

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

Cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo

Savana Iribarem Costa

Pelotas, 2015

SAVANA IRRIBAREM COSTA

Engenheira Agrônoma

Cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias

Coorientadora: Prof^a Dr^a Márcia Wulff Schuch

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837c Costa, Savana Iribarem

Cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo / Savana Iribarem Costa ; Paulo Celso de Mello-Farias, orientador ; Márcia Wulff Schuch, coorientadora. — Pelotas, 2015.

79 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Micropropagação. 2. Passiflora. 3. Reguladores de crescimento. 4. Carboidratos. I. Mello-Farias, Paulo Celso de, orient. II. Schuch, Márcia Wulff, coorient. III. Título.

CDD : 634.77

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias – Universidade Federal de Pelotas

Profª Drª Débora Leitzke Betemps – Universidade Federal da Fronteira Sul

Dr. Robson Ryu Yamamoto- Universidade Federal de Pelotas

Drª Cristina Copstein Cuchiara - Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais, Valdo e Elizete

A minha irmã, Sabrina

DEDICO

Agradecimentos

À Deus, por guiar meus passos em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação em Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Paulo Celso de Mello Farias, pela sua orientação, incentivo, e confiança em mim depositada.

À professora Dr^a. Márcia Wulff Schuch, pela coorientação neste trabalho.

Aos demais professores da Fruticultura, pelos ensinamentos durante o curso de mestrado.

Aos meus pais Valdo Bartolomeu de Avila Costa e Elizete Irribarem Costa, e minha irmã Sabrina Irribarem Costa pelo apoio, amor incondicional, incentivo e confiança, amo vocês mais que tudo.

À minha amiga do coração Ana e o meu afilhado Enzo, pela compreensão, amor e carinho sempre.

Aos amigos queridos e demais familiares pela participação fundamental em minha vida mesmo quando a distância era presente.

Aos colegas e amigos da área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Samila Camargo, Thais Lima, Andrio Copatti, Camila Schwartz e Igor de Albuquerque por toda a ajuda e momentos que passei junto à vocês.

A todos, aqui citados ou não, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

RESUMO

COSTA, Savana Iribarem. **Cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo**. 2015. 79f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

O maracujazeiro é pertencente à família Passifloraceae, que inclui mais de 630 espécies, das quais a maior parte pertence ao gênero *Passiflora* e esta presente nas regiões tropicais e subtropicais da América da Sul. O cultivo no Brasil vem crescendo com o passar dos anos e a demanda por mudas de qualidade também, porém, é necessário encontrar alternativas viáveis para a propagação vegetativa in vitro visando otimizar protocolos de cultivos para obter-se produções de mudas clonadas de forma mais rápida e com qualidade. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico e da escarificação na germinação de sementes, avaliar a multiplicação in vitro utilizando distintas concentrações e combinações de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético, e também diferentes fontes e concentrações de carboidratos no cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo. Os experimentos foram realizados no laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no período de março de 2013 a novembro de 2014. Para o artigo 1 foram avaliados a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação, e nos demais foram avaliados as variáveis número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm). As maiores médias para as variáveis porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação foram obtidas com a utilização de escarificação das sementes utilizando-se 125 mg.L^{-1} e 0 mg.L^{-1} . A escarificação da extremidade de sementes proporciona maiores médias para as variáveis analisadas em sementes de maracujazeiro-amarelo. A imersão das sementes em solução contendo o regulador de crescimento AG₃ por 24h não obteve efeito sobre as variáveis analisadas. No artigo (2), A ausência dos reguladores promoveu maior comprimento de brotações, da maior raiz e número de raízes. A concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP sem a adição de ANA em meio de cultivo MS apresentou maior número de folhas e a mesma dose combinado com ANA, promoveu o maior número de brotações na multiplicação in vitro. E no artigo (3), a glicose na concentração de 88 mM.L^{-1} apresentou maiores médias para números de folhas e brotações. A sacarose na concentração 88 mM.L^{-1} promoveu maiores médias para comprimento de brotações, de raízes e número de raízes em explantes de maracujazeiro-amarelo cultivados em meio MS.

Palavras-chave: micropropagação, *Passiflora*, reguladores de crescimento, carboidratos

ABSTRACT

COSTA, Savana Iribarem. **In vitro propagation of yellow passion fruit**. 2015. 79f. Thesis (Master degree) – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS.

Passion fruit belongs to Passifloraceae family, which includes over 630 species, which most belongs to genus *Passiflora* and inhabits the tropical and subtropical regions of South America. Passion fruit commercial yards in Brazil have grown over the years and also the demand for quality seedlings. However, it is necessary to find out in tissue culture new alternatives to obtain high quality cloned seedlings quickly. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of gibberellic acid and scarification on seed germination, to evaluate the in vitro multiplication using different concentrations and combinations of 6 - benzylaminopurine and naphthaleneacetic acid, and also different sources and carbohydrate concentrations in vitro cultivation yellow passion fruit. The experiments were conducted at Fruit Trees Propagation Laboratory, Department of Crop Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas (UFPEL), from March 2013 to November 2014. On Article 1 were evaluated the percentage of germination and germination speed index, and others articles were evaluated in the average number of leaves, average number of shoots, average shoot length (cm), average number of roots and medium length the largest root (cm). The highest averages for variables analyzed were obtained with seeds scarification using 125 mg.L^{-1} and 0 mg.L^{-1} GA_3 . Seed end scarification provides higher averages for the variables analyzed in *P. edulis* f. *flavicarpa*. The immersion of seeds in a solution containing growth regulator GA_3 for 24 hours got not effect on the variables analyzed. Article (2), the absence of regulatory promoted higher length of shoots, the largest root and root number. The concentration of 0.5 mg.L^{-1} BAP without the addition of NAA in MS medium showed higher number of leaves and the same dose combined with ANA, promoted the highest number of shoots of *P. edulis* f. *flavicarpa* on in vitro multiplication. And on Article (3), glucose at a concentration of 88 mM.L^{-1} showed the highest averages for number of leaves and shoots. Sucrose added to the concentration of 88 mM.L^{-1} showed higher averages for length of shoots, roots and number of roots in explants of yellow passion fruit grown on MS medium.

Keywords: micropropagation, *Passiflora*, growth regulators, carbohydrates

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Tabela 1. Porcentagem de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2015.	49
---	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1:

Figura 1. Porcentagem de germinação (G%) (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2015.49

ARTIGO 2:

Figura 1. Número médio de folhas (A), de brotações (B), comprimento médio de brotações (C), número médio de raízes (D) e comprimento médio da maior raiz (E) de segmentos caulinares com uma gema de maracujazeiro-amarelo avaliados as 60 dias. Pelotas-RS, 2015.61

ARTIGO 3:

Figura 1. Número médio de folhas (A), de brotações (B), comprimento médio de brotações (C), número médio de raízes (D) e comprimento médio da maior raiz (E) em função de diferentes doses de sacarose (Sac), glicose (Gli) e lactose (Lac) de explantes de maracujazeiro-amarelo. Pelotas-RS, 2015.74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG ₃	Ácido Giberélico
ANA	Ácido Naftalenoacético
BAP	6 – benzilaminopurina
G%	Percentual de germinação
Gli	Glicose
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
Lac	Lactose
Sac	Sacarose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
1 IDENTIFICAÇÃO	18
2 PROJETO DE PESQUISA	18
2.1 Título:	18
2.2 Equipe:	18
2.3 Instituição:	18
3 INTRODUÇÃO	19
3.1 Justificativa	20
3.2 Objetivo Geral:	21
3.3 Objetivos Específicos:	21
3.4 Fundamentação Teórica:	21
3.4.1 O Maracujazeiro	21
3.4.2 Cultura de tecidos de maracujazeiro	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Local dos experimentos	24
4.2 Material Vegetal	24
4.3 Metodologia	24
4.3.1 Germinação in vitro de maracujazeiro-amarelo	24
4.3.2 BAP e ANA na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo	26
4.3.3 Carboidratos na multiplicação de maracujazeiro-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.)	27
5 ORÇAMENTO	29
6 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	31
7 DIVULGAÇÃO PREVISTA	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
RELATÓRIO DO TRABALHO DE LABORATÓRIO	35
ARTIGO 1	36
Germinação in vitro de sementes maracujazeiro-amarelo	36
Resumo	36
In vitro germination of yellow passion fruit seeds	37
Abstract	37

Introdução	38
Material e Métodos	40
Resultados e Discussão	42
Conclusões	44
Agradecimentos	45
Referências	46
ARTIGO 2.....	50
Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo	50
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e Métodos	53
Resultados e discussão	55
Conclusões.....	57
Agradecimentos	58
Referências	59
ARTIGO 3.....	62
Fontes e concentrações de carbono na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo	62
Resumo	62
Abstract	63
Introdução	64
Material e Métodos	65
Resultados e Discussão	67
Conclusões.....	69
Agradecimentos	70
Referências	71
CONSIDERAÇÕES GERAIS	75
REFERÊNCIAS.....	76

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, com uma produção estimada em mais de 40 milhões de toneladas, depois da China e Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014).

A produção de maracujá concentra-se na América do Sul (Brasil, Equador, Peru e Colômbia) e em alguns países africanos. Nos países Sul Americanos, predomina a produção do maracujá-amarelo, já nos países africanos e na Austrália há predomínio da produção do maracujá-roxo. Em 2010 a produção brasileira de maracujá foi em torno de 920 mil toneladas, representando aproximadamente 70% do maracujá produzido mundialmente, com uma área plantada de 62 mil hectares, destacando-se os estados da Bahia com quase 45% da produção nacional, seguido do Ceará, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará e São Paulo, somados correspondem a 86% da produção nacional, enquanto a região Sul ocupou o último lugar com apenas 2% da produção brasileira da fruta (IBGE, 2012).

A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional, sendo que a evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial. Contudo, a produtividade nacional ainda é baixa, com cerca de 14 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014), devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência de cultivares superiores.

Dentre as espécies cultivadas comercialmente no Brasil, o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), é o responsável por 95% dos pomares, devido à excelente qualidade e rendimento de suco, e também pelo vigor, produtividade, e as condições ecológicas para seu cultivo no país (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

Segundo Minami (1995), a produção e a utilização de mudas de alta qualidade tornam-se uma estratégia para quem deseja melhorar o pomar, tornar

mais competitiva a produção e aumentar a exportação. Por esse motivo é interessante a produção de mudas clonais de maracujazeiro, permitindo que uma planta com características desejáveis possa ser preservada e multiplicada, transmitindo as características da planta mãe.

A propagação por sementes é a maneira mais usual para o estabelecimento de plantações comerciais da cultura, porém, o seu uso resulta em uma grande variabilidade genética (RUGGIERO, 1987). As técnicas de cultivo *in vitro* oferecem uma boa alternativa, pois pode-se produzir em grande escala clones selecionados de variedades com interesse comercial (FREITAS, 1997). Em passifloras esta técnica representa uma excelente alternativa para a produção de material vegetal, garantindo plantas uniformes com boas condições fitossanitárias em um curto período de tempo (PEREA; TIRADO, 2011).

