

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

LUCAS BERNARDO PIGARI

**PROPAGAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E TAMANHO DE PARCELAS
EXPERIMENTAIS DE ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO**

Ilha Solteira

2018

LUCAS BERNARDO PIGARI

**PROPAGAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E TAMANHO DE PARCELAS
EXPERIMENTAIS DE ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. Especialidade: Sistema de Produção

Prof. ^a Dr. ^a Glaucia Amorim Faria
Orientador

Prof. ^o Dr. ^o Antonio Flávio Arruda Ferreira
Prof. ^a Dr. ^a Ana Patrícia Bastos Peixoto
Co-orientadores

Ilha Solteira

2018

FICHA CATALOGRÁFICA


Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P628p Pigari, Lucas Bernardo.
Propagação, estabelecimento in vitro e tamanho de parcelas experimentais de espécies de maracujazeiro / Lucas Bernardo Pigari. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2018
95 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2018

Orientador: Glauca Amorim Faria
Co-orientador: Antonio Flávio Arruda Ferreira
Inclui bibliografia

1. Maracujá. 2. Micropropagação. 3. Tamanho de parcelas.


João Rosa Barbosa,
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Diretor Técnico
CRB 8-5642

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Propagação, estabelecimento in vitro e semeadura de parcelas experimentais de espécies de maracujazeiro

AUTOR: LUCAS BERNARDO FIGARI

ORIENTADORA: GLAUCIA AMORIM FARIA


COORDENADOR: ANTONIO FLÁVIO ARRUDA FERREIRA

COORDENADORA: ANA PATRICIA BASTOS PEIXOTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GLAUCIA AMORIM FARIA
Departamento de Matemática / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. KÁTIA LUCIENE MALTONI
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Dr. JOSÉ CARLOS CAVICHOLI
Polo Regional Alta Paulista-APTA / Adamantina/SP

Ilha Solteira, 22 de agosto de 2018

DEDICO

Dedico a Deus por me dar fé e força para conseguir concluir meus objetivos, ao meu pai Almir Cezer Pigari e minha mãe Mitzi Bernardo Pigari pela paciência, amor e carinho, e a minha namorada Vitória Moura Faria pelo amor, companheirismo, paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades em minha vida e por me fazer chegar até aqui, ao meu pai Almir Cezer Pigari e minha mãe Mitzi Bernardo Pigari e meus irmãos Pedro Bernardo Pigari e Felipe Bernardo Pigari pelo apoio de sempre e me ajudarem a perseverar.

À minha namorada Vitória Moura Faria pela companhia, carinho e atenção em todos estes momentos em que estive no mestrado.

Aos amigos que moram comigo em especial Rafael Mazzini Ramalho e Wellington Tortorelli.

Aos membros do laboratório de Estatística aplicada (LEA), especialmente a Beatriz Garcia Lopes pelo auxílio e amizade.

Aos membros do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) pela ajuda, especialmente Luiz Henrique Silvério Junior e Beatriz Cardoso Ribeiro

Aos meus orientadores: Professora Doutora Glaucia Amorim Faria, Professor Doutor Antonio Flávio Arruda Ferreira e Professora Doutora Ana Patrícia Bastos Peixoto pela paciência, ajuda e ensinamentos.

À Professora Doutora Kátia Luciene Maltoni, em especial, por todo apoio, carinho, cuidado e dedicação.

Ao Dr. José Carlos Cavichioli pelo auxílio e presença na banca de defesa de dissertação.

A FEIS-UNESP e a Capes por me dar a estrutura necessária para essa pesquisa.

PROPAGAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E TAMANHO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS DE ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO

Autor: Lucas Bernardo Pigari

Orientador: Prof Dra Gláucia Amorim Faria

Co-Orientador: Prof Dr Antônio Flavio Arruda Ferreira

Co-Orientador: Prof Dra Ana Patrícia Bastos Peixoto

RESUMO

A passicultura vem sofrendo com patógenos, os quais limitam muito a produtividade e a viabilidade do cultivo de maracujá. Dentre os principais patógenos estão a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.), a mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) e a morte-prematura (*Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*), esta é a principal doença e gargalo da cultura, limitando o tempo da passicultura de perene para anual. Alternativas que visem a melhoria deste cenário devem ser estudadas, deste modo os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar a germinação, contaminação endógena e exógena em sementes de maracujá-azedo comercial (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*); b) avaliar o estabelecimento *in vitro* de *Passiflora caerulea*, *Passiflora foetida* e *Passiflora tenuifila*, através do Teste exato de Fisher, Teste do Qui-Quadrado e Índice Kappa para as variáveis de natureza qualitativas e Teste de Tukey e análise de variância para as quantitativas; c) encontrar o tamanho ótimo de parcelas para experimentos em casa de vegetação com *Passiflora setacea* e *Passiflora alata* utilizando o método da máxima curvatura modificado. Conclui-se que na germinação o substrato orgânico pode substituir o meio MS, que a giberelina teve um efeito positivo na germinação e que o melhor tratamento físico de semente foi a escarificação. No estabelecimento, as espécies *Passiflora caerulea* e *Passiflora tenuifila* apresentaram melhores resultados que a *Passiflora foetida*, indicando que se adaptaram melhor ao protocolo utilizado; as estatísticas utilizadas no trabalho independente da natureza da variável, inferiram os mesmos resultados, mostrando que os testes não paramétricos são promissores. O tamanho ótimo de parcela variou de acordo com as espécies, *Passiflora setacea* obteve valores de 3 a 7 unidades básicas e *Passiflora alata* de 4 a 5 unidades básicas.

Palavras-chave- *Passiflora caerulea*. *P. foetida* e *P. tenuifila*, *P. setacea*, *P. alata*.
Germinação. Morfogênese. Precisão experimental.

ABSTRACT

Passiculture has been suffering with a several pathogens problems, which limit the productivity and viability of the passion-fruit culture. Between the mainly pathogens are the antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.), the bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) and the premature-death (*Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*), this one, the mainly bottleneck disease of the crop, limiting time of passiculture from perennial to annual. Alternatives aiming at improving of this scenario must been study, that way the objectives of this study was: evaluate the germination, endogen and hexogen contamination of commercial passion-fruit seed (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in factorial design of 10x3 (10 substrates and 3 physical treatments); evaluate the *in vitro* establishment of *Passiflora caerulea*, *Passiflora foetida* and *Passiflora tenuifila*, through Fisher's Exact Test, Chi-Square Test and Cohen's Kappa for the qualitative variables and Tukey's Test and variance analysis for the quantitatives; find the optimum plot sizes for the experiments on green house with *Passiflora setacea* and *Passiflora alata*. Concluded that for the germination the organic substrate can substitute the MS medium, that the gibberellin had a positive effect in germination and that the best physical treatments for seed was scarification. In establishment, the species *Passiflora caerulea* and *Passiflora tenuifila* shown better results than *Passiflora foetida* pointing that those one adapts itself better to the utilized protocol; the statistics used on the research do not rely on the nature of the variable, inferred the same results, showing that the non-parametric tests are promising. The optimum size plot varied according to the species, *Passiflora setacea* had values from 3 to 7 basic units and *Passiflora alata* from 4 to 5 basic units.

Keywords- *Passiflora caerulea*. *P. foetida*, *P. tenuifila*, *P. setacea*, *P. alata*.
Germination. Morphogenesis. Experimental precision.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Centro de origem do gênero <i>Passiflora</i>	17
Figura 2	- Volume comercializado de maracujá em toneladas (CEAGESP-SP).....	19
Figura 3	- Produção brasileira de maracujá em toneladas, por região fisiográfica.....	20
Figura 4	- Mancha bacteriana na folha e no fruto de maracujá.....	22
Figura 5	- Fruto (A), caule (B) e folha (C) de maracujazeiro com antracnose.	23
Figura 6	- Foto de folha (A) uma espaldeira de maracujazeiro (B) infestada pela morte-prematura.....	23
Figura 7	- A esquerda (A) colmo infectado por <i>Fusarium</i> sp. e a direita (B) colmo sadio de maracujá. Colmo de maracujá com a rachadura provocada pela doença (C).....	24
Figura 8	- Flor (A), folha (B) e fruto (C) <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i>	26
Figura 9	- Flor (A), folha (B) e fruto (C) de <i>Passiflora foetida</i> Linn.....	27
Figura 10	- Foto da flor (A), fruto (B) e folha (C) de <i>Passiflora setacea</i> D.C.....	28
Figura 11	- Foto da flor (A), folha (B) e fruto (C) <i>Passiflora tenuifila</i>	28
Figura 12	- Fotos da flor (A), folha (B) e fruto (C) de <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	29
Figura 13	- Sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) intactas (A), lixadas (B) e cortadas (C) na região oposta a emissão da radícula. Ilha Solteira/SP, 2017.....	51
Figura 14	- Contaminação endógena (A e B) e exógena (C) em sementes	54

de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)
em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP,
2017.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Produção brasileira de maracujá em 2016.....	20
Tabela 2	- Composição do maracujá por 100 gramas de parte comestível; centesimal, minerais, vitaminas e colesterol.....	24
Tabela 3	- Composição do meio MS para macronutrientes, micronutrientes e compostos orgânicos.....	34
Tabela 4	- Teste Exato de Fisher para contaminação endógena de tipos de sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.....	53
Tabela 5	- Teste Exato de Fisher para contaminação exógena de tipos de sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.....	55
Tabela 6	- Teste Exato de Fisher para germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.....	57
Tabela 7	- Análise de variância para germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.....	59
Tabela 8	- Germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.....	61
Tabela 9	- Índice Kappa, teste Qui-quadrado (p valor) e Teste Exato de Fisher (p valor) para contaminação exógena, contaminação endógena e desenvolvimento dos explantes entre as espécies de <i>Passiflora</i> . Ilha Solteira/SP, 2018.....	74
Tabela 10	- Análise de variância e teste de Tukey para as variáveis score de desenvolvimento (SCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF) e score de coloração (COR) no estabelecimento in vitro de espécies de <i>Passiflora</i> . Ilha Solteira/SP, 2017.....	75
Tabela 11	- Estimativas dos parâmetros da relação $CV_{(x)} = a/x^b$, pelo método da máxima curvatura modificada, coeficiente de variação (CV	85

%), valor da abscissa em que ocorre o ponto de máxima curvatura (X_c), coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis analisadas das espécies *P. Setacea* e *P. Alata*.....

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO	20
2.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA.....	21
2.3	EXIGÊNCIAS EDAFOCLIMÁTICAS	24
2.4	PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA	25
2.4.1	Morte prematura	25
2.4.2	Mancha bacteriana	26
2.4.3	Antracnose	27
2.5	CARACTERÍSTICAS NUTRACÊUTICAS E FÍSICOQUÍMICAS DO MARACUJÁ.....	28
2.6	DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	29
2.6.1	<i>Passiflora edulis</i> Sims	30
2.6.2	<i>Passiflora foetida</i> Linn	30
2.6.3	<i>Passiflora setacea</i> D.C.	31
2.6.4	<i>Passiflora tenuifila</i>	32
2.6.5	<i>Passiflora alata curtis</i>	33
2.6.6	<i>Passiflora caerulea</i>	33
2.7	PRODUÇÃO DE MUDAS E MÉTODOS PROPAGATIVOS.....	34
2.7.1	Sementes	34
2.7.2	Estacas	34
2.7.3	Enxertia	35
2.8	CULTURA DE TECIDOS	35
2.8.1	Germinação <i>In Vitro</i>	36
2.8.2	Estabelecimento <i>In Vitro</i>	37
2.8.3	Multiplicação <i>In Vitro</i>	38
2.8.4	Conservação <i>In Vitro</i>	38
3	INTRODUÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	64
7	INTRODUÇÃO	72
8	MATERIAL E MÉTODOS	73
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
10	CONCLUSÃO	80

11	INTRODUÇÃO.....	86
12	MATERIAL E MÉTODOS	87
13	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
14	CONCLUSÃO	93
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior centro de origem do gênero *Passiflora*, contendo mais de 150 espécies, destas 60 são consumidas por seres humanos. Com boa rentabilidade para o produtor, o gênero *Passiflora* também é utilizado na produção de cosméticos, fármacos com grande utilização nutracêutica, sendo uma grande fonte de vitamina A e C e minerais (OLIVEIRA et al., 1994).

Difundido em todas as regiões brasileiras é encontrado tanto em quintais de casa como em pomares comerciais. A espécie de maracujá com maior destaque comercial mundial é a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* ou maracujá-azedo como é mais comumente conhecido em seu país de origem, o Brasil.

A produção desta espécie chega a 95% da área plantada com pomares de maracujá no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE (2016) a produção brasileira de maracujá-azedo em 2016 foi de 703.489 t, com uma área plantada de 49.889 hectares e produtividade média no país de 14,10 t ha⁻¹.

No estado de São Paulo e outros estados brasileiros, a passicultura vem sofrendo um decréscimo em área de plantio, a cultura do maracujá antes perene agora passa a ser anual, devido à grande incidência de patógenos como a morte-prematura, a fusariose e outras doenças que acometem a cultura transformando-se num gargalo para produção da mesma.

A produtividade do maracujá é em torno de 14t/há/ano, sendo esta baixa produtividade influenciada por dois fatores principais, a utilização de sementes não oriundas de seleção genética e limpas de patógenos, o outro é o desemprego das tecnologias adequadas para a cultura, como correção de solo, adubação, polinização manual, podas de condução e utilização de defensivos (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

Diversos patógenos são de ocorrência no maracujazeiro, porém, o de maior importância é um conjunto de fungos e bactérias que causam a morte-prematura, dentre estes encontram-se *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, *Fusarium solani*, *Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae*, os quais promovem o rompimento dos tecidos na região do colo da planta, interrompendo o fluxo de seiva ou até mesmo chegando a separar a parte radicular da parte aérea, com o rompimento dos tecidos nesta região, levando a planta a morte (NAKAMURA, 1987; OLIVEIRA, 1987).

A germinação das sementes de maracujá-azedo passa por uma série de processos morfogênicos e metabólicos que promoverão o desenvolvimento do embrião em plântula (COLL et al., 1992). A absorção de água pela semente e seu consequente aumento de volume acarretam no rompimento do tegumento da semente, sob condições adequadas de água, temperatura e oxigênio, o embrião recomeçará as atividades do eixo embrionário, aumentando o tamanho e número de células para o crescimento da radícula e da plúmula, levando assim a emergência da plântula (LIMA et al., 2004).

A técnica da cultura de tecidos busca a isenção de patógenos endógenos e a multiplicação correta de segmentos nodais, para servir de base às pesquisas futuras, e avaliar metodologias de estabelecimento de espécies que tem como característica a resistência a doenças. Esta técnica é muito utilizada em plantas ornamentais, frutíferas, olerícolas e florestais, possuindo como grande vantagem a utilização de espaços reduzidos e curto período para obtenção de mudas (ANDRADE et al., 2000; GEORGE, 1993; LAMEIRA et al., 1997). A micropropagação, é a mais usual dessas técnicas por oferecer manutenção genotípica e fenotípica.

O uso de hormônios vegetais exógenos, prática comum na cultura de tecidos, produzem efeitos importantes na planta, como crescimento ou até mesmo senescência de folhas. Neste trabalho utilizou-se o ácido giberélico, também conhecido como GA3 (giberelina exógena), a giberelina possui função na germinação de sementes e divisão/alongamento celular (DE CARVALHO et al., 2016).

A utilização de meios nutritivos na propagação *in vitro* serve para o fornecimento de nutrientes e vitaminas essenciais para controlar o padrão de desenvolvimento. O meio nutritivo tem como base a exigência nutricional das plantas com algumas adaptações devido à restrição da atmosfera da planta cultivada em meio de cultura, o meio MS (MURASHIGE; SKOOGI, 1962) é o mais utilizado na cultura de tecidos, onde a fração inorgânica foi detectada como a fração que mais ajuda no desenvolvimento das plantas (LIMA et al., 2004).

A escolha do número de repetições e do tamanho ideal da parcela experimental se constitui num método racional para a experimentação. Uma vez que esse número varia em função do experimento, pois depende de uma série de fatores, local onde o experimento é realizado, variabilidade genética do material

trabalhado. Teoricamente, quanto maior o número de repetições, maior é a precisão, uma vez que o aumento do número dos graus de liberdade do resíduo assegura maiores estimativas dos efeitos dos tratamentos. Mas essa relação não é linear, esse aumento leva inicialmente a uma diminuição do erro experimental até certo ponto, a partir do qual o ganho com precisão é muito pequeno. Dentre os métodos mais utilizados para determinar o tamanho ótimo de parcelas os mais utilizados são o Método de Inspeção Visual da Curvatura Máxima e Método da Curvatura Máxima.

Nesse contexto, os objetivos do trabalho foram: a) avaliar a germinação das sementes de maracujá tratadas de diferentes formas e por meio de processos de escarificação mecânica sob a influência de diversos meios de cultura, por meio de técnicas estatísticas específicas que respeitem a natureza das variáveis qualitativas e quantitativas. b) avaliar o protocolo para estabelecimento *in vitro* de *Passiflora tenuifila*, *Passiflora foetida*, *Passiflora caerulea*, por meio de técnicas estatísticas específicas que respeitassem a natureza das variáveis com características qualitativas e quantitativas. c) calcular o tamanho ótimo de parcelas para experimentos em casa de vegetação com a cultura do maracujazeiro utilizando o método da máxima curvatura modificado.

REFERÊNCIAS

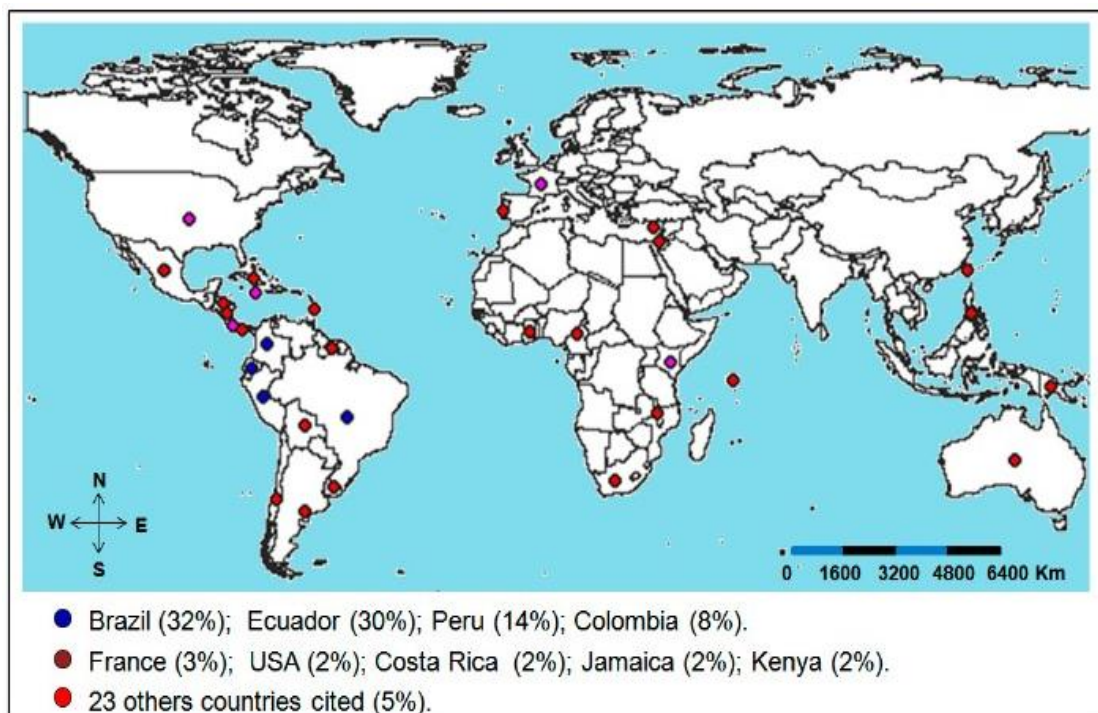
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan. mar. 2000.
- Carvalho, S. L. C. de. Maracujá-amarelo: recomendações técnicas para cultivo. In: COLL, J.B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S.; TAMÉS, R. S. **Fisiologia Vegetal**. Madrid: Piramide, 1992. 662 p.
- DE CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, Minas Gerais v. 7, n. 1, p. 30-60, 2016.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2016.
- GEORGE, E. F. Plant propagation and micropropagation. **Plant propagation by tissue culture**, Basingstoke, v. 1, p. 37-66, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2016.
- LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L. Efeito de thiadizuron na indução e manutenção de calos de erva baleeira (*Cordia verbenácea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 47-49, 1997.
- LIMA, A. et al. **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 394 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Madison, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAKAMURA, K. Murcha e morte. In: RUGGIERO, C. **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 160-161.
- OLIVEIRA, J. C de et al. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p. 27-37.
- OLIVEIRA, J. C de. Melhoramento genético. **Maracujá**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 218-246, 1987.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO

O maracujazeiro está dentro da divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem das *Malpighiales*, família *Passifloraceae* e dentro desta família se encontram 12 gêneros distintos e o gênero *Passiflora* é o com maior destaque comercial e nutracêutico o maior centro de origem (figura 1) das espécies da família é a América do Sul, com destaque ao Brasil, porém também se encontram algumas espécies nos Estados Unidos, China, Argentina e Austrália (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

Figura 1 – Centro de origem do gênero *Passiflora*.



