de vários fatores, incluindo genótipo, estado fisiológico das estacas. Os pulsos elétricos também foram relatados para estimular a diferenciação de plantas (BADARAU *et al.*, 2014).

Estudos feitos por Badarau *et al.* (2014) testou os efeitos eletroterápicos em plântulas de batatas, para eliminação do pvx, resultou na eliminação parcial do vírus com tratamentos de 100 mA por 10-20 minutos, os pulsos elétricos também são relatados como estimulantes da diferenciação de plantas *in vitro*, com isso mostra que a taxa de multiplicação dos explantes *in vitro* é influenciada pelo tratamento eletroterápico e depende da intensidade da corrente elétrica.

Singh *et al.* (2021) relataram em estudos feitos com eletroterapia *in vitro* para a eliminação de BBTV em bananeira, uma eliminação completa do BBTV pode ser alcançada após uma exposição de 100 mA de corrente elétrica por 60 minutos aplicada às culturas de banana foi suficiente para gerar propágulos livre de vírus com a confirmação via PCR.

Da mesma forma Bayat *et al.* (2011) em estudos para a eliminação do *Grapevine virus A* (GVA) por crioterapia e eletroterapia em estacas de videira, as estacas expostas a correntes elétricas de 0, 10, 20 e 30 mA por 10 ou 15 min, não houve eliminação do vírus em nenhum dos tratamentos, enquanto que após 15 minutos de exposição a 20 e 30 mA, 20% e 40% das plântulas ficaram livres de GVA, respectivamente.

Estudos anteriores mostraram que a exposição de tecidos vegetais à eletricidade aumenta a temperatura dentro das células e que a extensão desse incremento depende de condições como idade, volume, potencial hídrico, espessura do tecido e constituição celular. A desnaturação da porção proteica das partículas virais pode ocorrer pelo aumento da temperatura das células e pode envolver também proteínas vegetais normais, incluindo componentes que são influentes no crescimento e regeneração das plantas (GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

Cerqueira-Silva *et al.* (2012) compararam a eficiência de quatro variáveis patológicas que podem ser utilizadas para identificar populações de maracujazeiro com altos níveis de resistência e suscetibilidade ao CABMV. Estudos quantitativos de carga viral por PCR em tempo real podem ser outro método confiável em programas de melhoramento para selecionar variedades resistentes a vírus. O protocolo de RT-PCR atualmente desenvolvido pode ser utilizado em estudos epidemiológicos desses vírus, especialmente na genética e melhoramento de maracujazeiros, para melhorar a tolerância das plantas ao CABMV.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados no presente trabalho levam à conclusão de que os tratamentos de termoterapia aplicados com 47,5° C e 50° C resultaram em provável limpeza clonal de

CABMV nas novas gemas formadas. A termoterapia aplicada em estacas bem desenvolvidas, é uma alternativa metodológica, mais simples e mais barata que a eletroterapia.

A eletroterapia não demonstrou ser eficaz para a limpeza do vírus do CABMV em maracujazeiro-doce, devendo-se assim estudar os efeitos da corrente elétrica e tempo de exposição nesse tipo de técnica.

Sendo assim, conclui-se que a associação de altas temperaturas a menores tempos pode sim se tornar uma opção favorável, pois, obtêm-se bons resultados no crescimento e desenvolvimento das plantas bem como nos fatores relacionados à limpeza do vírus. No entanto, os efeitos benéficos da combinação tratamento térmico e tempo não podem ser generalizados.

5. AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ele me permitir chegar até aqui, e por todas as graças e conquistas que ele tem me proporcionado.

Aqueles que são à base da minha vida, meus familiares. Meu pai Vitório Milioli, minha mãe Roseli Caetano Milioli e minha irmã Karina Milioli. Obrigado por todo amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando, nos momentos de alegrias e dificuldades. Meu eterno agradecimento. Aos demais familiares, tios e tias.

Meu carinho aos meus orientadores do estágio Prof Dr Henrique Belmonte Petry e ao Dr Eduardo da Costa Nunes, pela amizade e por todo o aprendizado técnico e principalmente humano que adquiri durante período em que estagiei com vocês, com certeza todas as experiências compartilhadas são ensinamentos que levarei para o resto da vida. Também agradeço a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e seus profissionais que auxiliaram no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof Dr Edson Bertolini e ao Prof Dr Michael Mazurana, por me oportunizarem os conhecimentos adquiridos no tempo que fiquei em Porto Alegre e por todo carinho, acolhida e conhecimento compartilhado durante esse período.

A Faculdade UCP e a todo o corpo docente que teve parte em minha formação acadêmica, em especial a coordenadora do curso de Engenharia Agrônômica, Prof Dr^a Andricia Verlindo, e a minha orientadora Prof Ma Daiane Secco, obrigado por toda ajuda e contribuição no decorrer da implantação do estágio e no trabalho de conclusão de curso, com toda certeza foram dicas valiosas que enriqueceram ainda mais o trabalho desenvolvido.