Para maiores avanços, é necessário encontrar alternativas viáveis para a propagação vegetativa *in vitro* desta cultura visando otimizar protocolos de cultivos para se obter produções de mudas clonadas de forma mais rápida e com qualidade.

Plântulas germinadas *in vitro* podem constituir ótima fonte de explantes para estudos de morfogênese. Porém, as sementes do maracujazeiro apresentam dormência sob condições *in vitro*, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes (JUNGHANS; VIANA; JUNGHANS, 2006).

Dentre os reguladores de crescimento, as giberelinas (AGs) estão diretamente relacionadas à germinação de muitas sementes, uma vez que sua aplicação exógena promove a expressão dos genes que controlam a síntese das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares do endosperma, induzindo o crescimento do embrião e estimulando o processo germinativo (CARVALHO et al., 2012). Segundo Cardoso (2004), as AGs contrabalanceiam a inibição imposta pelo ácido abscísico, provocando um aumento endógeno de AGs, que torna evidente sua participação na superação da dormência das sementes. O tipo de AG mais utilizado *in vitro* é o ácido giberélico (AG₃) (BRAUN et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Algumas espécies da família Passifloraceae possuem dormência em suas sementes, ocasionada pelo mecanismo de controle da entrada de água para o seu interior, devido à dureza do tegumento, necessitando de tratamentos para sua superação (MORLEY-BUNKER, 1974), sendo importante estudar o processo de escarificação na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo.

A propagação de plantas *in vitro* do gênero *Passiflora* tem se mostrado viável para a produção comercial de plantas elite. Mostrando que um sistema de regeneração de plantas, a partir da organogênese, utilizando 6-benzilaminopurina (BAP) está prevalecendo atualmente em espécies de *Passiflora*, pois estes processos são mais frequentes na morfogênese direta e indireta (OZAROWSKI; THIEMA, 2013).

Segundo George et al. (2008), as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas e o balanço destes dois irá conduzir o desenvolvimento do explante. Auxinas e citocininas podem ter efeitos antagônicos ou complementares, de acordo com a etapa de desenvolvimento da plântula (BIELACH et al., 2012). Auxinas, sendo um forte sinal à dominância apical, mantém a dormência de gemas laterais, funcionando em sentido oposto às citocininas nesse caso. Entretanto, a formação de raízes, induzida muitas vezes pela adição de auxina, podem promover o crescimento de brotos, já que são as raízes as principais fontes de citocininas (MULLER; LEYSER, 2011).

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando conseqüentemente de uma fonte exógena de carboidratos. A melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido) dependem principalmente da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação (FARIA et al., 2006). Segundo Aires et al. (2007), as vitaminas e as fontes carbônicas são indispensáveis para o crescimento celular *in vitro*, tornando-se necessário o estudo para obter-se um desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A concentração de sacarose, glucose ou outra fonte de carbono, bem como de reguladores de crescimento é especificada em cada trabalho (CALDAS et al. 1998).

Alguns investigadores sugeriram, no entanto, que as diferentes fontes de carbono podem ter efeitos diferentes na morfogênese do tecido (WELANDER et al, 1989;. YU; REED, 1993; LEMOS; BAKER, 1998;. SKREBSKY et al, 2004;. PATI et al, 2006; DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010), tornando-se necessário avaliar os seus efeitos individuais com cada espécie. De acordo com Mosaleeyanon et al. (2004), os efeitos dos tipos e concentrações de diferentes carboidratos sobre o crescimento e

desenvolvimento de culturas in vitro ainda são questões relevantes na micropropagação, especialmente entre espécies lenhosas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico e da escarificação na germinação de sementes, avaliar a multiplicação in vitro utilizando distintas concentrações e combinações de 6 – benzilaminopurina e ácido naftalenoacético, e também diferentes fontes e concentrações de carboidratos no cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



PROJETO DE PESQUISA PARA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CULTIVO IN VITRO DE MARACUJAZEIRO-AMARELO

ENG^a AGRÔNOMA SAVANA IRRIBAREM COSTA

Projeto de Dissertação sob a orientação do Prof. Dr. PAULO CELSO DE MELLO FARIAS, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

PELOTAS

RIO GRANDE DO SUL – BRASIL

JANEIRO DE 2015

1 IDENTIFICAÇÃO

Nome da mestranda: Savana Iribarem Costa

Orientador: Paulo Celso de Mello Farias

Coorientadora: Márcia Wulff Schuch

Departamento: Fitotecnia

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Titulação: Engenheira Agrônoma

Período da Pesquisa: Início: 2013 Término: 2015

Área de conhecimento: Ciências Agrárias

2 PROJETO DE PESQUISA

2.1 Título:

Cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo.

2.2 Equipe:

- Savana Iribarem Costa, Engenheira Agrônoma, Discente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, nível de mestrado, bolsista CAPES, UFPEL / FAEM.
- Paulo Celso de Mello Farias, Professor Orientador, Dr. Departamento de Fitotecnia, UFPEL / FAEM.
- Márcia Wulff Schuch, Professora Coorientadora, Dr^a. Departamento de Fitotecnia, UFPEL / FAEM.

2.3 Instituição:

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Departamento de Fitotecnia (DFt), Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fruticultura de Clima Temperado.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, com uma produção estimada em mais de 40 milhões de toneladas, depois da China e Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014).

A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional, sendo que a evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial. Contudo, a produtividade nacional ainda é baixa, com cerca de 14 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014), devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência de cultivares superiores.

A família Passifloraceae encontra-se largamente distribuída nos trópicos e inclui mais de 630 espécies das quais a maior parte pertence ao gênero *Passiflora* e habita as regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (OLIVEIRA, 1987; VANDERPLANK, 1996).

O maracujazeiro é uma espécie tropical, podendo apresentar boa produtividade em temperaturas relativamente baixas, em níveis de altitude de até 3.200 m e em regiões de latitude entre 0 até 35° (MENZEL et al., 1987; MENZEL; SIMPSON, 1994).

O Brasil possui condições climatológicas favoráveis para o cultivo do maracujazeiro e a cultura está presente em quase todas as regiões (MELO; MANICA; JUNQUEIRA, 2001). O país é, também, o maior produtor e consumidor do fruto e seus derivados (LIMA et al., 2013).

As espécies de destaque cultivadas comercialmente incluem o maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis), o maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims) e o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), sendo o último responsável por 95% dos pomares brasileiros em função da excelente qualidade do seu suco, vigor, produtividade, rendimento de suco e as excelentes condições ecológicas para seu cultivo (SÃO JOSÉ et al., 2000; MELETTI; BRUCKNER, 2001; OLIVEIRA et al., 2005; BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

A produção de mudas de alta qualidade torna-se uma estratégia para quem deseja tornar mais competitiva sua produção e aumentar a exportação. Segundo Minami et al. (1994), considera-se que 60% do sucesso da cultura está em implantá-

la com mudas de qualidade, que proporcionem maior pegamento no campo e bom desenvolvimento inicial.

O método convencional de propagação do maracujazeiro é via sementes, embora também possa ser realizada através de estaquia, mergulhia e enxertia. A multiplicação por sementes é a maneira usual para o estabelecimento de plantações comerciais da cultura, contudo, o seu uso resulta em uma grande variabilidade genética (RUGGIERO, 1987). As técnicas de cultura in vitro oferecem uma boa alternativa, pois pode-se produzir em grande escala clones selecionados de variedades com interesse comercial (FREITAS, 1997).

A cultura de tecidos e a micropropagação, em particular, são boas alternativas para a propagação tradicional, para a obtenção de um elevado número de plantas uniformes e saudáveis num curto período de tempo e num espaço reduzido. Além disso, a propagação in vitro proporciona um sistema rápido para multiplicar a progênie obtida por programas de melhoramento genético, permite o uso de genótipos monoembrônicos, como portaenxertos, e é também muito útil para o melhoramento e conservação de germoplasma (CHIANCONE; GERMANÀ, 2013). Em passifloras esta técnica representa uma excelente alternativa para a produção de material vegetal (ROCA; MROGINSKI, 1997; PEREA; TIRADO, 2011).

Diante disso, métodos de propagação vegetativa de plantas, como a micropropagação e o cultivo in vitro, podem propiciar uma produção de mudas em larga escala, garantindo plantas uniformes com boas condições fitossanitárias em um curto período de tempo.

3.1 Justificativa

Uma das principais aplicações práticas da cultura de tecidos é a propagação vegetativa in vitro ou micropropagação, cujas principais vantagens são: propagar material livre de doenças; acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa, e produzir material vegetal em espaço reduzido e em grande escala. Trabalhos recentes têm sido publicados com diversas espécies do gênero *Passiflora*, inclusive com espécies silvestres e nativas, como *Passiflora foetida* L., *Passiflora giberti* N.E. Brown, *Passiflora setacea* DC., dentre outras (SOARES et al., 2012; FARIA et al. 2007; SANTOS et al., 2010).

Para maiores avanços na expansão do cultivo, é necessário encontrar alternativas viáveis para a propagação vegetativa in vitro desta cultura visando otimizar protocolos de cultivos para obter-se produções de mudas clonadas de forma mais rápida e com qualidade.

3.2 Objetivo Geral:

Obtenção de protocolos para o cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.).

3.3 Objetivos Específicos:

- Avaliar o uso da micropropagação como método de propagação vegetativa para a cultura do maracujazeiro-amarelo;
- Testar a germinação in vitro de maracujazeiro-amarelo;
- Testar diferentes concentrações e combinações de BAP (6 – benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo;
- Testar diferentes fontes e concentrações de carboidratos na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo.

3.4 Fundamentação Teórica:

3.4.1 O Maracujazeiro

O maracujazeiro é pertencente à família Passifloraceae, que inclui mais de 630 espécies, das quais a maior parte pertence ao gênero *Passiflora* e habita as regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (OLIVEIRA, 1987; VANDERPLANK, 1996).

Dentre as mais de 600 espécies, encontra-se o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), variedade de maior importância econômica para o Brasil. Este gênero apresenta uma enorme variabilidade genética, sendo o Brasil um dos principais centros de dispersão dessa variabilidade (FERREIRA, 2005). As passifloráceas apresentam potencial para atender o mercado

de frutas frescas, sucos concentrados, apresentando também, valor ornamental e medicinal, sendo algumas com múltipla finalidade (VANDERPLANK, 2000).

Dentre as espécies cultivadas comercialmente no Brasil, o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), é o responsável por 95% dos pomares, devido à excelente qualidade e rendimento de suco, e também pelo vigor, produtividade, e as condições ecológicas para seu cultivo no país (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

A importância da cultura do maracujazeiro vem crescendo a cada ano, desde 1995 o Brasil vem se destacando como maior produtor. Os dados comparativos do IBGE (2012) referentes aos anos de 2001 a 2010 no país mostram um aumento da produção de 52,64% e da área colhida de 53,74%.

Porém, a maneira mais usual de propagação de maracujazeiro é via sementes, e com isso, o seu uso resulta em uma grande variabilidade genética (RUGGIERO, 1987). A propagação desta cultura também pode ser realizada através de estaquia, mergulhia e enxertia.

