

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

**TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS PARA
EXPERIMENTOS IN VITRO COM MARACUJAZEIRO**

GLÁUCIA AMORIM FARIA

**ILHA SOLTEIRA – SÃO PAULO
MAIO – 2008**

TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS PARA EXPERIMENTOS IN VITRO COM MARACUJAZEIRO

GLÁUCIA AMORIM FARIA

Engenheira Agrônoma

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2001.

Tese de doutorado submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Sistemas de Produção. Linha de pesquisa: Estatística e Experimentação Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr Evaristo Bianchini Sobrinho

Co-Orientador: Prof. Dr Augusto Ramalho de Moraes

UNIVERSIDADE ESTADUAL JULIO DE MESQUITA FILHO
DOUTORADO EM AGRONOMIA
ILHA SOLTEIRA - SÃO PAULO - 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

F224t

Faria, Gláucia Amorim.

Tamanho ótimo de parcelas experimentais para experimentos in vitro com maracujazeiro / Gláucia Amorim Faria. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2008
101 f. : tab., graf.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2008

Orientador: Evaristo Bianchini Sobrinho

Co-orientador: Augusto Ramalho de Moraes

Inclui bibliografia

1. Maracujá – Tamanho de parcela. 2. Maracujá – Método da máxima curvatura modificado. 3. Maracujá – Cultivo in vitro.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS PARA EXPERIMENTOS IN VITRO COM MARACUJAZEIRO

AUTORA: GLÁUCIA AMORIM FARIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUGUSTO RAMALHO DE MORAIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUGUSTO RAMALHO DE MORAIS
Departamento de Ciências Exatas / Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. WALTER VERIANO VALERIO FILHO
Departamento de Matemática / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. SHIZUO SENO
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. LEONARDO FERREIRA DUTRA
Centro Nacional de Pesquisa de Florestas / Embrapa - Florestas

Profa. Dra. APARECIDA GOMES DE ARAUJO
Departamento de Agricultura / Universidade Federal de Lavras

Data da realização: 19 de maio de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. AUGUSTO RAMALHO DE MORAIS

Aos meus pais José Carlos Faria e Rita Amorim Rocha Faria, aos meus irmãos, José Carlos Faria Junior e Flávio Amorim Faria.

DEDICO

A meu filho, a meus avós, tios e primos, em especial a meu tio Marcos Amorim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, presença constante em minha vida.

À meus pais, irmãos e filho pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Ao Dr. Augusto Ramalho de Moraes pela orientação, cuidados dispensados, apoio e amizade.

Ao Professor João Albany Costa, pela ajuda e amizade na realização deste trabalho.

Ao Dr. Evaristo Bianchini Sobrinho pela orientação.

À Flávio Amorim Faria pelo apoio e correção do inglês instrumental.

Ao Bibliotecário: João Josué Barbosa pela ajuda oferecida.

À Onilda e Adelaide pela dedicação e ajuda dispensada durante o curso.

Ao meu tio, Dr. Marcos Amorim Rocha, pelo apoio dado desde o ato na inscrição do doutorado até a conclusão.

À Ana Patricia Bastos Peixoto pela amizade, ajuda e apoio.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade concedida e concessão de suas instalações.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

TAMANHO DE ÓTIMO DE PARCELAS EXPERIMENTAIS PARA EXPERIMENTOS *IN VITRO* COM MARACUJAZEIRO

Autora: Gláucia Amorim Faria

Orientador: Prof Dr Evaristo Bianchini Sobrinho

Co-Orientador: Prof. Dr Augusto Ramalho de Moraes

RESUMO: Estudos preliminares referentes ao tipo de explante, meio de cultura são necessários para se definir protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, multiplicação e conservação *in vitro*, bem como garantir a fidelidade na resposta morfogênica. A determinação do número ideal de repetições e do tamanho ótimo de parcelas experimentais é uma das maneiras de se aumentar a precisão experimental e, conseqüentemente, maximizar as informações obtidas em um experimento. Este trabalho teve por objetivo a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos *in vitro* nas etapas de estabelecimento, desenvolvimento, multiplicação e conservação de *Passiflora sp.* Foram conduzidos sete experimentos, com diversos ensaios de uniformidade com as espécies *Passiflora giberti* N.E. Brown., *P. edulis* Sims f. *edulis*, e *P. laurifolia* L.. Foram simulados diversos tamanhos e formas de parcelas, em que cada frasco com um explante foi considerado como uma unidade básica (parcela), os quais foram combinados formando parcelas com até 10, 25 e 50 frasco com um explante por unidade básica, em função do tipo de experimento. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. De acordo com os resultados obtidos para experimentos *in vitro* com a espécie *P. giberti* N. E. Brown., o tamanho ótimo de parcelas recomendado é o de 15 frasco com um explante para experimentos de estabelecimento, 10 frasco com um explante por parcela para experimentos com conservação e 13 frasco com um explante para experimentos com desenvolvimento. Para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, o tamanho ótimo de parcelas recomendado é o de 11 frasco com um explante para experimentos de estabelecimento e 26 frasco com um explante para experimentos de multiplicação. Para a espécie *P. laurifolia* L., o tamanho ótimo de parcela deve ser de 9 frasco com um explante para experimentos com estabelecimento e 34 frasco com um explante para experimentos

de multiplicação, considerando as variáveis avaliadas em todos os experimentos. Os resultados alcançados poderão servir de subsídio para experimentos com a cultura de maracujazeiro *in vitro* sob diferentes condições.

Palavras-chave: *Passiflora* sp., estabelecimento, desenvolvimento, multiplicação, conservação, método da máxima curvatura modificado.

OPTIMAL SIZE OF PLOTS FOR EXPERIMENTS WITH SPECIES OF PASSIONFRUIT

Author: Gláucia Amorim Faria

Advisor: Prof Dr Evaristo Bianchini Sobrinho

Co- Advisor: Prof. Dr Augusto Ramalho de Moraes

ABSTRACT: Preliminary studies concerning to explant type and culture medium are necessary to define establishment, development multiplication and *in vitro* conservation protocols, as well to guarantee fidelity in morphogenic response. One of the ways to increase experimental precision is to determinate the ideal number of repetitions and the optimal size of plots and maximize informations obtained in a experiment. This work aimed to determinate optimal size of plots in *in vitro* experiments for establishment, development, multiplication e conservation of *Passiflora* sp. Seven experiments were made, with several uniformity essays with *Passiflora giberti* N.E. Brown., *P. edulis* Sims f. *edulis*, e *P. laurifolia* L. species. Various sizes and plot forms were simulated, where as each bottle with a explant was considered as the basic unit till 10, 25 e 50 bottles with a explant by basic unit. Modified maximum curvature method was employed to estimate the optimal size of plots. According to results *in vitro* experiments with *P. giberti* N. E. Brown. species, optimal size of plots recommended is 15 bottles with a explant in establishment experiments, 10 bottles with a explant by plot in conservation experiments and 13 bottles with a explant in development experiments. The optimal size of plots recommended to *P. edulis* Sims f. *edulis* species is 11 bottles with a explant in establishment experiments and 26 bottles with a explant in multiplication experiments. The optimal size of plots to *P. laurifolia* L. species is 9 bottles with a

explant in establishment experiments and 34 bottles with a explant in multiplication experiments, considering available variables in all experiments. The results obtained can subsidize with *Passiflora* culture *in vitro* experiments under different conditions.

Index Terms: *Passiflora* sp., establishment, development, multiplication, conservation, maximum modified curvature methods.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3 Capítulo 1	
TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS PARA EXPERIMENTOS APLICADOS AO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO PASSIFLORA	40
4 Capítulo 2	
TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS NA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE <i>PASSIFLORA</i> <i>GIBERTI</i> N. E. BROWN	57
5 Capítulo 3	
TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS A MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PASSIFLORA</i>	69
6 Capítulo 4	
TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO DE <i>PASSIFLORA GIBERTI</i> N. E. BROWN <i>IN VITRO</i>	86
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8 APENDICE.....	99

1 INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro merece especial destaque já que o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial, com uma produção de 615.196 toneladas. O nordeste é a região maior produtora de maracujá correspondendo a 61% da produção brasileira, sendo o estado da Bahia o maior produtor, com uma produção de 207.962 toneladas, o equivalente a 55% da produção nordestina e 34% da produção nacional. Além da Bahia, os estados brasileiros que se destacam na produção de maracujá são Ceará (16%), Espírito Santo (12%), Pará (8%), Minas gerais (7%), Sergipe (7%), São Paulo (4%) e Rio de Janeiro (2%), que juntos perfazem 90% da produção brasileira (IBGE, 2008).

O maracujazeiro pertence à ordem Passiflorales, sendo a família de maior interesse comercial a *Passifloraceae*, essa família foi identificada por Jussieu em 1805 e é formada por aproximadamente 630 espécies e 18 gêneros, com distribuição principalmente nos trópicos da América, Ásia e África. O gênero *Passiflora* é o de maior importância econômica, com 24 subgêneros e 465 espécies, das quais 150 a 200 são originárias do Brasil, podendo ser utilizadas com finalidades alimentícias, medicinais, ornamentais e muitas delas com finalidades múltiplas (VANDERPLANK, 2000).

No Brasil existe um grande número de plantas nativas do gênero *Passiflora*, conhecidas como maracujá, mas apenas duas delas possuem interesse comercial: *Passiflora edulis*, utilizada para suco e *Passiflora alata*, conhecida como “maracujá doce” (DOYAMA et al, 2005).

Dentre as espécies comestíveis, pode-se citar *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. maliformis*, *P. setacea*, *P. nitida*, *P. macrocarpa*, *P. caerulea* e *P. cincinnata*. Das espécies cultivadas pelo aspecto ornamental, merecem destaque *P. coccinea*, *P. alata*, *P. suberosa* e *P. misera*, e, como espécies mais utilizadas para

fins medicinais, citam-se *P. incarnata*, *P. alata*, *P. edulis*, entre outras (OLIVEIRA et al., 1994).

A planta do maracujazeiro é trepadeira de grande porte, com crescimento intenso e grande massa vegetativa. Seu caule na base é lenhoso e lignificado, diminuindo o teor de lignina quando se aproxima das extremidades apicais da planta. Na axila de cada folha se encontra uma gavinha, um botão floral e uma gema vegetativa. As flores são solitárias e protegidas por brácteas foliáceas, apresentando gineceu e androceu. Por se tratar de uma planta trepadeira, necessita de suporte para proporcionar boa distribuição dos ramos e garantir maior produção de frutos. Os sistemas de condução mais utilizados são latada e espaldeira vertical (SILVA; SÃO JOSÉ, 1994; LIMA, 1999).

A primeira referência ao maracujá no país corresponde ao ano de 1587, no Tratado Descritivo do Brasil, em que foi citado como “erva que dá frutos”. No entanto, acredita-se que Nic. Monardis, em 1569, foi quem descreveu a primeira espécie do gênero *Passiflora* (FARIA; CUNHA, 2002).

O cultivo comercial do maracujá no Brasil teve início na década de 70, com a espécie *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg, no entanto, foi na década de 80 que a cultura adquiriu expressão econômica incentivada pela indústria de suco (BRUCKNER et al., 2002). Outras espécies tais como *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. caerulea* e *P. laurifolia*, mais esporadicamente, *P. ligularis*, *P. macrocarpa*, *P. raddiana* e *P. capsularis*, também são cultivadas no Brasil e na América tropical, como fornecedoras de frutos para consumo *in natura*, indústria de suco, e utilização na farmacologia ou para uso ornamental (OLIVEIRA et al., 1994).

O maracujá pode ser consumido ao natural ou industrializado e seu suco destaca-se entre os produzidos com frutas tropicais, tendo excelente aceitação entre os consumidores, representando 67% dos sucos exportados. Mais da metade da produção mundial de maracujá é exportada sob a forma de suco, sendo que o mercado de suco doce pronto para beber é ainda pequeno se comparado ao suco concentrado (IPA, 2004). No Brasil, no entanto, 65% da produção de maracujá amarelo é destinada ao consumo *in natura* e apenas 35% destinada à industrialização de suco concentrado (SALOMÃO; VIEIRA; MOTA, 2001).

Muito embora o Brasil seja um dos principais exportadores de suco de maracujá, sua participação no mercado internacional vem diminuindo nos últimos anos, dado a forte concorrência da Colômbia, Peru e Equador. Os incentivos

governamentais, associados ao baixo custo da mão-de-obra nesses países, têm proporcionado a colocação do suco a preços mais competitivos. O preço de exportação tem oscilado entre U\$ 1.400 e U\$ 2.500 a tonelada. Com relação ao mercado interno, o consumo de suco processado tem apresentado tendência de crescimento (IPA, 2004).

Do ponto de vista sócio-econômico, o maracujá apresenta características interessantes no que concerne à geração de emprego, por permitir a ocupação de mão-de-obra em número considerável e estabilização do fluxo de renda, uma vez que é colhido por diversas vezes e de forma continuada por safra (SOUZA et al., 2002).

Embora apresentando posição de destaque, 95% dos pomares brasileiros são representados por uma única espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujá azedo ou amarelo) (BRUCKNER et al., 2002), e a produtividade média nacional não tem crescido como deveria (AGUIAR; SANTOS, 2001), estando em torno de 10 a 15 t ha⁻¹ (MELETTI; MAIA, 1999). Essa baixa produtividade pode estar relacionada ao plantio de uma única espécie, o que gera uma estreita base genética, acarretando em desaparecimento gradual de cultivares de interesse local e regional, além de implicar em vulnerabilidade às pragas e doenças. Estes aspectos têm preocupado os melhoristas, que entendem ser imprescindível a preservação do germoplasma ainda disponível.

Além disso, os plantios comerciais de maracujá têm sido alvo da incidência de doenças, sendo as mais severas a murcha do *Fusarium*, a bacteriose causada pela *Xanthomonas campestris* sp. pv. *passiflorae* e outra de etiologia desconhecida, o 'definhamento precoce', o que tem levado a necessidade de estudos no sentido de desenvolver variedades e híbridos hortícolas com resistência ou tolerância à doenças.

Aliado a estes fatores, a perda de material genético também vem ocorrendo devido ao desmatamento que se observa em todo país, fruto do avanço imobiliário, expansão agropecuária, construção de hidrelétricas e de rodovias (CUNHA, 1999), bem como à eliminação de espécies selvagens, conseqüentes da expansão de qualquer monocultura, uma vez que a tendência atual da agricultura é a eliminação de grande parte da diversidade genética, pela utilização de poucas variedades melhoradas e uniformes.

Basicamente existem duas estratégias de conservação utilizadas denominadas *in situ*, que permite a manutenção da biodiversidade dentro do ecossistema, preservando a dinâmica evolutiva do habitat original ou do ambiente natural, e *ex situ*, realizada fora do ambiente natural, e contempla a formação de bancos de sementes até bancos em campo, *in vitro* ou criopreservação (NASS, 2001).

Por estas razões, a realização de estudos que visem desenvolver metodologias a serem aplicadas para a conservação de germoplasma, consiste num caminho racional a ser seguido na consolidação da cultura no âmbito nacional e mundial, por permitir avanços no melhoramento genético e outras aplicações futuras.

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. Se realizado em campo, a heterogeneidade do solo será um dos fatores que mais afetará a precisão experimental. Se realizado em laboratório ou ambiente controlado, subentende-se que os tratamentos estarão sendo influenciados de forma homogênea pelas mesmas condições. Mas existem outros fatores que também influenciam a precisão experimental, dentre eles se destacam os sistemas de condução e a variabilidade genética do material trabalhado.

Em qualquer planejamento de experimentos é necessário que o pesquisador defina adequadamente o que irá constituir a unidade experimental ou parcela, visando a redução do erro experimental. Uma das formas de tentar reduzir o erro experimental é aumentar o número de repetições. 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. Aliado a esse, outro fator importante é o tamanho de parcela ou da unidade experimental.

O tamanho da unidade experimental na maioria das pesquisas é fixado pelo pesquisador, considerando-se basicamente a natureza dos tratamentos e a disponibilidade de recursos, sem levar em consideração outros fatores que afetam o tamanho e a forma das parcelas.

É de fundamental importância na experimentação que se conheça o tamanho de unidade experimental capaz de possibilitar elevada precisão dos resultados. Para isso, a recomendação mais freqüente é que se faça uso de parcelas retangulares e

pequenas, em detrimento das parcelas quadradas e grandes (HENRIQUES NETO, 2003).

Embora se considere que quanto maior o tamanho da parcela, menor o erro experimental e maior precisão do experimento, essa relação não é linear. O aumento no tamanho de parcela leva inicialmente a uma diminuição do erro experimental até certo ponto, a partir do qual o ganho com precisão é muito pequeno. Deste modo, é importante encontrar métodos de determinação do tamanho ótimo de parcelas, que minimizem os fatores aleatórios que podem afetar o experimento e os tratamentos possam expressar os seus potenciais a serem avaliados de modo mais coerente e livre de fatores perturbadores. Dentre eles, os mais utilizados são o Método de Inspeção Visual da Curvatura Máxima e Método da Curvatura Máxima.

Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada para determinação do tamanho ótimo de parcelas e do número ideal de repetições para experimentos *in vitro* com a cultura do maracujazeiro, de modo que o único trabalho encontrado foi na cultura do Crisântemo.

Face a essa lacuna de informação, o presente trabalho foi conduzido visando obter informações a respeito do tamanho ótimo de parcelas experimentais para avaliação de experimentos *in vitro* de *Passiflora* sp., a partir de ensaios laboratoriais, no município de Cruz das Almas, BA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais e importância das espécies: *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, *Passiflora laurifolia* Linnaeus e *Passiflora giberti* N.E. Brown.

2.1.1 *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*

A espécie *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, “maracujá roxo” ou “maracujá de comer” apresenta folhas profundamente trilobadas. As flores possuem sépalas e pétalas brancas, oblongas. Os filamentos da coroa são de cor púrpura na base e brancos no ápice. O fruto é ovóide ou globoso, púrpura quando maduro, com casca exterior dura e polpa doce e aromática (SILVA; SÃO JOSÉ, 1994).

Originário do Brasil, Paraguai e norte da Argentina, e agora cultivado comercialmente em quase todos os países tropicais e subtropicais. Esta espécie tolera uma ampla faixa de condições climáticas e é comercialmente cultivada desde o nível do mar, no leste da Índia, até altitudes de 2500 metros no Quênia e outros países africanos, tolerando bem períodos frios de 5 - 13°C, sendo também apreciado na Austrália (VANDERPLANK, 2000).

De maneira geral, muito se assemelha a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), sendo que a diferença básica relaciona-se com a pigmentação da casca do fruto, por ocasião da maturação destes.

2.1.2 *Passiflora laurifolia* Linnaeus

Quanto ao *Passiflora laurifolia* Linnaeus, apresenta folhas oblongo-ovaladas ou oblongas, verde brilhantes, lustosas. As flores são odoríferas, manchadas de azul ou pontilhadas de vermelho púrpura. As sépalas são verdes e vermelhas exteriormente, branco-azuladas ou azuis internamente, oblongas. As pétalas são

levemente menores do que as sépalas, branco-azuladas ou azuis internamente. Os filamentos da coroa são listrados transversalmente de vermelho-púrpura, azul, violeta ou púrpura e branco. O fruto é ovóide, amarelo ou laranja quando maduro (CUNHA; KRAMPE, 1999). Esta espécie é originária das Índias orientais, Venezuela e leste do Brasil e seus frutos doces são comidos frescos e utilizadas para preparar bebidas e sorvetes, estando na terceira ou quarta posição em importância comercial entre as espécies do gênero *Passiflora* (THOMAS, 1974).

1.1.3 *Passiflora giberti* N.E. Brown.

A espécie *Passiflora giberti* N.E. Brown. é nativa do Brasil, Paraguai e Argentina. Apresenta folhas trilobadas, ocasionalmente com cinco lobos, flores com sépalas brancas na parte superior, verdes e brancas na inferior, oblongas e com pétalas brancas, levemente menores do que as sépalas. Os frutos são ovóides, amarelo alaranjado quando maduros (CUNHA; KRAMPE, 1999). Planta muito vigorosa típica do Pantanal Matogrossense, onde ocorre em beira de matas e até em margem de estradas a pleno sol, porém sempre em terrenos não encharcados. Possui flores grandes e frutos comestíveis de cor semelhante a maçãs ou alaranjada. Possui potencial para cultivo com fins ornamentais.