Fonte: Ferreira (2005). adaptado

Passifloraceae engloba cerca de 23 gêneros e dentro destes gêneros 600 espécies no total, dentre estas aproximadamente 120 ocorrem no Brasil e 38 em São Paulo (BERNACCI, 2003). O gênero *Passiflora* é o mais comum dentre a família *Passifloraceae*, possui em torno de 400 espécies, a palavra maracujá tem origem

etimológica do tupi-guarani e seu significado é *comida feita em cuia*, fazendo jus ao formato dos frutos e como o mesmo é consumido *in natura*.

No gênero *Passiflora* na Colômbia o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*), maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.), maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) e o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) tem destaque entre as espécies consumidas pelo homem (SILVA et al., 2017).

As plantas da família *Passifloraceae* são trepadeiras com vigor, folhas abauladas ou digitadas, bordos em formato de serra. Grande diferença anatomia das folhas da mesma planta, sendo as folhas basais maiores que as florais e do ápice (JORGENSEN et al., 1984).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CULTURA

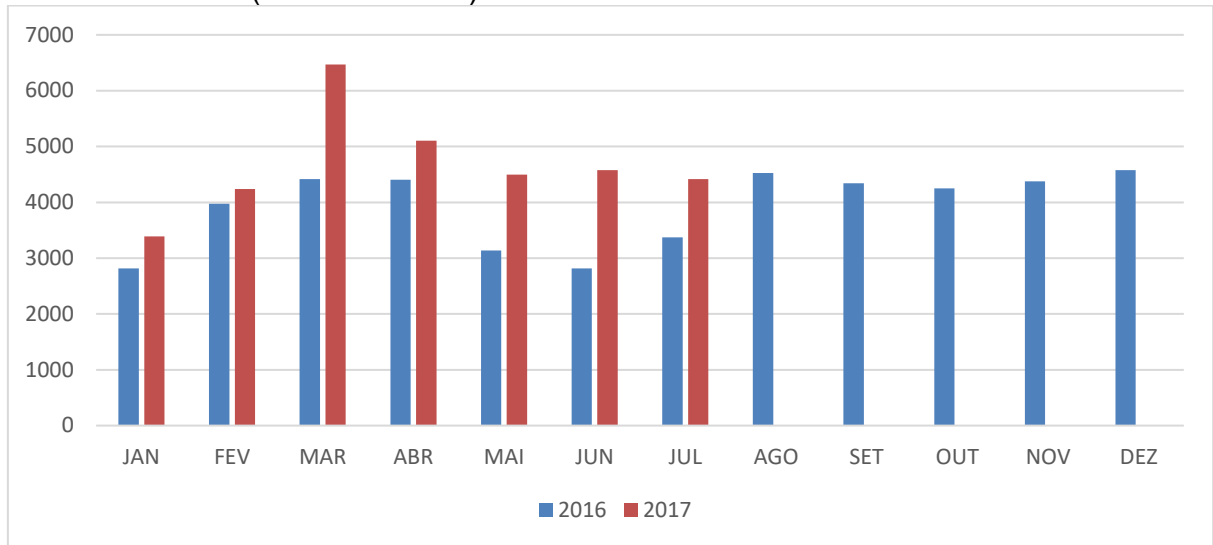
O Brasil é o maior consumidor e produtor mundial da cultura do maracujazeiro, é responsável por 32% da produção mundial, seguido pelo Equador com 30%, Peru com 14% e Colômbia com 8%, os outros países tem 3% ou menos da produção mundial. No Brasil essa cultura tem grande importância, principalmente para os pequenos produtores e no Nordeste do país (FERREIRA, 2005).

A espécie mais produzida e comercializada no Brasil é o maracujá-azedo. O maracujá-roxo (*P. edulis* f. *edulis*) é o mais produzido na África-do-Sul e Austrália. Na Colômbia a importância econômica e social do maracujá também é muito grande, o país tem cultivo de 6 espécies: *P. edulis* f. *edulis*, *P. tripartita*, *P. edulis*, *P. quadrangularis*, *P. maliformis*, e *P. ligularis*, esta última espécie tem destaque na comercialização e é comumente conhecida como *granadilla* (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

Embora com histórico de boa produtividade para esta cultura o Brasil vem enfrentando problemas, pois em muitos estados onde a cultura bianual a tri anual agora passou a ser anual por conta das inúmeras doenças que afetam a cultura na atualidade.

O volume de maracujá comercializado em toneladas (t) entre janeiro de 2016 e julho de 2017 foi de 79.699 t, tendo março e abril apresentado as maiores produções da cultura (figura 2).

Figura 2 – Volume comercializado de maracujá em toneladas no CEASA – São Paulo (CEAGESP-SP).

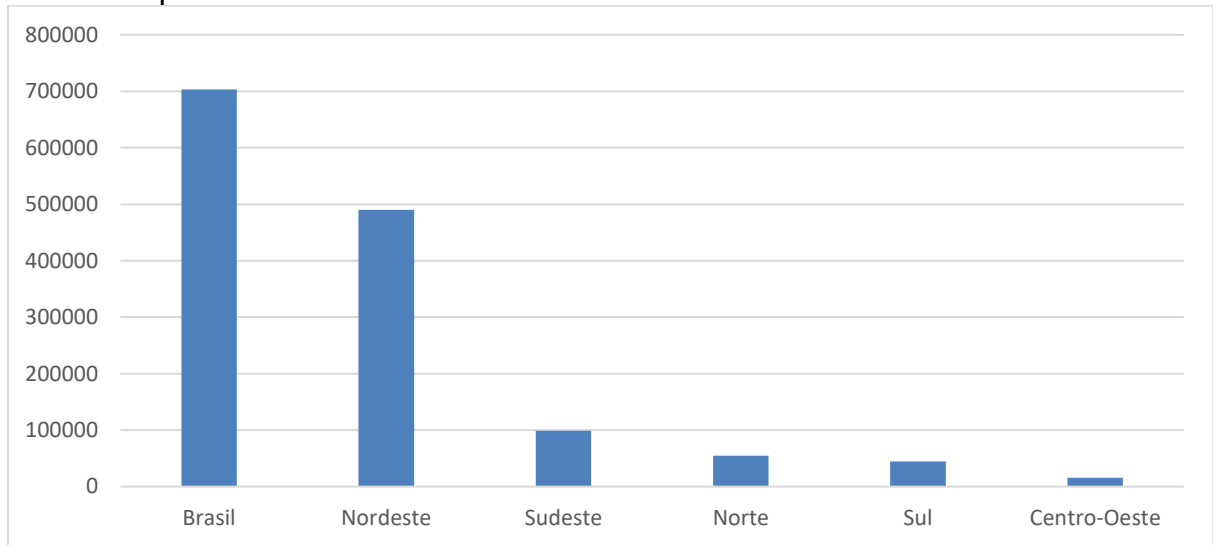


Fonte: Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo- CEAGESP (2017).

A região nordeste comercializa quatro vezes mais que as outras regiões, mostrando que o Vale do São Francisco, a Bahia e o Nordeste têm grande potencial produção da cultura quanto a temperatura, fornecimento de água para irrigação, fotoperíodo adequado e uma maior facilidade na exportação para a Europa por estar mais próximo, em relação ao Sudeste.

O Sudeste vem sofrendo oscilação em sua produção desde 2009 com redução na produção de 110.448 t em 2009 para 105.309 t, em 2015, decréscimo de 4,66% enquanto a região Nordeste sofreu um decréscimo de 13,53% (figura 3).

Figura 3 – Produção brasileira de maracujá em toneladas, por região fisiográfica, para 2016.



Fonte: SIDRA IBGE (2016).

No Brasil, Bahia e Ceará se destacam na região Nordeste, porém suas produtividades não são as maiores entre os estados (tabela 1). O estado da Bahia se destaca na área colhida e na produção, já a produtividade não é muito alta, com $12,56 \text{ t.ha}^{-1}$, um dos fatores que podem explicar essa baixa produtividade é a quantidade elevada de produtores na região e o fato de nem todos possuírem a tecnificação necessária para que a cultura obtenha altas produtividades.

Tabela 1 – Produção brasileira de maracujá em 2016.

Estados	Área Colhida(Ha)	Produção (T)	Rendimento (t.ha ⁻¹)
Bahia	27,298	342,780	12,56
Ceará	5,516	98,122	17,79
Minas Gerais	2,050	39,237	19,14
São Paulo	1,676	28,237	16,85
Espírito Santo	1,310	25,391	19,38
Outros	12,039	169,722	14,10
Brasil	49,889	703,489	14,10

Fonte: Autor (2016). Adaptado de EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

Em 2016, o estado de São Paulo obteve 1.676 hectares colhidos, com uma produção de 28.237 toneladas de produção e o rendimento de 16,85 t.ha⁻¹, maior que a média nacional e do que a Bahia, maior estado produtor, indicando uma boa tecnologia de produção, porém um dos gargalos que deixa o estado de São Paulo com uma produtividade menor que outros, como exemplo o Espírito Santo (19,38 t.ha⁻¹) e Minas Gerais (19,14 t.ha⁻¹), é a severa ocorrência da morte-prematura (**Tabela 1**).

2.3 EXIGÊNCIAS EDAFOCLIMÁTICAS

Com centro de origem tropical e subtropical, o maracujá se desenvolve melhor em clima quente e úmido, 22°C é a temperatura ideal, temperaturas baixas dificultam o crescimento da planta, diminuem a absorção dos nutrientes e conseqüentemente afeta a produção.

No verão a germinação das sementes tem uma maior porcentagem, já no inverno, com a queda de temperatura a germinação das sementes de maracujá é dificultada.

O maracujazeiro é uma planta em constante desenvolvimento, necessitando de água desde o plantio até a colheita, e por ser uma planta de cultivo de 2 a 3 anos, o desenvolvimento de flores e frutos bem como de ramos e folhas não cessa,

continuando seu crescimento mesmo depois da frutificação. A necessidade de chuva está entre 800 mm a 1750 mm de chuva por ano (SÃO JOSÉ, 1994).

Em relação a luminosidade o maracujá tem seu florescimento melhorado com regiões que tenham fotoperíodo acima de 11h, com abertura das flores ao meio dia e seu fechamento as 15h (GAMARRA ROJAS; MEDINA, 1995).

A umidade relativa do ar tem grande impacto na cultura, pois as doenças micóticas e bacterianas têm estrita ligação com a umidade, sendo ideal em torno de 60%, acima disto a incidência de patógenos é maior, o que favorece o desenvolvimento dos patógenos.

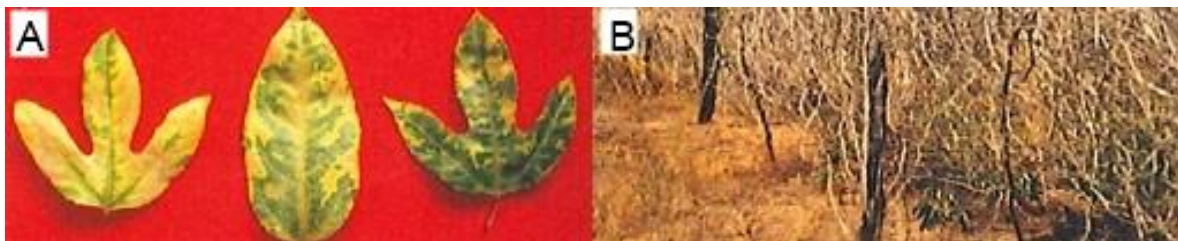
O solo ideal para o maracujá é o areno-argiloso, pois a drenagem é um fator relevante visto que fungos e bactérias se desenvolvem no solo e atacando as raízes e a parte basal da planta, podem comprometer seu desenvolvimento (LIMA et al., 2004).

2.4 PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA

2.4.1 Morte prematura

O maracujazeiro é alvo de diversas doenças bacterianas, micóticas e viróticas, o que levou a cultura de bi/trianual para anual, particularmente no estado de São Paulo, e a doença-chave para esta mudança tem sido a morte-prematura (figuras 4 e 5), doença transmitida por uma gama de patógenos, dentre eles bactérias e fungos, sendo um dos mais ocorrentes o *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, tendo as espécies *Passiflora setacea* D.C., *Passiflora giberti*, *P. alata* e *P. caerulea* se mostram resistentes a doença (OLIVEIRA, 1987).

Figura 4 – Folhas de maracujazeiro (A) e espaldeira de maracujá (B).



Fonte: Santos Filho (2017).

Figura 5 – A esquerda (A) colmo infectado por *Fusarium* sp. e a direita (B) colmo sadio de maracujá. Colmo de maracujá com a rachadura provocada pela doença (C).



Fonte: Dianese (A e B) e Liberato (C) (2017).

Os sintomas (figura 5) da morte-prematura ou podridão-do-colo se dão inicialmente na parte basal da planta, onde ocorrem rachaduras e estas vão aumentando de tamanho, a casca do caule vai apodrecendo ficando com aspecto de morta, formando um anelamento e impedindo a translocação de seiva na planta, podendo causar até a quebra do ramo na parte basal, ambos levando a morte, tanto o rompimento do caule (**Figura 5**) como o impedimento da passagem da seiva (COLE; HEDGES, 1992; DA PONTE; AGUIAR, 1996; LIBERATO, 2002).

2.4.2 Mancha bacteriana

A mancha bacteriana (**Figura 6**), doença comum no maracujazeiro tem como seus agentes causais as bactérias *Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae* (solo) e *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (parte aérea), sintomas são necrose basal e interrupção da translocação de fotossintatos e seiva bruta (NAKAMURA; RUGGIERO, 1987). Mostrou não afetar as espécies *P. setacea*, *P. giberti*, *P. foetida*, dentre outras (BARBOSA, 1995; KURODA, 1981).

Figura 6 – Manchas bacterianas em (A e B) folhas e (C) frutos de maracujá.



Fonte: Ishida (A e B). Halfeld-Vieira (C) (2009).

2.4.3 Antracnose

A antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) é causada por um fungo, e sua sintomatologia (**Figura 7**) afeta a parte aérea da planta como folhas, ramos, frutos e botões florais, surgem manchas que medem em torno de 5 mm, com formato circular. Lesões já avançadas podem causar deformidades nas folhas. No lenho da planta as lesões podem expor o tecido da planta, causando a morte da planta, nos frutos as lesões formam depressões em sua casca, deformando o mesmo.

Figura 7 – Fotos de maracujazeiro infectados por antracnose, fruto (A), caule (B) e folhas.



Fonte: Sassel (A e C) e Laranjeira (B) (2017).

2.5 CARACTERÍSTICAS NUTRACÊUTICAS E FÍSICOQUÍMICAS DO MARACUJÁ.

O maracujazeiro é muito utilizado por suas propriedades nutraceuticas e farmacológicas (tabela 2), seu suco é rico em vitaminas C e A, fósforo, sais minerais e cálcio (LIMA, 2004), é um dos gêneros mais utilizados na medicina popular, atuando em diversas causas como hipnótico, insônia, hipertensão arterial, asma e mal de Parkinson, porém seu uso mais comum é para tratamento de insônia e calmante, utilizado como sedativo (GRIEVE, 1994; DUKE, 1997, 2002; MAHADY et al., 2005; SOUZA; MELETTI, 1997).

As propriedades farmacológicas do *P. foetida* deve-se pela presença na planta de flavonoides, compostos glicosídeos cianogênicos, fenóis e alcaloides (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). É utilizado para o tratamento de ansiedade, estresse e insônia (PATIL; PATIL; PAIKRAO, 2013).

O *Passiflora tenuifila* também conhecido como maracujá-alho tem uma quantidade maior de lipídeos e proteínas que o maracujá-azedo, também observou que a espécie *P. tenuifila* possui grande quantidade de antioxidantes e polifenóis totais, podendo ser utilizado com finalidades nutraceuticas e na indústria alimentícia (WURLITZER et al., 2016).

Tabela 2 - Composição do maracujá por 100 gramas de parte comestível; minerais, vitaminas e colesterol.

	Maracujá fresco	Polpa congelada	Suco concentrado envasado
Umidade (%)	82,9	88,9	88,9
Energia (kcal)	68	39	42
Energia(kJ)	286	162	176
Proteína (g)	2,0	0,8	0,8
Lipídeos (g)	2,1	0,2	0,2
Colesterol (g)	NA	NA	NA

Carboidrato (g)	12,3	9,6	9,6
Fibra Alimentar (g)	1,1	0,5	0,4
Cinzas (g)	0,8	0,5	0,5
Cálcio (g)	5	5	4
Magnésio (g)	28	10	4
Manganês (mg)	0,12	0,07	0,07
Fósforo (mg)	51	15	14
Ferro (mg)	0,6	0,3	0,3
Sódio (mg)	2	8	22
Potássio (mg)	338	228	201
Cobre (mg)	0,19	0,05	0,05
Zinco (mg)	0,4	0,2	0,1
Retinol (µg)	NA	NA	NA
RE (µg)	114	-	-
RAE (µg)	57	-	-
Tiamina (mg)	Tr	Tr	Tr
Riboflavina (mg)	0,05	0,09	0,08
Piridoxina (mg)	0,05	0,06	0,05
Niacina (mg)	Tr	Tr	1,92
Vitamina C (mg)	19,8	7,3	13,7

Fonte: Lucas Bernardo Pigari (2011). Adaptado de Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

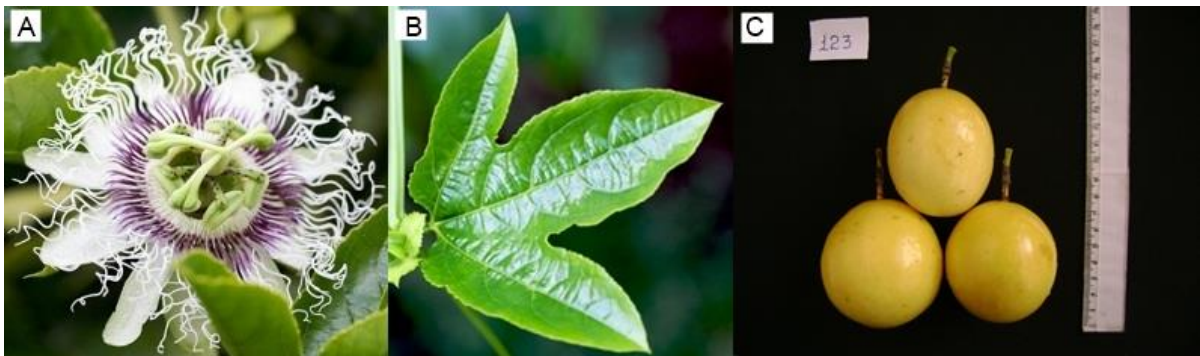
2.6 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

O conhecimento do estabelecimento de espécies como *Passiflora tenuifila*, *Passiflora setacea* e o *Passiflora foetida* Linn são de extrema importância para a genética e melhoramento do gênero, e a perda de espécies deste gênero devido ao desmatamento e ao desinteresse do homem em espécies que não tem bom desempenho comercial, podendo futuramente ser utilizadas como porta-enxertos e conferir resistência a patógenos, seca, diferenciação no crescimento e porte da planta e outras adições benéficas que a planta irá obter e poderá melhorar o pomar comercial de maracujá.