No Brasil, a multiplicação do maracujazeiro-amarelo é realizada principalmente por sementes, devido à facilidade e ao baixo custo, contudo, pode ocorrer a formação de pomares com indivíduos geneticamente diferentes quanto a caracteres de importância econômica, devido à segregação genética. A multiplicação por propagação vegetativa de plantas matrizes com características produtivas desejáveis reduz a segregação e, neste sentido, a micropropagação pode propiciar uma produção de mudas em larga escala, e garantindo plantas uniformes com boas condições fitossanitárias em um espaço de tempo menor.

3.4.2 Cultura de tecidos de maracujazeiro

A propagação clonal *in vitro* em *Passiflora* foi primeiramente descrita por NAKAYAMA (1966), utilizando a espécie *P. caerulea*, por meio da proliferação de gemas axilares. Segundo Garcia et al. (2011), em 1978 Moran-Robles testou diferentes meios de cultura para o crescimento de parte aérea e raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molíssima* (MORAN-ROBLES, 1978).

No caso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, a multiplicação vegetativa de gemas axilares foi obtida inicialmente por MORAN-ROBLES (1978). Duas fases foram necessárias para o estabelecimento das culturas, em que os melhores resultados

foram obtidos em presença de cinetina, sendo os explantes em seguida transferidos para o meio contendo ácido indol acético (AIA).

Segundo Ozarowski e Thiema (2013), a propagação de plantas medicinais in vitro do gênero *Passiflora* tem se mostrado viável para a produção comercial de plantas elite. Esta revisão mostrou que um sistema de regeneração de plantas, a partir de organogênese, utilizando BAP (6-benzilaminopurina) está prevalecendo atualmente em espécies de *Passiflora*, pois estes processos são mais frequentes na morfogênese direta e indireta.

Santos et al. (2010), obtiveram em sementes de maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.) uma percentagem de germinação de 46,8% utilizando-se 19,84 mg.L⁻¹ de AG₃ no meio de cultivo e realizando a escarificação na ponta da semente. Os mesmos autores observaram que com o aumento nas concentrações de AG₃, verificaram-se respostas crescentes quadráticas até o ponto de máximo, obtido com 19,84 mg.L⁻¹, seguidas com redução na porcentagem de germinação em concentrações superiores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local dos experimentos

Os experimentos serão conduzidos no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS.

A sala de crescimento é mantida a temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $27 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

4.2 Material Vegetal

As sementes utilizadas no experimento de germinação serão oriundas de frutos maduros de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), provenientes de plantas cultivadas no campo experimental do Centro Agropecuário da Palma (CAP), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, latitude $31^\circ52'00''$ S, longitude $52^\circ21'24''$ W GRW e 13 m de altitude.

4.3 Metodologia

4.3.1 Germinação in vitro de maracujazeiro-amarelo

Para o experimento de germinação in vitro, os tratamentos serão constituídos de seis doses de ácido giberélico (AG_3) (0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg.L^{-1}) e dois tratamentos físicos no tegumento (intacto e escarificado), totalizando 12 tratamentos.

O delineamento experimental será o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6×2 (dose x tratamento físico), com quatro repetições, onde cada repetição será constituída de cinco tubos de ensaio.

Os frutos serão cortados ao meio, onde se extrairá de sua cavidade central as sementes juntamente com os restos placentários, que serão despejados sobre uma

peneira de malha fina. Para a remoção completa do envoltório e do arilo das sementes, as mesmas serão friccionadas à mão e subsequentemente se promoverá uma lavagem em água corrente. Executada esta operação de extração dos envoltórios e do arilo das sementes, as mesmas serão distribuídas uniformemente sobre um papel toalha e deixadas secar à sombra por cinco dias.

Transcorridos os cinco dias, as sementes serão imersas em solução contendo as doses de AG₃ testadas no experimento, onde permanecerão por 24h. Após este período, as sementes serão primeiramente imersas por três minutos em solução de etanol a 70% sob agitação, objetivando-se a desinfestação superficial e surfactar a tensão superficial, e posteriormente, serão imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% com duas gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Na sequência, o material desinfestado será lavado três vezes com água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar, para posterior isolamento.

Feita a desinfestação, as sementes serão preparadas segundo os tratamentos físicos no tegumento em: escarificado (no lado oposto à região afilada das sementes seccionados com auxílio de bisturi) e intacto (o tegumento da semente não será submetido a tratamento físico). Passado este processo, as mesmas serão inoculadas em meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962, contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Serão utilizados tubos de ensaio (150x20 mm) contendo 10 mL de meio de cultura.

Os tubos serão fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e colocados em BOD no escuro a uma temperatura de 30 ± 2°C até o momento da germinação da semente. Quando germinadas, as sementes serão transferidas para sala de crescimento conforme descrição dada anteriormente.

As variáveis analisadas serão o percentual de sementes germinadas (G%) e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme a fórmula sugerida por Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ onde: G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

A contagem das sementes germinadas será realizada diariamente, considerando-se como germinadas, as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária, e ao final de 60 dias.

Os dados obtidos serão analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados serão submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos da escarificação serão comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$). Os efeitos das doses serão avaliados por modelos de regressão ($p \leq 0,05$).

4.3.2 BAP e ANA na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo

Neste experimento serão utilizados como explantes segmentos caulinares com uma gema e o ápice excisado, obtidos de plantas já estabelecidas in vitro.

Os tratamentos serão constituídos de cinco concentrações de 6 – benzilaminopurina (BAP) (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹) e a presença ou ausência de ácido naftalenoacético (ANA) (0 e 0,1 mg.L⁻¹), totalizando 10 tratamentos e mais um fator controle, sem adição de reguladores de crescimento.

O delineamento experimental será o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2 (concentrações de BAP x presença ou ausência de ANA), com seis repetições, cada repetição será constituída de um frasco com quatro explantes.

Os explantes serão inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, acrescidos ou não de reguladores, conforme os tratamentos. O pH do meio de cultivo será ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Serão utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco.

Os frascos serão fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e após a inoculação, os frascos permanecerão em sala de crescimento.

Aos 60 dias de cultivo, as variáveis analisadas serão número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Os dados obtidos serão analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados serão submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos do regulador de crescimento ANA (sem e com a presença) serão comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$), a DMS do teste será plotada no gráfico e as diferenças consideradas significativas quando não houver sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos das doses serão avaliados por modelo de regressão ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Carboidratos na multiplicação de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

Neste experimento também serão utilizados como explantes segmentos caulinares com uma gema e o ápice excisado, obtidos de plantas já previamente estabelecidas in vitro.

Os tratamentos serão constituídos de três fontes de carboidratos (sacarose, glicose e lactose) e quatro concentrações destes açúcares (0, 30, 59 e 88 mM.L⁻¹), totalizando 12 tratamentos.

O delineamento experimental será o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (fontes de carboidratos x concentrações de carboidratos), com cinco repetições, cada repetição será constituída de um frasco com quatro explantes.

Os explantes serão inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,25 mg.L⁻¹ de BAP e suplementados com as fontes de carbono de acordo com os tratamentos. O pH do meio de cultivo será ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Serão utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco.

Os frascos serão fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e após a inoculação, os frascos permanecerão em sala de crescimento.

Aos 60 dias de cultivo, as variáveis analisadas serão número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Os dados obtidos serão analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados serão submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos dos carboidratos serão comparados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), a DMS do teste será plotada no gráfico e as diferenças consideradas significativas quando não houver sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos das doses serão avaliados por modelo de regressão ($p \leq 0,05$).

5 ORÇAMENTO

a) Material de consumo:

DISCRIMINAÇÃO	Quantidade	Valor em Reais
Produtos para o meio de cultura e reagentes		3250,00
Vidrarias (tubos de ensaio, balão volumétrico, placas de petri, etc.)		1150,00
Luvras	2	25,00
SUBTOTAL		<u>4425,00</u>

b) Equipamentos e material permanente:

DISCRIMINAÇÃO	Quantidade	Valor em Reais
Ar condicionado	1	1500,00
Câmara de fluxo laminar, modelo miniflow I – Filtracom, área de trabalho de 950x500mm, 220W	1	4640,00
Autoclave 30L	1	1750,00
Conjunto de lâmpadas fluorescentes brancas frias	25	65,00
Prateleiras		450,00
SUBTOTAL		<u>8405,00</u>

c) Outras despesas:

DISCRIMINAÇÃO	Valor em Reais
Tinta preta para impressão	200,00
Fotocópias	50,00
Encadernações	40,00
Material bibliográfico	500,00
Impressões de banners	160,00
Viagens para congressos	1500,00
Inscrições em eventos	600,00
Divulgação dos resultados	500,00
Diárias	1700,00
Manutenção de equipamentos	1000,00
SUBTOTAL	<u>6250,00</u>

d) Total:

DISCRIMINAÇÃO	Valor em Reais
Material de consumo	4425,00
Equipamentos e Material permanente	8405,00
Outras despesas	6250,00
TOTAL	<u>19080,00</u>

e) Custo total:

DISCRIMINAÇÃO	Valor em Reais
Total	19080,00
Imprevistos: 10% a mais sobre o valor total	1908,00
TOTAL GERAL	<u>20988,00</u>

6 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	Desenvolvimento das atividades																											
	2013												2014												2015			
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A		
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
B			X	X	X	X	X																					
C							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
D								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
E																		X	X	X	X	X						
F																		X	X	X	X	X	X	X	X			
G																						X	X	X				
H																								X	X			
I																								X				

- a) Revisão de literatura
- b) Elaboração do projeto
- c) Instalação dos experimentos
- d) Avaliação dos experimentos
- e) Análise estatística dos dados
- f) Elaboração dos artigos científicos para publicação
- g) Elaboração da dissertação
- h) Publicação dos resultados
- i) Defesa da dissertação

7 DIVULGAÇÃO PREVISTA

Os trabalhos serão apresentados em congressos e/ou reuniões técnicas e os artigos científicos serão publicados em revistas científicas com corpo editorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 140p. 2014.

BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

CHIANCONE, B.; GERMANÀ, M. A. Micropropagation of Citrus spp. by organogenesis and somatic embryogenesis. **Methods in molecular biology**. v. 11013, p. 99-118, 2013.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; LEDO, C. A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento in vitro de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 41-51, 2005.

FREITAS, I. M. N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Actas de Horticultura**, Vilamoura, Portugal, v.18, p. 103-106, 1997.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 47-54, July 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M.A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. The Background: Springer, v.1, 709 p. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal – PAM. **Banco de Dados SIDRA**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 13 mar. 2014.

LIMA, A. de A.; CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. da S.; PIRES, M de M. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPMPF, 2013. (Boletim, 29). Disponível em: http://www.cnpmpf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/maracuja_29.pdf. Acesso em 20 out. 2014.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MINAMI, K.; TESSARIOLI NETO, J.; PENTEADO, S. R.; ESCARPARI FILHO, J. A. **Produção de mudas hortícolas de alta qualidade**. Piracicaba: ESAL/SEBRAE, 155 p., 1994.

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, p.345-385, 2001.

MELETTI, L. M. M.; OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 55p, 2010.