2.2 Melhoramento do Maracujazeiro

O melhoramento convencional do maracujazeiro tem tido pouco sucesso no desenvolvimento de variedades. De acordo com Bruckner et al. (2002) apesar da ampla variabilidade genética disponível, poucos são os relatos sobre melhoramento genético que podem contribuir significativamente para o aumento de qualidade e produtividade da cultura. A ausência de resultados significativos é atribuída à barreiras naturais ao melhoramento convencional relacionadas à biologia reprodutiva do gênero *Passiflora*. Entre estas limitações destacam-se a auto-incompatibilidade e conseqüente alogamia e a incompatibilidade cruzada dentro de uma mesma espécie (OLIVEIRA; FERREIRA, 1991).

De forma geral, os trabalhos desenvolvidos no Brasil visam explorar a máxima variabilidade genética da espécie *Passiflora*, mediante caracterização, avaliação e seleção de germoplasmas superiores a fim de obter híbridos adaptados

às condições edafoclimáticas das principais regiões produtoras, com ênfase para resistência a pragas e doenças.

Apesar das dificuldades existentes para obtenção de cruzamentos, alguns híbridos sexuais interespecíficos têm sido produzidos, uma vez que muitas espécies do gênero *Passiflora* possuem características desejáveis a serem transferidas (OLIVEIRA, 1987). De acordo com Delanoe (1991) as espécies *P. candida* e *P. fuchsiiflora* apresentam resistência aos *Fusarium pallidoroseum* e *F. solani*, enquanto *P. coccinea*, *P. laurifolia* e *P. glandulosa* são parcialmente resistentes, e verificou que *P. cirrhiflora*, *P. garckeii*, *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. edulis* eram altamente susceptíveis ao *Fusarium*.

Oliveira et al. (1982, 1983, 1986) constataram que populações de *P. caerulea* L. e de *P. serrato-digitata* L., mostraram indivíduos tolerantes à morte súbita, doença de causa desconhecida, enquanto que as espécies *P. giberti* N. E. Brown., *Passiflora* sp (maracujá-cobra) e *P. alata* Ait, mostraram resistência. No entanto, todos os acessos de *P. edulis* avaliados, mostraram-se susceptíveis à morte súbita das plantas (OLIVEIRA et al., 1986) e à murcha causada pelo *Fusarium* (OLIVEIRA; FERREIRA, 1991).

Oliveira e Ferreira (1991) demonstraram que os híbridos entre *P. edulis* e *P. alata*, *P. giberti*, *P. coccinea*, *P. incarnata*, *P. caerulea* e *Passiflora* sp (maracujá-de-cobra) foram susceptíveis à morte súbita de plantas, sugerindo que a tolerância à esta doença seria controlada por genes recessivos.

A utilização de porta-enxerto resistente é uma estratégia recomendada para contornar problemas causados por doenças no sistema radicular. *P. alata*, *P. giberti* e *Passiflora* sp são recomendados como porta-enxerto para o maracujá amarelo, visando o controle de murcha do *Fusarium* e a morte súbita, entretanto são susceptíveis à nematóides (OLIVEIRA; FERREIRA, 1991).

Com relação à doença de parte aérea Oliveira e Ferreira (1991) relatam que alguns genótipos de *P. caerulea*, *P. maliformis* L., *P. giberti*, e *P. coccinea* apresentaram plantas tolerantes à bacteriose.

Oliveira (1987) e Oliveira et al. (1988) relataram híbridos interespecíficos de *P. edulis* combinado com as seguintes espécies: *P. incarnata* L., *P. alata*, *P. caerulea*, *P. coccinea*, *P. giberti*, *P. cincinnata*, dentre outros. No entanto, estes híbridos apresentaram baixa fertilidade.

Há um número limitado de pesquisas conduzidas no Brasil com relação a

germoplasma e taxonomia (FERREIRA, 1998). As espécies de maracujazeiro possuem imensa variabilidade genética disponível, tanto inter quanto intra-específica, de interesse para programas de melhoramento genético e bancos de germoplasma.

No Brasil a caracterização do germoplasma vem sendo realizada por Giacometti e Ferreira (1977); Oliveira (1980); Oliveira (1987); Oliveira et al. (1988); Ferreira e Oliveira (1991); Meletti et al. (1992); Ferreira (1994); Meletti et al. (1994); Meletti e Maia (1999); Cunha (1999); Soares-Scott et al. (1999).

Resultados de trabalhos de melhoramento com a cultura do maracujazeiro a partir dos métodos de introdução de plantas, seleção massal, hibridação intra e interespecífica e hibridação somática foram apresentados por Dantas et al. (2001).

De acordo com Oliveira (1980) e Meletti et al. (1992) a variabilidade do maracujazeiro pode ser explorada por seleção massal. Cunha (1995) selecionou materiais com características agronômicas desejáveis, alta variabilidade reprodutiva e boa compatibilidade sexual buscando atender o mercado interno de material propagativo (sementes e mudas). Cunha (1996) verificou que a aplicação da seleção massal estratificada com modificações em maracujá tem mostrado efeitos positivos sobre a variabilidade genética das populações melhoradas com alta produtividade e com características agronômicas desejáveis, passíveis de incorporação imediata nos sistemas de produção em uso pelo agricultor.

Maluf et al. (1989) estudaram o ganho genético via seleção clonal e verificaram pela alta herdabilidade, que existe grande variação genética para produção e peso médio dos frutos. Meletti (1998), concluiu que produtividade, tamanho, peso dos frutos e número de sementes/fruto podem apresentar incrementos de até 100%, após quatro ciclos de seleção massal com teste de progênie.

Dentro deste contexto, os recursos das técnicas de cultivo *in vitro* como a cultura de óvulos e anteras, hibridação somática e transformação genética são ferramentas importantes que podem romper barreiras do melhoramento convencional. No entanto, para o sucesso destas técnicas se faz necessário à otimização e/ou desenvolvimento de protocolos que possibilitem a regeneração de plantas, sua multiplicação clonal, bem como a conservação de germoplasma.

Por sua vez, espécies silvestres do gênero *Passiflora* (*P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifolia*, *P. mucronata*, *P. giberti*, *P. amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P.*

coccinea, *P. caerulea*, entre outras) têm apresentado, com base em estudos preliminares, variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro (Cunha et al., 2002) e também variabilidade em nível de DNA (VIEIRA et al., 1997, ANGEL et al., 1998, CASSIANO et al., 1998; CROCHEMORE, 2002, PIO VIANA et al., 2003).

2.3 Micropropagação de espécies de *Passiflora*

As técnicas de cultura de tecidos vêm proporcionando maior disponibilidade de plantas de boa qualidade fitossanitária, sendo utilizada em escala comercial para várias espécies de fruteiras. Monteiro-Hara (2000) relata a propagação clonal a partir de matrizes superiores, a micropropagação de porta-enxertos e limpeza fitossanitária de clones, como contribuições imediatas das técnicas de cultivo *in vitro* na cultura do maracujazeiro.

A micropropagação em *Passifloraceae* tem sido reportada por Moran Robles (1978), Kantharajah e Dodd (1990), Dornelas e Vieira (1990), Drew (1991), Kawata et al. (1995) e Gill et al. (2003), sendo a grande maioria dos trabalhos realizada com *P. edulis* e *P. edulis f. flavicarpa*.

Em geral, o tipo de explante mais utilizado na micropropagação do maracujazeiro são os segmentos nodais (KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW, 1991; KAWATA et al., 1995; FARIA; SEGURA 1997) e ápices caulinares (FARIA; SEGURA, 1997; JUNGHANS et al., 2002). A grande vantagem destes tipos de explante é que por envolver órgãos meristemáticos pré-formados, propicia uma maior estabilidade genética das plantas micropropagadas.

A regeneração de plantas *in vitro* a partir de outros tipos de explante, tais como cotilédone, disco foliar, hipocótilo, também podem ser utilizados para a micropropagação, desde que a morfogênese ocorra por organogênese ou embriogênese somática de forma direta, ou seja, sem que ocorra a formação de calo, evitando assim a ocorrência de variantes somaclonais. Esta característica apesar de desejável para trabalhos de melhoramento é extremamente prejudicial quando da conservação e multiplicação clonal, pois a estabilidade genética deve ser mantida.

Para o êxito do cultivo *in vitro* devem ser levados em consideração os principais fatores que influenciam a expressão da morfogênese, tais como o tipo de

explante, genótipo do material cultivado, meio de cultura e condições ambientais onde a cultura será mantida.

2.3.1 Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* de plantas consiste em introduzir os explantes no meio para início do desenvolvimento. Cada espécie ou variedade possui um protocolo adequado para o seu estabelecimento.

Esse protocolo é formado pelo conjunto de procedimentos biotecnológicos que envolvem o estabelecimento *in vitro*. Nele deve constar o meio de cultura adequado com todas as concentrações de nutrientes.

Esses protocolos poderão ser diferentes a depender da espécie, variedade e tipo de explante utilizado. Portanto, devem estar disponíveis na literatura protocolos de assepsia para explantes obtidos por sementes, folhas, gemas, segmentos internodais etc., bem como protocolos para germinação de sementes das diversas espécies, protocolos de regeneração *de novo* de plantas a partir de cotilédones, hipocótilos, folhas e de segmentos internodais e desenvolvimento de plantas a partir de ápices meristemáticos e gemas.

O estabelecimento de plantas de maracujá *in vitro* pode ser um grande aliado ao melhoramento genético de plantas, uma vez que se pode escolher genótipos superiores para retirada dos explantes. Os explantes vegetativos podem ser obtidos no campo ou em casa de vegetação, podendo ser ápices meristemáticos de caule, segmentos nodais, gemas preexistentes no explante ou de outros explantes do qual será necessário obter a organogênese adventícia ou *de novo*.

Dornelas e Vieira (1994), reportaram a regeneração de plantas através da organogênese direta de cinco espécies de *Passiflora* (*P. amethystina*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. giberti*, *P. maliformis* e *P. mollissima*). Os autores obtiveram 57 brotos por cotilédone e de 18 a 48 brotos por hipocótilo e segmento foliar, respectivamente, para a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

Posteriormente Faria e Segura (1997), Gloria et al. (1999), Hall et al. (2000) e Gill et al. (2003), também relatam a regeneração de plantas a partir de hipocótilo, folhas e cotilédones. Muitas outras técnicas de cultivo *in vitro* também vêm sendo utilizadas na cultura de *Passiflora* incluindo a regeneração de plantas a partir de discos foliares (MONTEIRO-HARA, 2000), protoplastos (DORNELAS; VIEIRA, 1993;

VAZ D'UTRA et al., 1993; OTONI et al., 1995, ANTHONY et al., 1999) e cultura de endosperma (GUZZO et al., 2004).

2.3.2 Conservação *in vitro*

A conservação *in vitro* por cultura de tecidos, apesar de manter o germoplasma conservado por médio prazo, é uma metodologia que vem sendo aperfeiçoada na manutenção dos bancos ativos de germoplasma. Nas chamadas coleções de base, os genótipos são conservados por longos períodos, e, nesse processo o material não é utilizado em pesquisas, cessão e intercâmbio.

As vantagens de um banco ativo de germoplasma *in vitro* são inúmeras em relação à conservação no campo, tais como: menor risco de perda do germoplasma, maior qualidade fitossanitária, redução no custo de manutenção, rápida multiplicação e armazenamento, menor necessidade de espaço, disponibilidade imediata para propagação e facilidade de intercâmbio, além de significar mais uma alternativa de conservação para o maracujazeiro e suas espécies relacionadas

Um dos problemas da cultura *in vitro* é a baixa taxa de micropropagação em algumas espécies, além dos altos custos com mão de obra, já que é necessário realizar repicagens periódicas e constantes do material. Deste modo é essencial que se faça a seleção adequada de explantes com maior capacidade organogenética e que se tome os devidos cuidados para que esses explantes sejam introduzidos no meio de cultura adequado.

A obtenção das plântulas para a conservação se realiza por meio da multiplicação *in vitro* dos acessos a serem introduzidos, sendo necessário, entretanto, adequar condições para retardar o crescimento das plântulas, já que uma das desvantagens desta técnica é a necessidade de subcultivos periódicos, o que a torna não só laboriosa, mas também onerosa.

A fim de reduzir a velocidade de crescimento do germoplasma micropropagado e diminuir o custo de manutenção das coleções *in vitro*, é possível adotar diversas técnicas para minimizar o crescimento *in vitro*, como a adição de alguns compostos ao meio de cultivo, mas deve-se levar em consideração que a adição desses e o intervalo entre os subcultivos, não devem comprometer a qualidade e viabilidade dos explantes.

Os principais métodos de conservação *in vitro* consistem em se manter a cultura sob taxas de crescimento limitado, por meio da redução de temperatura de incubação, aplicação de compostos que provocam estresse osmótico e inibidores de crescimento no meio de cultura, e criopreservação, em que o material armazenado é exposto a temperaturas muito baixas (-196°C), onde todos os processos metabólicos são inativados (WITHERS, 1983; MORALES et al., 1997).

A redução da temperatura pode ser uma alternativa para a conservação *in vitro* de células e órgãos de plantas. Essa redução, aliada à diminuição na concentração dos macronutrientes e micronutrientes e da concentração de sacarose do meio de cultura, têm sido estratégias que, ao serem aplicadas conjuntamente, vêm obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* em várias culturas.

Diversos autores têm utilizado essa técnica e obtido sucesso em algumas fruteiras como macieira, pereira, ameixeira e cerejeira (WILKINS et al., 1988); videira e morangueiro (DODDS; ROBERTS, 1993); kiwizeiro (MONETTE, 1986); abacaxi (ZEE; MUNEKATA, 1992) e maracujazeiro (GONÇALVES et al., 2003).

Os fitormônios e os reguladores osmóticos são pouco adicionados aos meios de cultura por serem substâncias dispendiosas e para se manter a integridade genética do material, uma vez que os fitormônios são agentes responsáveis por provocar variação somaclonal, fenômeno que compromete a fidelidade genética do germoplasma.

Vários são os agentes osmóticos utilizados como retardantes de crescimento, tais como manitol, sorbitol e sacarose, dentre outros. Segundo Lemos et al. (2002) combinações de temperatura com reguladores osmóticos/fontes de carbono influenciaram significativamente na manutenção da viabilidade dos explantes de cana de açúcar conservados *in vitro* por três meses.

Os fitoreguladores têm apresentado grande potencial de utilização na cultura *in vitro* em função de seus efeitos sobre diferentes processos fisiológicos das plantas. O ácido abscísico, por atuar bloqueando a ação de hormônios promotores de crescimento, como auxinas e giberelinas, seria uma alternativa para ser utilizado em protocolos de conservação.

Vários tecidos e órgãos podem ser empregados, porém na maioria dos protocolos opta-se pelo emprego de meristemas, pois este tipo de explante possibilita menor ocorrência de alterações genéticas, são livres de patógenos, na

maioria das vezes, melhores para a micropropagação e mais resistentes às baixas temperaturas.

Apesar da grande aplicabilidade da conservação *in vitro*, poucos são os bancos de germoplasma *in vitro* de espécies frutíferas. Mundialmente existem 540 acessos de maracujá dos quais 94% são conservados em condições de campo e apenas 6% na forma de sementes ou *in vitro* (IBPGR, 1992 e IBPGR, 1989). No Brasil encontra-se 305 acessos que compreendem 8 coleções principalmente de *Passiflora edulis* (FERREIRA, 2004), das quais o Departamento de Genética da ESALQ/USP dispõe sob condições *in vitro*, de 20 espécies silvestres, acessos comerciais de maracujá azedo e híbridos somáticos obtidos por fusão de protoplastos (VIEIRA, 2000). A **Embrapa Mandioca e Fruticultura** mantém o Banco Ativo de Germoplasma, em campo, de *Passiflora* spp contando atualmente com 62 acessos (FARIA; CUNHA, 2002).

2.3.3 Multiplicação *in vitro* de *Passiflora*

A cultura de tecidos de plantas perenes requer a incubação do material em um ambiente artificial favorável ao crescimento. Entretanto as condições *in vitro* podem ser deletérias ao desenvolvimento normal das plantas (INFANTE et al., 1994). As limitações são a densidade de fluxo radiante, a umidade relativa elevada, limitações na troca gasosa (INFANTE et al., 1989), balanceamento hormonal adequado (DORNELAS; VIEIRA, 1994), o que contribui para a baixa atividade fotossintética, número reduzido de feixes vasculares, estômatos pouco funcionais e cutícula pouco espessa (INFANTE et al., 1994).

No entanto, para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de incubação da cultura para cada espécie e/ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam para a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in vitro*, estão os fitoreguladores, em especial as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (BAP).

As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese (GEORGE, 1996). No maracujazeiro, a adição de citocinina ao meio é capaz de promover a regeneração de gemas, provavelmente pela quantidade endógena de auxina já ser suficiente para a diferenciação (MORAN ROBLES, 1979; BIASI et al., 2000; LIMA et al., 2000), pois mesmo na ausência de

fitoreguladores há a formação de calo nos explantes (SCORZA; JANICK, 1976; BIASI et al., 2000).

A adição de citocinina no meio de cultura pode promover um efeito benéfico por causa de um fenômeno conhecido por mobilização de nutrientes induzida por este fitoregulador cuja ação promove o movimento de nutrientes para a folha a partir de outras partes da planta. De acordo com Taiz e Zeiger (2004) a sua adição também promove o desenvolvimento de cloroplastos e retarda a senescência foliar.

Os principais reguladores de crescimento utilizados nesta fase são as citocininas, porém, não ocorrendo crescimento satisfatório das plantas, pode ser necessário o uso de auxinas e/ou giberelinas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O uso de auxinas no meio de multiplicação não é necessário. Associações de citocininas e auxinas às vezes podem provocar uma menor multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), mas podem ser utilizadas com o objetivo de estimular o alongamento das brotações para posterior enraizamento.

Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocinas. Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina/citocinina menor que um. Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (KRIKORIAN, 1995).

2.4 Tamanho de parcelas experimentais

Um pesquisador ao instalar um experimento, basicamente, está preocupado em estimar, com a maior precisão possível, o efeito dos tratamentos sobre o material a ser investigado. O tamanho e a forma da parcela experimental, o número de repetições, a forma de bloco, o delineamento experimental, as falhas de plantas nas parcelas e a forma de condução do experimento constituem preocupações para o planejamento experimental e a caracterização adequada desses fatores contribui para auferir precisão nos ensaios experimentais.

As diferenças entre os tratamentos são estimadas a partir de testes de significância baseados no erro experimental. Steel e Torrie (1980) definem o erro

experimental como a variação devida ao efeito dos fatores não controlados ou que ocorrem ao acaso, de forma aleatória.

Ao enfatizar as formas de controle do erro experimental gerado pela heterogeneidade das unidades experimentais, deve-se dedicar atenção a algumas práticas, tais como a execução de experimento em branco, para adequar a área experimental escolhida ao delineamento, ao tamanho e forma de parcela, ao número de repetições e de tratamentos com a precisão desejada.

A precisão de um experimento está estreitamente relacionada ao erro experimental, uma medida da variação não controlada ou aleatória que ocorre entre parcelas que receberam o mesmo tratamento, e representa o desempenho diferenciado daquelas parcelas (FISHER, 1960).

O erro experimental interfere diretamente na análise e na conclusão dos experimentos, pois quanto maior for esse erro, as diferenças entre os tratamentos poderão não ser detectadas na análise realizada com a estatística F, levando a não discriminação das diferenças significativas entre as médias dos tratamentos pelos testes de significância (LÚCIO et al., 2004).

Independente do ambiente em que se fará a experimentação, geralmente o objetivo é a redução do erro experimental. Este consiste na variância existente entre unidades experimentais que receberam o mesmo tratamento é estimado mediante a aplicação da repetição, um dos princípios da experimentação (STORCK et al., 2005).

O erro experimental pode advir de várias fontes, como a heterogeneidade do material experimental, as competições intra e interparcelar (STORCK et al., 2005). De modo a diminuir o erro experimental, requisitos como número de repetições, seleção dos tratamentos, heterogeneidade do material experimental, diferença no número de plantas dentro da parcela, tipo de tratamento aplicado, tratos culturais, manejo e controle de pragas, doenças e plantas daninhas, amostragem na parcela e, principalmente, heterogeneidade das unidades experimentais devem ser atendidos (GOMEZ; GOMEZ, 1984).

O controle do erro experimental pode ser obtido com o delineamento experimental, tamanho, forma e o número de repetições das parcelas adequados, o que promoverá redução no erro decorrente da heterogeneidade das parcelas, maximizando as informações obtidas num experimento (STEEL; TORRIE; DICKEY, 1997).