2.6.1 *Passiflora edulis* Sims

O maracujá-azedo (figura 8) é uma planta perene de crescimento indeterminado, chegando em média a 7,5 metros de comprimento. Folhas alternadas e quando ainda não atingiram o estágio adulto tem forma ovalada, na fase adulta podendo ser trilobadas ou não, forma e tamanhos bem distintos, caule de forma circular, herbáceo no ápice e na região basal lenhoso, raiz pivotante de raio com até 60 cm a partir do colo da planta, 30 a 45 centímetros de alcance. As flores hermafroditas, necessitando de polinização cruzada, seja essa feita por abelhas (mamangavas) ou manualmente realizada pelo homem, flores necessitam de 11h de luz ou mais para florescerem, abrindo após o meio dia e permanecendo abertas até 5 a 6 horas da tarde, fruto denominado de baga ovalada, casca coriácea, coberta por uma camada de cera (DE OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

Figura 8 – (A) Flor, (B) folha e (C) fruto de *Passiflora edulis* Sims.



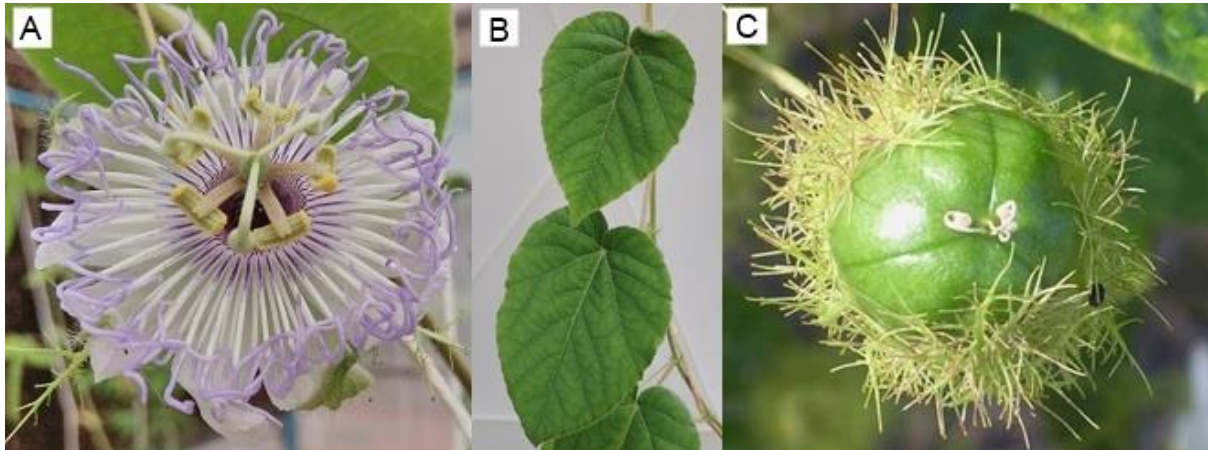
Fonte: Sargacal (A e B) e Oliveira (C) (2008) (A e B) e (2013) (C).

2.6.2 *Passiflora foetida* Linn

A espécie *Passiflora foetida* Linn (figura 9) tem como características agrônômicas as ramas de 1,5 a 6 m de comprimento, o caule apresenta grande pilosidade, tem formato cilíndrico, estípulas pedatissectas e filiformes, folhas lobadas e com presença de brácteas, floresce durante o ano todo e quando a planta é machucada exala um cheiro característico, daí o nome da espécie, pois a mesma

possui um cheiro “fétido”, porém a polpa é doce e aromática (WAGNER; HERBT; SOHMER, 1990).

Figura 9 – *Passiflora foetida* Linn, (A) flor, (B) folha e (C) fruto.



Fonte: Silvério Júnior (A e B) e (C) hablemosdeflores.com/passiflora-foetida/(2017) (A e B) e 2015 (C).

2.6.3 *Passiflora setacea* D.C.

O *Passiflora setacea* D.C. (figura 10) é conhecido no Rio de Janeiro como maracujá-sururuca, seus frutos são globosos e em formato de ovo, pesam em média 55 gramas, medem 3,8 centímetros de diâmetro por 5,3 cm de comprimento, tem a casca amarelo esverdeada com 5 listras longitudinais do ápice a base do fruto, é saboroso e tem suco ácido, porém doce, no caso do maracujá, é ideal para indústria. Material resistente a doenças corriqueiras do maracujá-azedo como verrugose, antracnose, e a doença-chave da cultura nos dias de hoje, a morte-prematura (DE OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

Figura 10 – (A) Folha, (B) fruto e (C) flor de *Passiflora setacea* D.C.

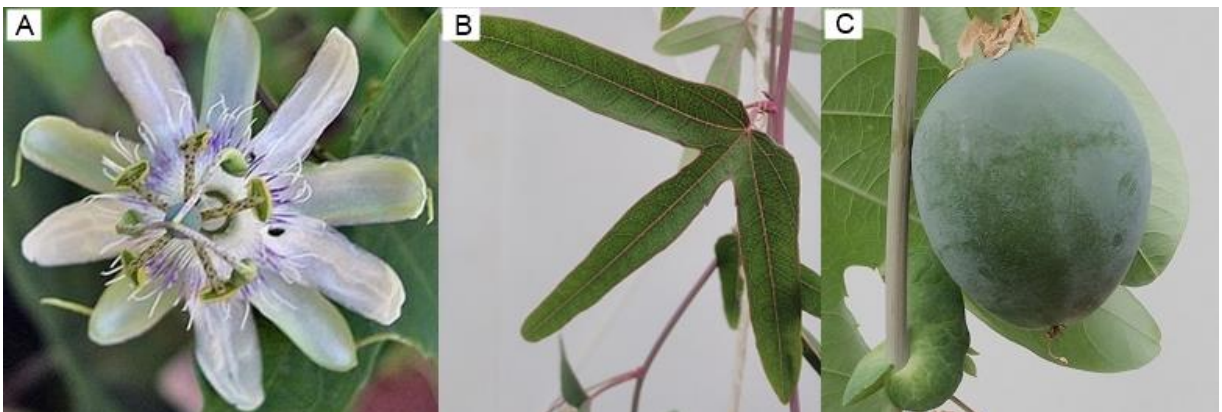


Fotos: Costa (A e C) e Oliveira (B), (2016) (A e C) e (2011) (B).

2.6.4 *Passiflora tenuifila*

A espécie *Passiflora tenuifila* possui folha trilobada, com margem inteiriça do limbo, hábito de trepadeira, florescendo em maio, setembro e novembro, e sua frutificação ocorre em abril e novembro, (figura 11) possui características agrônômicas distintas das demais espécies quanto ao formato, coloração, sabor e aroma do fruto, além da excessiva quantidade de semente em relação as outras espécies do gênero (PEREIRA et al., 2017).

Figura 11 – (A) flor, (B) folha e (C) fruto de *Passiflora tenuifila*.



Fonte: Silvério Júnior (B e C) e Peixoto (A) (2017).

2.6.5 *Passiflora alata curtis*

Com centro de origem no Brasil, Peru, Paraguai e Bolívia a *Passiflora alata* Curtis é uma espécie muito utilizada na farmacologia no Brasil juntamente com *P. incarnata* por apresentar maiores concentrações flavonoides e alcaloides (KILLIP, 1938). Herbácea semi-perene, de folhas inteiriças, margens sem serrilhamento ou raro, epiderme com ondas leves na parte adaxial e a parte abaxial recurvada e a nervura mediana da folha é biconvexa (figura 12), dois pares de nectários extraflorais no pecíolo, caule de formato alado-quadrangular (FREITAS, 1985).

Figura 12 – (A) flor, (B) folha e (C) fruto de *Passiflora alata* Curtis.



Fonte: Lopes (2013) (A e B), e deverdecasa.com/2012/09/passiflora-alata-o-maracuja-doce.html (C).

2.6.6 *Passiflora caerulea*

Folha digitada, bilobada ou trilobada, relação comprimento/altura da folha menor que a maioria, menor comprimento dos lóbulos da folha, espiral de gavinhas e internódio das hastes de tamanho reduzido quando comparado a outras espécies, células da parte abaxial da folha são ovaladas, maiores e de maior volume que na parte adaxial (FARIAS, 2014; CROCHEMORE et al., 2003).

Figura 13 – Fruto (A), flor (B) e folha (C) de *Passiflora caerulea*.



Fonte: <http://www.verdeden.com/verdeden-agronomos-paisajistas/plog/la-flor-de-la-pasion-la-pasionaria-passiflora-caerulea/> (A e B), Silvério Júnior (C) (2017).

2.7 PRODUÇÃO DE MUDAS E MÉTODOS PROPAGATIVOS

O maracujá pode ter sua propagação feita por sementes, estaquia e enxertia, por ser de custo mais acessível e de menor trabalho o método mais adotado na cultura do maracujazeiro é a semente, disponibilizadas no mercado para as principais cultivares do maracujá (FALEIRO et al., 2014).

2.7.1 Sementes

Uma das principais adaptações das plantas para sobreviver em meio terrestre culmina na utilização de sementes para a propagação das espécies (FINKELSTEIN, 2010).

As angiospermas têm sementes de maneira geral constituída por embrião, envoltório e endosperma, possuindo origens distintas, sendo o embrião formado pela fusão de gametas haploides parentais, o envoltório de células diploides da matriz e o endosperma formado pela fusão do núcleo espermático localizado no grão de pólen com 2 núcleos polares femininos (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

2.7.2 Estacas

Um dos principais métodos de propagação utilizados é a estaquia, técnica que consiste em retirar um segmento de uma matriz e o mesmo originara uma muda clone da planta-mãe, possui como vantagens a produção de muitas mudas com

pouco material vegetal, curto período de tempo para grande obtenção de mudas, redução do período de juvenilidade, no entanto traz como desvantagens a dificuldade na formação de raízes adventícias e a dificuldade de enraizamento das mudas (MELETTI, 1999; NEVES et al., 2006).

2.7.3 Enxertia

A enxertia, método comum de propagação, é a conciliação de um porta-enxerto com resistências benéficas da planta, juntamente com um enxerto com características de produtividade e alta qualidade de copa e frutos. O tipo de enxertia varia conforme o corte realizado na região em que será feita a união dos segmentos. O porta-enxerto confere características como resistência a seca devido a um sistema radicular mais vigoroso, conseqüentemente maior absorção de água e nutrientes e maior crescimento, e resistência a pragas e doenças, e o enxerto confere boas características de copa, como abertura adequada dos ramos, boa produtividade e qualidade dos frutos (BARRETO, 2013; CASTLE, 1995; PITA JUNIOR, 2010; SIMÃO 1998).

Já na enxertia hipocotiledonar o método consiste em unir o hipobionte do epibionte, este processo ocorre pelo contato e junção dos calos, gerado pelo tecido cambial do porta-enxerto e enxerto respectivamente, os calos são resultado dos tecidos que foram seccionados (JANICK, 1966).

2.8 CULTURA DE TECIDOS

A manipulação celular de órgãos e tecidos *in vitro* ocorre devido à capacidade células vegetais continuar e a crescer mesmo quando retiradas da matriz, e partindo-se da premissa que todas as células de planta são totipotentes (VASIL; VASIL, 1981).

A cultura de tecidos é um ótimo meio para propagação de plantas, por serem clones e herdarem as características genéticas desejadas, dando uniformidade ao pomar e buscando sempre isenção de patógenos, com foco em produzir mudas em larga escala a partir de meristemas ou segmentos nodais, obtendo-se elevado

número de explantes a partir da matriz (planta-mãe). A velocidade do processo está relacionada com o controle das condições ambientais e do meio em que é feita a multiplicação (QUISEN; ÂNGELO, 2008).

A cultura de tecidos vem sendo empregada para suprir a demanda de mercado onde as outras técnicas não se saem tão bem, conseguindo um número elevado de mudas com pouco material matricial, rapidez nos processos, ambiente com maior controle sanitário, evitando contaminações, independe da época do ano para a propagação, e algumas espécies tem dificuldades em propagação por outros métodos que não a cultura de tecidos (SCHUCH; ERIG, 2005).

2.8.1 Germinação *In Vitro*

O gênero *Passiflora* apresenta mecanismos de dormência por causa da dureza do tegumento de sua semente, dificultando a passagem de água para interior o da mesma Morley-Bunker (1986).

Negreiros et al. (2006), concluiu que a melhor época para se retirar as sementes dos frutos é quando o mesmo apresenta coloração da casca está em torno de 50% amarela, armazenar os frutos de 3 a 6 dias antes da retirada das sementes para obtenção e germinação das mesmas. A remoção do arilo para facilitar a germinação das espécies de *Passiflora* sp. parece ser de senso comum entre os produtores e pesquisadores das plantas do gênero.

Morley-Bunker (1986) relatou que a germinação melhorou com a escarificação mecânica com alternância de temperatura em algumas espécies do gênero.

A utilização de hormônios indutores de crescimento é uma prática comum na cultura de tecidos, temos muitos exemplos de uso das auxinas, giberelinas e citocininas, estimulando a formação e desenvolvimento de novos tecidos. O ácido giberélico é utilizado em sementes para indução de enzimas que enfraquecerão os tecidos e irão facilitar o desenvolvimento embrionário.

A germinação do maracujá-azedo ainda é um gargalo para a cultura, pois a maioria dos pomares do Brasil ainda utilizam a propagação sexuada, mesmo as sementes estando fisiologicamente preparadas, apresenta dificuldades com a sua germinação (ALMEIDA et al., 1987), sendo assim, o interesse de uma alta taxa de germinação nas sementes e a isenção de patógenos na mesma é de extrema relevância para o cultivo do maracujazeiro, especialmente o amarelo.

Para remoção do arilo e aceleração da germinação na semente de maracujá-azedo deve ser feita a fricção das sementes em peneira de malha de aço por 3 minutos (com ou sem areia grossa) ou imersão em cal virgem a 10% por 10 minutos ou fermentação natural por 6 dias (MARTINS et al., 2006). Mas deve-se ter cuidado com a água ofertada, pois as sementes de maracujá-amarelo são intolerantes a salinidade na água na germinação, tolerando até $1,0 \text{ dSm}^{-1}$ (CAVALCANTE et al., 2002).

Villa et al. (2016) relataram que o ácido giberélico entre as concentrações de 200 e 1000 mg. L^{-1} foi maléfico para a germinação do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), não germinando nenhuma semente entre essas concentrações do hormônio.

O *Passiflora setacea* D.C. apresenta tamanho diminuto de sementes quando comparado com outras espécies de *Passiflora* sp. e a mesma tem um decréscimo na germinação com o passar do tempo. Oliveira et al. (2013), relataram que as sementes de *P. setacea* são tolerantes a dessecação, aceitando níveis de até 4% de água, para maior longevidade se mantidas em temperaturas abaixo de 0°C , baixas temperatura e umidade induzem as sementes à sua dormência.

Ferreira (2005) observaram que a germinação do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) aumentou com o uso de ácido giberélico e a extração do arilo da semente. Para o *Passiflora alata* Curtis a giberilina (GA_{4+7}) juntamente com fenilmetil-aminopurina entre as concentrações de 200 e 250 mg L^{-1} favoreceram o processo germinativo da espécie (FERRARI et al., 2008). Zonta et al. (2005) cita que a giberelina favoreceu a germinação do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis), aumentando a velocidade a mesma. A escarificação na ponta da semente e a utilização de GA_3 (ácido giberélico exógeno) foram tidas como positivas na germinação de maracujá-do-sono por Santos et al. (2010).

2.8.2 Estabelecimento *In Vitro*

O estabelecimento *in vitro* está relacionado com a determinação e competência da desdiferenciação dos meristemas radiculares e caulinares e sua regulação deste processo realizada direta ou indiretamente por hormônios vegetais, criando assim pela vida toda da planta estabilidade estrutural e funcional dos tecidos recentemente diferenciados (FALEIRO et al., 2011).

2.8.3 Multiplicação *In Vitro*

A multiplicação em cultura de tecidos é advinda da capacidade que as células haploides ou somáticas da planta têm de se desenvolverem em estágios distintos da embriogênese, também conhecido como totipotencialidade (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; HABERLANDT 1902; FALEIRO et al., 2011).

A diferença entre embriões somáticos e zigóticos se dá devido aos zigóticos serem isentos de correlações físicas, genéticas e fisiológicas, enquanto os somáticos têm endosperma ausente, podendo acarretar em desenvolvimento incorreto (ZIMMERMAN, 1993).

2.8.4 Conservação *In Vitro*

O estabelecimento de espécies *in vitro* depende de fatores exógenos e endógenos, os fatores exógenos seriam o fotoperíodo em que os segmentos foram submetidos, temperatura, o meio em que o segmento foi colocado para o fornecimento de nutrientes para que o mesmo possa ter um desenvolvimento adequado.

O fornecimento de nutrientes não é um processo muito fácil pois os nutrientes têm de estar em proporções adequadas para que não haja efeitos de toxidez na planta por excesso e nem falta de nutrientes acarretando em sintomas de deficiência de algum elemento, retardando o crescimento do segmento e dificultando seu estabelecimento, ou até mesmo tornando o mesmo inviável.

O meio MS é o meio mais utilizado na cultura e tecidos e o mais indicado para espécies herbáceas (**Tabela 11**), porém o meio WPM tem uma maior afinidade com espécies que produzem segmentos lenhosos a serem utilizados, pois contém $\frac{1}{4}$ das concentrações de amônia e nitrato do meio MS e uma maior concentração de potássio e sulfato (BASSAN et al., 2006; JESUS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; VILLA et al., 2006; WERNER et al., 2010).

A utilização de explantes que contenham uma maior totipotencialidade é um padrão, como segmentos nodais, e gemas laterais e apicais de árvores tropicais e frutíferas.

Tabela 3 - Composição do meio MS para macronutrientes, micronutrientes e compostos orgânicos.

COMPONENTES	mg.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .7H ₂ O	22,30
H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	8,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	27,80
Fe(SO ₄).7H ₂ O	37,20
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	100,0
Piridoxina	0,5
Tiamina	0,1

Fonte: Adaptado de Torres et al. (1998) Quisen e Angelo (2008).

2.8 TAMANHO DE PARCELA, ENSAIO EM BRANCO E PRECISÃO EXPERIMENTAL

O tamanho e a forma da parcela experimental, o número de repetições, a forma do bloco, o delineamento experimental, as falhas de plantas nas parcelas e o modo de condução do experimento constituem preocupações para o planejamento experimental e a caracterização adequada desses fatores contribui para auferir precisão nos ensaios experimentais.

Diversos são os fatores que podem causar variabilidade experimental, testar o material experimental que será utilizado, encontrar o tamanho de parcela e número

de repetições necessário para expressar e caracterizar determinada variável, constituem importantes ferramentas para pesquisa, e o método mais recomendado para obter essas informações é através do uso de ensaios em branco.

O ensaio em branco também chamado de ensaio de uniformidade são ensaios em que não são aplicados nenhum tipo de tratamento, toda a área experimental é plantada com uma única espécie, variedade, cultivar e são utilizadas práticas idênticas de cultivo, sem efeitos de tratamentos. Estes ensaios servem para verificar a variabilidade experimental do material utilizado, bem como estimar o tamanho ótimo de parcela e o número de repetições.