MELO, K. T.; MANICA, I.; JUNQUEIRA, N. T. V. Produtividade de seis cultivares de maracujazeiro-azedo durante três anos em Vargem Bonita, DF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 9, p. 1117-1125, set. 2001.

MENZEL, C. M.; SIMPSON, D. R. Passion fruit. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops: subtropical and tropical crops**. Boca Raton: CRC. v.2, p.225-241, 1994.

MENZEL, C. M.; SIMPSON, D. R.; WINKS, C. W. Effect of temperature on growth, flowering and nutrient uptake of three passion fruit cultivars under low irradiance. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 31, n. 3/4, p. 259-268, 1987.

MORAN-ROBLES, M. J. Multiplication végétative, in vitro, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. molissima* Bailey. **Fruits**, v. 33, p.693-699, 1978.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum.**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata**, v.42, p.63-74, 1966.

OLIVEIRA, E. J. de; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.331-333, 2005.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento. In: Ruggiero, C. (ed.) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, p. 218-246, 1987.

OZAROWSKI, M.; THIEMA, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23, p. 937-947. 2013.

PEREA, M.; TIRADO, A. **Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio**. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011.

ROCA, W.; MROGINSKI, L. **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 1997.

RUGGIERO, C. Considerações gerais sobre a cultura no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Jaboticabal: Ed. L. Summa. 315p., 1987.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C. de; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 1, p. 112-117, Feb. 2010.

SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; PIRES, M. M.; ANGEL, D. N.; SOUZA, I. V. B.; BOMFIM, M. P. **Maracujá – praticas de cultivo e comercialização**. Universidade Estadual do sudoeste da Bahia, Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Vitória da Conquista – Ba. 2000.

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.esp., p.138-142, 2012.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge Press, 224p., 1996.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3. ed. Cambridge: The MIT Press, 224p., 2000.

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LABORATÓRIO

O início do trabalho de laboratório ocorreu no mês de março de 2013 e foi concluído em dezembro de 2014.

Em 2014 foi realizado o experimento de germinação de maracujazeiro-amarelo, onde frutos maduros de maracujazeiro-amarelo foram colhidos, provenientes de plantas cultivadas no campo experimental do Centro Agropecuário da Palma (CAP), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os frutos foram cortados ao meio para extração das sementes, e após as mesmas foram colocadas para secar à sombra para posterior estabelecimento. Devido a uma das variáveis analisadas ser o índice de velocidade de germinação, foi necessária a avaliação diária com a contagem de sementes germinadas no dia. Porém a avaliação da porcentagem de germinação foi realizada aos 60 dias.

Posteriormente, foi realizado o experimento de multiplicação utilizando-se diferentes concentrações de BAP e a presença ou ausência de ANA. Os explantes utilizados foram de materiais já estabelecidos in vitro em testes anteriores, e as avaliações foram realizadas aos 60 dias de cultivo, contudo, a cada 15 dias verificou-se a possível contaminação de explantes.

Ainda em 2014, foi realizado outro experimento de multiplicação, sendo testadas diferentes fontes de carboidratos (sacarose, glicose e lactose) e concentrações. Neste experimento, assim como no anterior, as avaliações foram realizadas aos 60 dias de cultivo, sendo a cada 15 dias verificada a possível contaminação de explantes, onde foi observada baixa contaminação dos explantes.

As variáveis analisadas nos experimentos de multiplicação foram número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Concluídos os experimentos, foi realizada análise estatística, e a partir dos resultados foram gerados três artigos científicos, os quais são apresentados a seguir.

ARTIGO 1

Germinação in vitro de sementes maracujazeiro-amarelo

(Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Savana Irribarem Costa¹, Paulo Celso de Mello-Farias¹, Andrio Spiller Copatti¹, Igor Cavalcante de Albuquerque¹ e Márcia Wulff Schuch¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Fruticultura de Clima Temperado, Departamento de Fitotecnia, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, Rio Grande do Sul/Brasil. E mail: vana_irribarem@hotmail.com, mellofarias@yahoo.com.br, andriocopatti@gmail.com, igordealbuquerque@hotmail.com, marciaws@ufpel.tche.br

Resumo

Sementes de maracujazeiro apresentam dormência sob condições in vitro, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes. Sendo assim, objetivou-se analisar aspectos da germinação in vitro de sementes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), quanto à escarificação e o efeito do uso do regulador de crescimento ácido giberélico (AG₃). Sementes de frutos maduros foram lavadas em água corrente, friccionadas à mão e, posteriormente, colocadas para secar à sombra por cinco dias. Após foram imersas em solução contendo as doses de AG₃ (0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg.L⁻¹), onde permaneceram por

24h. Passado este período, foi feita a desinfestação e posteriormente as mesmas foram preparadas segundo os tratamentos físicos no tegumento (escarificado e intacto). As sementes foram inoculadas em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas e mantidas em BOD sob condições controladas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2 (dose x tratamento físico), com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de cinco tubos de ensaio. A avaliação foi realizada diariamente e ao final de 45 dias, sendo observados a porcentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG). Maiores médias para as variáveis analisadas foram obtidas com a utilização de escarificação das sementes utilizando-se 125 mg.L^{-1} e 0 mg.L^{-1} de AG_3 , respectivamente. A escarificação da extremidade de sementes proporciona maiores médias para as variáveis analisadas em sementes de maracujazeiro-amarelo. A imersão das sementes em solução contendo o regulador de crescimento AG_3 por 24h não obteve efeito sobre as variáveis analisadas.

Termos para indexação: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, escarificação, AG_3 , cultura de tecidos

In vitro germination of yellow passion fruit seeds

Abstract

Passion fruit seeds present dormancy under in vitro conditions, causing low and desuniform germination rates. Therefore, aimed to analyze the in vitro germination of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), scarification and the effect of growth regulator use gibberellic acid (GA_3). Seeds from mature fruits were washed in water, were rubbed by hands and then put to dry in the shade for five days. After that, they were immersed in a solution

containing GA₃ doses (0, 25, 50, 75, 100 and 125 mg.L⁻¹), where they remained for 24 hours. After, it was made disinfection and subsequently they have been prepared in accordance with physical treatments in the integument. (scarified and intact). The seeds were inoculated on ½ MS medium containing half the minerals and vitamins concentrations and maintained in growth chamber under controlled conditions. The experimental design was completely randomized in a factorial 6x2 (dose x physical treatment), with four replicates, each consisting of five test tubes. Evaluation was performed daily and after 45 days, percentage of germinated seeds and germination speed index was observed. The highest averages for variables analyzed were obtained with seeds scarification using 125 mg.L⁻¹ and 0 mg.L⁻¹ GA₃. Seed end scarification provides higher averages for the variables analyzed in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. The immersion of seeds in a solution containing growth regulator GA₃ for 24 hours got not effect on the variables analyzed.

Index terms: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, scarification, GA₃, tissue culture

Introdução

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, que inclui mais de 630 espécies, das quais a maior parte é representada pelo gênero *Passiflora* e habita as regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (OLIVEIRA, 1987; VANDERPLANK, 1996). Apesar disso, a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. é a responsável por 95% dos pomares no Brasil, devido à excelente qualidade e rendimento de suco, e também pelo vigor, produtividade, e as condições ecológicas para seu cultivo no país (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

Para algumas espécies de maracujazeiro, o estabelecimento dos bancos ativos de germoplasma (BAGs) in vitro tem sido bem sucedido, principalmente para espécies que

exigem produção de matrizes livres de vírus, com a vantagem da economia de espaço e simplificação nos procedimentos de intercâmbio e quarentena de plantas. Contudo, a falta de protocolos de regeneração *in vitro* não tem permitido, ainda, o uso extensivo deste processo de manejo de germoplasma (CARVALHO et al., 2012).

Plântulas germinadas *in vitro* podem constituir ótima fonte de explantes para estudos de morfogênese. Porém, as sementes do maracujazeiro apresentam dormência sob condições *in vitro*, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes (JUNGHANS; VIANA; JUNGHANS, 2006).

Dentre os reguladores de crescimento, as giberelinas (AGs) estão diretamente relacionadas à germinação de muitas sementes, uma vez que sua aplicação exógena promove a expressão dos genes que controlam a síntese das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares do endosperma, induzindo o crescimento do embrião e estimulando o processo germinativo (CARVALHO et al., 2012). Segundo Cardoso (2004), as AGs contrabalanceiam a inibição imposta pelo ácido abscísico, provocando um aumento endógeno de AGs, que torna evidente sua participação na superação da dormência das sementes. O tipo de AG mais utilizado *in vitro* é o ácido giberélico (AG₃) (BRAUN et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Algumas espécies da família Passifloraceae possuem dormência em suas sementes, ocasionada pelo mecanismo de controle da entrada de água para o seu interior, devido à dureza do tegumento, necessitando de tratamentos para sua superação (MORLEY-BUNKER, 1974), sendo importante estudar o processo de escarificação na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo.

Para a cultura do maracujazeiro, não existem informações suficientes sobre a germinação *in vitro*, demonstrando a importância deste tipo de estudo na contribuição para o sucesso da fase de estabelecimento *in vitro* que precede a micropropagação por meio de

explantes derivados de sementes. O objetivo foi estudar aspectos da germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro-amarelo quanto à presença ou ausência de escarificação e utilização do regulador de crescimento AG₃.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2014.

Os tratamentos foram constituídos de seis doses de ácido giberélico (AG₃) (0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg.L⁻¹) e dois tratamentos físicos no tegumento (íntacto e escarificado), totalizando 12 tratamentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2 (dose x tratamento físico), com quatro repetições, onde cada repetição foi constituída de cinco tubos de ensaio, contendo uma semente cada tudo.

As sementes utilizadas foram oriundas de frutos maduros de maracujazeiro-amarelo seleção 'Ovalado Grande' da EPAGRI, provenientes de plantas cultivadas no campo experimental do Centro Agropecuário da Palma (CAP), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, latitude 31°52'00" S, longitude 52°21'24" W e 13 m de altitude.

Os frutos foram cortados ao meio, onde se extraiu de sua cavidade central as sementes juntamente com os restos placentários, que foram despejados sobre uma peneira de malha fina. Para a remoção completa do envoltório e do arilo das sementes, as mesmas foram friccionadas à mão e subsequentemente se promoveu lavagem em água corrente. Executada

esta operação de extração dos envoltórios e do arilo das sementes, as mesmas foram distribuídas uniformemente sobre um papel toalha e deixadas secar à sombra por cinco dias.

Transcorridos os dias, as sementes foram imersas em solução contendo as doses de AG₃ testadas no experimento, onde permaneceram por 24h. Após este período, as sementes foram primeiramente imersas por três minutos em solução de etanol a 70% sob agitação, objetivando-se a desinfestação superficial, e posteriormente, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% com duas gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Na sequência, o material desinfestado foi lavado três vezes com água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar, para posterior isolamento.

As sementes foram preparadas segundo os tratamentos físicos no tegumento em: escarificado (no lado oposto à região afilada das sementes, seccionadas com auxílio de bisturi) e intacto (o tegumento da semente não foi submetido a tratamento físico), sendo as mesmas inoculadas em meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962, contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (150x20 mm) contendo 10 mL de meio de cultura.