Em experimentos com biotecnologia, é de fundamental importância que os resultados apresentados na literatura sejam caracterizados pela consistência dos dados e pela repetibilidade dos protocolos experimentais. Embora esses experimentos sejam instalados em condições controladas, os materiais biológicos utilizados com maior frequência, como os explantes, são muito sensíveis às pequenas alterações dos fatores não controlados (IZQUIERDO; LÓPEZ, 1991). Dessa forma, atenção especial deve ser dada na fase de planejamento do experimento, no qual serão definidos o tamanho da parcela experimental e o número de repetições a serem utilizadas.

Nos programas de melhoramento, a diminuição do erro experimental em função do número de plantas por parcela e de repetições é de grande interesse, uma vez que promove a redução da variância fenotípica, contribuindo para aumento do coeficiente de herdabilidade, e, conseqüentemente, para maiores progressos genéticos com seleção (EBERHART, 1970).

A relação entre tamanho da parcela e erro experimental é inversa (SMITH, 1938; HATHEWAY, 1961; LE CLERG et al., 1962), o que equivale a uma redução na variação com o aumento do tamanho da parcela (SASMAL; KATIAL, 1980; ROSSETTI; PIMENTEL-GOMES, 1983; ZHANG et al., 1994; BANZATTO; KRONKA, 2006; FERREIRA, 2000), embora, implique aumento dos custos (ZHANG et al., 1994).

O uso de parcelas grandes tem sido associado à adoção de poucas repetições, representando um risco para a precisão experimental (ROSSETTI; PEREIRA; PIMENTEL GOMES, 1986; PIMENTEL GOMES, 2000). Uma forma de minimizar o erro experimental consiste na utilização de um maior número de repetições, combinado com parcelas menores. A princípio, quanto maior o número de repetições, melhor o experimento. Existem vários fatores, entretanto, que influenciam no número de repetições e discussões sobre esses fatores são encontradas em inúmeros trabalhos (MARQUES JÚNIOR, 1997).

Todavia, o ganho de precisão com o aumento do tamanho da parcela ou a taxa de decréscimo na variação diminui quando a parcela torna-se muito grande (GOMEZ; GOMEZ, 1984; ZHANG et al., 1994), e, a partir do tamanho ideal, o aumento na precisão decresce rapidamente com incrementos no tamanho (CHAVES, 1985; BANZATTO; KRONKA, 2006).

Diversos autores têm mostrado a existência de uma relação inversa entre o tamanho da parcela e o erro experimental (DAY, 1920; SMITH, 1938; STEEL; TORRIE; DICKEY, 1997; HATHEWAY, 1961; LE CLERG et al., 1962; LE CLERG, 1967). Desta forma, o aumento no tamanho da parcela leva a diminuição da variação entre parcelas. No entanto, tal diminuição não é proporcional ao tamanho da parcela (LE CLERG, 1967) e pouco ganho em precisão é obtido com o incremento no tamanho de unidades experimentais já suficientemente grandes.

Na opinião geral dos estudiosos, o aumento no tamanho da parcela provoca um redução do erro experimental, porem essa redução não é proporcional ao aumento. Para Ferreira (2000) a área das parcelas limita o número de repetições, diminuindo à medida que se aumenta a área da unidade experimental, mas isso não deve ser proporcional, pois, é preferível sacrificar a área da parcela em favor do número de repetições.

Diversos autores têm constatado que maior precisão experimental é obtida usando-se mais repetições de parcelas menores, comparativamente a menos repetições de parcelas maiores, conforme os experimentos em campo realizados por: Crews et al. (1963) com a cultura do fumo, Ribeiro et al. (1984) em caupi e milho, Silva et al. (1987) com milho irrigado, Henriques Neto (2003) com trigo, Oliveira e Estefanel (1995) com a batata, Viana (1999) com a mandioca.

2.4.1 Métodos para estimar o Tamanho ótimo de parcelas

O estabelecimento de um tamanho ótimo de parcela é uma das maneiras de se aumentar a precisão experimental e, conseqüentemente, maximizar as informações obtidas em um experimento. Storck (1979) apresenta uma revisão sobre os principais métodos para determinar o tamanho ótimo de parcelas. Basicamente, os diversos métodos relacionam o tamanho da parcela e a variação residual.

Diversos trabalhos, com inúmeras espécies, têm sido conduzidos em campo visando estabelecer o tamanho ótimo de parcelas experimentais e o número de repetições adequado: arroz (IGUE et al., 1972); milho (STORCK, 1979; STORCK et al., 2004); soja (PIGNATARO; GONÇALVES, 1972; STORCK et al., 1982; MARTIN et al., 2005); feijão (BERTOLUCCI, 1991), eucalipto (PIMENTEL GOMES; COUTO, 1985; ZANON ; STORCK, 1997; ZANON ; STORCK, 2000; SILVA et al., 2003;

SIMPLICIO et al., 1996), bananeira (GENEZI et al., 1980), seringueira (ROSSETTI; PIMENTEL GOMES, 1987), cajueiro comum (ROSSETTI et al., 1991), cajueiro anão precoce (ROSSETTI; BARROS; ALMEIDA, 1996), mandioca (VIANA et al., 2002), mamoeiro (LIMA et al., 2007), mangueira (LEDO et al., 2004).

A justificativa para determinação do tamanho ótimo de parcela experimental baseia-se no fato de que, parcelas com tamanhos excessivos tornam o trabalho difícil e oneroso, enquanto que as de tamanho inferiores oferecem informações suficientemente precisas para servirem de base nas recomendações técnicas. Os métodos estatísticos visam estimar o tamanho mais conveniente de parcela, a partir de ensaios de uniformidade ou em experimentos que incluem efeitos de tratamentos.

Vários métodos são empregados para estimar o tamanho da parcela experimental e a maioria deles está baseado na utilização de ensaios em branco, também conhecidos como ensaios de uniformidade, nos quais toda a área experimental é plantada com uma única cultivar, utilizando-se práticas idênticas de cultivo, sem efeitos de tratamentos.

Gomez e Gomez (1984) e Viana (1999) utilizaram os métodos da Inspeção visual da curvatura máxima, método empírico de Smith, método da curvatura máxima.

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.

2.4.1.1 Método da Máxima Curvatura

Um método freqüentemente utilizado e que também tem aplicação em dados provenientes de um ensaio em branco, é o da máxima curvatura. Consiste em construir um gráfico de duas dimensões no geral, no eixo das abscissas são tomados os diferentes tamanhos de parcela (x) e no eixo das ordenadas os respectivos coeficientes de variação em porcentagem da média (CV_x). Determina-se graficamente, por inspeção, o ponto de máxima inflexão da curva resultante; este denomina-se ponto de máxima curvatura, cujo valor da abscissa corresponde ao tamanho ótimo de parcela.

Esse método foi criticado por Smith (1938), pelo fato de não levar em consideração os custos gerados com os diferentes tamanhos das unidades experimentais e ser inconsistente, não produzindo sempre os mesmos resultados. Mostrou que a região da máxima curvatura depende do tamanho das unidades básicas e da escala de mensuração das coordenadas e, assim, mudando-se um desses fatores, o melhor tamanho de parcela também se altera.

A lei empírica de Smith (1938), que estabeleceu uma relação entre a variância e o tamanho de parcela, foi a precursora de vários métodos de determinação do tamanho de parcela. Essa relação é descrita como sendo $VU(x) = V_1 \cdot x^{-b}$, na qual $VU(x)$ é a variância por unidade básica da parcela com x unidades básicas de tamanho; V_1 é a variância entre as parcelas com uma unidade básica de tamanho; e, b é o índice de heterogeneidade do solo. A proximidade do valor de b com a unidade indica alta heterogeneidade na área experimental e, nestes casos, recomenda-se o uso de parcelas maiores.

Atualmente, dentre os métodos mais utilizados para a estimação do 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 $CV(x) = A \cdot x^{-B}$ (MEIER; LESSMAN, 1971). Também existem duas formas de estimar o tamanho ótimo de parcela por derivação das funções $CV(x)$ e $VU(x)$, variância por unidade básica para parcelas de X unidades básicas, descritos por Thomas (1974). Além desses, existem outros métodos aplicados por vários autores (STORCK, 1979; BAKKE, 1988; ZANON, 1996; REZENDE; SOUZA JÚNIOR, 1997).

O método da máxima curvatura consiste em plotar quaisquer dos índices de variabilidade citados, como os valores percentuais dos coeficientes de variação (CV) dos diferentes caracteres avaliados, para os vários tamanhos de parcelas pré estabelecidos, contra seus respectivos tamanhos (x) de parcelas num sistema de eixos coordenados, obtendo-se uma curva que representa a relação inversa entre estas variáveis (x , CV). Posteriormente é traçada uma curva a mão-livre (FEDERER, 1963) e o seu ponto da máxima curvatura é localizado por inspeção visual, adotando-se como tamanho ótimo o valor correspondente à abscissa do ponto de máxima curvatura.

Outro aspecto crítico desse método é a determinação visual do ponto correspondente ao tamanho ótimo da unidade experimental, o que constitui uma fonte de erro e discrepância na estimativa do tamanho da parcela, uma vez que, não existe um critério único de determinação desse ponto na curva. A interpretação varia com o autor, por exemplo, para Le Clerg (1967), o ponto da máxima curvatura é o ponto sobre a curva em que ocorre maior taxa de mudança no índice de variação por incremento de tamanho de parcela. Para Rossetti (1979) é o ponto no qual o raio da curva é menor e para Bakke (1988) é o ponto que representa a maior distância perpendicular em relação a uma reta unindo as extremidades da curva.

2.4.1.2 Método da Máxima Curvatura modificado

Com objetivo de eliminar a influência da escala dos eixos coordenados na determinação do ponto de máxima curvatura Lessman e Atkins (1963) propuseram uma alteração no método da máxima curvatura incorporando 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. Essa alteração foi denominada método da máxima curvatura modificado (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 $CV_x = \frac{\sqrt{S_x^2}}{\bar{x}} \times 100$, 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).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. R. D.; SANTOS, C. C. F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C. H.; PIÇANHA, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 9-32.
- ANGEL, F. O.; FAJARDO, D.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.101, p. 341-347, 1998.
- ANTHONY, P.; OTONI, W.C.; POWER, J.B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Protoplasts isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. **Methods in Molecular Biology**, New York, v.111, p.169-181, 1999.
- BAKKE, O.A. **Tamanho e forma de parcelas em delineamentos experimentais**. 1988. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP/FCAV, 2006. 256p.

BERTOLUCCI, F. L. G.; RAMALHO, M. A. P.; DUARTE, G. S. Alternativas de tamanho e forma da parcela para avaliação de progênies do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.3, p.295-305, 1991.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.661-665, 2000.

BRUCKNER, C.H.; MELETTI L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI; JUNIOR, F.M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER., C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV. 2002. p. 373-409.

CASSIANO, A. P. A. A.; LEMOS, E.G.M.; OLIVEIRA, J.C., Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.3, p.214, 1998.

CHAVES, L. J. **Tamanho da parcela para seleção de progênies de milho (*Zea mays* L.)**. 1985. 148 f. Tese. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985

CREWS, J. W.; JONES, G. L.; MASON, D. D. Field plot technique studies with flue-cured tobacco. I. Optimum plot size and shape. **Agronomy Journal**, Madison, v.55, n.2, p.197-199, 1963.

CROCHEMORE, M. L. Diversidade genética de *Passiflora* spp. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3, 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p. 69-74.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (Ed.). **Maracujá Produção**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104p. (Frutas do Brasil; 15).

CUNHA, M. A. P. Banco ativo de germoplasma de maracujá. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 1999, Londrina. **Anais...**Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná,1999. p. 72-73.

CUNHA, M. A. P. ; KRAMPE, R. Espécies do gênero Passiflora. In: LIMA, A. A. (Ed.). **O cultivo do maracujá**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMF, 1999. 129p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 35).

CUNHA, M.A.P. Recursos genéticos e modificações em métodos de seleção para produtividade em maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, p.413-423, 1996.

CUNHA, M.A.P. **Seleção massal estratificada modificada para produtividade em maracujá amarelo**: primeiro ciclo. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1995. (Pesquisa em andamento, 84).

DANTAS, J.L.L.; SOARES FILHO, W. dos S.; OLIVEIRA, J.R.P.; CABRAL, J.R.S.; BARBOSA, L.V.; CUNHA, M.A.P. da C.; RITZINGER, R.; SILVA, S. de O e. Melhoramento de fruteiras de clima tropical. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Rondonópolis: Fundação M T. 2001. p. 479-601.

DAY, J.W. The relation of size, shape, and number of replications of plots to probable error in field experimentation. **Journal of the American Society of Agronomy**, Geneva, v.12, p.100-105, 1920.

DELANOË, E. Étude de la résistance de passiflores de Guyane française vis-a-vis de fusarium pathogènes de la culture des fruits de la passion (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fruits**, Montpellier, v.46, n.5, p.593-600, 1991.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p.172-179.

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

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M. L. C. Cultura de tecidos e de protoplastos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESALQ, 5,1990, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1990. p.9.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.13, p.103-106, 1993.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H.G.;NOVELLI,E.L.B.;CEREDA, E.VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96,p. 371-374, 2005.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1991.

DUMET, D; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, n.14, p. 243-250,1993.

EBERHART, S.A. Factors affecting efficiencies of breeding methods. **African Soils**, Bangui, v.15, p. 669–680, 1970.

FARIA, G. A.; CUNHA, M. A. P. Banco ativo de germoplasma de maracujazeiro. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 5, 2001, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. p. 35.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.

FEDERER, W. T. **Experimental design**: theory and application. 2.ed. New York: Macmillan Company, 1963. 544 p.

FERREIRA, D. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. 3.ed. Maceió: EDUFAL - Universidade Federal de Alagoas, 2000. 419 p.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos - conservação de germoplasma de espécies frutíferas no campo. Disponível em: http://www.giacometti.org.br/html/artigo_exibe.cfm?Id=30. Acesso em: 04 mai. 2004.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: UESB, 1994. p.24-26.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Pesquisa em maracujazeiro no Brasil**: reunião técnica. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1998. p. 48-53. (Documentos, 77).

FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora*. In: SÃO JOSÉ, A.R.A. **Cultura de maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FINEP, 1991. p.187-200.

FISHER, R. A. **The design of experiments**. 7.ed. Edinburgh: Oliver and Boyd., 1960. 248p.

GENEZI, A.; LAHAV, E.; PUTTER, J. Determination of optimal plot size in banana experiments. **Fruits**, Paris, v.35, p.25-28, 1980.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: the technology. 2. ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574 p.

GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. Situação do germoplasma de espécies frutíferas mais importantes no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2, 1977, Salvador. **Anais...** Cruz das Almas: SBF, 1977. p.421-424.

GILL, M. I. S.; CANCINO, G. O.; ANTHONY, P., DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Pluronic F-68 Enhanced Shoot Regeneration in Micropropagated *Citrus* Rootstock and *Passiflora* Species. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 23, n. 4, p. 349-358, 2003.

GLORIA, B. A. ; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explant of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, 1999.

GOMEZ, K.A.; GOMEZ, A.A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2.ed. New York: Wiley, 1984. 680p.

GONÇALVES, K. S.; JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M. Cultivo *in vitro* de gemas laterais de maracujazeiro amarelo em função da temperatura. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Anais...** Cruz das Almas, 2003. CD-ROM.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB, v.1, p. 183-260, 1998.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61,n.1, p. 108-113, 2004.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGINS, C. M.; DIERZGEN, R. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal Botany**, Melbourne, v. 48, n.5, p.673-680, 2000.

HATHEWAY, W.H. Convenient plot size. **Agronomy Journal**, Madison, v.53, p.279-280, 1961.

HENRIQUES NETO, D. **Estimativas de tamanho e forma de parcelas experimentais para avaliação do rendimento de grãos em trigo**. 2003. 138 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

IGUE, T.; SOUZA, M.D.; NAGAI, V. Tamanho da parcela mais conveniente para experimentação de campo de arroz. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.24, n.11, p.1150-1153, 1972.

INFANTE, R. ; MAGNANIINI E.; RIGHETTI, B. The role of light and CO₂ in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actina deliciosa* *in vitro*. **Physiology Plant**, Bologna, n. 77, p. 191 - 195, 1989.

INFANTE, R. , ROTONDI A., MARINO, G. , et al. Solar light effects on growth, net photosynthesis, and leaf morphology of *in vitro* kiwifruit (*Actina deliciosa*) cv Hayward. **In vitro Cellular Developmental Biology**, Bologna, n. 30, p. 160 -163, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>. Acesso em: 22 fev. 2008.

INSTITUTO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - IBGE. **Maracujá** (*Passiflora edulis*). Disponível em: http://www.ipa.br/CD_1/J_MARACUJA/maracuja.html. Acesso em: 20 abr. 2004.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES - IBPGR. **Directory of germplasm collections**: 6. I - tropical and subtropical fruits and tree nuts. Rome, 1992. 337p.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES - IBPGR. **Directory of germplasm collections**: 6.II - temperate fruits and tree nuts. Rome., 1989. 296p.

IZQUIERDO, J. A.; LOPEZ F. Y. Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro* In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos e aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 375-399.

JUNGHANS, T. G.; VIDAL, A. M.; SOUZA, A. S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura In. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002. CD-ROM.

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.

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

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones, 2ª Ed., Davies P. J. (Ed). **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 1995. p. 774 – 796.

KUBOTA, C.; RAJAPAKSE, N.O.C.; YOUNG, R.O.E. Low-temperature storage of micropropagated plantlets under selected light environments. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 449-452, 1996.

LE CLERG, E. L. Significance of experimental design in plant breeding. In: FREY, K. J. (Ed.). **Plant breeding symposium**. Ames: Iowa State University, 1967. p. 243-313.

LE CLERG, E. L.; LEONARD, W. H.; CLARK, A. G. **Field plot technique**. 2.ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1962. 373 p.

LEDO, C. A. S.; PEREIRA, M. E. C.; LIMA, M. A. C.; AMORIM, T. B. F.; FARIA, G. A. Tamanho da parcela e número de repetições para experimentos com frutos de

mangueira em pós-colheita. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis : Epagri, 2004. (CD Room).

LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de ; NETO, C. E. R. ; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília.v. 37, n.10, p. 1359-1364, 2002.

LESSMAN, K.J.; ATKINS, R.E. Comparisons of planning arrangements and estimates of optimum hill plot for grain sorghum yield tests. **Crop Science**, Madison, v.3, p.477-481, 1963.

LIMA, A. de A. Condução. In: LIMA, A. de A. (Ed.) **O Cultivo do maracujá**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMF, 1999. 129 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Circular Técnica, 35).

LIMA, D. M. de; GOLOMBIESKY, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de técnicas de biotecnologia a cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria,v.30, n.2, p. 359-363, 2000.

LIMA, J. F. de ; PEIXOTO, C. P. ; LEDO, C. A. S. ; FARIA, G. A. . Tamanho ótimo de parcela para experimentos com plantas de mamoeiro em casa de vegetação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 1411-1415, 2007.

LÚCIO, A.D.; MELO, R.M.; STORCK, L.; CARPES, R.H.; BOLIGON, A.A.; ZANARDO, B. Estimativa de parâmetros para o planejamento de experimentos com a cultura do pimentão em áreas restritas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.766-770, 2004.

MALUF, W.R.; SILVA, J.R.; GRATTAPAGLIA, D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; MACHADO, M.A.; CALDAS, L.S. Genetic gains via clonal selection in passion fruit *P. edulis* Sims. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, p.833-841, 1989.

MARQUES JÚNIOR, O.G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão**. 1997. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

MARTIN, T. N. et al. Tamanho ótimo de parcela e número de repetições em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.271-276, 2005.

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, p.648-650, 1971.

MELETTI, L.M.M. **Caracterização agronômica de progênies de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.)**. 1998. 92 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 62 p. (Boletim Técnico, 181).

MELLETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P.. Caracterização agronômica e seleção de germoplasma de maracujá (*Passiflora* sp). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. **Anais...** Cruz das Almas: SBF, 1994, v.3, p.821-822.

MELLETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.175-162, 1992.

MONETTE, P.L. Cold storage kiwifruit shoot tips *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1203-1205, 1986.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

MORALES, E.A.V.; VALOIS, A.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa – SPI, 1997. 78 p.