Uma vez que não são aplicados tratamentos diferentes, trabalha-se com as estimativas dos erros dentro (proveniente da variância entre indivíduos dentro da parcela) e entre parcelas (proveniente da variância entre parcelas ou variância residual). A ideia base é que uma vez que a variância dentro da parcela é maior que a residual deve-se aumentar o tamanho da parcela, assim em caso contrário pode-se manter o tamanho da parcela, ou em alguns casos pode até diminuir o tamanho da parcela.

Atualmente são utilizadas técnicas mais refinadas para verificar a variabilidade do material e calcular o tamanho de parcelas ótimo. No entanto todas as técnicas buscam aumentar a precisão experimental, e a justificativa para determinação do tamanho ótimo da parcela experimental não se baseia apenas na precisão dos experimentos, e sim no fato de que, parcelas com tamanhos excessivos tornam o trabalho difícil e oneroso, enquanto que as de tamanho inferiores oferecem informações imprecisas para servirem de base nas recomendações técnicas.

Vários métodos podem ser empregados para estimar o tamanho da parcela experimental e a maioria deles se baseia na utilização de ensaios em branco. Gomez e Gomez (1984) e Viana (2002) utilizaram os métodos da Inspeção visual da curvatura máxima, método empírico de Smith. Paranaíba (2007) trabalhou com o método da curvatura máxima do coeficiente de variação, inspeção visual da curvatura máxima, método da curvatura máxima e com o modelo linear segmentado com platô nas culturas do arroz, trigo e mandioca.

Atualmente, dentre os métodos mais utilizados para estimar o tamanho ótimo de parcela, cita-se o método gráfico da máxima curvatura entre os coeficientes de variação ($CV(x)$) e os respectivos tamanhos (x) de parcelas (SMITH, 1938) e o

método da máxima curvatura, que estima o tamanho ótimo de parcela a partir da derivação da função $CV(x) = A.X^{-B}$ (MEIER; LESSMAN, 1971).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M.; NAKAGAWA, J.; ALMEIDA, RM de. Efeito do armazenamento na germinação de sementes de maracujá amarelo de diferentes estádios de maturação. Experimento I. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Pelotas. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. p. 603-608.

BARBOSA, L. S. **Resistência de passiflora spp. a xanthomonas campestris pv. passiflorae e detecção do patógeno em sementes.** Viçosa, MG: UFV, 1995.

BARRETO, L. F. **Enxertia e caracterização de rambutanzeiro por aspectos foliares.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013. 62 p.

BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BERNACCI, L. C. et al. Passifloraceae. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**, São Paulo, v. 3, n 3, p. 247-274, 2003.

CASTLE, W. S. Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. **Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v. 23, n. 4, p. 383-394, 1995.

CAVALCANTE, U. M. T. et al. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 5, p. 643-649, 2002.

COLE, D. L.; HEDGES, T. R.; NDOWORA, T. A wilt of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) caused by *Fusarium solani* and *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. **International Journal of Pest Management**, London, v. 38, n. 4, p. 362-366, 1992.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 5-10, 2003.

DA PONTE, J. J.; H. Y. C. AGUIAR. Adendo ao catálogo de plantas hospedeiras de *Meloidogyne* no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n1, p. 1, 1996.

DE OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. **Espécies de maracujá com potencial agrônomo**. Jaboticabal: FUNEP, 2005. 158 p.

DE RESENDE, A. P. C. et al. Teste modificado de Tukey: avaliação do poder e eficiência.: **Revista Estatística**, Ouro Preto, v.2, p. 64, 2012.

DHAWAN, K.; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam. Passiflora: a review update. **Journal of ethnopharmacology**, Netherlands, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DUKE, J. A. **The green pharmacy**: new discoveries in herbal remedies for common diseases and conditions from the world's foremost authority on healing herbs. New York; Rodale 1997. 507 p.

FALEIRO, F. G. et al. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares-fase 3**: resultados de pesquisa e desenvolvimento 2012-2016. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2014. (Documentos INFOTECA-E).

FALEIRO, F. G. et al. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujá-histórico e perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 36 p. – (Documentos INFOTECA-E).

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2016. 341 p. Livro Técnico INFOTECA-E.

FALEIRO, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Ed.). **Título da obra**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41–50.

FARIAS, V. de. **Anatomia foliar de passiflora L.** (Passifloraceae): aspectos taxonômicos e evolutivos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2014.

FERRARI, T. B. et al. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): Fases e efeito de reguladores vegetais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 3, p. 65-74, 2008.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: ALICE. **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. 677 p.

FINKELSTEIN, R.R. The role of hormones during seed development and germination. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones**. [S.l.]: Springer Netherlands, 2010. p. 549–573.

FREITAS P.C.D. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero *Passiflora***. 1985. 133 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 1985.

GAMARRA ROJAS, G.; MEDINA, V. M. Variações físico-químicas do maracujá ácido em relação à pigmentação da planta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 103-110, 1995.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. Philippines: John Wiley & Sons, 1984. 690 p.

GRIEVE, M. **Tiger books international**. London: A modern herbal. 1994. 920 p.

HABERLANDT, G. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. **Sitzungsber Akad. Wiss. Wien. Math-Naturwiss**, v. 111, p. 69-92, 1902.

JANICK, J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1966. p. 485.

JESUS, A. M. S. et al. Desenvolvimento in vitro de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 6, p. 431-436, 2010.

JORGENSEN, P. M.; LAWESSON, J. E.; HOLM-NIELSEN, L. B. A guide to collecting passionflowers. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Missouri, v. 71, n. 4, p. 1172-1174, 1984.

KILLIP, E. P. et al. The american species of passifloraceae. **The American species of Passifloraceae**, Illinois, v. 19, n. 407, p. 602, 1938.

KURODA, N. **Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1981. 45 p.

LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematoides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. v. 2, p. 699-825.

LIMA, A. et al. **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas; Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 396 p.

LOPES, G. L. **Passiflora alata Curtis**: maracujá-doce, maracujá-amarelo. [S.l: s.n.], 2013. Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/12457-2/>>. Acesso em: 8 ago 2017.

MAHADY, G. B. et al. In vitro susceptibility of helicobacter pylori to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, Sweden, v. 19, n. 11, p. 988-991, 2005.

MARTINS, M. R. et al. Influência de diferentes métodos de remoção do arilo na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg.). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 13, n. 2, p. 11, 2006.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Dormancy, germination inhibition and stimulation. **The germination of seeds**. Minnesota: Pergamon Press St Paul, 1989. p. 71-173.

MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of optimum field plot shape and size testing yield in *Crambe abyssinica* Hordnt. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 5, p. 648-650, 1971.

MELETTI, L. M. M.; MAIA, M. L. **Maracujá**: produção e comercialização. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 64 p. (Boletim Técnico, 181).

MORLEY-BUNKER, M. Miscellaneous and minor fruit crops. I in: JACKSON, D. (Ed.). **Temperate and subtropical fruit production**. New Zealand: Butterworths, 1986. p. 261- 262.

NAKAMURA, K. Murcha e morte. In: RUGGIERO, C. **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 160-61.

NEGREIROS, J. R. da S. et al. Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós colheita na germinação e desenvolvimento inicial do maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 21-24, 2006.

OLIVEIRA, G. A. F. et al. Cross-species amplification of microsatellite loci developed for *Passiflora edulis* Sims. in related *Passiflora* Species. **Brazilian Archives of**

Biology and Technology, Curitiba, v. 56, n. 5, p. 785-792, 2013.

OLIVEIRA, J.C. de. Melhoramento genético. **Maracujá**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 218-246, 1987.

PARANAÍBA, P. F. **Proposição e avaliação de métodos para estimar o tamanho ótimo de parcelas experimentais**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2007.

PATIL, A. S.; PAIKRAO, H. M.; PATIL, S. R. Passiflora foetida Linn: a complete morphological and phytopharmacological review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, New Delhi, India, v. 4, n. 1, p. 285-296, 2013.

PEREIRA, R.; DA SILVEIRA, M. R. S.; COSTA, A. M. **Maracujá silvestre (Passiflora tenuifila Killip)**: aspectos agronômicos e características dos frutos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2017. (Comunicado Técnico INFOTECA-E.

PITA JUNIOR, J. L. **Propagação do rambutanzeiro (Nephelium lappaceum L)**. 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Jaboticabal, 2010.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos).

R PROGRAM, R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2015. ISBN 3-900051-07-0.

RODRIGUES S. J. D. et al. Concentrações de sais do meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento in vitro de plântulas de orquídea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 772-777, 2009.

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

SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1994. v. 255.

SARGACAL. **Maracujá**. Sargacal: [s.n.], 2017. 1 p. Disponível em: <<http://www.sargacal.com/2008/04/25/maracuja-passiflora-edulis-passifloraceae/comment-page-1/>>. Acesso em: 22 ago 2017.

SILVA, J. J. et al. Caracterização morfológica de espécies do gênero passiflora do banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. **Revista RG News**, Brasília, DF, v. 3, n. 2, p. 65, 2017.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1998. 760 p.

SMITH, H.F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 28, n 1, p.1- 23, 1938.

TACO, N. Tabela brasileira de composição de alimentos. **Revista Ampliada NEPA UNICAMP**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 161, 2011.

TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998. 509 p.

VASIL, I. K.; VASIL, V. **Clonal propagation**. Amsterdam: [s.n.], 1981.

VIANA, A. E. S. et al. Estimativas de tamanho de parcela em experimentos com mandioca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 58-63, 2002.

VILLA, F. et al. Germinação de sementes de maracujá-amarelo em extrato aquoso de tiririca e ácido giberélico. **Revista de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina**, Lages, v. 15, n. 1, p. 3-7, 2016.

VILLA, F. et al. Multiplicação in vitro de amoreira-preta Cherokee: efeito de meios de cultura, cinetina e GA3. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 307, p. 357-362, 2006.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawaii** 'i. Honolulu: University of Hawaii Press & Bishop Museum Press, 1990. v. 2, 853 p.

WERNER, E. T. et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação de calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

SAS PROGRAM. World Headquarters SAS Institute Inc. **100 SAS Campus Drive Cary, NC 27513-2414, USA.** Phone: +1-919-677-8000 Fax: +1-919-677-4444.

WURLITZER, N. J. et al. Caracterização de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) e avaliação do potencial tóxico com uso de bioensaio com *Artemia salina*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., 2016, Gramado. **Anais...** Gramado: sbCTA-RS, 2016.

ZIMMERMAN, J. Lynn. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The plant cell**, Waterbury, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

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 LATINOAMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 5., 2005, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

CAPITULO I

MEIOS DE CULTIVO E TIPOS DE SEMENTES NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJÁ AZEDO

MEIOS DE CULTIVO E TIPOS DE SEMENTES NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJÁ AZEDO

RESUMO

Atualmente o cultivo de maracujá no Estado de São Paulo vem sofrendo com patógenos de solo, principalmente a morte prematura, tornando a cultura antes perene, em cultivo anual. A partir disso, os pesquisadores e agricultores têm buscado soluções para este problema, utilizando de técnicas alternativas de propagação e uso de cultivares e espécies resistentes. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar meios de cultivo para a germinação *in vitro* de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) utilizando técnicas estatísticas específicas que respeitem a natureza das variáveis qualitativas e quantitativas. Para tanto, utilizou-se de sementes intactas, lixadas e cortadas na região oposta a emissão da radícula, inoculadas em meios contendo substrato orgânico comercial (Bioflora®), meio MS e ácido giberélico. Avaliou-se a contaminação exógena, endógena e a porcentagem de germinação das sementes. Os dados obtidos foram avaliados por meio dos testes não paramétricos de Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher e Índice Kappa. Para porcentagem de germinação os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação de médias pelo teste Tukey (fator tipos de semente) e Scott-Knott (meio de cultivo) a 5% de probabilidade com auxílio dos softwares R e SAS. Por fim, pode-se concluir que o substrato orgânico comercial pode substituir o meio MS no cultivo *in vitro* do maracujá-azedo e a giberelina foi benéfica para a germinação das sementes, e o melhor tratamento físico de sementes foi o por lixa d'água.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*. Cultura de tecidos. Estabelecimento. Testes não paramétricos.

MEIOS DE CULTIVO E TIPOS DE SEMENTES NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE MARACUJÁ AZEDO

Abstract

Nowadays the cultivate of passion-fruit in São Paulo State have been suffering with soil pathogens, mainly the premature-death, making the crop before perennial to annual. From this, the researchers and farmers have searched solutions for this problem, using alternative techniques of propagation and use resistant species and cultivars. In this context, the goal of this study was to evaluate culture media for the *in vitro* germination of passion-fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) utilizing specific statistical techniques that respect the nature of the qualitative and quantitative variables. Therefore, was used intact, sanded and cut seeds on the opposite region of the radicle emission, inoculated in media containing commercial organic substrate (Bioflora®), MS medium and gibberelic acid. Was evaluated the hexogen, and endogen contamination and the percentage of seed's germination. The data acquired were evaluated through non-parametric tests of Chi-Square Test and Fisher's Exact Test and Cohen's Kappa. For the percentage of germination, the data were submitted to variance analysis by F Test and comparison of media by Tukey's Test (type of seed factor) and Scott-Knott (growing medium) onto 5% of probability with assistance by R and SAS softwares. Lastly, was concluded that the commercial organic substrate can substitute the MS medium in *in vitro* cultivation of yellow passion-fruit and the gibberellin was beneficial for seed germination, and the best physical treatment for seeds was by sandpaper.

Index terms: *Passiflora edulis*. Tissue culture. Establishment. Non-parametric tests.

3 INTRODUÇÃO

O consumo de frutíferas tropicais vem crescendo mundialmente e o maracujá, fruta nativa das américas, tem ganhado gosto no mercado exterior. Porém, a cultura vem sofrendo com problemas fitossanitários que prejudicam a produtividade, a qualidade e a oferta desse produto.

O maracujá azedo (*Passiflora edulis*) é bastante suscetível a doenças relacionadas ao solo, como *Fusarium oxysporum f. passiflorae*, *Fusarium solani*, *Phytophthora spp.* e a bactérias, como *Xanthomonas axonopodis pv. Passiflorae*, essas doenças causam redução da vida útil das plantas e representam um problema para a produtividade da cultura (CAVICHOLI, 2011).

Tendo em vista a importância dessa frutífera, tem-se a preocupação com a produção de mudas sadias, vigorosas e de qualidade para garantir melhores resultados na produção para suprir a crescente demanda mundial além do estabelecimento dos bancos ativos de germoplasma e pesquisas *in vitro*.

A cultura de tecidos, é usual na produção de mudas de plantas ornamentais, frutíferas, olerícolas e florestais, possuindo como grande vantagem a utilização de espaços reduzidos e curto período para obtenção de mudas de qualidade (ANDRADE et al., 2000; GEORGE, 1993; LAMEIRA et al., 1997).

A técnica de germinação *in vitro* tem a vantagem de produzir uma plântula que possa ser fonte confiável de explante, principalmente quando se trata de espécies que possuem problemas germinativos, altas incidências de patógenos durante o armazenamento da semente (HARTMANN et al., 2011; NASCIMENTO; FRANCO; FRASSETTO, 2007) além de possibilitar a multiplicação por organogênese direta, juvenildade e maior variabilidade num mesmo lote, possibilitando o melhoramento e seleção (GOLLE et al., 2010).

Além disso, Nascimento, Franco e Frassetto (2007) afirmaram que as condições ambientais apropriadas para o processo germinativo das sementes podem ser obtidas em laboratório por meio das técnicas de multiplicação *in vitro* e que os estudos dos meios de cultivo são importantes para maximizar a obtenção de plantas uniformes com qualidade genética e fitossanitária.

Para isso, deve-se priorizar o uso de meios de cultivo que favoreçam a germinação *in vitro* juntamente com o uso de tratamentos pré-germinativos e reguladores vegetais.

A utilização destes tratamentos pode diminuir o tempo entre a semeadura até a muda produzida, romper impedimentos à ocorrência do processo germinativo, propiciar maiores porcentagens de emergência de plântulas, favorecer a velocidade deste processo (FERREIRA; GENTIL, 2006; NAZÁRIO; FERREIRA, 2010) e proporcionar às plantas um desenvolvimento uniforme (ZAIDAN; BARBEDO, 2004; OLIVEIRA, 2007).

O efeito de giberelinas como regulador de crescimento desencadeador do processo germinativo vem sendo comprovado em diversas espécies, servindo como indutor da mobilização de reservas a serem utilizadas pelo embrião (STEIN et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013). O uso desse tipo de regulador no meio de cultivo proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente (KOCHABA et al., 1974).

De acordo com Stein et al. (2007) e Dodd e Donovan (1999) a presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de germinação, de acordo com a espécie e com o potencial osmótico de suas sementes, poderá ser o fator responsável pela adequada hidratação destas. Viabilizar ou não a ocorrência do processo germinativo.

Dentro deste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar meios de cultivo para a germinação *in vitro* de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) utilizando técnicas estatísticas específicas que respeitem a natureza das variáveis qualitativas e quantitativas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia da UNESP - FEIS (Ilha Solteira/SP). Foi utilizado sementes de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), provenientes de frutos maduros selecionados em supermercados da cidade com média 105 g, 6 cm de diâmetro e 7 cm de comprimento.

Os frutos foram cortados, as sementes fermentadas por 24h e posteriormente foram despulpadas com o auxílio de peneira de aço (1 mm) e água corrente para

retirada do arilo. Após a retirada do arilo as sementes foram secas por 48 h sobre papel absorvente a ± 28 °C.

As sementes foram divididas em três grupos: intactas (**Figura 13A**), escarificadas com auxílio de lixa d'água 150 (**Figura 13B**) e cortadas com bisturi cirúrgico (**Figura 13C**), ambas na região oposta e emissão da radícula.

As sementes foram desinfestadas em álcool 70 % (v:v) por 1 minuto e posteriormente em hipoclorito de sódio 2,5 % (Kiboa®) por 30 minutos acrescido de 2 gotas de Tween 20 (Dinâmica®). O triplo enxágue foi realizado em câmara de fluxo laminar utilizando-se água deionizada e autoclavada.

As sementes foram, então, inoculadas em frascos de vidro (88 x 64 mm) contendo os seguintes meios de cultivo:

- **SA**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL de água;
- **S½ML**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL da solução nutritiva do meio MS (MURASHIGE; SKOOGI, 1962) com 50% dos sais;
- **S1ML**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL da solução nutritiva do meio MS com 100% dos sais;
- **½MS**: meio MS com 50% das concentrações de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado em 5,7±0,3 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar;
- **1MS**: meio MS com 100% das concentrações de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado em 5,7±0,3 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar;
- **SAG**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL da solução contendo 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) (Dinâmica®);
- **S½MLG**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL da solução nutritiva do meio MS com 50% dos sais + 75 mg L⁻¹ de GA₃;
- **S1MLG**: substrato orgânico comercial (Bioflora®) + 40 mL da solução nutritiva do meio MS com 100% dos sais + 75 mg L⁻¹ de GA₃;
- **½MSG**: meio MS com 50% das concentrações de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado em 5,7±0,3 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar + 75 mg L⁻¹ de GA₃; e
- **1MSG**: meio MS com 100% das concentrações de sais, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado em 5,7±0,3 e solidificado com 5 g L⁻¹ de ágar + 75 mg L⁻¹ de GA₃.

Figura 13 – Sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) intactas (**A**), lixadas (**B**) e cortadas (**C**) na região oposta a emissão da radícula. Ilha Solteira/SP, 2017.



Fonte: Ferreira (2017).

Todos os meios de cultivo utilizados foram autoclavados por 20 minutos a 1 atm e 121°C. Após a inoculação o experimento foi mantido no escuro em câmara de germinação tipo BOD a 28°C por 40 dias. Transcorrido 40 dias o experimento foi colocado em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 3 °C e radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 3 (10 meios de cultivo x 3 tipos de sementes), com 8 repetições (frascos) por tratamento, sendo cada repetição com 5 sementes semeadas.