A todos meus incontáveis amigos que fiz durante o período de estágio, fica até difícil mencionar todos os nomes. Enfim a todos que de uma forma ou outra fazem parte da minha vida e da minha formação profissional, meu sincero, carinhoso e fraterno agradecimento.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. R. M. de.; FONSECA, L. P.; SILVA, M. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Estudos preliminares para o uso de termoterapia ex vitro em maracujazeiro-azedo visando à eliminação de vírus-do-endurecimento-dos-frutos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 267. Planaltina – DF: **Embrapa Cerrados**, p. 19, Fev, 2010.

BADARAU, C. L.; FLORENTINA, D.; CHIRU, N. Effects of some electrotherapy treatments of pvx infected potato plantlets cv. Roclas, on several biological development indicators. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v. 18, p. 25-29, 2014.

BAYATI, SH.; SHAMS-BAKHS, M.; MOIENI, A. z. J. **Agr. Sci. Tech**, v. 13, 2011.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 31, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; MELO, J. R. F.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. **European Journal of Plant Pathology**, 2012.

COLARICCIO, A.; GARCÊZ, R. M.; RODRIGUES, L. K.; EIRAS, M.; PERUCH, L. A. M.; CHAVES, A. L. R. Doenças causadas por vírus na cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis*). In: **Maracujazeiro-azedo: polinizadores, pragas e doenças**. Epagri: Florianópolis, p. 220, 2018.

FABRO, F. F.; MAZUCCO, G. C.; PETRY, H. B.; NUNES, E. C.; SILVA, D. A. Produção de mudas de estacas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*). In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRONOMIA, Florianópolis-SC, 2021. Disponível em: <<https://attitudepromo.iweventos.com.br/evento/cba2021/trabalhosaprovados/naintegra/10160>>. Acesso em: 22 de Set de 2022.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de espécies florestais. Documentos 94. Colombo – Pr: **Embrapa Florestas**, p. 22, Agos de 2004.

GONZÁLEZ, J.E, SÁNCHEZ, R. e SÁNCHEZ, A. Análise Biofísica do Processo de Inativação de Nucleoproteínas Mediada por Corrente Elétrica. Centro Agrícola, 2: 42-47. 2006.

KRIZAN, B.; ONDRUSIKOVA, E. Thermotherapy of apricot cultivars. **Acta Horticulture**, v. 839, 2009. p. 269-274.

LIMA, A. de et al. Enraizamento de híbridos interespecíficos de maracujá utilizando regulador de crescimento AIB (ácido indol-butírico). Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em: < [View of AIB doses in rooting of passion fruit cuttings \(rsdjournal.org\)](#)>. Acesso em: 22 de Set de 2022.

LINDEN, U. M. von der. The passionfruit market is it controllable? In: **Fruit Processing**, p. 4, 2007. Disponível em: <https://www.carriere.de/files/Download/passionfruit-market.pdf>. Acesso em: 24 de Jun de 2022.

MELETTI, L. M. M. Avanços da cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, p. 9, Out, 2011.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, M. X. de.; JOSÉ, A. R. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; MORAIS, O. M.; DOURADO, F. W. N. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* MAST.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 32, n. 2, p. 584-590, Jun 2010.

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

PEREIRA, K.J.C.; DIAS, D.C.F.S. Germinação e vigor de sementes de maracujá-amarelo (*passiflora edulis* sims. f. *flavicarpa* deg.) submetidas a diferentes métodos de remoção de mucilagem. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 22, n. 1, p.288-291, 2000.

PETRY, H. B.; GOULART JUNIOR, R.; ALMEIDA, G. V. B. de.; MARCHESI, D. R. A importância da cultura do maracujazeiro: aspectos econômicos da produção e mercado. In: **Maracujazeiro-azedo: polinizadores, pragas e doenças**. Epagri: Florianópolis, p. 220, 2018.

RIBEIRO, L. M. **Técnicas de cultivo in vitro e microenxertia ex vitro visando a eliminação do Cowpea aphid-borne mosaic vírus em maracujazeiro-azedo**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília. Brasília – DF, Jun, 2006.

SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, W. E.; DUARTE, R. C. C.; SIQUEIRA, D. L. D. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 1, 2002. p. 163-167

SINGH, V.; ADIL, S.; QURAISHI, A. Elimination of BBTv via a systemic in vitro eletrotherapy approach. **Journal of virological methods**. [S.I.: s.n.], 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093421003062>>. Acesso em: 19 de set de 2022.

Site: IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de maracujá**. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acesso em: 24 de Jun de 2022.

SOUZA, L. B. Propagação *in vitro* e aplicação de termoterapia e crioterapia visando limpeza viral *Hippeastrum hybridum* Hort. Cv. Flor de maçã. Lavras-MG, 2019.

VIEIRA, D. S. **Eletroterapia para obtenção de alho livre de vírus**. 2015. Projeto da disciplina de Projetos em Ciências Rurais (Curso de Ciências Rurais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, Junho de 2015.

WAHG, M. R.; CUI, Z. H.; LI, J. W.; HAO, X. Y.; ZHAO, L.; WANG, Q. C. In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. **Plant Methods**, 2018.