MORAN ROBLES, M. J. Multiplication vegetative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Pasiflora edulis* var. *Flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, n.10, p. 639-699, 1978.

MORAN ROBLES, M. J. Potentiel morpho genetique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. molissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, San José, v. 29, n. 3, p. 224-228, 1979.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I. S. de, VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rodanópolis: Fundação MT, 2001, p. 30-55.

OLIVEIRA, J. C. ; CARNIER, P. E.; ASSIS, G. M. Preservação de germoplasma de maracujazeiros. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1, 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1988. p.200.

OLIVEIRA, J. C. ; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ (Ed.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 211-239.

OLIVEIRA, J. C. ; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura das plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.9, p. 64-65, 1983.

OLIVEIRA, J. C. ; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura das plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: UNB, 1986. p. 403-438.

OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C.; NAKAMUR, K.; FERREIRA, F.R. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region of American Society of Horticultural Sciences**, New York, v.25, p. 343 -345, 1982.

OLIVEIRA, J.C. de. **Melhoramento genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. visando aumento de produtividade**. 1980. 133 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1980.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá: cultura**. Jaboticabal: FCAV, 1987. p. 218-246.

OLIVEIRA, J.C. de; NAKAMURA, K.; MAURO, A. O.; CENTRURION, M.A.P. da C. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p. 27-37.

OLIVEIRA, P.H.; ESTEFANEL, V. Tamanho e forma ótimos da parcela para avaliação do rendimento em experimentos com batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, p.205-208, 1995.

OTONI, W.C.; CASALI V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll-derived protoplasts of *Passiflora coccinea*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.243, p.461-468, 1995.

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.

PIGNATARO, I. A. B.; GONÇALVES, H. M. Estimativa do melhor tamanho de parcela para experimento de soja (*Glycine max* (L) Merrill). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.7, n.2, p.153-159, 1972.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: do autor Nobel, 2000. 466 p.

PIMENTEL-GOMES, F.; COUTO, H. T. Z. O tamanho ótimo de parcela experimental para ensaios com eucaliptos. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, n.31, p.75-77, 1985.

PIO VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

RESENDE, M. D. V. ; SOUZA JÚNIOR, C. L. Número de repetições e tamanho da parcela para seleção de progênies de milho em solos sob cerrado e fértil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.8, p.781-788, 1997.

RIBEIRO, V.Q.; SILVA, E.C.; FREIRE FILHO, F.R. Tamanho e forma de parcelas de culturas consorciadas e solteiras de caupi e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1365-1371, 1984.

ROSSETTI, A. G. **Determinação do tamanho ótimo de parcelas em ensaios agrícolas**. 1979. 70 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agrônômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.

ROSSETTI, A.G.; ALMEIDA, J.I.L. ; PARENTE, J.I.G.; BARROS, L. M. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com cajueiro comum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.2, p.117-122, 1991.

ROSSETTI, A. G.; PIMENTEL-GOMES, F. Determinação do tamanho ótimo de parcelas em ensaios agrícolas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.5, p.477-487, 1983.

ROSSETTI, A.G.; PERREIRA, A.V.; PIMENTEL-GOMES, F. A amostragem na experimentação em viveiro de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p.837-841, 1986.

ROSSETTI, A.G.; PIMENTEL-GOMES, F.A method for the determination of optimum plot size in experiments with rubber tree (*Hevea*). **Journal of Natural Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.2, n.3, p.135-141, 1987.

ROSSETTI, A. G.; BARROS, L. de M.; ALMEIDA, J. I. L. de. Tamanho ótimo de parcelas experimentais para experimento de campo com cajueiro-anão precoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.12, p.843-852, 1996.

SALOMÃO, L.C.C.; VIEIRA, G.; MOTA, W.F. da. Tecnologia de colheita e pós-colheita. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 283-303.

SASMAL, B. C.; KATYAL, V. Note on the size and shape of plots and blocks in field experiments with tossa jute. **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v.50, n.10, p.791-793, 1980.

SCORZA, R.; JANICK, J. Tissue culture in Passiflora. 24° annual congress American Society for Horticultural Sciences Tropical Region, Puerto Rico, December, 179-183, 1976.

SILVA, P. S. L.; MACHADO, A. A.; MOURA, M. M. Tamanho e forma de parcela para experimentação com milho irrigado. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.39, n.12, p.1178-1181, dez. 1987.

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

SILVA, R. L. ; XAVIER, A. ; LEITE, H. G. ; PIRES, I. E. . 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, Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 669-676, 2003.

SILVA, A. C. ; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, 1994. p.1-5.

SIMPLÍCIO, E. ; MUNIZ, J. A. ; AQUINO, L. H. de ; SOARES, A. R. Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamento de *Eucalyptus grandis* Hill, I - parcelas retangulares. *Cerne*, Lavras, v.2, n.1, p.53-65, 1996.

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

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J.A. Caracterização de germoplasma de *Passiflora*: *P. quadrangularis*, *P. serrato-digitata* e *P. setacea*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45, 1999, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. p.718.

SOUZA, J. S.; CARDOSO, C.E.L.; LIMA, A.A.; COELHO, E. F. Aspectos socioeconômicos. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Técnica, 2002. 104 p. (Frutas do Brasil, 15).

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York : McGraw -Hill, 1960. 481 p.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3.ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1997. 672p.

STORCK, L. **Estimativa para tamanho e forma de parcelas e número de repetições para experimentos com milho (*Zea mays* L.)**. 1979. 98 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.

STORCK, L.; SACCOL, A.V.; SCHNEIDER, F.M. Comparação de métodos de estimativa do índice de heterogeneidade do solo e do tamanho ótimo de parcela em experimento com soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.12, n.2/3, p.189-202, 1982.

STORCK, L.; MARTIN, T.N.; LÚCIO, A.D.C.; LOPES, S.J.; SANTOS, P.M. dos ; CARVALHO, M.P. de . Variação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: ABMS, 2004. CD-ROM.

STORCK, L.; OLIVEIRA, S. J. R. ; GARCIA, D. C.; BISOGNIN, D. A. Comprimento e largura do tamanho ótimo da parcela experimental em batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.1043-1048, 2005.

STORCK, L.; BISOGNIN, D.A.; OLIVEIRA, S.J.R. de . Dimensões dos ensaios e estimativas do tamanho ótimo de parcela em batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.6, p.903-909, 2006.

STORCK, L.; GARCIA, D.C.; LOPES, S.J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação vegetal**. Santa Maria: UFSM, 2000. 198 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

THOMAS, H. L. Relationship between plot size and plot variance. **Agricultural Research Journal of Kerala**, v.12, p. 178-189. 1974. Disponível em http://florawww.eeb.uconn.edu/acc_num/199900009.html>. Acesso em: 22 abr. 2004.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 2000. 224 p.

VAZ D'UTRA, F.D.; DOS SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.12, p.220-225, 1993.

VIANA, A. E. S. **Estimativas do tamanho de parcelas e características do material de plantio em experimentos com mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**.1999. 123 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

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.

VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, C.A.; MAYEDA, L.Y.; DORNELAS, M.C.; FUNGARO, M.H.P. Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiro (*Passiflora* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p. 88, 1997.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 14, p. 18-20, 2000.

WILKINS, C. P.; NEWBURY, H. J.; DODDS, J.H. Tissue culture conservation of fruit trees. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 1, n. 73/74, p. 9-20, 1988.

WITHERS, L.A. Germosplam preservation through tissue culture: an overview. In: CELL AND CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, 1983, Beijing. **Proceedings...** Beijing: Science Press, 1983, p. 315-341.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI, 1998. v.1, p. 297-329.

ZANON, M.L.B. **Tamanho e forma ótimos de parcelas experimentais para *Eucaliptus saligna* Smith**. 1996. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, 1996.

ZANON, M.L.B.; STORCK, L. Tamanho de parcelas experimentais para *Eucalyptus saligna* Smith. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p. 589-593, 1997.

ZANON, M. L. B.; STORCK, L. Tamanho ótimo de parcelas experimentais para *Eucalyptus saligna* Smith em dois estádios de desenvolvimento. **Cerne**, Lavras, v.6, n.2, p.104-111, 2000.

ZEE, F.T.; MUNEKATA, M. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 57-58, jan. 1992.

ZHANG, R; WARRICK, A. W.; MYERS, D. E. Heterogeneity, plot shape effect and optimum plot size. **Geoderma**, Amsterdam, v.62, n.1/3, p.183-197, 1994.

CAPÍTULO 1

**TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS PARA EXPERIMENTOS APLICADOS AO
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO PASSIFLORA**

TAMANHO ÓTIMO DE PARCELAS PARA EXPERIMENTOS APLICADOS AO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO PASSIFLORA

Resumo – Este trabalho teve por objetivo determinar o tamanho ótimo de parcelas em experimentos de estabelecimento *in vitro* de maracujá roxo *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. Para cada espécie foram conduzidos ensaios de uniformidade com duas concentrações de sais do meio de cultura (MS e ½ MS) e em cada ensaio realizaram-se avaliações aos 45, 75 e 105 dias após incubação dos explantes. Em cada avaliação e meio de cultura foram simulados diversos tamanhos de parcelas, variando de uma (1) unidade básica até 50 por parcela, sendo cada unidade básica constituída por uma planta. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Em experimentos de estabelecimento *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*, de 15 explantes para *P. giberti* N. E. Brown. e de 9 explantes para *P. laurifolia* L.

Termo para Indexação: *P. edulis* Sims f. *edulis*, precisão experimental, erro experimental, coeficiente de variação, ensaio de uniformidade.

OPTIMAL SIZE OF PLOTS FOR EXPERIMENTS WITH *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF THREE SPECIES OF THE *PASSIFLORA* GENUS

Abstract – The objective of this work was to determine the optimal size of plots of *Passiflora Edulis*, *P. Laurifolia* e *P. Giberti* N. E. Brown, with in vitro establishment experiments. Two uniformity essays with the species were conducted, two concentration of salts and nutrients of the MS medium (MS e ½ MS). Various sizes and plot forms, whereas each plant was considered as the basic unit, were simulated. For the estimation of the optimal size of plots, the methods of maximum modified curvature was employed. It can be concluded that for the specie and variables studied, the optimal plot size should be formed with 11 explants for *P. edulis* Sims f. *edulis*, 15 explants for *P. giberti* N. E. Brown and 9 explants for *P. laurifolia* L.

Index terms: *P. edulis* Sims f. *edulis*, experimental precision, experimental error, variation coefficient, uniformity essay.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora*, essencialmente americano, é constituído por aproximadamente 630 espécies conhecidas (VANDERPLANK, 2000), dessas 152 espécies são procedentes da parte Central e Norte do Brasil com cerca de 64 espécies de frutos comestíveis (SÃO JOSÉ et al., 1997).

No Brasil existe um grande número de plantas nativas do gênero *Passiflora*, conhecidas como maracujá, mas apenas duas delas possuem interesse comercial: *Passiflora edulis*, utilizada para suco e *Passiflora alata*, conhecida como “maracujá doce” (DOYAMA et al, 2005).

A espécie *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, maracujá roxo é originário do Brasil, Paraguai e norte da Argentina, e agora cultivado comercialmente em quase todos os países tropicais e subtropicais. De maneira geral, muito se assemelha a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), sendo que a diferença básica relaciona-se com a pigmentação da casca do fruto, por ocasião da maturação destes.

A espécie *Passiflora laurifolia* Linnaeus é originária das Índias orientais, Venezuela e leste do Brasil e seus frutos doces são comidos frescos e utilizados para preparar bebidas e sorvetes, estando na terceira ou quarta posição em importância comercial entre as espécies do gênero *Passiflora*.

A espécie *Passiflora giberti* N.E. Brown. é nativa do Brasil, Paraguai e Argentina. Apresenta frutos ovóides, amarelo alaranjado quando maduros (CUNHA; KRAMPE, 1999). Planta muito vigorosa típica do Pantanal Matogrossense, possui flores grandes e frutos comestíveis de cor semelhante a maçãs ou alaranjada. Possui potencial para cultivo com fins ornamentais.

Fisher (2003), Meletti (2001) e Menezes (1994) relataram a *resistência de* *P. nitida*, *P. caerulea*, *P. laurifolia*, *alguns acessos de P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. giberti* e *P. setacea* a morte prematura e a outras doenças causadas por patógenos do solo.

Espécies silvestres do gênero *Passiflora* têm apresentado, com base em estudos preliminares, variabilidade para resistência às principais doenças do

maracujazeiro (CUNHA; BARBOSA; JUNQUEIRA, 2002). Oliveira et al. (1982, 1983, 1986) constataram que a espécie *P. giberti* N. E. Brown. mostrou resistência à morte súbita, doença de causa desconhecida. No entanto, todos os acessos de *P. edulis* avaliados, mostraram-se susceptíveis à morte súbita das plantas (OLIVEIRA et al., 1986). Já Oliveira e Ferreira (1991) demonstraram que os híbridos entre *P. edulis* e *P. giberti*, foram susceptíveis à morte súbita de plantas, sugerindo que a tolerância a esta doença seria controlada por genes recessivos. Com relação à doença de parte aérea Oliveira e Ferreira (1991) relatam que alguns genótipos de *P. giberti* N. E. Brown apresentaram plantas tolerantes à bacteriose.

O estabelecimento *in vitro* de plantas consiste em introduzir os explantes no meio para desenvolvimento, para isso é necessário conhecer o protocolo de estabelecimento adequado para cada espécie. Esse protocolo é formado pelo conjunto de procedimentos biotecnológicos que envolvem o estabelecimento *in vitro* nele deve constar o meio de cultura adequado com todas as concentrações de nutrientes.

O estabelecimento de plantas de maracujá *in vitro* pode ser um grande aliado ao melhoramento genético de plantas, uma vez que se pode escolher genótipos superiores para retirada dos explantes. A micropropagação em *Passifloraceae* tem sido reportada por, Kantharajah e Dodd (1990), Dornelas e Vieira (1993), Drew (1991), Kawata et al. (1995) e Gill et al. (2003), sendo a grande maioria dos trabalhos realizada com *P. edulis* e *P. edulis f. flavicarpa*.

Em experimentos com biotecnologia, é de fundamental importância que os resultados apresentados na literatura sejam caracterizados pela consistência dos dados e pela repetibilidade dos protocolos experimentais. Embora esses experimentos sejam instalados em condições controladas, os materiais biológicos utilizados com maior frequência, como os explantes, são muito sensíveis às pequenas alterações (IZQUIERDO; LÓPES, 1991). Dessa forma, atenção especial deve ser dada na fase de planejamento do experimento, no qual serão definidos o tamanho da parcela experimental e o número de repetições a serem utilizados.

Com a necessidade de se detectar diferenças significativas entre tratamentos, devem-se planejar experimentos que permitam a obtenção de resultados com uma boa precisão experimental. Dentre os fatores que influenciam a precisão nos ensaios experimentais destaca-se o tamanho da parcela.

O tamanho ideal da parcela depende da relação entre os custos fixos e os custos variáveis para a implantação do experimento, assim como das condições experimentais (HATHEWAY; WILLIAMS, 1958). Deste modo, o tamanho ótimo de parcela assume grande importância, pois parcelas pequenas aumentam o número de repetições, enquanto que parcelas grandes apresentam menor variância e são estatisticamente mais desejáveis (DURNER, 1989).

Vários são os métodos empregados para estimar o tamanho da parcela experimental, a maioria deles com a utilização de ensaios de uniformidade, a partir dos quais são calculados a variância e o coeficiente de variação para as diferentes dimensões de parcela avaliadas. Os métodos da máxima curvatura e da máxima curvatura visual são os mais utilizados para estimar o tamanho ótimo de parcela.

Na literatura consultada não foram encontrados referências específicas sobre a determinação de tamanho de parcelas em experimentos com estabelecimento *in vitro*; os trabalhos aplicados não fazem citação ao porque de se utilizar determinado tamanho de parcelas. Desse modo, este estudo objetivou a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de estabelecimento *in vitro* com as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. utilizando o método da máxima curvatura modificado, com a finalidade de propiciar a obtenção de resultados de pesquisa com maior confiabilidade e precisão.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados como material vegetal acessos de *P. edulis* Sims f. *edulis*. As sementes dessas espécies foram oriundas de polinização manual dos acessos do banco ativo de germoplasma de maracujá da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Para formação das mudas foi utilizada a casa de vegetação da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, tomando-se os devidos cuidados fitossanitários com a qualidade das sementes, preparo do substrato, semeadura e condução das mudas. O substrato utilizado para plantio foi composto por três partes de solo, uma de esterco de curral curtido (bovino), três quilos de superfosfato-simples e meio quilo de cloreto de potássio, em aproximadamente 1m³ de solo. Utilizaram-se sacos de polietileno de 10 x 20 x 08 cm e, semeando-se quatro sementes por saco à profundidade de 1,0 cm.

Os explantes foram retirados em casa de vegetação, levados ao laboratório, onde foram desinfestados com etanol 70% por 40 segundos e solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 15 minutos, e lavados com água destilada esterilizada por quatro vezes. Para o estabelecimento *in vitro* optou-se pelo uso de microestacas. Essas microestacas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram cultivadas em frascos com 30 mL do meios de cultura, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificados com 2 g L⁻¹ de phytigel®, ajustados a um pH de 5,8, autoclavado a 121°C (1 kg cm⁻²) e sem adição de hormônio vegetal. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 µE m⁻² s⁻¹.

Foram conduzidos seis ensaios de uniformidade, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com 100 repetições, no esquema fatorial 3 × 2, três espécies (*P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L.), duas concentrações de sais do meio de cultura (meio MS completo (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e com a metade das concentrações dos sais minerais e vitaminas (½MS)), perfazendo seis 6 tratamentos. Cada tratamento, também chamado de ensaio, foi constituído por 100 unidades experimentais, que foram dispostas em 10 fileiras (linha) por 10 colunas. Cada unidade experimental foi constituída por um (1) explante. Realizaram-se avaliações aos 45, 75 e 105 dias após a incubação dos explantes em meio de cultura.

Em cada avaliação foram avaliadas as variáveis: comprimento das brotações em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas. Para os dados de coloração das folhas foi adotada uma escala de notas para quantificar a viabilidade dos explantes, essas notas variaram de 1 a 3, sendo que 1: folhas totalmente verdes; 2: folhas verde-claro; e 3: folhas senescentes.

Utilizando-se as 100 unidades básicas dispostas numa grade de 10 linhas por 10 colunas, simularam-se diferentes tamanhos de parcelas, formados por X₁ unidades básicas na linha e X₂ unidades básicas na coluna. Os tamanhos de parcelas foram simulados pelo agrupamento de unidades adjacentes, de modo que X₁X₂ = x correspondesse a x tamanho da parcela, em unidades básicas.

Desse modo, simularam-se 31 tamanhos de parcelas em cada ensaio de uniformidade (Tabela 1), de modo que o tamanho da parcela variou de (1) uma unidade básica ate 50 unidades por parcela. Desta forma, o número de parcelas

variou de 100 até 2. Para cada simulação foram estimados os parâmetros: número de parcelas, média das parcelas com x unidades básicas, variância por unidade básica e coeficiente de variação. Para as parcelas simuladas de diferentes formas, mas com o mesmo tamanho, calcularam-se as médias dos coeficientes de variação (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho da parcela, forma da parcela e número de parcelas totais em cada simulação para os ensaios de uniformidade de plantas de maracujazeiro roxo *in vitro*.

Simulações	Tamanho	Forma	Número de parcelas
1	1	1 × 1	100
2	2	2 × 1	50
3	2	1 × 2	50
4	3	3 × 1	30
5	3	1 × 3	30
6	3	2 + 1	25
7	3	1 + 2	25
8	4	2 × 2	25
9	5	2 × 2 + 1	15
10	6	2 × 3	15
11	6	3 × 2	15
12	7	2 × 3 + 1	10
13	7	3 × 2 + 1	9
14	8	2 × 4	10
15	8	4 × 2	10
16	10	2 × 5	10
17	10	5 × 2	10
18	12	3 × 4	6
19	12	4 × 3	6
20	15	3 × 5	6
21	15	5 × 3	6
22	16	4 × 4	4
23	18	3 × 6	3
24	18	6 × 3	3
25	20	4 × 5	4
26	20	5 × 4	4
27	25	5 × 5	4
28	30	5 × 6	2
29	30	6 × 5	2
30	50	5 × 10	2
31	50	10 × 5	2

O tamanho ótimo de parcela foi estimado utilizando-se o método da máxima curvatura modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963). Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa no qual ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X_0 = \exp\{[1/(2b+2)]\log[(ab)^2(2b+1)/(b+2)]\}$, em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER; LESSMAN, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura MS completo proporcionou melhor desenvolvimento para os genótipos estudados. Somente não ocorreu diferença significativa entre as espécies para o número de raízes no meio 1/2MS. Como houve interação entre espécies e meio para todas as variáveis avaliadas, conforme mostra a tabela 2, foram realizadas simulações para estudo do tamanho de parcela em cada tratamento.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de determinação (R^2) da função de curvatura e do valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0), para os ensaios de uniformidade, das espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L., nos meios MS e 1/2MS, e valores médios dos ensaios, avaliações e espécies.