Os tubos foram fechados com papel alumínio, selados com filme de PVC transparente e colocados em BOD no escuro a uma temperatura de 30 ± 2°C até o momento da germinação da semente. Durante o período de avaliação do experimento, não observou-se contaminação das sementes.

As variáveis analisadas foram o percentual de sementes germinadas (G%) aos 45 dias, e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme a fórmula sugerida por Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, onde: G1, G2, Gn = número de sementes

germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Para a avaliação do IVG, a contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente, considerando-se como germinadas, as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária, até os 45 dias.

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Para as variáveis de germinação e IVG foi necessária a transformação $\sqrt{(x+0,5)}$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos da escarificação foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$). Os efeitos das doses foram avaliados por modelos de regressão linear ($p \leq 0,05$), conforme segue:

$$y = a + bx;$$

$$y = y_0 + ax + bx^2;$$

onde: y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = doses de AG₃ (mg.L⁻¹).

Resultados e Discussão

Não houve interação entre os fatores testados, apenas nos fatores isoladamente.

Observou-se diferença significativa quanto à escarificação, uma vez que as sementes que não foram escarificadas não germinaram mesmo com a adição de AG₃, até o período final da avaliação (Tabela 1).

Com relação à porcentagem de germinação, a maior média foi obtida quando foi feita a escarificação da extremidade das sementes e utilizada a dose de 125 mg.L⁻¹ de AG₃ (Figura 1A). Verificou-se que, para as sementes escarificadas, não houve diferença estatística entre as doses de AG₃ testadas, exceto para a dose de 50 mg.L⁻¹ que obteve a menor média. Carvalho et al. (2012) verificaram em relação à porcentagem de germinação, a maior média quando foi realizada a escarificação da extremidade de sementes secas com pinça e bisturi, sendo que para as sementes frescas, não houve diferença estatística entre a escarificação da extremidade da semente com lixa e com a utilização de pinça e bisturi.

A ausência de escarificação não proporcionou a germinação das sementes, independente das doses de AG₃. Estes resultados corroboram com os encontrados por Carvalho et al. (2012), onde observou-se que a ausência de escarificação proporcionou as menores taxas de germinação e até mesmo a ausência de germinação, independentes das concentrações de AG₃ testadas. Baseado nos resultados deste trabalho pode-se inferir que o maracujazeiro-amarelo possui dormência extra-embriônica, superada por ação mecânica.

Neste trabalho, as sementes foram capazes de germinar independentemente da adição do regulador de crescimento AG₃, não constituindo assim um caso de dormência embriônica, porém mostrando-se necessária a escarificação. Esses resultados são contrários aos de autores que observaram incremento na germinação das sementes de várias espécies do gênero *Passiflora* quando da utilização de reguladores de crescimento (FERREIRA, 1998; ZONTA et al., 2005; FERRARI et al., 2008; LIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2010; COSTA et al., 2010), inclusive com a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* (FERREIRA, 1998). Entretanto, a necessidade do rompimento do tegumento para ocorrência da germinação verificada neste

trabalho, corrobora com trabalhos realizados com Passifloráceas (ZONTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

Os maiores índices de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos para sementes com escarificação de suas pontas, com as concentrações de 125 mg.L^{-1} e 0 mg.L^{-1} de AG_3 (Figura 1B), não diferindo estatisticamente. As demais doses apresentaram comportamento semelhante, sendo a menor média observada quando foi utilizado a dose de 50 mg.L^{-1} . Quanto à escarificação (Tabela 1), houve diferença significativa entre os tratamentos físicos realizados no tegumento, não havendo sementes germinadas para o cálculo do IVG nas sementes que não foram escarificadas. Carvalho et al. (2012), observaram maiores médias para IVG em sementes frescas e secas com escarificação de suas pontas. Assim como os resultados obtidos para percentagem de germinação in vitro, os mesmos autores verificaram que a ausência de escarificação propiciou a velocidade mais lenta para sementes frescas e secas.

Em experimento realizado por Lima et al. (2006), o índice de velocidade de emergência (IVE) de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi de 8,85 dias, sendo inferior as demais espécies, que apresentaram uma menor velocidade de emergência. Confirmando os resultados obtidos no presente trabalho, a partir dos resultados de Lima et al. (2006), verifica-se que, para tornar a germinação in vitro de *P. edulis* f. *flavicarpa* viável, devem-se utilizar métodos de superação de dormência.

Conclusões

1. A escarificação da extremidade de sementes proporciona maiores médias para a germinação e índice de velocidade de germinação de *P. edulis* f. *flavicarpa* independente da dose de AG_3 .

2. A imersão das sementes em solução contendo o regulador de crescimento AG₃ por 24h não afeta a germinação in vitro de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

- BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.566-576, 2008.
- BRAUN, H.; LOPES, J.C.; SOUZA, L.T.; SCHMILDT, E.R.; CAVATTE, R.P.Q.; CAVATTE, P.C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.
- CARDOSO, V.J.M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 386-408, 2004.
- CARVALHO, M.A. de F.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; PORTO, J.M.P.; HERRERA, R.C.; STEIN, V.C. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, maio/jun. 2012.
- COSTA, C.J.; SIMÕES, C.O.; COSTA, A.M. **Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação de dormência de sementes de *Passiflora setacea* D. C.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010, 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 271).
- FERRARI, T.B.; FERREIRA, G.; MISCHAN, M M.; PINHO, S.Z. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): fases e efeito de reguladores vegetais. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 65-74, set. 2008.

FERREIRA, G. **Estudo da embebição e do efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloraceas**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998, 139p.

JUNGHANS, T.G.; VIANA, A.J.C.; JUNGHANS, D.T. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá *gibertii* com e sem tegumento parcialmente removido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006, Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRuralRJ, p. 191, 2006.

LIMA, A. de A.; CALDAS, R.C.; SANTOS, V. da S. Germinação e crescimento de espécies de maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 125-127, 2006.

LIMA, C.S.M.; BETEMPS, D.L.; TOMAZ, Z.F.P.; GALARÇA, S.P.; RUFATO, A.R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, jan./dez. 2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177,1962.

MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010, 55p.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. **Some aspects of seed dormancy with reference to Passiflora spp. and other tropical and subtropical crops**. London: University of London, 1974. 43 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento. In: RUGGIERO, C. (ed.) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, p. 218-246, 1987.

ROUSSEEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C.; SANTOS, F.C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge Press, 1996, 224p.

ZONTA, J.B.; SILVA, I.C.; DIAS, M.A.; CÔRREA, N.B.; LOPES, J.C. Germinação de sementes do maracujazeiro (*Passiflora alata* Dryand) submetidas a tratamentos físicos no tegumento e a pré-embebição em ácido giberélico (GA₃). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 5., 2005, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos, 2005.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2015.

Dose (mg.L AG ₃)	Escarificação	
	Sem	Com
	G%	
0	0,00±0,00 *	85,00±9,57 ^{1/}
25	0,00±0,00 *	65,00±9,57
50	0,00±0,00 *	40,00±0,00
75	0,00±0,00 *	60,00±0,00
100	0,00±0,00 *	65,00±9,57
125	0,00±0,00 *	90,00±5,77
	IVG	
0	0,00±0,00 *	0,29±0,02
25	0,00±0,00 *	0,18±0,05
50	0,00±0,00 *	0,08±0,00
75	0,00±0,00 *	0,20±0,02
100	0,00±0,00 *	0,19±0,02
125	0,00±0,00 *	0,32±0,03

^{1/} Média de quatro determinações ± erro padrão. ^{ns} e * Não-significativo e significativo, respectivamente, pelo teste t (p≤0,05) comparando a escarificação dentro de cada dose.

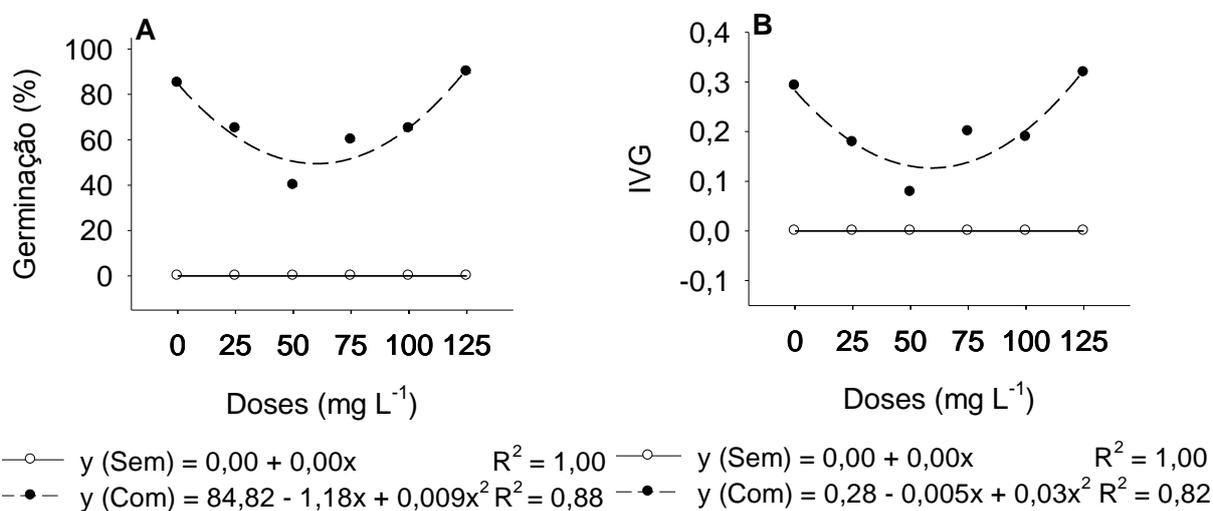


Figura 1 Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2015.

ARTIGO 2

Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo

(Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Savana Iribarem Costa¹, Paulo Celso de Mello-Farias¹, Andrio Spiller Copatti¹, Igor Cavalcante de Albuquerque¹ e Márcia Wulff Schuch¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Fruticultura de Clima Temperado, Departamento de Fitotecnia, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, Rio Grande do Sul/Brasil. E mail: vana_irribarem@hotmail.com, mellofarias@yahoo.com.br, andriocopatti@gmail.com, igordealbuquerque@hotmail.com, marciaws@ufpel.tche.br

Resumo

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas da Universidade Federal de Pelotas, RS. Segmentos caulinares com uma gema foram inoculados em meio de cultura MS, acrescidos ou não dos reguladores 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0 e 0,1 mg.L⁻¹), em diferentes combinações, sendo após mantidos em sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2

(concentrações de BAP x presença ou ausência de ANA), com seis repetições, sendo cada constituída de um frasco com quatro explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados o número médio de folhas, de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm). A ausência dos reguladores promoveu maior comprimento de brotações, da maior raiz e número de raízes. A concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP sem a adição de ANA em meio de cultivo MS apresentou maior número de folhas e a mesma dose combinado com ANA, promoveu o maior número de brotações de *P. edulis* f. *flavicarpa* na multiplicação in vitro.