Avaliou-se aos 40 dias após a inoculação: contaminação exógena (%) e endógena (%); e germinação (%). Os dados obtidos foram avaliados por meio dos testes não paramétricos de Qui-Quadrado (PEARSON, 1900) e Teste Exato de Fisher (FISHER, 1922). Testes não paramétricos, que consistem em analisar a associação entre as variáveis qualitativas. Nos casos em que uma das caselas teve frequência menor que 5 foi adotado o teste exato de Fisher. Para interpretação desses dois testes (atribuindo a hipótese nula: de que não há relação entre os tratamentos estudadas e os resultados encontrados), utilizamos o p-valor como regra de decisão. As relações entre os tratamentos foram ditas significativas se o p-valor do teste foi inferior a 0,05, ou seja, existe diferença entre os tratamentos. Do mesmo modo se o p-valor do teste foi superior ao nível de significância adotado (>0,05) as relações entre os tratamentos foram consideradas não significativas, ou seja, as metodologias comparadas produzem resultados estatisticamente iguais, a diferença se faz devido ao fator aleatório e não ao método utilizado.

Para germinação (%) os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação de médias pelo teste Tukey (fator tipos de semente) e Scott-Knott (meio de cultivo) a 5% de probabilidade com auxílio dos softwares R (R

DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018) e SAS *on demand* (Statistical Analysis System-SAS, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação endógena não foi influenciada pelos tratamentos de meio de cultivo e sementes (intactas, escarificadas e cortadas (**Tabela 4**) pelo Teste Exato de Fisher a 5% de probabilidade.

Para sementes intactas todos os tratamentos apresentaram p valor igual a 1, portanto, em associação completamente perfeita, ou seja, independente do tratamento aplicado a resposta quanto a contaminação endógena foi a mesma e atingiu 33%.

As sementes escarificadas apresentaram p valor de 0,58 para todos os tratamentos e mais uma vez os resultados foram semelhantes ou não significativos (Tabela 1), e neste caso a contaminação endógena chegou a 69 %.

Tabela 4 – Teste Exato de Fisher para contaminação endógena de tipos de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.

	Sementes Intactas								
	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S1MLG								1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
½MSG									1,00 ^{ns}

Sementes Lixadas									
	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
S½ML		0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
S1ML			0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
½MS				0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
1MS					0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
SAG						0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
S½MLG							0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
S1MLG								0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}
½MSG									0,58 ^{ns}

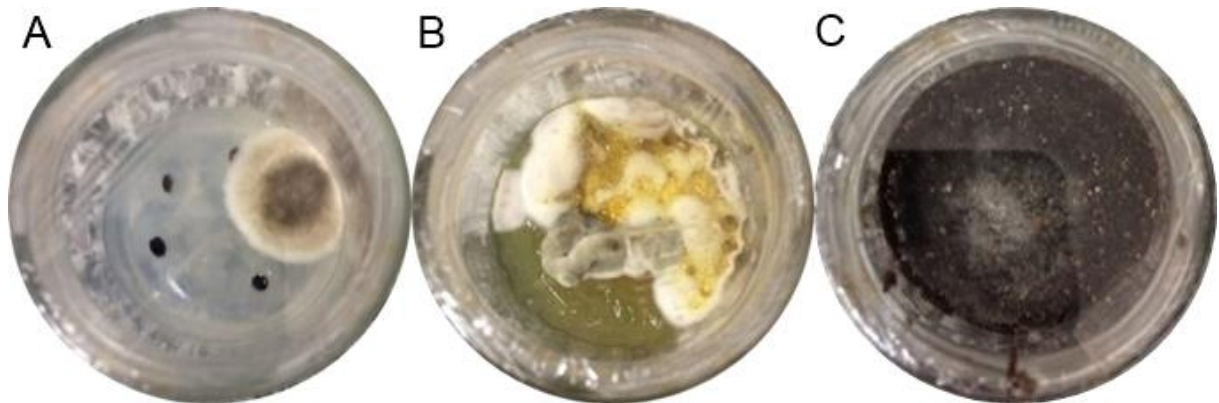
Sementes Cortadas									
	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S1ML			0,29 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					0,58 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S1MLG								1,00 ^{ns}	0,57 ^{ns}
½MSG									0,57 ^{ns}

^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste Exato de Fisher. *S = substrato orgânico comercial (Bioflora®); A = 40 mL água; ½ M = 40 mL metade da concentração do meio MS; 1M = 40 mL do meio MS; G = 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico; L = líquido.

Variações entre os tratamentos foram observadas para sementes cortadas (**Tabela 4**), com amplitude de 71%, *p* valor variou de 0,29 a 1,00, porém a significância do teste é considerada apenas para o *p* valor < 0,05, nota-se que os tratamentos não diferem entre si quanto à contaminação endógena nas sementes, que chegou a 72%.

A ausência de significância da contaminação endógena em relação aos tratamentos, sugere que esta ocorreu antes da inoculação, o que se justifica uma vez que as sementes, do maracujá-azedo, são oriundas de frutos obtidos em mercados regionais e, possivelmente, já estavam contaminadas (**Figura 13**).

Figura 13– Contaminação endógena (**A** e **B**) e exógena (**C**) em sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Outro aspecto a se considerar é que frutos comerciais não passam por controle fitopatológico das sementes. Borges et al. (2012) e Grattapaglia e Machado (1998) relataram que o estado nutricional e sanitário da matriz, onde se realiza a coleta dos frutos para utilização da semente em germinação *in vitro* é de suma importância, visto que a planta é assintomática, sem estresse hídrico e bem nutridas produzem sementes de melhor qualidade facilitando seu sucesso germinativo.

O tratamento $\frac{1}{2}$ MS é estatisticamente diferente dos tratamentos SA, SAG, S $\frac{1}{2}$ MLG e S1MLG; o tratamento 1MS difere de SAG, S $\frac{1}{2}$ MLG e S1MLG; o tratamento SAG difere de $\frac{1}{2}$ MSG; o tratamento S $\frac{1}{2}$ MLG difere de $\frac{1}{2}$ MSG e 1MSG; o tratamento S1MLG difere de $\frac{1}{2}$ MSG e 1MSG quanto a contaminação exógena (Tabela 5).

Para o Teste de Fisher a 1% de probabilidade em relação a contaminação exógena na germinação em sementes intactas (Tabela 5) obteve-se diferença estatística entre os tratamentos 1MS e SA, SAG, S $\frac{1}{2}$ MLG e S1MLG (0,00 – 1% de probabilidade); e entre os tratamentos $\frac{1}{2}$ MSG e S $\frac{1}{2}$ ML, S1ML, SA, S $\frac{1}{2}$ MLG e S1MLG com valores de 0,02* (5% de probabilidade), os demais valores não foram significativos.

Tabela 5 – Teste Exato de Fisher para contaminação exógena de tipos de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.

	Sementes Intactas								
	S $\frac{1}{2}$ ML	S1ML	$\frac{1}{2}$ MS	1MS	SAG	S $\frac{1}{2}$ MLG	S1MLG	$\frac{1}{2}$ MSG	1MSG
SA	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S $\frac{1}{2}$ ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
$\frac{1}{2}$ MS				1,00 ^{ns}	0,02*	0,02*	0,02*	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}

1MS				0,02*	0,02*	0,02*	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	
SAG					1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	0,02*	
S½MLG						1,00 ^{ns}	0,02*	0,02*	
S1MLG							0,02*	0,02*	
½MSG								1,00 ^{ns}	
Sementes Lixadas									
	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,00**	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	0,00**	0,00**	0,00**	0,07 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S1MLG								0,02*	1,00 ^{ns}
½MSG									1,00 ^{ns}
Sementes Cortadas									
	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,05*	0,13 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,02*	0,13 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					0,05*	0,05*	0,05*	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	0,02*	1,00 ^{ns}
S1MLG								0,02*	1,00 ^{ns}
½MSG									0,61 ^{ns}

**Significativo a 1%, a *5% de probabilidade e ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste Exato de Fisher. ¹S = substrato orgânico comercial (Bioflora®); A = 40 mL água; ½ M = 40 mL metade da concentração do meio MS; 1M = 40 mL do meio MS; G = 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico; L = líquido.

O Teste Exato de Fisher, para a contaminação exógena na germinação de sementes cortadas (**Tabela 5**) apresentou *p* valor de de 0,05* para o tratamento MS o qual difere de SA, S½MLG, S1MLG; já para os valores de 0,02* (significativos a 5% de probabilidade) obteve-se diferença estatística entre ½MSG, SA, S1ML, SAG, S½MLG e S1MLG; os demais tratamentos não obtiveram diferenças significativas entre si.

A utilização da autoclave para esterilização do meio de cultura e da vidraria é indispensável para a desinfecção e prevenção de contaminação exógena, na inoculação do material que resultará em plântulas (BURGER, 1988); o presente trabalho corrobora com o autor e ressalta que mesmo com a utilização da autoclave pode ocorrer o aparecimento de fungos exógenos.

De acordo com Dias et al. (2003) a desinfecção das sementes com álcool 70% não é necessária a esterilização de sementes de maracujazeiro com ou sem

tegumento, quando as mesmas forem submetidas ao hipoclorito de sódio (NaClO). O autor relata também resultados de que a desinfecção com álcool não é benéfica para a germinação, que na presença deste foi de 47%, enquanto que na presença de água estéril foi de 59%.

Apesar de Burger (1988) destacar a importância do uso da autoclave e Dias et al. (2003) afirmarem que não há necessidade da utilização do álcool 70% para que não haja contaminação exógena, neste trabalho utilizou-se as duas metodologias, no entanto a taxa de contaminação foi alta.

A assepsia do material e do local de trabalho não significa esterilização, pois sabe-se que mesmo tomando os devidos cuidados, pode ocorrer contaminação. Segundo Oliveira et al. (2000) há registros de que a contaminação em biofábricas brasileira está acima de 1/3 do material inoculado.

As contaminações verificadas neste trabalho (Figura 14C) são corroboradas por Sousa et al. (2007) ao relatarem que a contaminação dos explantes foi de 60% em *Cattleya walkeriana* em meio de cultivo Knudson (1922).

A taxa de germinação em sementes intactas (Tabela 6) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos pelo Teste Exato de Fisher a 5% de probabilidade, com p valor indicando que $\frac{1}{2}$ MS difere de SA, S $\frac{1}{2}$ ML e S1ML; $\frac{1}{2}$ MS difere de SG e S1MLG; diferença entre 1MSG, SA, S $\frac{1}{2}$ ML, S1ML, SAG, S $\frac{1}{2}$ MLG e S1MLG, os demais foram não significativos e os p valores obtidos foram de 0,58 e 1,00.

O teste de germinação em sementes escarificadas apresentou p valor, para o Teste Exato de Fisher de 1,00; 0,57; 0,58 e 0,29; indicando que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si a 5% de probabilidade (**Tabela 6**).

A taxa de germinação para sementes cortadas (**Tabela 6**) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo o p valor de 1,00 entre todos os tratamentos, indicando que não há diferença entre os mesmos.

Tabela 6 – Teste Exato de Fisher para germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.

	Sementes Intactas								
	S $\frac{1}{2}$ ML	S1ML	$\frac{1}{2}$ MS	1MS	SAG	S $\frac{1}{2}$ MLG	S1MLG	$\frac{1}{2}$ MSG	1MSG
SA ¹	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,00 ^{**}	0,05 [*]	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02 [*]	0,00 ^{**}
S $\frac{1}{2}$ ML		1,00 ^{ns}	0,00 ^{**}	0,05 [*]	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02 [*]	0,00 ^{**}
S1ML			0,00 ^{**}	0,05 [*]	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02 [*]	0,00 ^{**}

½MS				0,5 ^{ns}	0,00 ^{**}	0,00 ^{**}	0,00 ^{**}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					0,05 [*]	0,05 [*]	0,05 [*]	1,00 ^{ns}	0,58 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,02 [*]	0,00 ^{**}
S½MLG							1,00 ^{ns}	0,02 [*]	0,00 ^{**}
S1MLG								0,02 [*]	0,00 ^{**}
½MSG									1,00 ^{ns}

Sementes Lixadas

	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,29 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,57 ^{ns}
1MS					1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,57 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,29 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,57 ^{ns}
S1MLG								1,00 ^{ns}	0,57 ^{ns}
½MSG									1,00 ^{ns}

Sementes Cortadas

	S½ML	S1ML	½MS	1MS	SAG	S½MLG	S1MLG	½MSG	1MSG
AS	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S½ML		1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S1ML			1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
½MS				1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
1MS					1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
SAG						1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S½MLG							1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
S1MLG								1,00 ^{ns}	1,00 ^{ns}
½MSG									1,00 ^{ns}

**Significativo a 1%, a *5% de probabilidade e ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste Exato de Fisher. ¹S = substrato orgânico comercial (Bioflora®); A = 40 mL água; ½M = 40 mL metade da concentração do meio MS; 1M = 40 mL do meio MS; G = 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico; L = líquido.

O maracujá-azedo, apresenta dificuldades em sua germinação mesmo estando as sementes fisiologicamente preparadas, no entanto há outros fenômenos envolvidos no processo de germinação (ALMEIDA; NAKAGAWA; ALMEIDA, 1987); esta afirmativa vem ao encontro dos resultados obtidos, pois mesmo estando fisiologicamente preparadas as sementes apresentaram dificuldades de emergência.

Martins et al. (2006) utilizando metodologia similar e realizando a remoção do arilo da semente de maracujá-azedo, relataram benefícios deste procedimento para sua germinação, tendo a retirada sido feita friccionando as sementes em peneira de malha de aço por 3 minutos (com ou sem areia grossa); imersão em cal virgem a 10% por 10 minutos; fermentação natural por 6 dias, tratamentos eficazes na remoção do arilo e aceleraram a germinação.

Reforçando a importância da remoção do arilo, estes autores citam que o gênero *Passiflora* spp. contem espécies com sementes que contém dormência, característica intrínseca do gênero devido a impermeabilidade do seu tegumento e impedimento da passagem de água para o interior da semente, assim a remoção física de parte deste tegumento, seja com lixa ou bisturi, facilita a entrada de água na mesma e conseqüentemente seu processo germinativo (MAGALHÃES et al., 2010; MORLEY-BURNKER, 1974; TSUBOI; NAKAGAWA, 1992).

O uso da giberelina foi avaliado para relatar sua influência no aumento da germinação e na verificação da uniformidade da mesma, sabe-se que a giberelina tem papel na síntese de RNAs e proteínas responsáveis pela germinação da semente, atuando na regulação da síntese de enzimas α e β -amilase, responsáveis pela hidrólise dos tecidos de reserva da semente, esta quebra irá transformar as reservas em aminoácidos, ácidos nucléicos e açúcares, deslocando estes compostos para regiões de crescimento embrionário; outra função da giberelina exógena (ácido giberélico ou GA3) é acelerar a quebra de dormência da semente e uniformizar o processo germinativo (FERRARI et al., 2008; MORLEY-BURNKER, 1974; SALISBURY; ROSS, 1991; SOARES et al., 2012; TAIZ E ZEIGER, 2004; TAKAHASHI et al., 1991; ZONTA et al., 2005).

A análise de variância (Tabela 7) indica efeitos dos tratamentos de semente e de substrato (meio de cultivo) sobre a germinação do maracujá-azedo e para interação entre estas fontes de variação; para semente e meio de cultivo foram encontrados p valor $<0,01$ indicando significância a 1% de probabilidade em relação a germinação, já para a interação, o valor obtido se encaixou entre 0,05 e 0,01 (0,0140), indicando 5% de confiabilidade.

A germinação das sementes lixadas (5,25%) superou a das sementes intactas (1,25%) e cortadas (1,25%), que não diferiram entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 7). As sementes lixadas foram as que apresentaram maiores médias de germinação, diferindo das sementes intactas e das sementes cortadas, indicando que em geral o tratamento com sementes lixadas obteve germinação 4,00% superior aos demais, este resultado mostra que lixar as sementes foi o melhor tratamento físico do tegumento, facilitando a entrada de água na semente e sua posterior germinação para esta espécie de *Passiflora*.

Tabela 7 - Análise de variância para germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.

Fontes de Variação	Germinação (%)
	p – Valor
Tipo de Sementes (TS)	<0,01**
Meio de Cultivo (MC)	<0,01**
TS x MC	0,0140*
Média	2,58
C. V. (%)	336,30
Tipos de Sementes	Médias Gerais
Intactas	1,25 B ⁽¹⁾
Lixadas	5,25 A
Cortadas	1,25 B
Meio de Cultivo	Médias Gerais
SA ⁽³⁾	0,00 B ⁽²⁾
S ¹ / ₂ ML	0,00 B
S1ML	0,00 B
¹ / ₂ MS	0,83 B
1MS	0,83 B
SAG	10,83 A
S ¹ / ₂ MLG	2,50 B
S1MLG	0,83 B
¹ / ₂ MSG	5,83 A
1MSG	4,17 B

**Significativo a 1% e *a 5% de probabilidade pelo teste F; ⁽¹⁾Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey e ⁽²⁾Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade; ⁽³⁾S = substrato orgânico comercial (Bioflora®); A = 40 mL água; ¹/₂M = 40 mL metade da concentração do meio MS; 1M = 40 mL do meio MS; G = 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico; L = líquido.

Os resultados obtidos apresentam discordâncias com os resultados apresentados por Junghans et al. (2010) que concluíram, que o meio ¹/₂ MS (metade das concentrações de vitaminas e sais minerais do original) é tido como o mais eficiente em relação ao meio MS completo, para a germinação *in vitro* de sementes de maracujá-azedo independente da consistência do meio MS, nos resultados obtidos, neste trabalho, os tratamentos mais efetivos foram o SAG continha substrato + 40 mL de água + 75 mL L⁻¹ e o ¹/₂MSG, meio ¹/₂ MS sólido + 75 mL L⁻¹ de GA3, com 10,83% e 5,83% de germinação respectivamente, os demais não foram significativos, dentre estes alguns sequer apresentaram germinação (SA, S¹/₂ML e S1ML).

Por outro lado o uso da giberelina mostra efeitos positivos sobre a germinação do maracujá-azedo, contrariando os resultados de Carvalho et al., (2012) os quais encontraram resultados ineficazes para o uso da giberelina, em trabalho similar para germinação *in vitro* de *Passiflora giberti*, no qual não observaram diferença

significativa pelo teste de Tukey a 5% para as doses de giberelina (μM) de 0; 28,87; 57,74; 86,61 e 115,47, todas foram ineficazes. Neste mesmo trabalho Carvalho et al. (2012), realizaram os mesmos tratamentos físicos usados neste trabalho, sementes intactas, lixadas e cortadas na ponta e os resultados apresentaram 0%, 40% e 91% de germinação, respectivamente.

A retirada de tegumento para uma melhor germinação de espécies de *Passiflora* spp. foi relatada por diversos autores (CARVALHO et al., 2012; SANTOS et al., 2010; ZONTA et al., 2005); corroborando com este trabalho (**Tabela 7**). Uma melhor germinação nos tratamentos com sementes lixadas está relacionada à facilitação da entrada de água na semente. Para cortadas a remoção da ponta pode ter danificado o eixo embrionário ou tecido de reserva da semente, prejudicando a germinação e para intactas pode ter ocorrido a dificuldade da passagem de água para o interior da semente, pois a água é a principal responsável pela boa germinação das sementes. Pois a passagem da água pelo tegumento e consequente contato com o eixo embrionário poderá acelerar os processos germinativos, devido ao aumento na taxa respiratória dos tecidos e outras atividades no metabolismo da semente, que resultam no fornecimento de nutrientes e energia para o retorno do crescimento embrionário (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983).