Os coeficientes de determinação variaram de 80% a 98% para a espécie *P. edulis*, de 71% a 98% para a espécie *P. giberti* e 74% a 98% para *P. laurifolia*, mostrando que o método da máxima curvatura modificado apresentou bom ajuste, com valores médios de R^2 variando de 86% a 96% para a espécie *P. edulis*, de 79% a 95% para *P. giberti* e 84% a 97% *P. laurifolia*. Observa-se, que em média, os valores de R^2 são menores para a espécie *P. giberti* N. E. Brown. quando comparados com as outras espécies, o que nos mostra que o ensaio dessa espécie se apresentou mais heterogêneo que as demais.

Tabela 2. Valores médios para o comprimento das brotações, em cm, número de raízes e coloração das folhas em função dos meios de cultura e das espécies. *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L.

Meio	Espécie			Média
	<i>P. edulis</i>	<i>P. giberti</i>	<i>P. laurifolia</i>	
Comprimento das brotações				
MS	2,1109 aB	3,2008 aA	1,9183 aB	2,4243 a
½ MS	1,7931 aA	1,6532 bAB	1,3695 bB	1,6205 b
Média	1,9376 B	2,4451 A	1,6633 C	
Número de raízes				
MS	0,1931 bB	0,1565 aB	0,5097 aA	0,2891 a
½ MS	0,2419 aA	0,1760 aA	0,1256 bA	0,1853 b
Média	0,2196 AB	0,17 B	0,3320 A	
Coloração das folhas				
MS	1,8592 aA	1,7442 bA	1,0903 bB	1,5222 b
½ MS	1,9667 aB	2,3810 aA	1,5067 aC	1,8945 a
Média	1,9084 A	1,9531 A	1,2261 B	
Número de folhas				
MS	1,3776 aB	1,4656 aB	1,7859 aA	1,5479 a
½ MS	0,8152 bA	0,4560 bB	0,5675 bB	0,6217 b
Média	1,0727 A	0,9727 A	1,2213 A	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a espécie *P. edulis* (Tabela 3), observa-se, que em média, os valores de R^2 são menores para o meio ½ MS quando comparado com o meio MS em todas as variáveis, com exceção para número de folhas; no entanto, essas diferenças são de pequena magnitude, sugerindo que a qualidade de ajuste dos dados ao modelo do método foram semelhantes.

Para a espécie *P. edulis* e utilizando o meio MS, o maior tamanho de parcela encontrado foi 46,43 na variável número de raízes aos 45 dias e o menor foi 6,09 na variável coloração de folhas aos 75 dias. No tratamento ½ MS o maior tamanho de parcela encontrado foi 31,15 unidades básicas na variável número de raízes e o menor foi 4,60 unidades básicas na variável comprimento das brotações, ambos aos 45 dias. Pela média dos tratamentos o maior tamanho de parcela encontrado foi 31,15 unidades básicas para a variável número de raízes e 6,21 unidades básicas na variável coloração de folhas, ambos aos 45 dias (Tabela 3).

Para a espécie *P. edulis*, variável número de folhas o maior e o menor tamanho de parcela, 17,96 e 12,18 foram encontrados no meio MS aos 45 e 75 dias de avaliação, respectivamente. Para a variável coloração das folhas o maior valor

encontrado foi o de 7,18 aos 75 dias e o menor tamanho foi 6,08 aos 45 dias de avaliação, ambos no meio $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 3).

Para a espécie *P. edulis* o número de raízes foi a variável que apresentou maiores tamanhos de parcelas, independente do meio de cultura e das avaliações. Uma vez que no estabelecimento a variável número de raízes (NR) não é considerada de suma importância, pois o que se busca são plantas saudáveis, isentas de vírus e com bom crescimento, a variável comprimento da plântula (CB) será adotada como prioridade na recomendação de um tamanho de parcela ideal. Nesta variável pode-se observar que o menor tamanho de parcela encontrado foi o de 4,60 aos 45 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS e o maior tamanho 10,99 aos 75 dias no meio MS, sendo recomendável como tamanho ótimo a utilização de 11 plantas por parcela.

Para a espécie *P. edulis* os diferentes tamanhos de parcelas observados entre as variáveis (8,6 para CB, 31,3 para NR) sugerem muita cautela quando do planejamento de experimentos desse tipo, pois dependendo da variável, um maior ou menor tamanho poderá ser adotado. Já com relação ao meio de cultura, os valores não diferiram muito um do outro em avaliações mais tardias, podendo utilizar menores tamanhos aos 105 dias, 14 unidades básicas nas duas com posições do meio, aos 75 dias parcelas com 16 unidades básicas para a composição MS e 15 para a composição $\frac{1}{2}$ MS. Aos 45 dias houve grande diferença, sendo encontrado o valor 20 para a composição MS e 15 para composição $\frac{1}{2}$ MS.

Em experimentos de estabelecimento *in vitro* com a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, considerando comprimento das brotações como sendo a variável referência, o tamanho ótimo de parcela recomendado é de 11 plantas por parcela para experimentos com o meio MS e o de 10 plantas por parcela para experimentos no meio $\frac{1}{2}$ MS.

Para a espécie *P. giberti* observa-se, que em média, os valores de R^2 são maiores para o meio $\frac{1}{2}$ MS quando comparado com o meio MS em todas as variáveis, com exceção para número de folhas, o que nos mostra que o ensaio nesse tratamento se apresentou mais homogêneo que outro.

Para a espécie *P. giberti*, tratamento MS o maior tamanho de parcela encontrado foi 34,53 na variável número de raízes aos 75 dias e o menor foi 4,39 na variável coloração de folhas aos 45 dias. No tratamento $\frac{1}{2}$ MS o maior tamanho de parcela encontrado foi 35,36 na variável número de raízes aos 75 dias e o menor foi 2,34 na variável coloração das folhas aos 45 dias de avaliação. Pela média dos

tratamentos o maior tamanho de parcela encontrado foi 34,95 para a variável número de raízes aos 75 dias e 3,36 na variável coloração de folhas aos 45 dias (Tabela 2).

Para a espécie *P. giberti*, variável número de folhas o menor e o maior tamanho de parcela, 15,29 e 25,70 foram encontrados no meio MS aos 75 e no meio $\frac{1}{2}$ MS aos 105 dias de avaliação, respectivamente. Para a variável coloração das folhas o maior valor encontrado foi o de 9,52 aos 75 dias no meio MS e o menor tamanho foi 2,34 aos 45 dias de avaliação no meio $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 2).

Para a espécie *P. giberti* o número de raízes foi a variável que apresentou maiores tamanhos de parcelas independente do tratamento. No entanto, uma vez que no estabelecimento a variável número de raízes não é considerada de suma importância, pois o que se busca são plantas saudáveis, isentas de vírus e com um bom crescimento, a variável comprimento da plântula será adotada como prioridade na recomendação de um tamanho de parcela ideal. Nesta variável pode-se observar que o menor tamanho de parcela encontrado foi o de 7,29 aos 45 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS e o maior tamanho 14,70 aos 105 dias no meio MS, sendo recomendável como tamanho ótimo 15 plantas por parcela.

Em experimentos com estabelecimento *in vitro* com a espécie *P. giberti* N. E. Brown. o tamanho ótimo de parcela recomendado é de 15 plantas por parcela para experimentos com o meio MS e o de 8 plantas por parcela para experimentos no meio $\frac{1}{2}$ MS.

Para a espécie *P. laurifolia* no tratamento MS o maior tamanho de parcela encontrado foi 41,37 na variável número de raízes aos 45 dias e o menor foi 4,56 na variável coloração de folhas aos 105 dias. No tratamento $\frac{1}{2}$ MS o maior tamanho de parcela encontrado foi 30,41 na variável número de raízes aos 75 dias e o menor foi 6,25 na variável coloração das folhas aos 105 dias de avaliação. Pela média dos tratamentos o maior tamanho de parcela encontrado foi 41,37 para a variável número de raízes aos 45 dias e 5,40 na variável coloração de folhas aos 105 dias (Tabela 3).

Para a espécie *P. laurifolia*, variável número de folhas o menor tamanho de parcela encontrado foi 11,53 aos 45 dias em meio MS e o maior tamanho de parcela 20,48 aos 105 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS. Para a variável coloração das folhas o maior valor encontrado foi o de 12,06 aos 45 dias e o menor tamanho foi 4,56 aos 105 dias de avaliação, ambos no meio MS (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de determinação (R^2) e estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_0) para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. nos meios de cultura MS e ½ MS ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis: comprimento das brotações em cm (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF).

Meio	Avaliação (dias)	CB		NR		NF		CF		Média	
		X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>											
MS	45	8,82	0,98	46,43	0,97	17,96	0,94	6,34	0,82	19,88	0,93
	75	10,99	0,97	32,57	0,97	12,18	0,97	6,09	0,90	15,46	0,95
	105	8,99	0,96	26,06	0,96	13,02	0,98	7,00	0,82	13,77	0,93
	Média	9,60	0,97	35,02	0,97	14,39	0,96	6,48	0,85	16,37	0,94
½ MS	45	4,60	0,89	31,15	0,95	15,56	0,94	6,08	0,96	14,35	0,93
	75	8,96	0,94	26,44	0,95	14,38	0,96	7,18	0,80	14,24	0,91
	105	9,28	0,91	25,17	0,93	14,89	0,96	6,31	0,85	13,91	0,91
	Média	7,61	0,91	27,59	0,95	14,94	0,95	6,52	0,87	14,17	0,92
Média Geral	45	6,71	0,94	38,79	0,96	16,76	0,94	6,21	0,89	17,12	0,93
	75	9,97	0,95	29,51	0,96	13,28	0,96	6,63	0,85	14,85	0,93
	105	9,14	0,93	25,61	0,95	13,95	0,97	6,65	0,83	13,84	0,92
	Média	8,61	0,94	31,30	0,96	14,66	0,95	6,50	0,86	15,27	0,93
<i>P. giberti</i> N. E. Brown.											
MS	45	11,85	0,85	29,24	0,96	15,93	0,94	4,39	0,78	15,35	0,88
	75	13,62	0,87	34,53	0,94	15,29	0,96	9,52	0,80	18,24	0,89
	105	14,70	0,86	25,11	0,89	19,99	0,93	7,33	0,88	16,78	0,89
	Média	13,39	0,86	29,63	0,93	17,07	0,94	7,08	0,82	16,79	0,89
½ MS	45	7,29	0,93	31,26	0,96	24,50	0,98	2,34	0,85	16,35	0,93
	75	7,47	0,93	35,36	0,95	22,08	0,94	2,43	0,71	16,83	0,88
	105	8,07	0,94	34,66	0,96	25,70	0,96	2,64	0,74	17,77	0,90
	Média	7,61	0,94	33,76	0,95	24,09	0,96	2,47	0,76	16,98	0,90
Média Geral	45	9,57	0,89	30,25	0,96	20,22	0,96	3,36	0,82	15,85	0,91
	75	10,54	0,90	34,95	0,95	18,69	0,95	5,98	0,76	17,54	0,89
	105	11,39	0,90	29,88	0,92	22,85	0,94	4,98	0,81	17,28	0,89
	Média	10,50	0,90	31,69	0,94	20,58	0,95	4,77	0,79	16,89	0,90
<i>P. laurifolia</i> L.											
MS	45	6,72	0,95	41,37	0,98	11,53	0,95	12,06	0,91	17,92	0,95
	75	8,49	0,97	21,61	0,95	11,78	0,97	8,49	0,92	12,59	0,95
	105	8,01	0,97	19,03	0,95	18,61	0,96	4,56	0,80	12,55	0,92
	Média	7,74	0,96	27,34	0,96	13,97	0,96	8,37	0,87	14,35	0,94
½ MS	45	7,62	0,94	-	-	19,30	0,90	-	-	13,46	0,92
	75	7,95	0,96	30,41	0,98	19,54	0,95	11,28	0,77	17,30	0,91
	105	8,64	0,96	31,53	0,98	20,48	0,94	6,25	0,74	16,72	0,91
	Média	8,07	0,95	30,97	0,98	19,77	0,93	8,77	0,75	15,83	0,91
Média Geral	45	7,17	0,94	41,37	0,98	15,41	0,93	12,06	0,91	19,00	0,94
	75	8,22	0,97	26,01	0,96	15,66	0,96	9,89	0,85	14,94	0,93
	105	8,32	0,97	25,28	0,97	19,55	0,95	5,40	0,77	14,64	0,91
	Média	7,90	0,96	30,89	0,97	16,87	0,95	9,11	0,84	16,19	0,93

(-) não houve dados suficientes para análise.

Para a espécie *P. laurifolia* o número de raízes foi a variável que apresentou maiores tamanhos de parcelas independente do tratamento. Uma vez que no

estabelecimento a variável número de raízes não é considerada de suma importância, pois o que se busca são plantas saudáveis, isentas de vírus e com um bom crescimento, a variável comprimento da plântula será adotada como prioridade na recomendação de um tamanho de parcela ideal. Nesta variável pode-se observar que o menor tamanho de parcela encontrado foi o de 7,0 aos 45 dias no meio MS e o maior tamanho 9,0 no meio $\frac{1}{2}$ MS aos 105 dias, sendo recomendável como tamanho ótimo 9 plantas por parcela (Tabela 3).

Dutra et al. (2003) trabalhando com micropropagação *in vitro* de crisântemo, verificaram que o tamanho ótimo de parcela experimental era constituído por dois tubos de ensaio e que números superiores a esse valor, tanto de tubos quanto de repetições, não alteram a precisão experimental. No entanto, a utilização de pequeno número de unidades experimentais pode trazer insegurança às pesquisas, que são sujeitas a vários fatores não previsíveis e com isso ocorrer a perda de algumas informações e comprometer a qualidade de resultados.

CONCLUSÃO

Para experimentos de estabelecimento *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*, de 15 explantes para *P. giberti* N. E. Brown e de 9 explantes para *P. laurifolia* L.

REFERÊNCIAS

- CHAVES, L. J. **Tamanho da parcela para seleção de progênies de milho (*Zea mays* L.)**. 1985. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.
- CUNHA, M. A. P. da; KRAMPE, R. Espécies do gênero *Passiflora*. In: LIMA, A. de A. (Ed.). **O cultivo do maracujá**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1999. 129p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 35).

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (Ed.). **Maracujá Produção: Aspectos Técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104p. (Frutas do Brasil; 15).

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.13, p.103-106, aug. 1993.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H.G.;NOVELLI,E.L.B.;CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.96, p. 371-374, 2005.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 23-27,1991.

DURNER, E.F. OPS: A computer program for estimating optimum plot size for field research. **Hortscience**, Alexandria, v. 24, n.6, p. 1040, 1989.

DUTRA, L.F.; CIRILLO, M.A.; FRÁGUAS, C.B.; ARAUJO, A.G. de; PEREIRA, A.R.; SOARES, G.A.; PASQUAL, M.; FERREIRA, D.F.; RODRIGUES, V.A. Micropropagação de crisântemo: tamanho ótimo da parcela experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14, CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p. 170.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Embrapa. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Pesquisa em maracujazeiro no Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa, 1998. p.48-53. (Reunião técnica).

FISCHER, I. H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e**

Phytophthora parasítica. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

GILL, M. I. S.; CANCINO, G. O.; ANTHONY, P.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Pluronic F-68 Enhanced Shoot Regeneration in Micropropagated *Citrus* Rootstock and *Passiflora* Species. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 23, n. 4, p. 349-358, 2003.

HATHEWAY, W.H.; WILLIAMS, E.J. Efficient estimation of the relationship between plot size and the variability of crop yields. **Biometrics**, Washington, D.C., v. 14, p.207-222, 1958.

IZQUIERDO, J. A.; LOPEZ F. Y. Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro* In: Roca, W. M.; Mroginski, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos e aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 375-399.

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.

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

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, p.477-481, 1963.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SOARES, F.P.; EMRICH, E. B.; SILVA, Á.A.N. Callus Induction in leaf segments of *Croton urucurana* BAILL. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

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

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

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D. A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, São Paulo, v.22, n. 1, p. 95-104. 1994.

MORAN ROBLES, M. J. Multiplication vegetative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Pasiflora edulis* var. *Flavicarpa* Deg. et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, n.10, p. 639-699, 1978.

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

OLIVEIRA, J. C. de; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ (Ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 211-239.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura das plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.9, p. 64-65, 1983.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R. Determinação de fonte de resistência em Passifloraceae quanto à morte prematura das plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: UNB, 1986. p. 403-408.

OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C.; NAKAMUR, K.; FERREIRA, F.R. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region of American Society of Horticultural Sciences**, New York, v.25, p. 343 -345, 1982.

SÃO JOSÉ, A. R.; BRUCKNER,H.; MANICA,I.; HOFFMANN, M. **Maracujá**: temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p.26-47.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 2000. 224p.

CAPÍTULO 2

**TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS NA
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE *PASSIFLORA GIBERTI* N. E.
BROWN**

TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE *PASSIFLORA GIBERTI* N. E. BROWN

Resumo – Este trabalho teve por objetivo a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos *in vitro* que visam a conservação de *Passiflora Giberti*. Foram conduzidos dez ensaios de uniformidade com a espécie *Passiflora Giberti* N. E. Brown. Neste trabalho foi comparado o tratamento testemunha (MS com 30 g L⁻¹ de sacarose) com o meio MS acrescido de três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹) combinado com três concentrações de sorbitol (10, 20 e 40 g L⁻¹), totalizando 10 tratamentos com 20 repetições. As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias de incubação, observando-se a altura das brotações (cm); número de raízes, bem como número e coloração das folhas. Foram simulados diversos tamanhos e formas de parcelas, em que cada planta foi considerada primeiramente como uma unidade básica (parcela) até 10 plantas por unidade básica. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Para a espécie *P. giberti* N. E. Brown o tamanho de parcela ótimo recomendado deve perfazer 10 plantas.

Termo para Indexação: Precisão experimental, erro experimental, coeficiente de variação, ensaio de uniformidade.

OPTIMAL SIZE OF PLOTS FOR EXPERIMENTS WITH *IN VITRO* CONSERVATION OF GERMOPLASM OF *PASSIFLORA GIBERTI* N. E. BROWN.

Abstract – The objective of this work was to determine the optimal size of plots of *P. giberti* N. E. Brown. with *in vitro* establishment experiments. Ten uniformity essays with the species *P. giberti* N. E. Brown. were conducted. The control treatment (MS with 30 g L⁻¹ of sucrose) was compared to the MS medium supplemented with three sucrose concentrations (0, 15 and 30 g L⁻¹) combined with three sorbitol concentrations (10, 20 and 40 g L⁻¹), in a total of 10 treatments with 20 repetitions. The evaluation of the experiments were carried out at 30, 60, 90 and 120 days of incubation, whereas the height of shoots (cm), number of roots as well as the number and color of leaves were observed. Various sizes and plot forms, whereas each

plant was considered as the basic unit, were simulated. For the estimation of the optimal size of plots, the methods of maximum modified curvature was employed. For the specie and variables studied, the optimal plot size recommended should be formed with 10 plants.

Indexation term: Experimental precision, experimental error, variation coefficient, uniformity essay.

INTRODUÇÃO

Basicamente existem duas estratégias de conservação dos recursos genéticos, denominadas *in situ*, que permite a manutenção da biodiversidade dentro do ecossistema, preservando a dinâmica evolutiva do habitat original ou do ambiente natural, e *ex situ*, realizada fora do ambiente natural, e contempla a formação de bancos de sementes até bancos em campo e *in vitro* (NASS, 2001; VIEIRA; GLÓRIA, 2001).

As técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em métodos valiosos para a preservação de recursos genéticos vegetais (HARDING; BENSON; CLACHER, 1997; NASS, 2001) e se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos. Esta estratégia possibilita a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livres das intempéries e riscos que existem no campo, reduz os custos, garante a manutenção da fidelidade genética dos materiais conservados, facilitando a disponibilidade dos mesmos para o melhoramento genético e o próprio intercâmbio de germoplasma.

Existem dois métodos principais de conservação *in vitro*: crescimento lento (períodos médios) e a criopreservação (períodos longos), nos quais os processos metabólicos do material vegetal são inativados. O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso principalmente para a conservação de meristemas e/ou ápices meristemáticos de muitas espécies e consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessário para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção.

Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento ou diminuindo-se a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS, 1983 e 1985; WITHERS; WILLIAMS, 1998).

A realização de estudos que visam desenvolver metodologias a serem aplicadas para a conservação de germoplasma, consiste num caminho racional a ser seguido na consolidação da cultura do maracujazeiro no âmbito nacional e mundial, por permitir a preservação da variabilidade genética e possibilitar seu uso em programas de melhoramento genético e outras aplicações futuras.

A técnica de conservação *in vitro* tem sido utilizada como ferramenta para a conservação da diversidade genética do maracujazeiro, pois reduz os custos com mão-de-obra e material de consumo, tornando os processos de conservação mais eficientes, evitando eventuais perdas de materiais que poderiam ter interesse no melhoramento de plantas.

Em trabalhos de conservação geralmente se utiliza um maior número de repetições possível por tratamento, devido a grande variabilidade do material biológico a ser testado e do tempo que esse material será testado sem subcultivos, levando a maior número de repetições, acarretando maior custo do experimento, maior tempo para avaliação e gasto de material de consumo, o que pode limitar a execução de um projeto pelas instituições de pesquisa e seu financiamento pelas agências de fomento.

Por essas razões, estudos envolvendo a conservação *in vitro*, a determinação do número ideal de repetições e do tamanho ótimo de parcelas experimentais, fornecerá informações importantes para os programas de melhoramento genético e conseqüente consolidação da cultura do maracujá no Brasil.

A determinação do tamanho de parcela e do número de repetição são questões práticas pertinentes ao planejamento experimental, e sua caracterização de forma otimizada permite a obtenção de maior precisão. O uso do tamanho e forma adequados da parcela é crucial para diferentes experimentos, pois, independentemente dos seus objetivos, o que se procura detectar é a existência de diferenças significativas entre tratamentos testados, que depende da redução do erro experimental.

Existem vários métodos citados na literatura que permitem a estimação do tamanho de parcelas, entre esses, se destaca o método da máxima curvatura. Com a intenção de eliminar a influência da escala dos eixos coordenados na determinação do ponto de máxima curvatura, Lessman e Atkins (1963) propuseram uma alteração no método da máxima curvatura incorporando o coeficiente de heterogeneidade do solo de Smith (1938), pelo estabelecimento de uma relação entre coeficiente de variação (*CV*) e o tamanho da parcela.

Diante da importância que se tem a conservação *in vitro* de espécies cultivadas e a falta de informações sobre procedimentos que indicam o tamanho adequado de parcelas, este estudo teve por objetivo a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de conservação *in vitro* de maracujá *P. giberti* N. E. Brown.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, em Cruz das Almas, Bahia, utilizando como material vegetal segmentos nodais de plantas de *Passiflora giberti* N. E. Brown., do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (MS padrão).

Esses explantes foram dispostos em magentas® contendo 20 mL do meio de cultura MS, suplementado com 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sorbitol combinados com 0, 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, mais uma testemunha com meio MS padrão, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2 g L⁻¹ de phytigel®, ajustado a um pH de 5,8 e sem adição de fitoreguladores. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 µE m⁻²s⁻¹.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 3 x 3 +1, sendo três concentrações de sacarose, três concentrações de sorbitol, mais uma testemunha (MS padrão), totalizando 10 tratamentos. Cada unidade experimental foi constituída de 1 explante por magenta®.

As avaliações dos experimentos foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias de incubação, observando-se a altura das brotações (cm); número de folhas; número de raízes e coloração das folhas. Para este último parâmetro foi atribuída a seguinte escala de notas: 1- folhas totalmente verdes; 2- verde clara e 3- início do secamento e morte das folhas.

Cada tratamento foi considerado um ensaio de uniformidade. Utilizando-se as 20 unidades básicas, em cada um dos tratamentos, simularam-se 15 diferentes tamanhos de parcelas, formados por X_1 unidades básicas na linha e X_2 unidades básicas na coluna. Os tamanhos de parcela foram simulados pelo agrupamento de unidades de modo que X_1X_2 correspondesse a X (tamanho da parcela em unidades básicas), conforme pode ser observado na Tabela 1. Para cada simulação foram estabelecidos os parâmetros: número de parcelas (N), média das parcelas, com X unidades básicas, variância por unidades básica e coeficiente de variação. Para as parcelas simuladas de diferentes formas com o mesmo tamanho, calcularam-se as médias dos coeficientes de variação.

Tabela 1. Tamanho da parcela, forma da parcela e número de parcelas totais para os ensaios de uniformidade de plantas de *P. giberti* N. E. Brown *in vitro* conservadas até os 120 dias de cultivo *in vitro*.

Simulações	Tamanho (X)	Forma ($X_1 \times X_2$)	Número de parcelas
1	1	1x1	20
2	2	2x1	10
3	2	1x2	8
4	3	3x1	5
5	3	1x3	4
6	3	2+1	4
7	3	1+2	4
8	4	2x2	4
9	5	2x2+1	2
10	6	2x3	2
11	6	3x2	2
12	7	2x3+1	2
13	8	2x4	2
14	8	4x2	2
15	10	2x5	2

O tamanho ótimo de parcela foi calculado pelo método da máxima curvatura modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963). Por esse método, a relação entre

o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa em que ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X_0 = \exp\left\{\left[1/(2b+2)\right]\log\left[(ab)^2(2b+1)/(b+2)\right]\right\}$, em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (Meier e Lessman, 1971).

Também foram estimados os coeficientes de determinação para verificar a qualidade de ajuste do modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os melhores tratamentos para conservação foram aqueles dos meios de cultura enriquecidos com 10 g L⁻¹ ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose. A presença de sacarose propiciou maior altura das microplantas e maior número de raízes e de folhas. Uma vez que foi verificada interação significativa entre as concentrações de sorbitol e de sacarose para todas as variáveis avaliadas, conforme mostra a tabela 2, foram realizadas simulações para obtenção do tamanho de parcelas em todos os tratamentos.

São apresentados na Tabela 3 os coeficientes de determinação (R^2) da função de curvatura e do valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0) para os ensaios de uniformidade para todos os tratamentos.

Para os tratamentos, em geral, os coeficientes de determinação variaram de 24% a 98%, sendo que os tratamentos 8 e 10 apresentaram os maiores coeficientes (98%). O método da máxima curvatura modificado apresentou boa precisão entre tratamentos com valores médios de R^2 variando de 62 % a 88%. Observa-se, que em média, os valores de R^2 são menores para o tratamento 1 (65%) e maiores para o tratamento 8 (98%), os demais tratamentos variaram de 70% a 87%.

Observa-se (Tabela 3) que o número de folhas foi à variável que apresentou maior tamanho de parcela em todos os tratamentos e períodos de avaliação; o maior valor de tamanho de parcela dessa variável (31,41) foi encontrado no tratamento 10

aos 90 e 120 dias de avaliação, e o menor tamanho de parcela (6,00) foi obtido no tratamento 8.

Tabela 2. Valores médios para altura das microplantas (cm), número de raízes, número de folhas e coloração de folhas de *Passiflora giberti* N. E. Brown. em função das concentrações de sacarose e sorbitol (g L^{-1}) aos 150 dias de cultivo.

Sacarose	Sorbitol			Média
	10	20	40	
Altura das microplantas				
0	1,5450 Ab	1,1875 Ab	1,1667 Aa	1,3130 b
15	6,2750 Aa	4,1000 Aa	1,0526 Ba	3,8559 a
30	4,5450 Aa	4,5050 Aa	1,2450 Ba	3,4317 a
Média	4,1217 A	3,4125 A	1,1561 B	3,2719
Testemunha				6,5211
Número de raízes				
0	0,0000 Aa	0,0455 Ab	0,0000 Aa	0,0133 b
15	0,5625 Aba	0,6875 Aa	0,0000 Ba	0,4255 a
30	0,4750 Aba	0,9250 Aa	0,0250 Ba	0,4750 a
Média	0,3458 AB	0,5841 A	0,0085 B	0,4520
Testemunha				1,7000
Número de folhas				
0	0,6875 Ab	0,4394 Ab	0,2000 Ab	0,4425 b
15	2,2750 Aa	1,9375 Aa	1,6533 Aa	1,9617 a
30	2,3125 Aba	2,7000 Aa	1,1750 B ab	2,0625 a
Média	1,7583 A	1,7699 A	0,9957 B	1,6095
Testemunha				2,5125
Coloração das folhas				
0	1,0000 Aa	1,4615 Aa	1,2500 Aa	1,2188 a
15	1,0204 Ba	1,0000 Bb	1,3590 Aa	1,1163 a
30	1,1220 Ba	1,2830 Bab	1,6429 Aa	1,3115 a
Média	1,0571 B	1,1963 B	1,4648 A	1,2292
Testemunha				1,3208

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Números de tamanho de parcelas altos também foram encontrados na variável número de raízes, sendo o maior valor (30,11) no tratamento 4 aos 30 dias de avaliação, para essa variável o menor tamanho de parcela (7,98) foi obtido no tratamento 4 aos 60 dias de avaliação e nos tratamentos 2, 3, 5, 6, 7 e 10 em todos os períodos de avaliação.

Tabela 3. Coeficientes de determinação (R^2) e estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_0) para as variáveis altura das microplantas em cm (AM), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração de folhas (CF) nos dez tratamentos.

Tratamentos	Avaliação (dias)	AM		NR		NF		CF		Média	
		X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2
1- Testemunha Meio MS	30	7,94	0,65	27,98	0,87	10,79	0,24	6,38	0,71	13,27	0,62
	60	10,65	0,62	17,46	0,68	10,26	0,56	7,98	0,87	11,59	0,68
	90	10,68	0,56	14,24	0,43	11,51	0,75	6,76	0,87	10,80	0,65
	120	7,39	0,34	12,83	0,52	11,51	0,75	7,16	0,87	9,72	0,62
	Média	9,17	0,54	18,13	0,63	11,02	0,58	7,07	0,83	11,89	0,65
2- 0g L^{-1} de sacarose + 10g L^{-1} de sorbitol	30	3,23	0,76	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	6,79	0,85
	60	4,49	0,58	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,11	0,80
	90	6,52	0,68	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,62	0,83
	120	7,65	0,62	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,90	0,81
	Média	5,47	0,66	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,17	0,82
3- 0g L^{-1} de sacarose + 20g L^{-1} de sorbitol	30	9,07	0,67	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	8,26	0,82
	60	9,36	0,77	7,98	0,87	21,66	0,76	7,98	0,87	11,75	0,82
	90	9,45	0,79	7,98	0,87	24,81	0,62	7,98	0,87	12,56	0,79
	120	9,64	0,77	7,98	0,87	24,81	0,62	7,98	0,87	12,60	0,79
	Média	9,38	0,75	7,98	0,87	19,82	0,72	7,98	0,87	10,85	0,81
4- 0g L^{-1} de sacarose + 40g L^{-1} de sorbitol	30	9,07	0,87	30,11	0,87	7,98	0,87	6,39	0,37	13,39	0,75
	60	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	90	3,84	0,71	22,30	0,62	7,98	0,87	7,98	0,87	10,53	0,77
	120	3,80	0,71	16,92	0,60	7,98	0,87	7,98	0,87	9,17	0,76
	Média	6,18	0,79	19,33	0,74	7,98	0,87	7,58	0,75	10,63	0,80
5- 15g L^{-1} de sacarose + 10g L^{-1} de sorbitol	30	4,60	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,14	0,87
	60	9,38	0,48	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	8,33	0,78
	90	8,20	0,39	7,98	0,87	21,55	0,73	7,98	0,87	11,43	0,72
	120	9,20	0,65	7,98	0,87	21,55	0,73	7,98	0,87	11,68	0,78
	Média	7,84	0,60	7,98	0,87	14,77	0,80	7,98	0,87	8,97	0,79
6- 15g L^{-1} de sacarose + 20g L^{-1} de sorbitol	30	2,15	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	6,53	0,87
	60	6,28	0,67	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,56	0,82
	90	11,45	0,65	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	8,85	0,82
	120	11,69	0,82	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	8,91	0,86
	Média	7,89	0,75	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,64	0,84
7- 15g L^{-1} de sacarose + 40g L^{-1} de sorbitol	30	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	60	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	90	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	120	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	Média	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
8- 30g L^{-1} de sacarose + 10g L^{-1} de sorbitol	30	8,61	0,98	14,84	0,95	-	-	2,22	0,32	8,56	0,75
	60	12,06	0,92	13,04	0,97	6,00	0,95	8,67	0,96	9,94	0,95
	90	12,46	0,98	12,77	0,99	16,55	0,93	8,27	0,91	12,51	0,95
	120	10,84	0,93	11,13	0,90	16,55	0,93	-	-	12,84	0,92
	Média	10,99	0,95	12,94	0,95	13,03	0,93	6,39	0,73	10,34	0,88
9- 30g L^{-1} de sacarose + 20g L^{-1} de sorbitol	30	5,34	0,74	10,66	0,87	7,98	0,87	6,58	0,87	7,64	0,84
	60	8,09	0,87	10,33	0,81	17,28	0,87	7,98	0,87	10,92	0,86
	90	13,12	0,93	11,13	0,87	16,49	0,87	10,67	0,87	12,85	0,89
	120	13,17	0,86	11,59	0,97	16,49	0,87	6,62	0,87	11,97	0,89
	Média	9,93	0,85	10,93	0,88	14,56	0,87	7,96	0,87	10,47	0,86
10- 30g L^{-1} de sacarose + 40g L^{-1} de sorbitol	30	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87
	60	7,98	0,87	7,98	0,87	7,98	0,87	7,35	0,77	7,82	0,85
	90	7,98	0,87	7,98	0,87	31,41	0,87	7,73	0,94	13,78	0,89
	120	7,98	0,87	7,98	0,87	31,41	0,87	6,97	0,98	13,59	0,90
	Média	7,98	0,87	7,98	0,87	19,70	0,87	7,51	0,89	9,86	0,87
Média dos tratamentos		8,28	0,76	10,92	0,84	12,36	0,82	7,67	0,85	9,84	0,82

(-) não houve dados suficientes para análise.

O menor tamanho de parcela (2,15) foi obtido no tratamento 6 para variável tamanho da planta aos 30 dias de avaliação, nessa variável o maior valor foi encontrado no tratamento 9 com 13,12 e 13,17, aos 90 e 120 dias, respectivamente.

A média dos valores entre tratamentos e períodos de avaliação foi de 8,28 para altura da planta, 10,92 para número de raízes, 12,36 para número de folhas e 7,67 para coloração de folhas, ficando a média geral em torno de 9,84 plantas por parcela.

A coloração de folhas foi à variável que apresentou em média os menores tamanho de parcela em todos os tratamentos, o maior valor de tamanho de parcela dessa variável (10,67) foi encontrado no tratamento 9 aos 90 dias de avaliação, para essa variável o menor tamanho de parcela (2,22) foi obtido no tratamento 8 aos 30 dias de avaliação (Tabela 3).

Dutra et al. (2003) trabalhando com micropropagação *in vitro* de crisântemo, verificaram que o tamanho ótimo de parcela experimental era constituído por dois tubos de ensaio e que números superiores a esse valor, tanto de tubos quanto de repetições, não alteram a precisão experimental. No entanto, a utilização de pequeno número de unidades experimentais pode trazer insegurança às pesquisas, que são sujeitas à vários fatores não previsíveis e com isso ocorrer a perda de algumas informações e comprometer a qualidade de resultados.

O cálculo do tamanho de parcelas pelo método da máxima curvatura modificado apresenta a vantagem de estabelecer uma relação entre coeficiente de variação (medida da precisão experimental) e o tamanho da parcela por meio de uma equação de regressão, cujo ajuste em geral é muito, com altos valores de coeficiente de determinação, como a maioria dos encontrados neste trabalho, aumentando a confiabilidade das estimativas. Apresenta a desvantagem de não considerar os custos do experimento, o que, no entanto, dentro de certos limites, e desde que os custos não sejam tão elevados, podem ser desprezados.

De modo geral, mesmo com a presença de interação significativa entre os fatores sacarose e sorbitol, optou-se em sugerir um tamanho de parcela que pudesse representar todos os tratamentos. Desse modo, com base nas médias das estimativas do tamanho de parcelas, que variaram de 7,6 até 12,3 explantes, sugere-se que não se deve usar menos do que 10 explantes como um tamanho adequado de parcela.

CONCLUSÃO

Em experimentos com conservação *in vitro* da espécie *P. giberti* N. E. Brown o tamanho ótimo de parcela recomendado é o de 10 microplantas (explantes) por parcela, considerando que todas as variáveis analisadas assumem o mesmo grau de importância no processo da conservação.

REFERÊNCIAS

- DUTRA, L.F.; CIRILLO, M.A.; FRÁGUAS, C.B.; ARAUJO, A.G. de; PEREIRA, A.R.; SOARES, G.A.; PASQUAL, M.; FERREIRA, D.F.; RODRIGUES, V.A.
Micropropagação de crisântemo: tamanho ótimo da parcela experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14, CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p. 170.
- HARDING, K.; BENSON, E.E.; CLACHER, K.; Plant conservation biotechnology : An overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, may-june, 1997.
- 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, p.477-481, 1963.
- MEIER, V.D.; LESSMAN, K.J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Science**, Madison, v.11, p. 648-650, 1971.
- MORAN ROBLES, M. J. Multiplication vegetative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Pasiflora edulis* var. Flavicarpa Deg. et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, n.10, p. 639-699, 1978.
- NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I. S. de, VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos**

Genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55.

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.

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

VIEIRA, M. L. C.; GLÓRIA, B. A. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 911-938.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa – SPI, 1998. v.1. p. 297-329.

WITHERS, L.A. Germplasm preservation through tissue culture: an overview. In: CELL AND CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing, 1983, Beijing. **Proceedings...** Beijing: Science Press, 1983. p. 315-341.

WITHERS, L.A. Cryopreservation and storage of germplasm. In: DIXON, R.A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach.** Oxford: Irl.Press, 1985. p.169-191.

CAPÍTULO 3

**TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS A
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORA***

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS COM MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORA*

Resumo – Este trabalho teve por objetivo a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de multiplicação *in vitro* de *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia* L. Foram conduzidos ensaios de uniformidade com as duas espécies, em dois meios de cultura MS e MSM, em duas concentrações de BAP (0 e 3 mg.L⁻¹), perfazendo um total de 4 tratamentos para cada espécie. Foram simulados diversos tamanhos e formas de parcelas, em que cada planta foi considerada primeiramente como uma unidade básica (parcela) até 25 plantas por unidade básica. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Para as espécies e variáveis estudadas, o tamanho de parcela ótimo recomendado deve ser formado por 26 plantas para *P. edulis* Sims f. *edulis* e 34 plantas para *P. laurifolia* L.

Termo para Indexação: *P. edulis* Sims f. *edulis*., *P. laurifolia* L., precisão experimental, erro experimental, coeficiente de variação, ensaio de uniformidade.

OPTIMAL SIZE OF PLOTS FOR EXPERIMENTS WITH *IN VITRO* MULTIPLICATION OF TWO SPECIES OF THE *PASSIFLORA* GENUS

Abstract – The objective of this work was to determine the optimal size of plots of *P. edulis* Sims f. *edulis* and *P. laurifolia* L. with *in vitro* multiplication experiments. Uniformity essays were conducted, two medium MS and MSM, two concentration of BAP (0 e 3 mg.L⁻¹), perform a total of 4 treatments for specie. Various sizes and plot forms, whereas each plant was considered as the basic unit but also 25 plants for unit basic, were simulated. For the estimation of the optimal size of plots, the methods of maximum modified curvature was employed. For the species and variables studied, the optimal plot size recommended should be formed with 26 plants for *P. edulis* Sims f. *edulis* and 34 plants for *P. laurifolia* L.

Indexation term: *P. edulis* Sims f. *edulis*., *P. laurifolia* L. experimental precision, experimental error, variation coefficient, uniformity essay.

INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro apresenta significativa participação no mercado nacional. Essa produção ganhou grande impulso a partir dos anos 70, expandindo-se para as regiões Norte e Nordeste do país (CHAGAS, 1991). Na década de 90 a área plantada era de 25.329 ha (FARIAS, 2003) em 2006 essa área passou a ser de 45.327 ha (IBGE, 2008). A evolução da produção do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial de maracujá. Apesar do destaque da produção, a produtividade da cultura brasileira ainda é baixa, cerca de 14 t ha⁻¹ ano⁻¹ (IBGE, 2008). Essa baixa produtividade é motivada por problemas fitossanitários sendo um indicativo de condições inadequadas de cultivo e da ausência de resultados significativos, por não se ter conseguido desenvolver uma cultivar verdadeiramente nova, a partir de programas de melhoramento.

Há um número limitado de pesquisas conduzidas no Brasil com relação a germoplasma e taxonomia (FERREIRA, 1998). As espécies de maracujá possuem uma imensa variabilidade genética disponível, tanto inter quanto intra-específica, de interesse para programas de melhoramento genético e bancos de germoplasma.

O maracujá roxo, *P. edulis* Sims f. *edulis*, de maneira geral muito se assemelha a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), sendo que a diferença básica relaciona-se com a pigmentação da casca do fruto, por ocasião da maturação destes.

Passiflora laurifolia Linnaeus, por ser uma espécie promissora, é utilizada em trabalhos desenvolvidos que visam explorar a máxima variabilidade genética da espécie *Passiflora*. Apesar das dificuldades existentes para obtenção de cruzamentos, alguns híbridos sexuais interespecíficos têm sido produzidos, uma vez que muitas espécies do gênero *Passiflora* possuem características desejáveis a serem transferidas (OLIVEIRA, 1987). A espécie *P. laurifolia* é parcialmente resistente ao *Fusarium* enquanto a *P. edulis* é altamente susceptível (DELANOE, 1991), e, resistente a morte prematura e a

outras doenças causadas por patógenos do solo (FISHER, 2003; MELETTI, BRUCKNER, 2001 e MENEZES et al.,1994)).

As condições *in vitro* podem ser deletérias ao desenvolvimento normal das plantas, desse modo é necessário que se crie um ambiente artificial favorável ao crescimento, para isso deve ser feito um balanceamento hormonal adequado (DORNELAS; VIEIRA, 1994). Acredita-se que no maracujazeiro a quantidade endógena de auxina seja suficiente para a diferenciação, pois mesmo na ausência de reguladores de crescimento há a formação de calo nos explantes (BIASI; RODRIGUEZ; MENDES, 1996). A adição de citocinina no meio de cultura serve para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese e promovendo a multiplicação das gemas.

A realização de estudos que visem desenvolver metodologias a serem aplicadas para experimentos *in vitro* podem permitir avanços no melhoramento genético e fornecer outras aplicações futuras. Mas o fator econômico pode vir a ser um entrave para esses experimentos, que geralmente tem custos elevados devido aos reagentes e reguladores de crescimento utilizados, o que pode constituir um problema para sua execução. Deste modo, definir o tamanho do experimento, ou seja, o tamanho das parcelas e das repetições utilizadas consiste num caminho racional para a experimentação *in vitro*.

Independente do ambiente em que se fará a experimentação, geralmente o objetivo é a redução do erro experimental. Em experimentos com biotecnologia, é de fundamental importância que os resultados apresentados na literatura sejam caracterizados pela consistência dos dados e pela repetibilidade dos protocolos experimentais. O estabelecimento de um tamanho ótimo de parcela é uma das maneiras de se aumentar a precisão experimental e, conseqüentemente, maximizar as informações obtidas em um experimento.

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. Se realizado em campo, a heterogeneidade do solo será um dos fatores mais prejudiciais a precisão experimental. Se realizado em laboratório ou ambiente controlado, subentende-se que os tratamentos estarão sendo influenciados de forma

homogênea pelas mesmas condições. Mas existem outros fatores que também influenciam a precisão experimental, dentre eles podemos citar os sistemas de condução e a variabilidade genética do material trabalhado.

O tamanho ideal da parcela depende da relação entre os custos fixos e os custos variáveis para a implantação do experimento, assim como das condições experimentais (HATHEWAY; WILLIAMS, 1958). Vários métodos são empregados para estimar o tamanho da parcela experimental, esses métodos estatísticos visam estimar o tamanho mais conveniente de parcela, a partir de ensaios que incluem efeitos de tratamentos ou ensaios de uniformidade, também conhecidos como ensaios em branco, nos quais toda a área experimental é plantada com uma única cultivar, utilizando-se práticas idênticas de cultivo, sem efeitos de tratamentos. A partir desses ensaios são calculados a variância e o coeficiente de variação para as diferentes dimensões de parcela avaliadas.

O tamanho ótimo de parcela assume grande importância, pois parcelas pequenas aumentam o número de repetições, enquanto que parcelas grandes apresentam menor variância e são estatisticamente mais desejáveis (DURNER, 1989).

Gomez e Gomes (1984) e Viana (1999) utilizaram os métodos da Inspeção visual da curvatura máxima, método empírico de Smith e método da curvatura máxima. O Método da Máxima Curvatura Modificado foi desenvolvido por Lessman e Atkins (1963), que estabeleceram uma função do tipo $y = aX^{-b}$, para explicar a relação entre coeficiente de variação (CV) e tamanho da parcela, permitindo que o ponto que corresponde ao tamanho ótimo da parcela fosse determinado algebricamente, dando maior precisão aos resultados obtidos. Este estudo objetivou a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de multiplicação *in vitro*

Este estudo objetivou a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de multiplicação *in vitro* de *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia* L.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, em Cruz das Almas, Bahia, utilizando como material vegetal

segmentos nodais retirados de microplantas de *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia* L. do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, cultivadas *in vitro* no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (MS padrão).

Esses explantes foram dispostos em tubos de ensaio® contendo 30 mL dos meios de cultura MS e MSM (MONTEIRO, 2000), suplementados com duas concentrações de BAP (0 e 3 mg.L⁻¹), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2 g L⁻¹ de phytigel®, ajustado a um pH de 5,8. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 µE m⁻²s⁻¹.

Foram conduzidos 4 ensaios de uniformidade para cada espécie, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com 50 repetições e 1 explante por tubo®, no esquema fatorial 2 × 2, dois meios (MS e MSM) e duas concentrações de BAP (0 e 3 mg.L⁻¹), perfazendo um total de 4 tratamentos por espécie.

Avaliou-se o comprimento das brotações em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas, brotações >1cm, brotações <1cm, calos, vitrificação, deficiência e contaminação.

As avaliações foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a incubação dos explantes em meio de cultura. Para os dados de coloração das folhas foi adotada uma escala de notas para quantificar a viabilidade dos explantes, essas notas variaram de 1 a 3, sendo que 1: folhas totalmente verdes; 2: folhas verde-claro; e 3: folhas senescentes.

Foram simulados 25 tamanhos de parcelas nos dois ensaios de uniformidade, em que cada planta foi considerada como uma unidade básica até 25 plantas por unidade básica, desta forma os tamanhos variaram de 1 a 25 plantas por parcelas, com número de parcelas variando de 50 a 2, respectivamente. Para as parcelas simuladas de diferentes formas com o mesmo tamanho, calcularam-se as médias dos coeficientes de variação (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho da parcela, forma da parcela e número de parcelas totais para os ensaios de uniformidade de plantas de maracujazeiro *in vitro*.

Simulações	Tamanho	Forma	Número de parcelas
1	1	1x1	50
2	2	2x1	25
3	2	1x2	20
4	3	3x1	15
5	3	1x3	10
6	3	2+1	10
7	3	1+2	10
8	4	2x2	10
9	5	2x2+1	5
10	6	2x3	5
11	6	3x2	6
12	7	2x3+1	5
13	7	3x2+1	3
14	8	2x4	5
15	8	4x2	4
16	10	2x5	5
17	10	5x2	4
18	12	3x4	3
19	12	4x3	2
20	15	3x5	3
21	15	5x3	2
22	16	4x4	2
23	20	4x5	2
24	20	5x4	2
25	25	5x5	2

O tamanho ótimo de parcela foi calculado pelo método da máxima curvatura modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963). Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X_0 = \exp\{[1/(2b+2)]\log[(ab)^2(2b+1)/(b+2)]\}$, em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER; LESSMAN, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento que possibilitou maior multiplicação dos explantes para a espécie *P. edulis* foi o do meio de cultura MSM enriquecido com 3 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 2). As avaliações mais tardias, principalmente aos 90 dias, também propiciaram melhores resultados, exceto para tamanho de brotações. Uma vez que foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, conforme mostra a Tabela 2, foram realizadas simulações para todos os tratamentos e variáveis.

Para a espécie *P. Laurifolia* os tratamentos que possibilitaram maior multiplicação dos explantes foram os do meio de cultura MS enriquecido com 3 mg L⁻¹ de BAP e do meio de cultura MSM sem adição de BAP (Tabela 3). Uma vez que foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, conforme mostra a Tabela 3, foram realizadas simulações para todos os tratamentos e variáveis.

Na Tabela 4 e 5 são apresentados os coeficientes de determinação (R^2) da função de curvatura e do valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0) para os ensaios de uniformidade para as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia*, nos 4 tratamentos estudados, respectivamente.

Para a espécie *P. edulis* os coeficientes de determinação variaram de 88% a 100% (Tabela 4), para a espécie *P. laurifolia* os coeficientes de determinação variaram de 71% a 99% (Tabela 5). O método da máxima curvatura modificado apresentou boa precisão para as duas espécies, com valores médios de R^2 variando de 85% a 100% entre variáveis para espécie *P.edulis* e 89% a 96% em *P. laurifolia*. Observa-se, que o tratamento 2 de modo geral apresentou em média maiores valores de R^2 quando comparados com os demais, na espécie *P. edulis*, Na espécie *P. laurifolia* o tratamento 2 apresentou em média maiores valores de R^2 para as variáveis numero de brotações maiores e menores que 1cm, número de folhas e tamanho da planta quando comparados com os demais, o que nos mostra que esses ensaios foram mais homogêneos.

Tabela 2. Valores médios em função dos tratamentos para as variáveis: comprimento das brotações em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas, brotações >1cm, brotações <1cm, calos, vitrificação, deficiência e contaminação, ao longo dos períodos de avaliação.

Variáveis	Avaliações	Tratamentos				Média
		T1: MS	T2: MS + 3mg de BAP	T3: MSM	T4: MSM + 3mg de BAP	
Comprimento das brotações (cm)	30	0,92 Cab	0,98 Bab	0,64 Cb	1,23 Ca	0,94 C
	60	2,81 Ba	1,93 Ab	1,67 Bb	3,07 Ba	2,38 B
	90	3,53 Aa	2,06 Ac	2,77 Ab	3,75 Aa	3,03 A
	Média	2,41 A	1,65 B	1,70 B	2,68 A	
Número de raízes	30	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00
	60	3,88 Bc	11,04 Ab	2,69 Bd	13,70 Ba	7,82 A
	90	4,57 Ac	11,02 Ab	3,12 Ad	14,22Aa	8,27 A
	Média	2,80 C	7,31 B	1,94 C	9,27 A	
Número de Folhas	30	0,54 Ca	0,00 Ab	0,00 Bb	0,00 Bb	0,14 B
	60	1,04 Ba	0,00 Ab	0,22 Bb	0,22 Bb	0,31B
	90	1,49 Aa	0,02 Ab	0,70 Ab	0,70 Ab	0,63 A
	Média	1,02 A	0,0067 C	0,31 B	0,31 B	0,36
Coloração das Folhas	30	0,00 Ba	-	-	0,00 Ba	0,00 C
	60	1,31 Aa	1,23 Aa	0,00 Bb	1,00 Aa	0,86 B
	90	1,17 Aa	1,23 Aa	1,06 Aa	1,00 Aa	1,12 A
	Média	0,77 B	1,23 A	0,42 D	0,62 C	
Brotações maiores que 1cm	30	0,86 Ab	0,74 Bb	0,28Bc	1,44 Aa	0,83 B
	60	0,82 Ab	1,58 Aa	0,61 ABb	1,72 Aa	0,86 B
	90	0,08 Bd	1,28 Ab	0,65 Ac	1,40 Aa	1,19 A
	Média	0,59 C	1,20 B	0,52 C	1,52 A	
Brotações menores que 1cm	30	0,28 Bb	2,82 Aa	0,32 Ab	2,64 Aa	1,52 A
	60	0,22 Bb	1,06 Ba	0,44 Ab	0,16 Cb	0,47 C
	90	1,00 Aa	0,54 Cb	0,38 Ab	1,26 Ba	0,79 B
	Média	0,50 B	1,47 A	0,39 B	1,35 A	
Calos	30	0,00 Ab	0,48 Aa	0,00 Ab	0,14 Aa	0,16 B
	60	0,00 Ab	0,66 Aa	0,00 Ab	0,12 Ab	0,20 AB
	90	0,02 Ab	0,64 Aa	0,04 Ab	0,24 Ab	0,24 A
	Média	0,01 C	0,59 A	0,01 C	0,17 B	
Vitrificação	30	0,16 Aa	0,20 Ba	0,00 Aa	0,16 Aa	0,13 B
	60	0,30 Aab	0,56 Aa	0,04 Ab	0,22 Ab	0,28 A
	90	0,16 Aab	0,36 ABa	0,00 Ab	0,10 Ab	0,15 B
	Média	0,21 B	0,37 A	0,01 C	0,16 B	
Deficiência	30	0,24 Aa	0,22 Aab	0,02Ab	0,14 Aab	0,16 A
	60	0,10 Aa	0,04 Aa	0,04Aa	0,00 Aa	0,04 B
	90	0,2 Aa	0,18 Aa	0,18Aa	0,14 Aa	0,19 A
	Média	0,20 A	0,15 AB	0,15 AB	0,09 B	
Contaminação	30	0,00 Aa	0,00 Aa	0,02 Aa	0,00 Aa	0,00A
	60	0,02 Aa	0,00 Aa	0,02 Aa	0,00 Aa	0,01 A
	90	0,02 Aa	0,00 Aa	0,02 Aa	0,02 Aa	0,01 A
	Média	0,01 A	0,00	0,02 A	0,01 A	

(-) não houve desenvolvimento

Letras minúsculas comparam nas colunas e maiúsculas nas linhas pelo teste Tukey (5%).

Tabela 3. Valores médios em função dos tratamentos para as variáveis: comprimento das brotações em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas, brotações >1cm, brotações <1cm, calos, vitrificação, deficiência e contaminação, ao longo dos períodos de avaliação.

Variáveis	Avaliações	Tratamentos				Média
		T1: MS	T2: MS + 3mg de BAP	T3: MSM	T4: MSM + 3mg de BAP	
Comprimento das brotações (cm)	30	0,89 Ba	1,03 Aa	1,23 Ba	0,87 Aa	1,01 C
	60	1,31 ABb	1,05 Ab	2,46 Aa	1,09 Ab	1,48 B
	90	1,61 Ab	1,05 Ac	2,82 Aa	1,13 Ac	1,64 A
	Média	1,26 B	1,04 C	2,17 A	1,03 C	
Número de raízes	30	0,00 Aa	0,00 Aa	0,18 Ba	0,00 Aa	0,05 B
	60	0,00 Aa	0,00 Aa	0,32 Ba	0,00 Aa	0,09 AB
	90	0,00 Ab	0,00 Ab	0,70 Aa	0,00 Ab	0,19 A
	Média	0,00 B	0,00 B	0,40 A	0,00 B	
Número de Folhas	30	0,00 Ba	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 B
	60	1,24 Ad	7,63 Ba	2,80 Bb	2,11 Ac	3,79 A
	90	1,24 Ad	7,97 Aa	3,82 Ab	2,13 Ac	4,17 A
	Média	0,82 C	5,13 A	2,20 B	1,37 B	
Coloração das Folhas	30	-	-	-	-	-
	60	1,00 Ab	1,35 Aa	0,75 Ab	1,07 Bab	0,99 B
	90	1,00 Ab	1,32 Ab	1,06 Ab	1,50 Aa	1,22 A
	Média	1,00 B	1,33 A	0,89 B	1,29 A	
Brotações maiores que 1cm	30	0,38 Aa	0,64 Aa	0,59 Aa	0,47 Aa	0,54 A
	60	0,32 Ac	0,83 Aa	0,77 Ab	0,52 Abc	0,65 A
	90	0,36 Ab	0,60 Aab	0,82 Aa	0,59 Aab	0,62 A
	Média	0,36 C	0,69 A	0,73 A	0,53 B	
Brotações menores que 1cm	30	0,62 Ab	1,22 Aa	0,45 Ab	0,96 Aab	0,85 A
	60	0,60 Ab	1,29 Aa	0,25 Ab	1,04 Aab	0,83 A
	90	0,52 Abc	1,58 Aa	0,34 Ac	0,85 Ab	0,88 A
	Média	0,58 C	1,36 A	0,35 D	0,95 B	
Calos	30	0,00 Aa	0,12 Aa	0,00 Aa	0,28 ABa	0,11 A
	60	0,00 Ac	0,33 Ab	0,00 Ac	0,48 Aa	0,23 A
	90	0,00 Ab	0,44 Aa	0,00 Ab	0,00 Bb	0,13 A
	Média	0,00 B	0,29 A	0,00 A	0,25 A	
Vitrificação	30	0,00 Aa	0,00 Aa	0,11 Aa	0,00 Aa	0,03 AB
	60	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 B
	90	0,00 Aa	0,19 Aa	0,07 Aa	0,00 Aa	0,07 A
	Média	0,00 B	0,06 A	0,06 A	0,00 B	
Deficiência	30	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 B
	60	0,00 Aa	0,06 Aa	0,14 Aa	0,13 Aa	0,09 A
	90	0,00 Aa	0,02 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa	0,01 B
	Média	0,00 A	0,03 A	0,05 A	0,04 A	
Contaminação	30	0,08 Aa	0,04 Aa	0,12 Aa	0,06 Aa	0,08 A
	60	0,08 Aa	0,04 Aa	0,12 Aa	0,08 Aa	0,08 A
	90	0,08 Aa	0,04 Aa	0,12 Aa	0,08 Aa	0,08 A
	Média	0,08 B	0,04 C	0,12 A	0,07 B	

(-) não houve desenvolvimento

Letras minúsculas comparam nas colunas e maiúsculas nas linhas pelo teste Tukey (5%).

Tabela 4. Coeficientes de determinação (R^2) e estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_{MC}) para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis* ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis: comprimento das brotações em cm (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF), brotações >1cm (B>), brotações <1cm (B<), calos(C), vitrificação (VT), deficiência (DF) e contaminação(CT).