Termos para indexação: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, micropropagação, reguladores de crescimento, cultura de tecidos

Growth regulators on in vitro multiplication of yellow passion fruit

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of growth regulators on in vitro multiplication of yellow passion fruit. The study was conducted at Fruit Plant Propagation Laboratory at Federal University of Pelotas, RS. Stem segments with a bud were inoculated on MS medium added or not with growth regulators 6 – benzylaminopurine (BAP) (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 mg.L^{-1}) and naphthalene acetic acid (NAA) (0 and 0.1 mg.L^{-1}), according to the treatment. Then, they were kept in a growth chamber. Experimental design was completely randomized in a factorial 5x2 (BAP x presence or absence of NAA) with six replicates, each consisting of a bottle with four explants. After 60 days of cultivation number of leaves, shoots, average shoot length (cm), average number of roots and average length of roots (cm) were evaluated.

The absence of regulatory promoted higher length of shoots, the largest root and root number. The concentration of 0.5mg.L^{-1} BAP without the addition of NAA in MS medium showed higher number of leaves and the same dose combined with ANA, promoted the highest number of shoots of *P. edulis* f. *flavicarpa* on in vitro multiplication.

Index terms: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, micropropagation, growth regulators, tissue culture

Introdução

O Brasil é o maior produtor de maracujazeiro, e também o maior consumidor do fruto e seus derivados (LIMA et al., 2013). Porém, apresenta baixa produtividade (cerca de $14\text{ t.ha}^{-1}\text{.ano}^{-1}$) (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014), atribui-se a isso problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência de cultivares superiores.

As espécies *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener são as mais cultivadas comercialmente no país. Contudo, a espécie de destaque é a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, sendo responsável por 95% dos pomares brasileiros em função de seus atributos agrônômicos desejáveis e as excelentes condições ecológicas para seu cultivo (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

A propagação de plantas in vitro do gênero *Passiflora* tem se mostrado viável para a produção comercial de plantas elite. Mostrando que um sistema de regeneração de plantas, a partir da organogênese, utilizando 6-benzilaminopurina (BAP) está prevalecendo atualmente em espécies de *Passiflora*, pois estes processos são mais frequentes na morfogênese direta e indireta (OZAROWSKI; THIEMA, 2013).

As citocininas desempenham um papel crucial em muitas fases do crescimento e desenvolvimento das plantas e, quando adicionados ao meio de cultivo in vitro, promovem a

superação da dominância apical quebrando a dormência das gemas laterais, estando, assim, relacionadas com a indução de brotos (GEORGE et al., 2008).

O BAP é uma citocinina comercialmente disponível, e tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo. A fonte de citocinina, assim como sua concentração, são os fatores que mais influenciam o processo de desenvolvimento *in vitro* (CORDEIRO et al., 2004).

As auxinas, por sua vez, são utilizadas em meio de cultivo geralmente para indução de raízes adventícias. Na micropropagação, o enraizamento é uma fase de suma importância, em virtude do envolvimento das raízes na aquisição de água e de nutrientes, entre outros (SAINI et al., 2013).

Segundo George et al. (2008), as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas e o balanço destes dois irá conduzir o desenvolvimento do explante. Auxinas e citocininas podem ter efeitos antagônicos ou complementares, de acordo com a etapa de desenvolvimento da plântula (BIELACH et al., 2012). Auxinas, sendo um forte sinal à dominância apical, mantém a dormência de gemas laterais, funcionando em sentido oposto às citocininas nesse caso. Entretanto, a formação de raízes, induzida muitas vezes pela adição de auxina, podem promover o crescimento de brotos, já que são as raízes as principais fontes de citocininas (MULLER; LEYSER, 2011).

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos reguladores de crescimento (BAP e ANA) na multiplicação *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2014.

Os explantes utilizados neste experimento foram oriundos de material já estabelecido de maracujazeiro-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), e utilizou-se segmentos caulinares com uma gema e o ápice excisado.

Os tratamentos foram constituídos de cinco concentrações de BAP (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹) e a presença ou ausência de ANA (0 e 0,1 mg.L⁻¹), totalizando 10 tratamentos e mais um fator controle (testemunha), sem adição de reguladores de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2 (concentrações de BAP x presença ou ausência de ANA), com seis repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com quatro explantes.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, acrescidos ou não de reguladores, conforme os tratamentos. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco.

Os frascos foram fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e após a inoculação, permaneceram em sala de crescimento com temperatura constante de 25 ± 2°C e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol.m⁻².s⁻¹.

Aos 60 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e

suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Para as variáveis número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz foi necessária a transformação $\sqrt{(x+0,5)}$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos do regulador de crescimento (sem e com a presença de ANA) foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$), a DMS do teste foi plotada no gráfico e as diferenças consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos das doses foram avaliados por modelo de regressão linear ($p \leq 0,05$), conforme segue:

$$y = a + bx;$$

onde: y : variável resposta; a : valor máximo estimado para a variável resposta; b : inclinação da reta ou curva; x : doses de BAP (mg.L^{-1}). Quando não ocorreu ajuste de equação, as doses foram comparadas com intervalos de confiança a 95%, esses intervalos foram plotados no gráfico e as diferenças foram consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.

Resultados e discussão

Verificou-se um maior incremento no número de folhas na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e na ausência de ANA (Figura 1A), porém não houve diferença significativa entre as demais doses sem auxina. Observou-se que todas as concentrações testadas de BAP com a ausência de ANA diferiram da testemunha, indicando a necessidade do regulador BAP para obter maiores valores para esta variável. Resultado semelhante foi encontrado por Soares

(2013), onde obteve a maior média por explante utilizando $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em espécies do gênero *Passiflora*. As concentrações de $0,5$ e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP diferiram significativamente quanto à presença de auxina, entretanto as demais doses não apresentaram diferença. A menor média foi observada na presença de auxina com a dose mais elevada de citocinina.

Em relação ao número de brotações (Figura 1B), a dose que apresentou maior média foi na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP combinado com ANA, não diferindo significativamente da mesma dose na ausência da auxina. Ao realizar a comparação entre as doses observou-se que os explantes inoculados nos meios contendo BAP não diferiram entre as outras concentrações. Verificou-se que comparando a presença ou ausência de ANA no meio de cultivo, apenas a concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentou diferença significativa, o que não foi observado para as demais doses. Soares (2013), utilizando segmentos nodais de plântulas de espécies nativas, observou que a espécie *P. setacea* apresentou a maior média na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, seguida de *P. cincinnata* na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e, novamente, *P. setacea* em meio contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, não encontrando diferença significativa em relação as diferentes concentrações de BAP. Pacheco et al. (2012) obtiveram maiores médias para número de brotações em *P. alata* em meio MSM nas concentrações de 2 e 4 mg.L^{-1} de BAP.

Na figura 1C, observou-se o maior comprimento de brotações quando não foi utilizado os reguladores de crescimento, diferindo estatisticamente das doses testadas. Comparando entre as doses, o maior valor foi observado na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP na ausência de ANA, porém, não diferiu da mesma dose na presença da auxina. Verificou-se que na ausência de ANA, a menor dose não apresentou diferença da dose de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, porém, diferiu das demais. Na presença da auxina, não foi observado diferença entre as doses, diferindo apenas da testemunha que obteve maior valor. Comparando entre as doses sem ANA, verificou-se um decréscimo de acordo com o aumento das concentrações, sendo de

74,85% na dose $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em comparação com a menor dose. Resultados semelhantes foram encontrados por Soares (2013) que obteve maior média na ausência do regulador, e também, observou comportamento linear decrescente, na qual maiores concentrações de BAP determinaram menores comprimentos de brotos. Para a espécie *P. foetida*, em um trabalho realizado por Anand et al. (2012), o maior comprimento de brotações foi obtido em meio MS suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP combinado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.

Para as variáveis número médio de raízes (Figura 1D) e comprimento médio da maior raiz (Figura 1E) só ocorreu significância estatística para aplicação de BAP, A testemunha apresentou maior média para número e comprimento de raízes, diferindo das concentrações testadas. Ao comparar as doses, $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP não diferiram entre si, mas a dose de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentou diferença em relação às demais e caracterizou o maior número médio de raízes entre as doses. Para o comprimento médio da maior raiz, as doses não diferiram entre si, porém observou-se um decréscimo nas doses $1,5$ e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP de respectivamente 49,57 e 99,14%, em comparação à menor concentração. Em trabalho realizado por Anand et al. (2012), os autores observaram uma maior indução de raízes em seguimentos nodais de *P. foetida* quando cultivado em meio MS suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA combinado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB.

Conclusões

1. A ausência dos reguladores promoveu maior comprimento de brotações, da maior raiz e número de raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa* na multiplicação in vitro.
2. A concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP sem a adição de ANA em meio de cultivo MS apresentou maior número de folhas.

3. A dose de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP combinado com ANA, promoveu o maior número de brotações.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

ANAND, S.P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 87-91, 2012.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 140p. 2014.

BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, 2012.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos in vitro de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, v. 10, n. 1, 2004.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.de. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. The Background: Springer, v. 1, 709 p., 2008.

LIMA, A. de A.; CARDOSO, C.E.L.; SOUZA, J. da S.; PIRES, M de M. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPMF, 2013. (Boletim, 29). Disponível em:

<http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/maracuja_29.pdf>. Acesso em 20 out. 2014.

MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J.C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 55p, 2010.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 7, p. 1203-1212, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OZAROWSKI, M.; THIEMA, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23, p. 937-947. 2013.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, n. 1, p. 42-47, Sept. 2012.

ROUSSEEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection**, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P.K. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A.C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação in vitro de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, 2002.

SOARES, A.L.C. **Multiplicação, enraizamento e conservação in vitro de maracujazeiro nativo**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Lavras, UFLA/MG, 2013.