Diversos experimentos mostram como os tratamentos físicos no tegumento da semente influenciaram a germinação do maracujá-azedo, e relatam a ocorrência de poucas sementes germinadas com o tegumento intacto (DORNELAS; VIEIRA, 1994; KANTHARAJAH; DODD, 1990; MOHAMED et al., 1996), resultado que corrobora com este trabalho, pois o índice de germinação no tratamento sementes com tegumento intacto foi muito baixa cerca de 1,25% de sementes germinadas.

Biricolti e Chiari (1994) e Dias et al. (2003), também relataram dificuldades em obter sementes germinadas com tegumento inteiro, em seus experimentos.

Magalhães et al. (2010), citam que é apenas necessário realizar a retirada do arilo da semente de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, não necessitando de fermentação das sementes. Martins et al. (2006), utilizou a remoção do arilo, atritando as sementes em peneira de arame trançado na presença de água corrente, concordando que a remoção do arilo nas sementes de maracujá-azedo influenciou positivamente a emergência de plântulas.

Para emergência de plântulas, o tratamento SG foi superior aos demais para sementes cortadas, SG e MSG para sementes lixadas e MMSG para sementes

intactas. Indicando diferenças entre a interação dos tratamentos aplicados as sementes e os meios de cultura (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Germinação (%) de tipos de sementes de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) em meios de cultivo. Ilha Solteira/SP, 2017.

Meios de Cultivo	Tipo de Sementes		
	Intactas	Lixadas	Cortadas
SA ⁽²⁾	0,00 Ba*	0,00 Ba	0,00 Ba
S ¹ / ₂ ML	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
S1ML	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
¹ / ₂ MS	0,00 Ba	2,50 Ba	0,00 Ba
1MS	0,00 Ba	2,50 Ba	0,00 Ba
SAG	0,00 Bb	20,00 Aa	12,50 Aa
S ¹ / ₂ MLG	0,00 Ba	7,50 Ba	0,00 Ba
S1MLG	0,00 Ba	2,50 Ba	0,00 Ba
¹ / ₂ MSG	12,50 Aa	5,00 Bb	0,00 Bb
1MSG	0,00 Bb	12,50 Aa	0,00 Ba
Média Geral	1,25	5,25	1,25

*Médias com mesma letra maiúscula entre linhas e minúscula entre colunas não diferem entre si pelo Teste Tukey e Scott-Knott a 5% de probabilidade; ⁽²⁾S = substrato orgânico comercial (Bioflora®); A = 40 mL água; ¹/₂M = 40 mL metade da concentração do meio MS; 1M = 40 mL do meio MS; G = 75 mg L⁻¹ de ácido giberélico; L = líquido.

Destaca-se que os tratamentos com maior germinação (SG, MSG e MMSG) contém 75 mg L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico), dados corroborados por Santos et al., (2013) que recomendam o uso de GA₃ até 100 mg L⁻¹ para estimular a germinação de sementes do maracujá-azedo e que acima desta quantidade de ácido giberélico descrevem um decréscimo na germinação (**Tabela 8**).

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- 1- A utilização de sementes oriundas de mercados locais deve ser evitada devido ao grande risco de contaminação endógena e baixa viabilidade;
- 2- Substratos comerciais podem ser utilizados na substituição de meios de cultivo como o meio MS;
- 3- Sementes lixadas favorecem a germinação das sementes.
- 4- A giberelina teve ação benéfica para a germinação das sementes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M.; NAKAGAWA, J.; ALMEIDA, R. M. Efeito do armazenamento na germinação de sementes de maracujá amarelo de diferentes estádios de maturação. Experimento I. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. p. 603-608 p.
- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan. mar. 2000.
- BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 8, n. 3, p. 171-175, 1994.
- BORGES, S. R. et al. Estabelecimento in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.
- BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- CARVALHO, M. A. F. et al. Germinação in vitro de *Passiflora gibertii* NE Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, 2012.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 429 p.
- CAVICHIOLO, J. C. et al. Desenvolvimento e produtividade do maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 567-574, 2011.
- COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCIA, B. S.; TAMÉS, R. S. **Fisiologia vegetal**. Madrid: Piramide, 1992. 662 p.
- DE CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, MG, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2016.

Dias, J. M. M. et al. Desinfestação e Germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 291, p 550-563, 2003.

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, St Louis, v. 86, n. 8, p. 1146-1153, 1999.

DORNELAS, M. C.; CARNEIRO VIEIRA, M. L. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, v. 36, n. 2, p. 211-217, 1994.

FERRARI, T. B. et al. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): Fases e efeito de reguladores vegetais. **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 3, p. 65-74, 2008.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 2, p.141-146, 2006.

FISHER, R. A. On the mathematical foundations of theoretical statistics. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**, London, v. 222, n. 594-604, p. 309-368, 1922.

GEORGE, E. F. Plant propagation and micropropagation. **Plant propagation by tissue culture**, Westbury, v. 1, n. 2, p. 37-66, 1993.

GOLLE, D. P. et al. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 39-48, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 183-260, 1998.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 928 p.

JUNGHANS, T. G.; VIANA, A. J. C.; JUNGHANS, D. T. **Armazenamento e tratamento mecânico na emergência de plântulas de *Passiflora gibertii***. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento INFOTECA-E).

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 337-339, 1990.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L. Efeito de thiadizuron na indução e manutenção de calos de erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 47-49, 1997.

LIMA, A. et al. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e fruticultura, 2004. 396 p.

MAGALHÃES, A. C. B. **Caracterização de frutos e sementes e germinação de *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener* e *Passiflora cincinnata Mast.*** Bahia: Feira de Santana, 2010. 73 p.

MARTINS, M. R. et al. Influência de diferentes métodos de remoção do arilo na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*). **Revista da FZVA**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 28-38, 2006.

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant cell, tissue and organ culture**, Westbury, v. 46, n. 2, p. 161-164, 1996.

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 bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Madison, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. N. Emergência de plântulas de *Astrocaryum aculeatum* G. May. em função da temperatura e do período de embebição das sementes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 165-170, 2010.

OLIVEIRA, O. S. **Tecnologia de sementes florestais.** Curitiba: Imprensa Universitária, 2007. 185 p.

OLIVEIRA, R. P. de; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

PEARSON, K. X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, London, v. 50, n. 302, p. 157-175, 1900.

R PROGRAM, R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2018.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Mineral nutrition. **Plant physiology**, Belmont, v. 1, n. 4 481 p. 116-135, 1991.

SANTOS, F. C. et al. Micropropagation of *Passiflora setacea* DC. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.

SOARES, W. S. et al. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 138-142, 2012.

SOUSA, G. C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S1, p. 405-407, 2007.

STEIN, V. C. et al. Germination *in vitro* and *ex vitro* of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 95-114.

TAKAHASHI, N.; PHINNEY, B. O.; MACMILLAN, J. **Gibberellins**. New York: Springer-Verlag, 1991. 426 p.

TSUBOI, H.; NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação das sementes de maracujazeiro-amarelo. **Revista Científica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 63 –62, 1992.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. L. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. (Ed.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. p. 135-146.

ZONTA, J. B. et al. 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, 8.; Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação, 5., 2005, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: UNIVAP. p. 590-592, 2005.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMIENTO IN VITRO DE PASSIFLORA

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE PASSIFLORA

Resumo

O *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* é a espécie mais comumente conhecido no mundo, mas o seu cultivo vem passando inúmeras dificuldades pois é muito suscetível a patógenos como a fusariose e a morte-prematura. Algumas espécies silvestres apresentam resistência a morte-prematura, sendo um novo caminho para a melhora da passicultura. A técnica de cultura de tecidos proporciona obtenção de mudas isentas de patógenos, em curto período de tempo e espaço, com isso a propagação e o estabelecimento *in vitro* de espécies é uma excelente alternativa para o cultivo do maracujá. O objetivo deste trabalho foi verificar o protocolo para estabelecimento *in vitro* de *Passiflora tenuifila*, *Passiflora foetida*, *Passiflora caerulea*, por meio de técnicas estatísticas específicas que respeitassem a natureza das variáveis com características qualitativas e quantitativas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições. Foram utilizados os testes estatísticos não-paramétricos, Qui-Quadrado, Teste Exato de Fisher, além do índice Kappa, para análise de dados qualitativos e análise de variância e teste de Tukey para as variáveis quantitativas. Os testes qualitativos utilizados mostraram-se eficientes e promissores para este tipo de análise, corroborando com o resultado encontrado através dos testes quantitativos. As espécies *Passiflora caerulea* e *Passiflora tenuifila* diferiram do *Passiflora foetida*, obtendo médias superiores pelo teste de Tukey para as variáveis SCDES, NG e COR, indicando que essas espécies se adaptaram melhor ao protocolo utilizado.

Palavras-Chave- *Passiflora tenuifila*. *Passiflora foetida*. *Passiflora caerulea*.
micropropagação.

Abstract

The *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* it's the most common specie in the world, but its cultivation has been confronting several difficulties because it's very susceptible to pathogens like fusarium and premature-death. Some wild species have shown

resistant to premature-death, becoming a new path to improvement of passiculture. The technique of tissue culture provides the attainment of seedlings without pathogens, in a short period of time and space, with this the *in vitro* propagation and establishment of species it's an excellent alternative for passion-fruit cultivation. The goal of this study was to verify the *in vitro* establishment protocol of *Passiflora tenuifila*, *Passiflora foetida*, *Passiflora caerulea*, by means of specific statistical techniques that respected the nature of the variables with quality and quantitative characteristics. Completely randomized block design was used, with 25 repetitions. Was used the non-parametric statistical tests, Chi-Square, Fisher's Exact Test, besides the Cohen's Kappa, to analyze qualitative datum and variance analysis and Tukey's Test for the analysis of quantitative variables. The qualitative tests used showed efficiency and promising for this kind of analysis, corroborating with the result that was found through the quantitative tests. The species *Passiflora caerulea* and *Passiflora tenuifila* differ from *Passiflora foetida*, obtaining superior medias by Tukey's test for the variables SCDES, NG and COR, indicating that this species have a better adaptation to the utilized protocol.

Keywords- *Passiflora tenuifila*. *Passiflora foetida*. *Passiflora caerulea*.
micropropagation.

7 INTRODUÇÃO

Do gênero *Passiflora*, a espécie mais comumente conhecido é o maracujá amarelo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, que é nativa do Brasil, maior centro de origem do gênero, contendo mais de 150 espécies, destas 60 são aptas ao consumo humano. O maracujá apresenta diversas funções além do seu consumo *in natura*, como uso em fármacos, grande fonte de vitamina A e C, contém também passiflorina, utilizada como calmante natural (OLIVEIRA et al., 1994).

O cultivo do maracujá vem passando por dificuldades nas últimas décadas, a principal espécie utilizada, o *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* é muito suscetível a patógenos como a fusariose e a morte-prematura (PREISIGKE et al., 2017), a cultura antes perene passa, em pomares comerciais a ter duração de um a seis anos de vida, devido à grande incidência de doenças, principalmente ao ataque fúngico relacionado a vários agentes patogênicos, diminuindo consideravelmente a longevidade das plantas do pomar (KUDO et al., 2012).

Fungos como *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, *Fusarium solani* e a bactéria *Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae* são os principais responsáveis pela incidência de morte-prematura no maracujazeiro, provocando necrose e rompimento dos tecidos na região do colo da planta, impedindo a translocação de seiva, levando a planta à morte (NAKAMURA, 1987; OLIVEIRA, 1987).

O estudo citogenético em espécies de importância econômica pode contribuir de forma significativa no melhoramento genético (BRITO et al., 2018). O estabelecimento *in vitro* de novas espécies é uma saída para o desenvolvimento de resistência nas plantas dos pomares por meio da enxertia, pois algumas espécies silvestres apresentam resistência a morte-prematura, sendo um novo caminho para a melhora da passicultura, além disso, a técnica de cultura de tecidos é a de maior sucesso dentre os meios para obtenção de mudas isentas de patógenos, em curto período de tempo e espaço, com isso a propagação e o estabelecimento *in vitro* de espécies é uma excelente alternativa para o cultivo do maracujá (ANDRADE et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar o protocolo para estabelecimento *in vitro* de *Passiflora tenuifila*, *Passiflora foetida*, *Passiflora caerulea*, por meio de técnicas estatísticas específicas que respeitassem a natureza das variáveis com características qualitativas e quantitativas.

8 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados material vegetal das espécies *Passiflora caerulea*, *Passiflora tenuifila* e *Passiflora foetida*. Este experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia da Unesp-FEIS (Ilha Solteira – SP). O substrato para plantio constituiu-se de três partes de solo e uma de esterco de curral curtido (bovino), o solo foi adubado com 3 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de KCl por 1 m³. As sementes foram colocadas para germinar à profundidade de 1 cm em sacos de polietileno, contendo o substrato (1 L).

As plantas cultivadas em casa de vegetação tiveram partes coletadas, estas foram desinfetadas com etanol 70% (40 s) e hipoclorito de sódio 0,2% (15 min) e lavadas 4 vezes com água deionizada esterilizada. Para o estabelecimento *in vitro* utilizaram-se de microestacas, com 1 cm de comprimento, contendo gemas axilares. Estas foram cultivadas em frascos (30 mL) do meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações dos sais minerais e vitaminas (½MS), suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificado com 6 g L⁻¹ de ágar, com pH de 5,8 e autoclavado a 121°C (1 kg cm⁻²). O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons de 22 µE m⁻² s⁻¹.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições, os tratamentos eram constituídos de três espécies (*Passiflora caerulea*, *Passiflora tenuifila* e *Passiflora foetida*).

Nos 60 dias que se seguiram à incubação dos explantes, em meio de cultura, foram avaliadas: a contaminação endógena (CEN), contaminação exógena (CEX), o score de desenvolvimento do explante (SCDES), desenvolvimento da microplanta

(DM), o comprimento (cm) das brotações (CB), o número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (COR), as escalas DM e CF foram criadas pelo próprio autor para avaliação deste experimento.

Essas escalas utilizam notas, que variam de 1 a 5 para quantificar a viabilidade dos explantes. Para DM considerou-se a escala 1 = gema não desenvolvida mais vigorosa; 2 = gema em desenvolvimento; 3 = plântula em crescimento; 4 = planta com folhas e 5 = planta completa, e para CF considerou-se: 5 = folhas verde-escuro; 4 = folhas verde-médio; 3 = folhas verde-claro; 2 = folhas verde-amareladas; 1 = folhas amareladas.

Os dados para as variáveis contaminação endógena, contaminação exógena e desenvolvimento ou não do explante, foram analisados por meio do teste de Qui-Quadrado (PEARSON, 1900) e do Teste Exato de Fisher (FISHER, 1922), bem como pelo índice Kappa.

Testes não paramétricos, que consistem em analisar a associação entre as variáveis qualitativas. Nos casos em que uma das caselas teve frequência menor que 5 foi adotado o teste exato de Fisher. Para interpretação desses dois testes (atribuindo a hipótese nula: de que não há relação entre os tratamentos estudadas e os resultados encontrados), utilizamos o p-valor como regra de decisão. As relações entre os tratamentos foram ditas significativas se o p-valor do teste foi inferior a 0,05, ou seja, existe diferença entre os tratamentos. Do mesmo modo se o p-valor do teste foi superior ao nível de significância adotado ($>0,05$) as relações entre os tratamentos foram consideradas não significativas, ou seja, as metodologias comparadas produzem resultados estatisticamente iguais, a diferença se faz devido ao fator aleatório e não ao método utilizado.

O índice Kappa foi utilizado com a finalidade de medir a concordância entre as espécies e observar se as metodologias de propagação utilizadas foram adequadas para as três espécies, e qual a relação entre elas. O índice Kappa mede o grau de concordância de dois ou mais métodos na interpretação de um determinado resultado, o coeficiente de concordância total utilizado para medir a acurácia apresenta escala de 0 a 1, sendo 0 sem concordância e com 1 concordância perfeita (HELLDEN et al., 1980).

Para o cálculo da proporção de concordância adotou-se o modelo de concordância diagonal proposto por Goodman (1972,1979), que utiliza a equação 1 para estimar a concordância:

$$k = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} = 1 - \frac{1 - P_0}{1 - P_e} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde P_0 é a taxa de aceitação relativa e P_e é a taxa hipotética de aceitação, sendo que quando a concordância é total entre os dois conjuntos de dados, $k = 1,0$. A interpretação desse índice obedeceu a seguinte ordem: < 0 Não existe Concordância; $0 - 0,20$ Concordância Mínima; $0,21 - 0,40$ Concordância Razoável; $0,41 - 0,60$ Concordância Moderada; $0,61 - 0,80$ Concordância Substancial; $0,81 - 1,0$ Concordância Perfeita determinada pelo índice Kappa (COHEN, 1960).

Os dados para comprimento das brotações (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF) foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial e as médias das espécies foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A variável comprimento das brotações foi transformada para $\ln(x + 10)$ e as variáveis número de folhas e coloração da folha foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Para análise dos dados utilizou-se o instrumento computacional dos programas R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018) e SAS *on demand* (SAS, 2018).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para contaminação exógena as porcentagens obtidas para cada uma das espécies foram 0,34 % para *P. caerulea*; 0,31% para *P. tenuifila* e 0,20 para *P. foetida*. Essas porcentagens de contaminação, obtidas pela desinfestação dos explantes com hipoclorito de sódio a 0,2% por 15 min corroboram com as obtidas por Cruz et al. (2016), que relataram a desinfestação de sementes a 2,5% de hipoclorito de sódio em 3 tempos distintos e obtiveram taxa máxima de contaminação de 33,3% em 10min.

Para contaminação endógena as porcentagens obtidas para cada uma das espécies foram 0,35 % para *P. caerulea*; 0,27% para *P. tenuifila* e 0,39% para *P. foetida*. A porcentagem de desenvolvimento dos explantes foi de 0,75 % para *P. caerulea*; 0,67% para *P. tenuifila* e 0,51% para *P. foetida*.

Para análise dos dados com nível de mensuração nominal uma vez que as variáveis são qualitativas, e contendo amostras independentes, foram utilizados os testes estatísticos não-paramétricos, Qui-Quadrado, Teste Exato de Fisher, além do índice Kappa, regularmente utilizado para avaliar mapas de georreferenciamento.

Os coeficientes do índice Kappa foram utilizados para analisar a contaminação exógena nas três espécies de *Passiflora* sp. (**Tabela 9**) e somente o *Passiflora caerulea* obteve uma concordância razoável (0,23); os demais se encaixaram na concordância mínima, indicando uma fraca relação entre a contaminação exógena e a espécie.

Para todas as associações verificadas entre espécies, nas variáveis analisadas, o p-valor tanto de teste qui quadrado quanto teste exato de Fisher foram superiores ao nível de significância adotado ($>0,05$), as relações entre as espécies foram consideradas não significativas, ou seja, não existe diferença estatística significativa entre as espécies para as variáveis analisadas, as espécies produzem resultados estatisticamente iguais para contaminação exógena, contaminação endógena e desenvolvimento dos explantes, a diferença que existe nos resultados se faz devido ao fator aleatório. Mas quando quantificamos essa diferença pelo índice Kappa conseguimos encontrar resultados distintos para as espécies.

Para contaminação exógena a espécie *P. caerulea* teve concordância razoável com *P. tenuifila* e mínima com *P. foetida* e a espécie *P. tenuifila* não teve concordância com o *P. foetida*, o que nos mostra que para essa variável *P. caerulea* não difere de *P. tenuifila* e ambas diferem de *P. foetida* (**Tabela 9**).

Para contaminação bacteriana a espécie *P. caerulea* teve concordância razoável com *P. tenuifila* e com *P. foetida*, mas o *tenuifila* não teve concordância com o *foetida*, mostrando *Caerulea* não difere de *P. tenuifila* e de *P. foetida*, mas *P. tenuifila* e *P. foetida* apresentam comportamento distinto (**Tabela 9**).

Tabela 10 - Análise de variância e teste de Tukey para as variáveis *score* de desenvolvimento (SCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF) e *score* de coloração (COR) no estabelecimento in vitro de espécies de *Passiflora*. Ilha Solteira/SP, 2017.