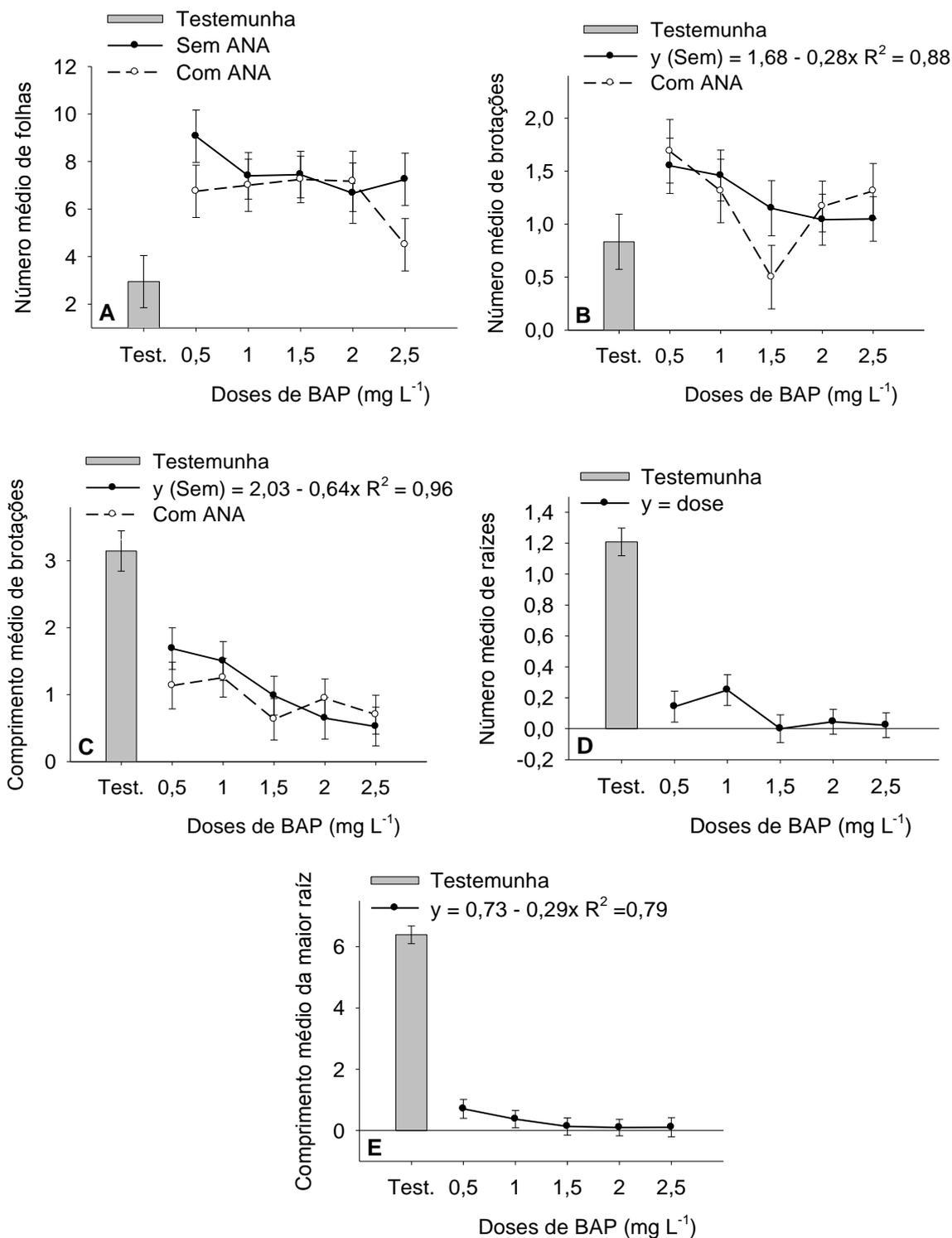


Figura 1 - Número médio de folhas (A), de brotações (B), comprimento médio de brotações (C), número médio de raízes (D) e comprimento médio da maior raiz (E) de segmentos caulinares com uma gema de maracujazeiro-amarelo avaliados as 60 dias. Pelotas-RS, 2015. (As barras verticais representam a DMS do teste t ($p \leq 0,05$) ou os intervalos de confiança a 95%).

ARTIGO 3

Fontes e concentrações de carbono na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo

(Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Savana Iribarem Costa¹, Paulo Celso de Mello-Farias¹, Andrio Spiller Copatti¹, Igor Cavalcante de Albuquerque¹ e Márcia Wulff Schuch¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Fruticultura de Clima Temperado, Departamento de Fitotecnia, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, Rio Grande do Sul/Brasil. E mail: vana_irribarem@hotmail.com, mellofarias@yahoo.com.br, andriocopatti@gmail.com, igordealbuquerque@hotmail.com, marciaws@ufpel.tche.br

Resumo

No cultivo in vitro, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando consequentemente de uma fonte exógena de carboidratos. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose e lactose) e concentrações na multiplicação in vitro de maracujazeiro-amarelo. Segmentos caulinares com uma gema e ápices excisados de maracujazeiro-amarelo foram inoculados em meio de cultura MS, acrescidos ou não de carboidratos (sacarose, glicose e lactose) nas concentrações de 0, 30, 59 e 88 mM.L⁻¹, e mantidos em sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado

em esquema fatorial 3x4 (fontes de carboidratos x concentrações de carboidratos), com cinco repetições, sendo cada uma constituída de um frasco com quatro explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados número médio de folhas, de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm). A glicose na concentração de 88 mM.L⁻¹ apresentou maiores médias para números de folhas e brotações. A sacarose na concentração 88 mM.L⁻¹ promoveu maiores médias para comprimento de brotações, de raízes e número de raízes em explantes de maracujazeiro-amarelo cultivados em meio MS.

Termos para indexação: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, micropropagação, sacarose, glicose, lactose

Sources and carbon concentrations in vitro multiplication of yellow passion fruit

Abstract

Under in vitro conditions, plants partially lose autotrophism, requiring an exogenous source of carbohydrates. The objective of this work was to evaluate the effect of distinct carbon sources (sucrose, glucose and lactose) and concentrations in vitro multiplication of yellow passion fruit. Stem segments with a bud and the excised apex were inoculated on MS medium added or no carbohydrates (sucrose, glucose and lactose) at concentrations of 0, 30, 59 and 88 mM.L⁻¹, and they were kept in a growth chamber. Experimental design was completely randomized in a 3x4 factorial (sources of carbohydrates x carbohydrate concentrations), with five replicates, each consisting of a bottle with four explants. After 60 days of cultivation, average number of leaves, average of shoots, average shoot length (cm), average number of roots and average length of roots (cm) were evaluated. Glucose at a concentration of 88 mM.L⁻¹ showed the highest averages for number of leaves and shoots. Sucrose added to

the concentration of 88 mM.L⁻¹ showed higher averages for length of shoots, roots and number of roots in explants of yellow passion fruit grown on MS medium.

Index terms: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, micropropagation, sucrose, glucose, lactose

Introdução

A produção de maracujá concentra-se na América do Sul (Brasil, Equador, Peru e Colômbia) e em alguns países africanos. Nos países Sul Americanos, predomina a produção do maracujá-amarelo, porém nos países africanos e na Austrália há predomínio da produção do maracujá-roxo. Em 2010 a produção brasileira de maracujá foi em torno de 920 mil toneladas, representando aproximadamente 70% do maracujá produzido mundialmente, com uma área plantada de 62 mil hectares (IBGE, 2012).

Devido à importância da cultura no País, sendo o maior produtor da fruta, uma alternativa promissora de propagação é a cultura de tecidos, cuja principal meta é a produção massal de indivíduos geneticamente idênticos e fisiologicamente uniformes, com desenvolvimento normal e com plantas livres de doenças e patógenos (PEREA; TIRADO, 2011).

No cultivo in vitro, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando conseqüentemente de uma fonte exógena de carboidratos. A melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido) dependem principalmente da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação (FARIA et al., 2006). Segundo Aires et al. (2007), as vitaminas e as fontes carbônicas são indispensáveis para o crescimento celular in vitro, tornando-se necessário o estudo para obter-se um desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A concentração de sacarose, glicose ou outra fonte de carbono, bem como de reguladores de crescimento é especificada em cada trabalho (CALDAS et al. 1998).

A sacarose tem sido amplamente utilizada como uma fonte de carbono para estudos *in vitro*, e é geralmente considerada como a melhor fonte de carbono para a promoção do crescimento e diferenciação. Alguns investigadores sugeriram, no entanto, que as diferentes fontes de carbono podem ter efeitos diferentes na morfogênese do tecido (WELANDER et al, 1989;. YU; REED, 1993; LEMOS; BAKER, 1998;. SKREBSKY et al, 2004;. PATI et al, 2006; DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010), tornando-se necessário avaliar os seus efeitos individuais com cada espécie. De acordo com Mosaleeyanon et al. (2004), os efeitos dos tipos e concentrações de diferentes carboidratos sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas *in vitro* ainda são questões relevantes na micropropagação, especialmente entre espécies lenhosas.

Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose, glicose e lactose) e concentrações na multiplicação *in vitro* de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2014.

Os tratamentos foram constituídos de três fontes de carbono (sacarose P.A., glicose anidra P.A. e lactose monohidratada P.A.) e quatro concentrações destes açúcares (0, 30, 59 e 88 mM.L⁻¹, sendo 10,27, 20,20 e 30,12g.L⁻¹ de sacarose, 5,41, 10,63 e 15,85g.L⁻¹ de glicose e 10,81, 21,26 e 31,71g.L⁻¹ de lactose), totalizando 12 tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 (fontes de carbono x concentrações de carbono), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com quatro explantes.

Foram utilizados como explantes segmentos caulinares com uma gema e ápices excisados, obtidos de plantas já previamente estabelecidas in vitro de maracujazeiro-amarelo.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,25 mg.L⁻¹ de BAP, e suplementados com as fontes de carbono de acordo com os tratamentos. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco.

Os frascos foram fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e após a inoculação, os mesmos permaneceram em sala de crescimento com temperatura constante de 25 ± 2°C e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol.m⁻².s⁻¹.

Aos 60 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e

suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Para as variáveis número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz foi necessária a transformação $\sqrt{(x+0,5)}$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos do tipo de carboidrato foram comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), a DMS do teste foi plotada no gráfico e as diferenças consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos das doses foram avaliados por modelos de regressão polinomiais ($p \leq 0,05$), conforme segue:

$$y = a + bx;$$

$$y = y_0 + ax + bx^2,$$

onde: y : variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a : valor máximo estimado para a variável resposta; b : inclinação da reta ou curva; x : doses dos carboidratos (mM). Quando não ocorreu ajuste de equação, as doses foram comparadas com intervalos de confiança a 95%, esses intervalos foram plotados no gráfico e as diferenças foram consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.

Resultados e Discussão

Ao comparar as fontes de carbono para a variável número médio de folhas (Figura 1A), apenas a glicose na concentração 88 mM.L^{-1} diferiu significativamente das demais, apresentando maior média. Nas outras doses, não houve diferença significativa entre os açúcares. Observou-se um comportamento linear crescente quando utilizou-se glicose, para sacarose e lactose, verificou-se um comportamento diferenciado, onde ocorreu um pico

máximo estimado até dose 50 e 55 mM.L⁻¹, respectivamente, e posterior decréscimo. Com relação ao número de folhas emitidas, Faria et al. (2006), utilizando gemas laterais de plantas de *P. giberti*, encontraram os maiores valores, independentemente da concentração de sorbitol utilizada, os maiores valores quando foi adicionada sacarose ao meio de cultura. Sendo que na concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose, combinada com a adição de 20 g.L⁻¹ de sorbitol, promoveu a formação de um maior número de folhas.

Para número médio de brotações (Figura 1B), a glicose na concentração de 88 mM.L⁻¹ apresentou maior média, diferindo estatisticamente dos demais carboidratos. Os açúcares, sacarose e lactose, apresentaram resultados semelhantes entre si, não diferindo estatisticamente. Ao realizar a comparação entre as doses, utilizando como fonte de carbono glicose na concentração 88 mM.L⁻¹, observou-se um acréscimo de 46,32% quando comparado a dose zero. Resultados semelhantes foram observados por Nicoloso et al. (2003), que verificaram que tanto na metade da dose (15 g.L⁻¹) como naquela usualmente recomendada (30 g.L⁻¹), o efeito da sacarose igualou-se ao da lactose, onde houve o menor número de brotações, apesar de ter ocorrido aumento desse parâmetro pelo acréscimo dessas duas fontes de carboidratos. Ainda segundo os mesmos, percebeu-se que ao contrário do observado para sacarose, que influenciou de modo positivo e linear, a lactose em dose superior a 30 g.L⁻¹ reduziu o número de brotações.