Tabela 9 – Índice Kappa, teste Qui-quadrado (*p* valor) e Teste Exato de Fisher (*p* valor) para contaminação exógena, contaminação endógena e desenvolvimento dos explantes entre as espécies de *Passiflora*. Ilha Solteira/SP, 2018.

Estatística	CONTAMINAÇÃO EXÓGENA		
	<i>P. caerulea</i>		<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. foetida</i>	<i>P. foetida</i>
Kappa*	0,23	0,17	0,14
Qui-quadrado	0,2636	0,2900	0,5310
Fisher	0,3684	0,3555	0,5088
Estatística	CONTAMINAÇÃO BACTERIANA		
	<i>P. caerulea</i>		<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. foetida</i>	<i>P. foetida</i>
Kappa*	0,34	0,21	0,08
Qui-quadrado	0,1276	0,0697	0,6390
Fisher	0,1736	0,1437	1,0000
Estatística	DESENVOLVIMENTO DOS EXPLANTES		
	<i>P. caerulea</i>		<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. foetida</i>	<i>P. foetida</i>
Kappa*	0,37	0,05	0,20
Qui-quadrado	0,6929	0,7136	0,3710
Fisher	0,1273	0,7307	0,5598

*<0 não existe concordância; 0-0,20 concordância mínima; 0,21-0,40 concordância razoável; 0,41-0,60 concordância moderada; 0,61-0,80 concordância substancial; 0,81-1,0 concordância perfeita. Fonte: Lucas Bernardo Pigari.

Para desenvolvimento dos explantes a espécie *P. caerulea* teve concordância razoável com *P. tenuifila* e mínima com *P. foetida*, assim como *P. tenuifila* teve concordância mínima com *P. foetida* mostrando que *P. caerulea* não é diferente de *P. tenuifila*, mas ambos apresentam comportamento distinto de *P. foetida* (**Tabela 9**).

A análise de variância (**Tabela 10**) para as espécies estudadas, resultou em valores significativos para as variáveis *score* de desenvolvimento (SCDES), número de gemas (NG) e *score* de coloração (COR). Para comprimento da brotação (CB), e número de folhas (NF) não foram encontradas diferenças significativas entre as espécies.

FONTES DE VARIAÇÃO	SCDES	NG	CB	NF	COR
Espécies (p-valor)	<0,01**	0,0275*	0,6574 ^{ns}	0,4360 ^{ns}	0,0438*
Média	0,83	1,44	0,66	3,08	1,67
CV	145,12	74,98	36,24	49,72	54,35
Espécies					
<i>P. caerulea</i>	1,23±1,42ab	1,67±1,23 ^a	0,63±0,22a	2,90±1,38 ^a	1,55±0,80ab
<i>P. tenuifila</i>	0,65±1,35ab	1,45±1,39ab	0,70±0,27a	4,00±2,64 ^a	3,00±1,73a
<i>P. foetida</i>	0,30±0,60b	1,08±0,47b	0,70±0,26a	4,00±0,00a	1,00±0,01b
DMS	0,61 ²	0,55	0,24	3,16	1,90

*Significativo e ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste f.** Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste f. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. DMS: diferença mínima significativa do Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²DMS do teste Modificado de Tukey a 5% de probabilidade (ANDRADE et al., 2012).

Fonte: Lucas Bernardo Pigari.

De acordo com o teste de Tukey (**Tabela 10**) para score de desenvolvimento os melhores resultados foram para as espécies *Passiflora caerulea* e *Passiflora tenuifila* com $1,23 \pm 1,42$ e $0,65 \pm 1,35$ respectivamente, não havendo diferença estatística entre elas. Para número de gemas o melhor resultado foi para *P. caerulea* ($1,67 \pm 1,23$ gemas/explante) e o resultado menor foi para *P. foetida* ($1,08 \pm 0,47$ gemas/explante), mas apesar dessas espécies diferirem entre si, os resultados não foram distintos de *P. tenuifila* ($1,45 \pm 1,39$ gemas/explante) para as espécies. Para score de coloração o melhor resultado foi para *P. tenuifila* ($3,00 \pm 1,73$) e o menor foi para *P. foetida* ($1,00 \pm 0,01$) mas apesar dessas espécies diferirem entre si, os resultados não foram distintos de *P. caerulea* ($1,55 \pm 0,8$). Para as demais variáveis não foi encontrada diferença estatística entre as espécies.

As espécies *Passiflora tenuifila*, *P. caerulea* e *P. foetida* não são domesticadas, com isso a variabilidade entre elas e os acessos coletados é muito ampla, a variabilidade intraespecífica e seus diferentes requerimentos de nutrientes, tempo de exposição à luz, e outros fatores a se controlar na micropropagação possivelmente levou a essa diferença nos resultados (**Tabela 10**) entre as espécies (LIMA et al, 2004).

Soares et al. (2012) obtiveram como resposta da análise descritiva do estabelecimento de *Passiflora foetida* os seguintes valores: 0,76 comprimento médio das plântulas (cm); 0,56 número médio de gemas axilares, valores similares aos encontrados nesse trabalho para comprimento de brotações ($0,70 \pm 0,26$ cm) e inferiores ao encontrado para número de gemas de $1,08 \pm 0,47$.

Cruz (2016) obteve após 90 dias de estabelecimento de *Passiflora teunuifila* os seguintes valores que variaram de $1,83 \pm 0,76$ a $3,13 \pm 1,81$ para comprimento médio das plântulas (cm) e $9,23 \pm 4,47$ a $10,95 \pm 4,12$ para número de folhas.

Jafari, Daneshvar e Lotfi (2017) não conseguiram regenerar explantes de *Passiflora caerulea* sem adicionar regulares vegetais, fato que não ocorreu neste trabalho. Os autores encontraram resposta a regeneração apenas nos tratamentos que combinaram BAP, TDZ, KIN e IBA. Não foram encontradas gemas sem adição dos reguladores e os valores encontrados entre as combinações dos reguladores variaram de 2,16 a 8,86 gemas por explante.

10 CONCLUSÃO

As espécies *Passiflora caerulea* e *Passiflora tenuifila* diferiram do *Passiflora foetida*, obtendo médias superiores pelo teste de Tukey para as variáveis SCDES, NG e COR, indicando que essas espécies se adaptaram melhor ao protocolo utilizado.

O teste qui quadrado e o teste exato de Fisher se mostraram promissores para análise dos dados qualitativos e o índice Kappa mostrou ser uma ferramenta eficiente para quantificar as diferenças entre variáveis de natureza qualitativa. Através desse índice pode-se perceber que mesmo nas variáveis qualitativas as três espécies estudadas apresentaram o mesmo comportamento, pois de modo geral *P. caerulea* e *P. tenuifila* apresentaram o mesmo comportamento e diferiram de *P. foetida*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan. mar. 2000.
- BRITTO, F. F.; DIAS, D. L. O.; AMARAL, C. L. F.; e MAFFEI, E. M. D. Caracterização de genótipos de maracujazeiros com vistas à hibridação. **Cultura Agrônômica: Revista de Ciências Agrônômicas**, Ilha Solteira, v. 27, n. 1, p. 111-123, 2018.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and psychological measurement**, London, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.
- CRUZ, D. C. **Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC. e cultura *in vitro* de *Passiflora tenuifila***. 2016. 110 f. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação)- Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, 2016.
- FISHER, R. A. On the mathematical foundations of theoretical statistics. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**, London, v. 222, n. 594-604, p. 309-368, 1922.
- Goodman, N. **Seven strictures on similarity: problems and projects**. Indianapolis: Bobbs-Merrill, 1972.
- GOODMAN, N. **Ways of worldmaking**. Indianapolis: Hackett Publishing, 1978. 148 p.
- HELLDEN, U. **A test of Landsat-2 imagery and digital data for thematic mapping illustrated by an environmental study in northern Kenya**. Sweden; Lund University Natural Geography Institute Report, 1980. v. 47.
- JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H.; LOTFI, A. In vitro shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. **BioTechnology**, Poland, v. 98, n. 2, p. 113-119, 2017.
- KUDO, A. S.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BLUM, L. E. B. Suscetibilidade de genótipos de maracujazeiro-azedo à septoriose em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 200-205, 2012.
- NAKAMURA, K. Murcha e morte. In: RUGGIERO, C. **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 160-61.
- OLIVEIRA, J. C. de et al. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p. 27-37.

OLIVEIRA, J. C. de. Melhoramento genético. **Maracujá**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 218-246, 1987.

PEARSON, K. X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. **Philosophical Magazine and Journal of Science**, London, v. 50, n. 302, p. 157-175, 1900.

PREISIGKE, S. D. C.; SILVA, L. P. D.; SERAFIM, M. E.; BRUCKNER, C. H.; ARAÚJO, K. L.; NEVES, L. G. Early selection of *Passiflora* species resistant to fusariosis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 321-325, 2017.

SOARES, W. S. et al. Estabelecimento in vitro e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n.3, p. 138-142, 2012.

CAPÍTULO 3

TAMANHO DE PARCELA EXPERIMENTAL DE PASSIFLORA

Resumo

A determinação do tamanho de parcela é uma questão prática pertinente ao planejamento experimental, e sua caracterização de forma otimizada permite a obtenção de maior precisão e resultados com qualidade. Diante disso, neste trabalho objetivou-se determinar o tamanho de parcelas em experimentos de maracujazeiro em dois ensaios de uniformidade com a espécie *Passiflora setacea* e *Passiflora alata*. O experimento foi constituído de um substrato para plantio com três partes de solo e uma de esterco de curral curtido, o solo foi adubado com 3 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de KCl por 1 m³. Cada espécie de passiflora foi considerada um ensaio de uniformidade com 40 unidades básicas. As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 60 dias após o transplante, observando-se altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, número de gemas e clorofila. Foram simulados diversos tamanhos parcelas, em que cada planta foi considerada primeiramente como uma unidade básica até 40 plantas por unidade básica. Para a estimativa do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Os tamanhos de parcelas variaram com a espécie, encontrando-se valores de 3 a 7 ub para a *Passiflora setacea*, de 4 a 5 ub para *Passiflora alata*.

Palavras-Chave- Precisão Experimental. *P. setácea*. *P. alata*.

Abstract

– The determination of the plot size it's a relevant practical question on experimental planning, and its description on na optimized form allow it to have a greater precision and quality results. Therefore, on this study the mainly goal was to determine the plot size in experiments of passion-fruit in two uniformity tests with *Passiflora setacea* and *Passiflora alata*. The experiment was constituted of a substrate at planting with 3 thirds of soil and 1 of barnyard manure, the soil was fertilizer with 3 kg of simple superphosphate and 0,5 kg of KCl by 1m³. Each species of *Passiflora* was considered a uniformity test with 40 basic units. The avaliations of the experiments were done on 60 dias after the transplant, noticing the tree's height, stem's diameter, number of leaves, number of gems, number of meristems and chlorophyll. Several

plot sizes were simulated, in which each plant was first considered as a basic unit at maximum of 40 plants. For the estimation optimum plot size the maximum modified curvature method was used. The size plot's varied with the specie, founding values as 3 to 7 basic units for *Passiflora setacea* and 4 to 5 for *Passiflora alata*.

Keywords- Experimental Precision. *P. setácea*. *P. alata*.

11 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no setor de fruticultura, produzindo em média 40 milhões de toneladas de frutas por ano de 2012 a 2016, disponibilizando para esse cultivo uma área de 2,7 milhões de hectares aproximadamente.

A produção de maracujá foi de 703.489 toneladas em uma área colhida de 49.880 hectares, garantindo ao país o título de maior produtor mundial dessa frutífera. A região nordeste é a maior produtora do país, sendo responsável por cerca de 69,64% da produção nacional, e o estado da Bahia é o maior produtor. Além da Bahia (342.780t ou 49%), os estados brasileiros que se destacam na produção de maracujá são Ceará (98.122t ou 14%), Minas gerais (39.237 ou 6%), São Paulo (28.237 ou 4%), Espírito Santo (25.391t ou 4%), Santa Catarina (25.021t ou 4%), Pará (21.338 ou 3%), que juntos perfazem 82% da produção brasileira (IBGE, 2016).

No Brasil basicamente apenas duas espécies possuem interesse comercial: *Passiflora edulis*, utilizada para suco e *Passiflora alata*, conhecida como “maracujá doce”. Mas existem diversas espécies que podem ser promissoras para produção comercial e/ou estudos que visem o aumento da produção e ou melhoramento genético da cultura. *Dentre* as espécies comestíveis, além das citadas, temos: *P. caerulea*, *P. setacea*, *P. nitida*, *P. macrocarpa*, *P. maliformis* e *P. cincinnata*. Das espécies cultivadas pelo aspecto ornamental: *P. coccinea*, *P. suberosa* e *P. misera*, e, para fins medicinais: *P. incarnata*, *P. alata*, *P. edulis*.

Devido a sua importância econômica e a necessidade da realização de estudos que promovam desenvolver metodologias a serem aplicadas para aumento de produção, conservação de germoplasma, melhoramento genético dessas espécies são necessários que sejam realizados diversos experimentos, em diversas condições experimentais, utilizando distintas espécies de *Passiflora*. Desse modo estudos que visem a escolha do planejamento experimental, tamanho de parcelas, número de repetições tornam grandes aliados dos pesquisadores, pois a definição do tamanho de parcela experimental é um dos fatores mais importantes na experimentação agropecuária e varia em função do experimento, pois depende de uma série de fatores, dentre eles o local onde o experimento é realizado.

Sabe-se que uma das formas de tentar reduzir o erro experimental é aumentar o número de repetições, em teoria quanto maior o número de repetições,

maior é a precisão, uma vez que o aumento do número dos graus de liberdade do resíduo assegura maiores estimativas dos efeitos dos tratamentos. Mas os custos, tempo despendido, área experimental e mão de obra disponível podem tornar os experimentos com frutícolas onerosos, o que dificultariam a implantação e aprovação de projetos em agências de fomento.

O cálculo do tamanho ótimo de parcelas para cada tipo de experimentação poderá vir a fortalecer o setor frutícola do país. Dentre os métodos mais utilizados para o cálculo do tamanho de parcela estão o método da máxima curvatura e método da máxima curvatura modificado. Ambos, assumem a mesma metodologia sendo que o segundo apresenta estimativas mais robustas, uma vez que o ponto ótimo é encontrado com base em estatística e não apenas pelo visual. Mas em grande parte dos cálculos utilizando os dois métodos os valores encontrados e observados são bem próximos.

Celanti et al. (2016), utilizaram os métodos de inspeção visual da curvatura máxima e o da máxima curvatura modificado e obtiveram as mesmas estimativas para os tamanhos de parcelas através de ambos os métodos em seus estudos realizados com a cultura do mamão. Donato et al. (2008), observaram menores tamanhos de parcela obtidas pelo método da máxima curvatura modificado comparado ao método de inspeção visual da curvatura máxima em experimento com bananeira, indicando que o primeiro método seria o mais adequado para determinar tamanhos de parcela. Conclusão semelhante ao de Lopes et al. (2005), avaliando o tamanho de parcela ideal para sorgo granífero, que indicou o método da máxima curvatura modificado como o mais representativo.

O objetivo deste trabalho foi calcular o tamanho ótimo de parcelas para experimentos em casa de vegetação com a cultura do maracujazeiro utilizando o método da máxima curvatura modificado.

12 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois ensaios de uniformidade na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia da Unesp-FEIS (Ilha Solteira – SP). Para cada ensaio foi utilizada uma das espécies *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado e *P. alata* cv. BRS Mel do Cerrado, fornecidas pelo pesquisador Fábio Gelape Faleiro da Embrapa Cerrados.

O substrato para plantio constituiu-se de três partes de solo e uma de esterco de curral curtido (bovino), o solo foi adubado com 3 kg de superfosfato simples e 0,5 kg de KCl por 1 m³. Foram utilizadas 100 sementes por espécie, estas foram colocadas para germinar à profundidade de 1 cm em bandejas de isopor, com 200 células, de 15,8 ml de substrato por célula. Após a germinação as plantas foram transplantadas para jardineiras com 24,5 l de substrato. Cerca de 60 dias após o transplante foram medidas as seguintes variáveis: Altura da planta, Diâmetro do caule, Número de Folhas, Número de Gemas e Clorofila.

Para as parcelas simuladas de diferentes formas, mas com o mesmo tamanho, foi considerada a média aritmética dos coeficientes de variação, provenientes de formas de diferentes parcelas, sendo que cada espécie de passiflora foi considerada como um ensaio em branco. Desse modo, utilizando-se as 40 unidades básicas, dispostas convenientemente em linhas e colunas nas grades, em cada um dos ensaios simularam-se 25 diferentes tamanhos de parcelas, formados por X_1 unidades básicas na linha e X_2 unidades básicas na coluna.

Para cálculo do tamanho de parcelas foi adotado o método da máxima curvatura modificado por Lessman e Atkins (1963). Esse método incorpora o coeficiente de heterogeneidade do solo de Smith (1938), pelo estabelecimento de uma relação entre coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela, representada por uma equação de regressão do tipo potencial $y = a/x^b$, em que y representa o coeficiente de variação, e x correspondente ao tamanho da parcela em unidades básicas (MEIER; LESSMAN, 1971; BAKKE, 1988) e reside em determinar algebricamente o ponto em que a curvatura é máxima.

A equação geral $y = a/x^b$, define a relação entre a variância da variável resposta a ser estudada por área unitária e o tamanho de parcela em unidades básicas, $V_x = \frac{V_1}{x^b}$ (LESSMAN; ATKINS, 1963) e, também, a relação entre o coeficiente de variação e o tamanho da parcela, quando as constantes apropriadas a e b são conhecidas. Os coeficientes de variação são estimados nos ensaios em branco utilizando-se a expressão $CV_x = \frac{\sqrt{S_x^2}}{\bar{x}}$, sendo $V_x = S_x^2$ a variância e \bar{x} a média da produção das parcelas de x unidades básicas (LESSMAN; ATKINS, 1963; BAKKE, 1988), e justifica o uso da equação geral para relacionar o coeficiente de

variação e o tamanho da parcela, ou seja, $CV_x = \frac{a}{b}$, como ilustra Bakke (1988). Os parâmetros a e b podem ser estimados pelo método dos mínimos quadrados ponderados pelos respectivos números de graus de liberdade. Assim, para a função $CV_x = \frac{a}{b^x}$ o ponto de máxima curvatura pode ser estimado pela expressão sugerida por Meier e Lessmam (1971): $X_0 = \exp\{[1/(2b+2)]\log[(ab)^2(2b+1)/(b+2)]\}$, em que a é o coeficiente de regressão (intercepto); e b , coeficiente de regressão (inclinação). As análises referentes ao cálculo do tamanho de parcela foram realizadas através do instrumento computacional do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

13 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas dos parâmetros equações de regressão entre o coeficiente de variação e o seu correspondente tamanho de parcela em unidades básicas, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2), como também a estimativa do tamanho adequado da parcela (X_c) para as duas espécies de passiflora e suas respectivas variáveis são apresentadas na **Tabela 11**. Os valores do coeficiente de variação variaram de 7,59 a 16,6% para a espécie *P. setacea* e 6,51 a 15,1% para a espécie *P. alata*. Podemos verificar que para a espécie *P. setacea* os tamanhos de parcela encontrados variaram de 2,81 (Número de gemas) a 6,26 (altura), com coeficientes de determinação (R^2) de 0,83 e 0,91 %, respectivamente. Para *P. alata* os valores encontrados foram 3,92 (Diâmetro) a 4,97 (número de folhas), com coeficientes de determinação de 0,83 e 0,94%, respectivamente. As variações que ocorreram revelaram que houve um bom ajuste para todas as variáveis analisadas e que os dados se ajustam ao modelo estatístico utilizado para a determinação do tamanho ideal de parcela.

Tabela 11 - Estimativas dos parâmetros da relação $CV_{(x)} = a/x^b$, pelo método da máxima curvatura modificada, coeficiente de variação (CV %), valor da abscissa em que ocorre o ponto de máxima curvatura (X_c), coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis analisadas das espécies *P. setacea* e *P. alata*.

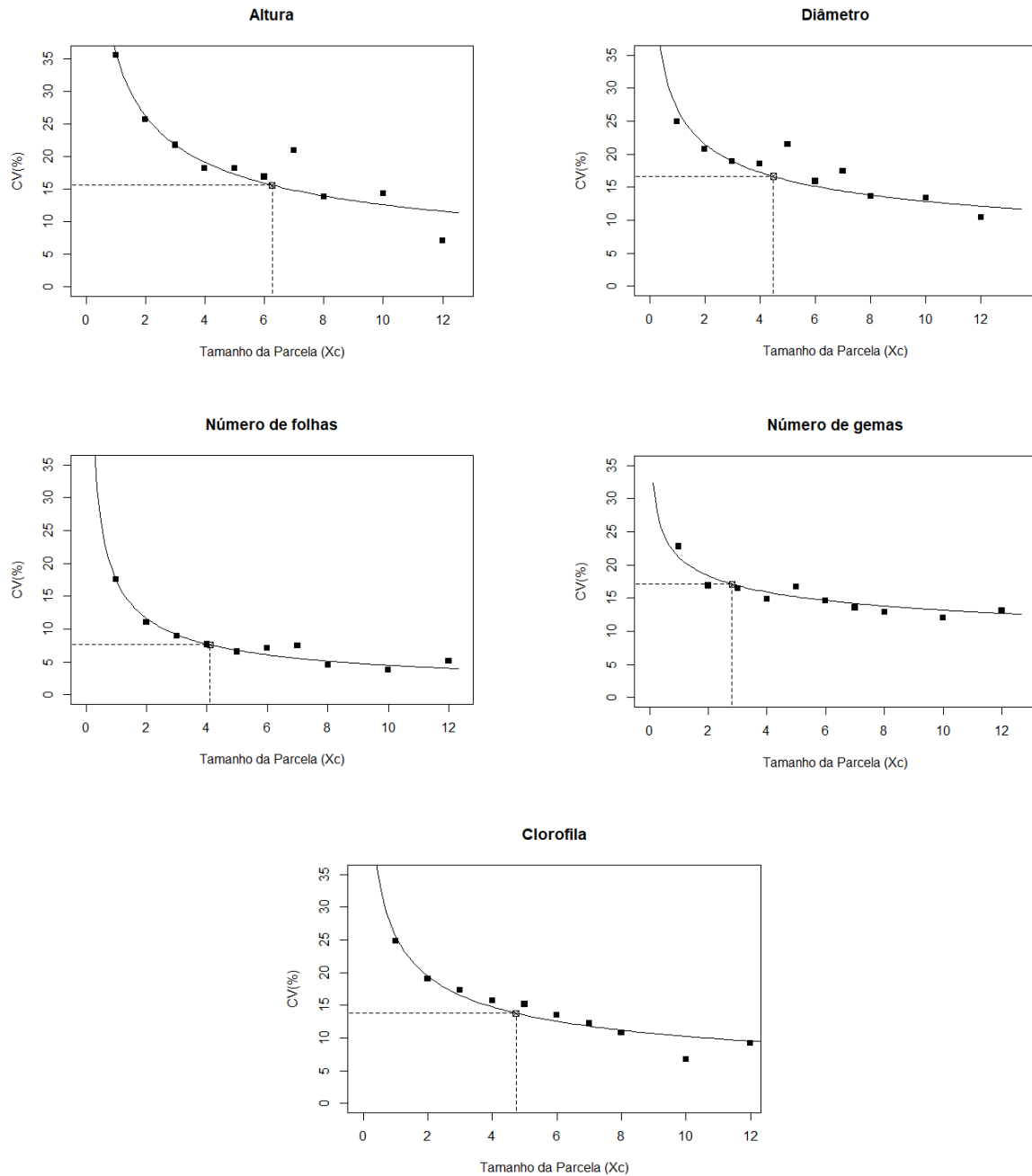
Espécies	Variáveis	Parâmetros		Coeficiente	Tamanho	Coeficiente
		\hat{a}	\hat{b}	de variação CV	de parcela X_c	de determinação R^2
<i>P. setacea</i>	Altura	36,0	0,45	15,6	6,26	0,91
	Diâmetro	26,9	0,32	16,6	4,48	0,83
	Nº de Folhas	17,5	0,59	7,59	4,11	0,94
	Nº de Gemas	21,2	0,42	17,1	2,81	0,83
	Clorofila	25,6	0,39	13,8	4,74	0,90
<i>P. alata</i>	Altura	27,8	0,22	20,8	3,71	0,78
	Diâmetro	23,1	0,309	15,1	3,92	0,87
	Nº de Folhas	25,0	0,488	11,4	4,97	0,96
	Nº de Gemas	18,1	0,636	7,21	4,26	0,94
	Clorofila	17,6	0,727	6,51	4,24	0,97

Fonte: Lucas Bernardo Pigari.

Pelas estimativas do coeficiente (a), intercepto da regressão, que estima o CV máximo, nota-se que houve pouca variação de valores (**Tabela 11**) sugerindo uniformidade entre as variáveis nas duas espécies. Com relação ao coeficiente de regressão (b) que pode ser visto como uma medida de variabilidade do material em estudo, de modo que valores próximos de zero, indicam baixa variabilidade e valores próximos de um indicam alta variabilidade, observa-se a ocorrência de maior variabilidade para a variável clorofila na espécie *P. alata* (**Tabela 11**).

As **Figura 1** e **2** mostram os gráficos da relação do CV com o tamanho de parcela obtidos por meio do método da máxima curvatura modificado para as espécies.

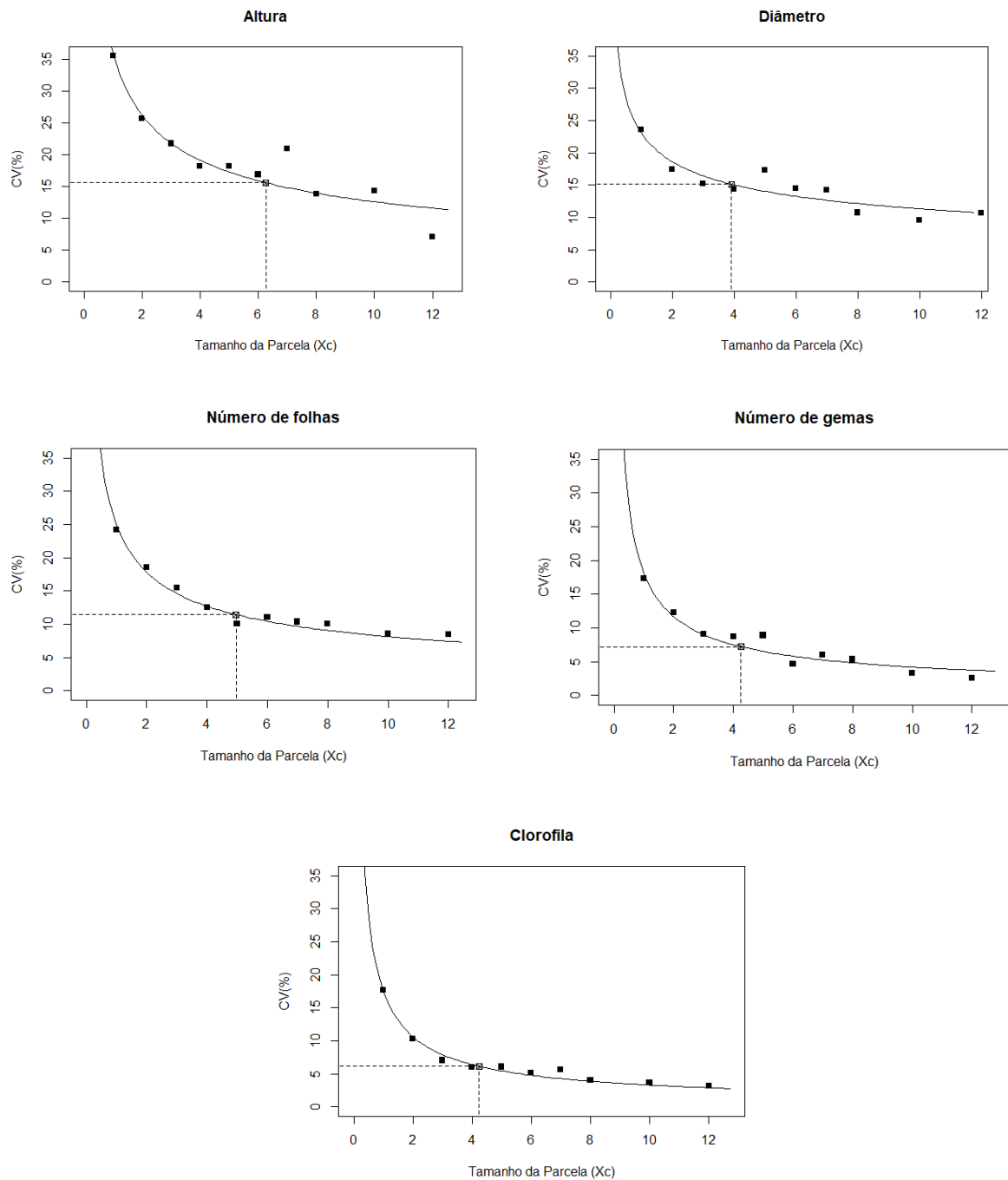
Figura 14 - Relação entre o coeficiente de variação CV (%) e tamanho de parcela (X_c) para as variáveis da espécie *P. setacea*.



Fonte: Lucas Bernardo Pigari.

de *Passiflora setacea* e *Passiflora alata* respectivamente, do qual possível determinar que o ponto de inflexão da curva, que é o ponto onde é definido o tamanho ideal da parcela.

Figura 15 - Relação entre o coeficiente de variação CV (%) e tamanho de parcela (X_c) para as variáveis da espécie *P. alata*.



Fonte: Lucas Bernardo Pigari.

Pelo fato do tamanho de parcela ser estimado algebricamente, os valores obtidos não são necessariamente inteiros, o que leva a possibilidade de arredondamento sempre para cima, pois este método estima valores pequenos de tamanhos de parcela, existindo a possibilidade de decréscimo nos valores do

coeficiente de variação com o aumento do tamanho de parcela na região superior ao ponto de máxima curvatura, como descrito por Henriques Neto et al. (2004).

Diversos autores utilizaram o método da máxima curvatura modificada para determinar o tamanho de parcelas nas mais distintas culturas. Muniz et al. (1999), Muniz et al. (2009) e Simplício et al. (1996) determinaram o tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill com parcelas quadráticas, lineares e retangulares e os tamanhos de parcelas encontrados foram de 4 ub, 5 ub e 10 ub respectivamente.

Parcelas com 5 ub por fila para híbrido simples e 6 ub por fila para híbrido duplo e triplo em milho (CARGNELUTTI FILHO et al., 2011), 5 a 10 ub em Eucalipto (SILVA et al, 2003), 10 ub em cana de açúcar (LEITE, 2007), 8 ub em feijão (CARNEIRO et al., 2012), 6 ub em bananeira (DONATO et al., 2008), 8 ub em Jatrofa (BHERING et al., 2015), 60 ub em candeia, conformação retangular 2x30 (linhas x plantas) (OLIVEIRA et al., 2011); 2,38 m² com a cultura do arroz (PARANAÍBA et al., 2009), 3,2 m² em sorgo granífero (LOPES et al., 2005).

Em frutíferas foram encontradas parcelas com 18 ub em tomateiro (LOPES et al., 1998), 12 ub em videira, 10 ub em cultivo no solo e morango e 6 ub em cultivo hidropônico em morango (COCCO et al, 2010), posteriormente Brum et al. (2016) confirmaram 6 ub em cultivo hidropônico; 5 ub em mamão (CELANTI et al., 2016).

Peixoto et al. (2011), Campos et al. (2010) e De Oliveira da Silva et al. (2012) utilizaram o modelo de regressão linear segmentado com platô, com as culturas do maracujazeiro *in vitro*, café e rabanete, respectivamente. Peixoto et al. (2011) encontrou 6 ub pelo método de regressão linear e de 10 ub pelo modelo de regressão quadrático com platô, Campos et al. (2010) foi 12 ub e De Oliveira da Silva et al. (2012) estimam tamanhos de parcela diferentes; de 21 a 63 ub.

14 CONCLUSÃO

Em experimentos com as espécies de *P. setacea* e *P. alata* houve pouca variabilidade em relação ao tamanho de parcela encontrado de acordo com o método da máxima curvatura modificado. Os tamanhos variaram com a espécie, encontrando-se valores de 3 a 7 ub para a *P. setacea*, de 4 a 5 ub para *P. alata*. Sugere-se utilizar parcelas formadas por 5 unidades básicas em experimentos com

essas espécies, pois foi o número de unidades que satisfizes todos as variáveis testadas.

REFERÊNCIAS

- BAKKE, O. A. **Tamanho e forma ótimos de parcelas em delineamentos experimentais**. 1988. 142 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) –Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Universidade do Estado de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- BHERING, L. L. et al. Plateau regression reveals that eight plants per accession are representative for *Jatropha* germplasm bank. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 65, p. 210-215, 2015.
- BRUM, B. et al. Tamanho ótimo de parcela para ensaios com sorgo granífero em duas épocas de semeadura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 315-320, 2008.
- CAMPOS, Katia Alves et al. Métodos de regressão não linear para determinação de tamanho de parcelas em ensaio com sistema radicular de mudas de cafeeiro. **SINAPE**, São Pedro, v. 19, p. 1-6, 2009.
- CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Tamanho de parcela e número de repetições em feijão de porco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 12, p.2142-2150, 2014.
- CARNEIRO, F.F. et al. Minimum number of common bean plants per plot to assess field resistance to white mold. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.11, n. 4, p. 358-364, 2011. Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/bd534dc5-2c80-70b2.pdf>>. Acesso em: 8 ago 2017.
- CELANTI, H. F. et al. Plot size in the evaluation of papaya seedlings 'baixinho de santa amália' in tubes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 3, e-553, 2016.
- CELANTI, H. F. et al. Optimal plot size in the evaluation of papaya scions: proposal and comparison of methods. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 4, p.469-476, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201663040006>>. Acesso em: 20 ago 2017.
- COCCO, C. et al. Tamanho e forma de parcela em experimentos com morangueiro cultivado em solo ou em hidroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 7, p. 681-686, 2010.

Cruz, D. C. **Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* D.C. e cultura *in vitro* de *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae).**

Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2016. 110 p.

DE OLIVEIRA DA SILVA, L. F. et al. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com rabanetes. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 59, n. 5, p. 624-629, 2012.

DONATO, S. L. R.; SIQUEIRA, D. L. de; SILVA, S. O. E; CECON, P. R.; SILVA, J. A.; SALOMÃO, L. C. C. Estimativas de tamanho de parcelas para avaliação de descritores fenotípicos em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 8, p. 957-969, 2008.

DONATO, S. L. R. et al. Estimativas de tamanho de parcelas para avaliação de descritores fenotípicos em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 8, p. 957-969, ago. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2008000800003>>. Acesso em: 22/80/2017.

HENRIQUES NETO, D.; SEDIYAMA, T.; SOUZA, M. A.; CECON, P. R.; YAMANAKA, C. H.; SEDIYAMA, M.; VIANA, A. E. Tamanho de parcelas em experimentos com trigo irrigado sob plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 6 p. 517-524, 2004.

LEITE, M. S. O. **Tamanho da amostra para seleção de famílias de cana-de-açúcar**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

LESSMAN, K. J.; ATKINS, R. E. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield test, **Crop Science**, Madison, v. 3, n. 6, p. 477-481, 1963.

LIMA, A. et al. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e fruticultura, 2004. 396 p.

LOPES, S. J. et al. Técnicas experimentais para tomateiro tipo salada sob estufas plásticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 28, p.193-197. 1998.

LOPES, S. J. et al. Tamanho de parcela para produtividade de grãos de sorgo granífero em diferentes densidades de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 6, p. 525-530, 2005.

LOPES, S. J. et al. Técnicas experimentais para tomateiro tipo salada sob estufas plásticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 28, p.193-197. 1998.

MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Sci**, Madison, v. 11, n. 1, p. 648-650, 1971.

MUNIZ, J. A. et al. Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill. II- parcelas quadradas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 2, n. 23, p. 446-453, 1999.

MUNIZ, J. A. et al. Estudo do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill, usando parcelas lineares. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 33, p. 1002-1010, agosto. 2009.

OLIVEIRA, G. M. V. et al. Tamanho e forma de parcelas experimentais para *Eremanthus erythropappus*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2011.

PARANAÍBA, P. F.; FERREIRA, D. F.; MORAIS, A. R. Tamanho ótimo de parcelas experimentais: proposição de métodos de estimação. **Revista Brasileira de Biometria**, Lavras, MG, v. 27, n. 2, p. 255-268, 2009.

PEIXOTO, A. P. B.; FARIA, G. A.; MORAIS, A. R. de. Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimento de conservação in vitro de maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 11, n. 41, p. 1907-1913, nov. 2011.

R PROGRAM, R CORE TEAM R. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, ano de publicação. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22/08/2017.

SILVA, R. L. da et al. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intraclasse e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 669-676, 2003.

SIMPLÍCIO, E. et al. Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden I: parcelas retangulares. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 33, n. 4, p. 1003-1010, 2009.

SMITH, H. F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 1-23, 1938.

SOARES, W. S. et al. Estabelecimento in vitro e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, p. 138-142, 2012.

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Substratos comerciais podem ser utilizados na substituição de meios de cultivo como o meio MS para a germinação de sementes de maracujá amarelo.

A giberelina teve um efeito positivo na germinação de maracujá amarelo, diferente do que muitos autores afirmavam.

As sementes comerciais não são indicadas para propagação vegetativa do maracujá amarelo. A utilização de sementes oriundas de mercados locais deve ser evitada devido ao grande risco de contaminação endógena.

O melhor tratamento físico no tegumento foi o lixamento das sementes, pois o mesmo não fere o eixo embrionário facilmente como o corte e melhor que intacta pôr o tegumento da semente do maracujazeiro ser impermeável.

As espécies de maracujá apresentaram comportamento diferenciado no cultivo *in vitro*. Comportamento que também é verificado em campo ou em casa de vegetação.

Este trabalho corrobora com o afirmado por Bake (1988) que mesmo fixando determinada espécie vegetal, podem ocorrer variações no tamanho e forma ótimos da parcela, ainda mais quando se tratam de espécies diferentes.

As estimativas de tamanho de parcela devem ser calculadas para cada espécie, cultivar, pois esse número pode ser influenciado pelo porte da planta, local, idade, característica avaliada, número de plantas utilizadas na unidade básica.

Apesar da literatura sobre estimativa de tamanho e forma de parcela envolvendo diferentes culturas ser vasta, não foram encontrados resultados de pesquisas nacionais nem internacionais que envolvessem experimentos com maracujazeiro em casa de vegetação.

Em experimentos com as espécies de *Passiflora Setacea* e *Passiflora Alata* houve pouca variabilidade em relação ao tamanho de parcela encontrado de acordo com o método da máxima curvatura modificado. Os tamanhos variaram com a espécie, encontrando-se valores de 3 a 7 ub para a *Passiflora Setacea*, de 4 a 5 ub

para *Passiflora Alata*. Sugere-se utilizar parcelas formadas por 5 unidades básicas em experimentos com essas espécies, pois foi o número de unidades que satisfaz todos as variáveis testadas. Portanto, os resultados alcançados poderão servir de subsídio para experimentos com a cultura de maracujazeiro em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

BAKKE, O. A. **Tamanho e forma ótimos de parcelas em delineamento experimentais**. 1988. 142 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.