Na Figura 1C, verificamos que a maior média para comprimento de brotações foi observada para sacarose na dose de 88 mM.L⁻¹, diferindo significativamente das outras fontes de carbono. Nas concentrações 0, 30 e 59 mM.L⁻¹ não houve diferença significativa entre os açúcares. Ao realizar a comparação entre as doses, verificou-se que os explantes cultivados em meio MS com as doses de 59 e 88 mM.L⁻¹ dos açúcares, apresentaram acréscimo no comprimento de brotações de 88,59 e 92,05% para sacarose, 76,62 e 83,02% para glicose, e 83,49 e 88,29% para lactose, respectivamente.

Faria et al. (2006), observaram que os meios de cultura suplementados com 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, combinados com 10 e 20 g.L⁻¹ de sorbitol, proporcionaram maiores comprimentos das brotações, sendo a maior média encontrada na combinação de 15 g.L⁻¹ de sacarose com 10 g.L⁻¹ de sorbitol. Segundo os mesmos autores, estes dados indicam que a presença da sacarose no meio de cultivo foi fundamental para manter o desenvolvimento das plantas. Nicoloso et al. (2003), verificaram que a altura média das brotações foi maior quando a sacarose foi a fonte de carbono utilizada, nas doses de 30, 45 e 60 g.L⁻¹, que registraram valores de, respectivamente, 6,3 e 8,0 cm nesses parâmetros, demonstrando que o aumento da dose de sacarose favorece a elongação das brotações, permitindo um maior aproveitamento dos segmentos nodais durante a repicagem.

Para as variáveis número médio de raízes (Figura 1D) e comprimento médio de raízes (Figuras 1E), os açúcares apresentaram resultados semelhantes, onde as maiores médias foram observadas para meio de cultura contendo 88 mM.L⁻¹ de sacarose. As doses 59 e 88 mM.L⁻¹ com sacarose diferiram significativamente dos outros açúcares. Faria et al. (2006) constataram que os tratamentos com sacarose no meio de cultivo favoreceram o desenvolvimento de raízes, com exceção daqueles combinados com 40 g.L⁻¹ de sorbitol. Santana (2003), estudando os fatores que afetam o enraizamento in vitro em brotações e estacas de *Annona glabra* L., verificou que os maiores percentuais de enraizamento ocorreram em meio de cultura suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose.

Conclusões

1. A fonte de carbono glicose na concentração de 88 mM.L⁻¹ apresentou maiores médias para números de folhas e brotações em cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo.

2. A sacarose na concentração 88 mM.L^{-1} promoveu maiores médias para comprimento de brotações, de raízes e número de raízes em explantes cultivados em meio MS.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

- AIRES, P.S.R.; CARVALHO, J.M.F.C.; PIMENTEL, N.W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.
- BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. v.1 . p 87-132, 1998.
- DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J.A.T. Micropropagation of apple: a review. **Scientia Horticulturae Biotechnology Advances**, Ottawa, v.28, n.4, p.462-488, 2010.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de C.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 8 dez 2014.
- LEMOS, E.E.P.; BAKER, D.A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.25, n.2, p.105-112, 1998.
- MOSALEEYANON, K.; SHA-UM, S.; KIRDMANADEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.103, p.51-63, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomertata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, jan./fev., 2003.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Ottawa, v.24, p.94-114, 2006.

PEREA, M.; TIRADO, A. **Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio**. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011.

ROUSSEEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection**, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sucrose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

WELANDER, M.; WELANDER, N.T.; BRACKMAN, A.S. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.64, n.3, p.361-366, 1989.

YU, X.; REED, B.M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.12, n.5, p.256-259, 1993.

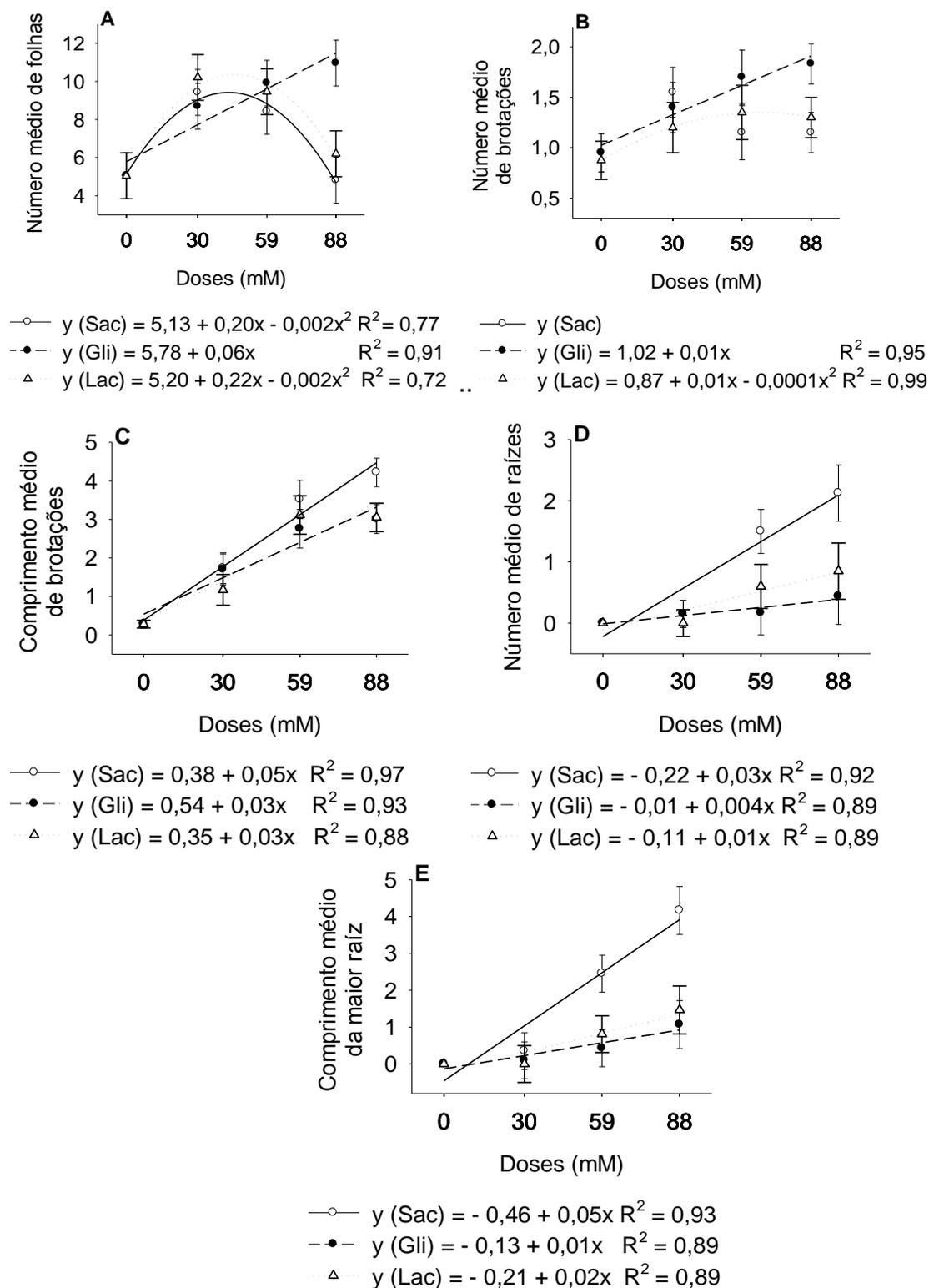


Figura 1 - Número médio de folhas (A), de brotações (B), comprimento médio de brotações (C), número médio de raízes (D) e comprimento médio da maior raiz (E) em função de diferentes doses de sacarose (Sac), glicose (Gli) e lactose (Lac) de explantes de maracujazeiro-amarelo. Pelotas-RS, 2015. (As barras verticais representam a DMS do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) ou os intervalos de confiança a 95%).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa pode-se concluir que:

- A escarificação da extremidade de sementes de maracujazeiro-amarelo favorece um aumento na germinação e no índice de velocidade de germinação.
- A imersão das sementes em solução contendo AG_3 por 24h não afeta a germinação de maracujazeiro-amarelo.
- A ausência dos reguladores (testemunha) promove maior comprimento de brotações, da maior raiz e número de raízes.
- A concentração de $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de ANA combinado com a dose $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, favorece maior número de brotações em maracujazeiro-amarelo na multiplicação in vitro.
- A fonte de carbono glicose na concentração de 88mM.L^{-1} promove maiores médias para números de folhas e brotações e a sacarose na mesma dose promove maiores médias para comprimento de brotações, de raízes e número de raízes em explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivados em meio MS.
- Concentrações mais altas de lactose favorecem o aparecimento de clorose nas folhas de maracujazeiro.
- Doses mais altas de glicose e sacarose devem ser testadas.

REFERÊNCIAS

AIRES, P.S.R.; CARVALHO, J.M.F.C.; PIMENTEL, N.W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2014. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 140p. 2014.

BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

BRAUN, H.; LOPES, J.C.; SOUZA, L.T.; SCHMILDT, E.R.; CAVATTE, R.P.Q.; CAVATTE, P.C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.

BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, 2012.

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

CARDOSO, V.J.M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 386-408, 2004.

CARVALHO, M.A. de F.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; PORTO, J.M.P.; HERRERA, R.C.; STEIN, V.C. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com

escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, maio/jun. 2012.

DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J.A.T. Micropropagation of apple: a review. **Scientia Horticulturae Biotechnology Advances**, Ottawa, v.28, n.4, p.462-488, 2010.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de C.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FREITAS, I. M. N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Actas de Horticultura**, Vilamoura, Portugal, v.18, p. 103-106, 1997.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.de. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. The Background: Springer, v. 1, 709 p., 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 8 dez 2014.

JUNGHANS, T.G.; VIANA, A.J.C.; JUNGHANS, D.T. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá *gibertii* com e sem tegumento parcialmente removido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006, Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRuralRJ, p. 191, 2006.

LEMOS, E.E.P.; BAKER, D.A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.25, n.2, p.105-112, 1998.

MELETTI, L. M. M.; OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 55p, 2010.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: T.A. Queiroz, 132 p., 1995.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. **Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp. and other tropical and subtropical crops.** London: University of London, 1974. 43 p.

MOSALEEYANON, K.; SHA-UM, S.; KIRDMANADEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.103, p.51-63, 2004.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 7, p. 1203-1212, 2011.

OZAROWSKI, M.; THIEMA, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23, p. 937-947. 2013.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Ottawa, v.24, p.94-114, 2006.

PEREA, M.; TIRADO, A. **Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio.** Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011.

RUGGIERO, C. Considerações gerais sobre a cultura no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Jaboticabal: Ed. L. Summa. 315p., 1987.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C.; SANTOS, F.C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sucrose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

WELANDER, M.; WELANDER, N.T.; BRACKMAN, A.S. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.64, n.3, p.361-366, 1989.

YU, X.; REED, B.M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.12, n.5, p.256-259, 1993.