Tratamento1 (MS)																						
Avaliações	CB		NR		NF		CF		B>		B<		C		VT		DF		CT		Média	
	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²
30	4,64	0,96	17,91	0,96	-	-	-	-	8,01	0,95	18,73	0,99	-	-	21,51	0,99	19,55	0,97	-	-	15,06	0,97
60	8,88	0,96	19,22	0,98	9,39	0,98	7,18	0,95	8,32	0,98	15,15	0,94	-	-	17,62	0,90	25,31	0,95	42,38	0,95	17,05	0,95
90	9,69	0,93	21,04	0,94	8,70	0,98	6,29	0,94	25,97	0,95	7,09	0,98	33,46	0,97	20,16	0,88	45,78	1,00	43,58	0,99	22,18	0,96
média	9,29	0,95	19,39	0,96	9,05	0,98	6,74	0,94	17,15	0,96	13,66	0,97	33,46	0,97	19,76	0,93	30,21	0,97	42,98	0,97	19,61	0,95
Tratamento 2 (MS + 3mg de BAP)																						
30	2,74	0,98	-	-	-	-	-	-	11,76	0,97	8,51	0,97	12,99	0,98	20,41	0,98	18,33	0,97	-	-	12,46	0,98
60	6,46	0,98	-	-	9,22	0,96	6,82	0,97	10,45	0,97	15,53	0,98	9,69	0,98	12,17	0,97	39,74	0,97	-	-	13,76	0,97
90	7,03	0,97	43,29	0,98	11,71	0,95	6,90	0,96	11,68	0,95	20,66	0,93	10,57	0,98	14,69	0,98	34,21	0,97	-	-	17,86	0,96
média	5,41	0,98	43,29	0,98	10,47	0,96	6,86	0,97	11,30	0,97	14,90	0,96	11,09	0,98	15,75	0,98	30,76	0,97	-	-	15,81	0,97
Tratamento 3 (MSM)																						
30	4,45	0,97	17,66	0,96	-	-	-	-	8,01	0,94	18,73	0,99	-	-	21,53	0,99	19,67	0,97	-	-	15,01	0,97
60	9,99	0,97	19,15	0,98	9,39	0,98	7,09	0,94	8,27	0,98	16,05	0,97	-	-	17,52	0,97	25,03	0,96	43,85	0,98	17,37	0,97
90	16,34	0,91	24,49	0,97	15,91	0,97	5,86	0,91	15,50	0,98	13,64	0,97	-	-	-	-	45,78	1,00	45,78	1,00	22,91	0,96
média	10,26	0,95	20,43	0,97	12,65	0,98	6,47	0,93	10,59	0,97	16,14	0,98	-	-	19,52	0,98	30,16	0,98	44,82	0,99	20,14	0,97
Tratamento 4 (MSM + 3mg de BAP)																						
30	4,42	0,98	17,66	0,96	-	-	-	-	8,12	0,95	19,22	0,96	-	-	21,51	0,99	19,55	0,97	-	-	15,08	0,97
60	9,62	0,98	18,70	0,92	9,40	0,99	6,75	0,95	8,33	0,98	16,20	0,96	-	-	17,52	0,97	25,20	0,96	42,79	0,99	17,17	0,97
90	13,21	0,92	23,98	0,98	16,91	0,96	20,54	0,98	12,06	0,96	13,10	0,88	24,73	0,97	22,11	0,99	46,14	1,00	-	-	21,42	0,96
média	9,08	0,96	20,11	0,95	13,16	0,97	13,64	0,97	9,51	0,96	16,17	0,93	24,73	0,97	20,38	0,98	30,30	0,97	42,79	0,99	19,29	0,96
Médias tratamentos																						
30	4,07	0,97	17,74	0,96	-	-	-	-	8,97	0,95	16,30	0,98	12,99	0,98	21,24	0,99	19,27	0,97	-	-	14,37	0,97
60	8,74	0,97	19,02	0,96	9,35	0,98	6,96	0,95	8,84	0,98	15,73	0,96	9,69	0,98	16,21	0,95	28,82	0,96	43,01	0,97	16,64	0,97
90	11,57	0,93	28,20	0,97	13,31	0,97	9,90	0,95	16,30	0,96	13,62	0,94	22,92	0,97	18,99	0,95	42,98	0,99	44,68	0,99	22,25	0,96
média	8,12	0,96	21,66	0,96	11,33	0,97	8,43	0,95	11,37	0,96	15,22	0,96	15,20	0,98	18,81	0,96	30,36	0,97	43,84	0,98	19,44	0,96

(-) não houve dados suficientes para análise.

Tabela 5. Coeficientes de determinação (R^2) e média das estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_0) para a espécie *P. laurifolia* L. ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis: comprimento das brotações em cm (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF), brotações >1cm (B>), brotações <1cm (B<), calos(C), vitrificação (VT), deficiência (DF) e contaminação(CT).

Tratamento1 (MS)																						
Avaliações	CB		NR		NF		CF		B>		B<		C		VT		DF		CT		Média	
	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	Tpar	R ²	R ²
30	6,96	0,99	-	-	-	-	-	-	20,06	0,73	8,88	0,82	-	-	-	-	-	-	28,57	0,91	16,12	0,86
60	9,01	0,99	-	-	14,39	0,78	-	-	19,88	0,74	9,78	0,90	-	-	-	-	-	-	27,88	0,93	16,19	0,87
90	11,41	0,93	-	-	33,55	0,81	-	-	24,58	0,71	13,83	0,85	-	-	-	-	28,09	0,94	6,72	0,92	19,70	0,86
média	10,21	0,96	-	-	23,97	0,80	-	-	22,23	0,73	10,83	0,86	-	-	-	-	28,09	0,94	21,06	0,92	17,33	0,86
Tratamento 2 (MS + BAP)																						
30	8,28	0,98	-	-	-	-	-	-	15,31	0,95	10,15	0,92	20,28	0,95	-	-	-	-	32,23	0,94	17,25	0,95
60	8,09	0,98	-	-	14,92	0,94	-	-	15,45	0,95	13,23	0,93	14,73	0,95	-	-	38,15	0,92	31,77	0,92	19,48	0,94
90	9,51	0,94	-	-	15,52	0,94	7,03	0,94	18,98	0,94	11,66	0,92	17,03	0,80	21,10	0,91	32,23	0,94	31,77	0,92	18,31	0,91
média	8,63	0,97	-	-	15,22	0,94	7,03	0,94	16,58	0,95	11,68	0,92	17,35	0,90	21,10	0,91	35,19	0,93	31,92	0,92	18,35	0,94
Tratamento 3 (MSM)																						
30	8,36	0,93	30,85	0,95	-	-	-	-	10,56	0,95	14,42	0,94	-	-	19,08	0,93	-	-	26,87	0,95	18,36	0,94
60	9,89	0,93	19,75	0,93	10,36	0,98	9,00	0,95	9,23	0,94	18,44	0,92	-	-	-	-	22,91	0,92	27,40	0,92	15,87	0,94
90	9,76	0,96	21,36	0,94	10,00	0,95	4,11	0,92	10,34	0,97	15,22	0,92	41,73	0,95	29,43	0,93	29,43	0,93	27,40	0,92	19,88	0,94
média	9,34	0,94	23,99	0,94	10,18	0,97	6,55	0,93	10,04	0,95	16,02	0,92	41,73	0,95	24,26	0,93	26,17	0,92	27,22	0,93	18,04	0,94
Tratamento 4 (MSM + BAP)																						
30	6,15	0,96	-	-	-	-	-	-	14,19	0,94	11,70	0,88	17,34	0,98	-	-	-	-	33,16	0,95	16,51	0,94
60	8,97	0,96	-	-	21,52	0,91	3,80	0,94	13,78	0,87	11,40	0,94	12,27	0,98	-	-	23,87	0,95	26,21	0,96	15,23	0,94
90	8,77	0,96	-	-	21,70	0,94	6,57	0,82	14,51	0,92	13,05	0,94	-	-	-	-	35,67	0,95	26,01	0,96	18,04	0,93
média	7,96	0,96	-	-	21,61	0,92	5,18	0,88	14,16	0,91	12,05	0,92	14,81	0,98	-	-	29,77	0,95	28,46	0,96	16,59	0,94
Média dos tratamentos																						
30	7,44	0,97	30,85	0,95	-	-	-	-	15,03	0,89	11,28	0,89	18,81	0,96	19,08	0,93	-	-	30,21	0,94	18,96	0,93
60	8,99	0,97	19,75	0,93	15,30	0,90	6,40	0,94	14,58	0,88	13,21	0,92	13,50	0,96	-	-	28,31	0,93	28,31	0,93	16,48	0,93
90	9,86	0,95	21,36	0,94	20,19	0,91	5,91	0,89	17,10	0,88	13,44	0,91	29,38	0,88	25,26	0,92	31,35	0,94	22,97	0,93	19,68	0,91
média	8,76	0,96	23,99	0,94	17,75	0,91	5,91	0,92	15,57	0,89	12,65	0,91	29,38	0,94	22,17	0,92	29,83	0,93	27,17	0,93	18,38	0,93

(-) não houve dados suficientes para análise.

Para a espécie *P. edulis*, a variável deficiência, avaliada aos 90 dias foi a que apresentou o maior tamanho de parcelas, 46,14 plantas, enquanto a variável altura do explante aos 30 dias apresentou o menor valor (2,74) (Tabela 4). Para a espécie *P. laurifolia* (Tabela 5) observa-se que a variável calo avaliada aos 90 dias foi a que apresentou o maior tamanho de parcelas, 41,73 plantas (Tratamento 3). E a variável altura do explante aos 60 dias, apresentou o menor valor, 3,80 (Tratamento 4).

Uma vez que para a multiplicação as variáveis mais importantes são números de brotações, comprimento das brotações e número de folhas. As variáveis deficiência, contaminação, número de raízes, calos e vitrificação não foram consideradas de suma importância, pois o que se busca nesse experimento são plantas com brotações para a multiplicação, com bom crescimento e bom números de folhas, o que acarretará maior número de gemas.

Considerando as variáveis mais importantes para multiplicação, os maiores valores obtidos na espécie *P. edulis* (Tabela 4) por tratamentos foram: 25,97 no tratamento 1 na variável brotações maiores que 1 cm, 20,66 no tratamento 2 na variável brotações menores que 1 cm, ambos aos 90 dias; e nos tratamentos 3 e 4, na variável brotações menores que 1 cm aos 30 dias de avaliação, com valores de 18,73 e 19,22, respectivamente.

Para a espécie *P. laurifolia* (Tabela 5) os maiores valores obtidos por tratamentos foram: 33,55 no tratamento 1 na variável número de folhas, 18,98 no tratamento 2 variável brotações maiores que 1 cm, ambos aos 90 dias; e nos tratamentos 3 e 4, na variável brotações menores que 1 cm aos 60 dias de avaliação e na variável número de folhas aos 90 dias, com valores de 18,44 e 21,70, respectivamente.

Os maiores valores de tamanho de parcela para a espécie *P. edulis* (Tabela 4) obtidos para cada variável foram: 25,97 para números de brotações maiores que 1 cm (tratamento 1 aos 90 dias de avaliação), 16,91 para número de folhas e 16,34 para altura da planta.

Para a espécie *P. laurifolia* os maiores valores de tamanho de parcela obtidos para as variáveis número de folhas, números de brotações maiores que 1 cm, brotações menores que 1 cm e altura da planta foram respectivamente, 33,55, 24,58, 13,83 e 11,41 no tratamento 1 aos 90 dias de avaliação. O menor tamanho de parcela

ocorreu no tratamento 4 aos 60 dias de avaliação (3,80) variável cor da folha, sendo que o maior valor aconteceu no tratamento 3, variável calos aos 90 dias de avaliação (41,73) (Tabela 5).

Todos os valores encontrados neste trabalho foram superiores aos de Dutra et al, (2003) trabalhando com micropropagação *in vitro* de crisântemo. Os autores verificaram que o tamanho ótimo de parcela experimental era constituído de dois tubos de ensaio e que números superiores a esse valor, tanto de tubos quanto de repetições, não alteravam a precisão experimental. No entanto, a utilização de pequeno número de unidades experimentais pode trazer insegurança às pesquisas, que são sujeitas a vários fatores não previsíveis e com isso ocorrer a perda de algumas informações e comprometer a qualidade de resultados.

Em função dos resultados obtidos, em experimentos com multiplicação *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis* é o de 26 plantas por parcela para tratamentos com meio MS sem adição de BAP, de 21 para tratamentos com meio MS e com a adição de BAP, de 19 para tratamentos com meio MSM sem adição de BAP e 20 para tratamentos com meio MSM e com a adição de BAP (Tabela 4). Para a espécie *P. laurifolia* L, o tamanho ótimo de parcela recomendado é o de 34 plantas por parcela para tratamentos com meio MS sem adição de BAP, de 19, para tratamentos com meio MS e com a adição de BAP, e para tratamentos com meio MSM sem adição de BAP, e, 22 para tratamentos com meio MSM e com a adição de BAP (Tabela 5).

O método da máxima curvatura modificado apresenta a vantagem de estabelecer uma equação de regressão com altos valores de coeficiente de determinação, como encontrado nesse trabalho, aumentando a confiabilidade das estimativas. Apresenta a desvantagem de não considerar os custos do experimento. Entretanto, dentro de certos limites, desde que os custos não sejam tão elevados, podem ser desprezados, com o intuito de se aumentar a precisão de um experimento.

CONCLUSÃO

De maneira geral, para experimentos de multiplicação *in vitro* de *P. edulis* Sims f. *edulis*, o tamanho ótimo de parcela deve ser de 26 plantas, considerando as variáveis avaliadas.

REFERÊNCIAS

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

CHAGAS, C.M. Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. ; VAZ, R.L. (Ed.). **A cultura de maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.175-186.

DELANOE, E. Étude de la résistance de passiflores de Guyane française vis-a-vis de fusarium pathogènes de la culture des fruits de la passion (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fruits**, Montpellier, v.46, n.5, p.593-600, 1991.

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

DURNER, E. F. OPS: computer program for estimating optimum plot size for field research. **Hortscience**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 1040, 1989.

DUTRA, L.F.; CIRILLO, M.A.; FRÁGUAS, C.B.; ARAUJO, A.G. de; PEREIRA, A.R.; SOARES, G.A.; PASQUAL, M.; FERREIRA, D.F.; RODRIGUES, V.A. Micropropagação de crisântemo: tamanho ótimo da parcela experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14, CONGRESSO BRASILEIRO

DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 170.

FARIAS, M. A. A. **Competição de populações de maracujá-amarelo selecionadas e introduzidas em Cruz das Almas-BA**. 2003, 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2003.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Pesquisa em maracujazeiro no Brasil**: reunião técnica. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1998. p. 48-53. (Documentos, 77).

FISCHER, I. H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasítica***. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

GOMEZ, K.A.; GOMEZ, A.A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2.ed. New York: Wiley, 1984. 680p.

HATHEWAY, W.H.; WILLIAMS, E.J. Efficient estimation of the relationship between plot size and the variability of crop yields. **Biometrics**, Washington, v.14, p.207-222, 1958.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**: produção agrícola municipal. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>. Acesso em: 22 de fev. 2008.

LESSMAN, K.J.; ATKINS, R.E. Comparisons of planning arrangements and estimates of optimum hill plot for grain sorghum yield tests. **Crop Science**, Madison, v.3, p.477-481, 1963.

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, p.648-650, 1971.

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

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D. A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, São Paulo, v.22, n. 1, p. 95-104. 1994.

MONTEIRO, A. C. B. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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

OLIVEIRA, J.C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá - Cultura**. Jaboticabal: FCAV, 1987. p. 218-246.

VIANA, A. E. S. **Estimativas do tamanho de parcelas e características do material de plantio em experimentos com mandioca** (*Manihot esculenta* Crantz). 1999. 123 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

CAPÍTULO 4

**TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS APLICADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE *PASSIFLORA GIBERTI* N. E. BROWN *IN VITRO*.¹**

TAMANHO ÓTIMO DE PARCELA PARA EXPERIMENTOS COM DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *PASSIFLORA GIBERTI* N. E. BROWN

Resumo – Este trabalho teve por objetivo a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de desenvolvimento *in vitro* de *Passiflora Giberti* N. E. Brown. Foi comparado o tratamento testemunha (MS) com o meio MS acrescido de quatro concentrações de nitrato de prata nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 g L⁻¹, perfazendo um total de 5 tratamentos, com 30 unidades básicas em cada um. Foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento das brotações, número de raízes, número e coloração das folhas, aos 30, 60 e 90 dias. Cada combinação de concentração de nitrato de prata com avaliação foi considerada como um ensaio de uniformidade. Foram simulados diversos tamanhos e formas de parcelas, em que cada planta foi considerada primeiramente como uma unidade básica (parcela) ate 15 plantas por unidade básica. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Para as espécies e variáveis estudadas, o tamanho de parcela ótimo deve ser de 12 plantas.

Termo para Indexação: Precisão experimental, erro experimental, coeficiente de variação, ensaio de uniformidade, *Passiflora sp.*

OPTIMAL SIZE OF PLOTS FOR EXPERIMENTS WITH *IN VITRO* DEVELOPMENT OF *P. GIBERTI* N. E. BROWN.

Abstract – The objective of this work was to determine the optimal size of plots of *P. giberti* N. E. Brown. with *in vitro* development experiments. Five uniformity essays with the species *P. giberti* N. E. Brown. were conducted. The control treatment (MS) was compared to the MS medium supplemented with four nitrate of silver concentrations 1, 2, 4 e 8 g L⁻¹), in a total of 5 treatments with 30 repetitions. The following variables were identifies shooting length, number of roots, leaves coloration and number, in 30, 60 and 90 days. Various sizes and plot forms, whereas 15 plant was considered as the basic unit, were simulated. For the estimation of the optimal size of plots, the method of

maximum modified curvature was employed. It can be concluded that for the specie and variables studied, the optimal plot size should be formed with 12 (twelve) plants.

Indexation term: Experimental precision, experimental error, variation coefficient, uniformity essay, *Passiflora Sp.*

INTRODUÇÃO

A realização de estudos que visem desenvolver metodologias a serem aplicadas para o desenvolvimento *in vitro* de maracujazeiro consiste num caminho racional a ser seguido na consolidação da cultura no âmbito nacional e mundial, por permitir avanços no melhoramento genético e outras aplicações futuras. As técnicas de cultura de tecidos vêm proporcionando maior disponibilidade de plantas de boa qualidade fitossanitária. Dentre essas técnicas, a clonagem *in vitro* de plantas, conhecida como micropropagação, é a forma mais rápida de multiplicar uma determinada planta, ou genótipo, que apresente características agrônômicas desejáveis.

O maracujazeiro produz uma alta taxa de etileno (LUDFORD, 1995), a produção em excesso desse regulador pode causar um acúmulo nos frascos de cultura acarretando diversos problemas no desenvolvimento das suas espécies como: dificuldade de regeneração dos explantes e morfogênese *in vitro* (ROUSTAN; LATCHÉ; FALLOT, 1992). A diminuição da taxa de regeneração pela presença de etileno no cultivo *in vitro* foi verificada em maracujazeiro por Faria e Segura (1997). A adição de compostos considerados inibidores do etileno, como nitrato de prata (ROUSTAN; LATCHÉ; FALLOT, 1992; TREVISAN; MENDES, 2005), têm sido realizada com o propósito de diminuir a taxa de etileno nos frascos de cultura.

Ao instalar um experimento, o pesquisador, basicamente, está preocupado em estimar com a maior precisão possível, o efeito dos tratamentos sobre o material a ser investigado. A precisão de um experimento está estreitamente relacionada ao erro experimental, uma medida da variação não controlada ou aleatória que ocorre entre

parcelas que receberam o mesmo tratamento, e representa o desempenho diferenciado daquelas parcelas (FISHER, 1960).

Para maximizar as informações obtidas num experimento reduzindo o erro decorrente da heterogeneidade das parcelas deve-se adequar o delineamento experimental, tamanho e forma da parcela e o número de repetições (STEEL; TORRIE; DICKEY, 1997), sendo de fundamental importância que se conheça o tamanho de unidade experimental capaz de possibilitar elevada precisão dos resultados (HENRIQUES NETO, 2003).

Storck (1979) faz uma revisão sobre os métodos para determinação do tamanho ótimo de parcelas, os vários métodos se baseiam na relação observada entre o tamanho da parcela e a variação residual, diferindo em diversos aspectos. Os métodos mais conhecidos são: método da Inspeção visual da curvatura máxima, método da curvatura máxima e método da máxima curvatura modificado.

Devido a falta de informações básicas nos experimentos com maracujazeiro, este estudo objetivou a determinação do tamanho ótimo de parcelas em experimentos de *P. Giberti* N. E. *Brown* desenvolvidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi instalado um experimento no laboratório de biotecnologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para este estudo foram utilizados os acessos caracterizados de *Passiflora giberti* N.E. Brown do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical** em Cruz das Almas-BA.

As sementes dessa espécie, oriundas de polinização controlada, foram levadas à casa de vegetação, semeadas para germinação em sacos de polietileno de 10 x 25 cm, utilizando a mistura terra e esterco de curral na proporção 3:1, tomando-se os devidos cuidados fitossanitários com a qualidade das sementes, preparo do substrato, semeadura e condução das mudas.

Através das plantas obtidas em casa de vegetação foram coletadas microestacas de maracujazeiro da espécie *Passiflora giberti* N. E. Brown, com aproximadamente 1 cm, sendo essas microestacas foram dispostos em tubos de ensaio® contendo 30 mL

do meio de cultura. Os tratamentos eram formados pelo meio MS suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, gelificados com 2 g L^{-1} de phytigel® e nitrato de prata nas concentrações de 0, 1, 2, 4 e 8 mg L^{-1} e, ajustado a um pH de 5,8. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons $22 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Foram realizadas avaliações aos 30, 60 e 90 dias após a incubação dos explantes em meio de cultura, sem subcultivos.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 30 unidades experimentais, com os tratamentos dispostos no esquema de parcelas divididas no tempo, sendo as concentrações de nitrato de prata alocadas nas parcelas e as avaliações nas subparcelas.

Avaliou-se o comprimento das brotações, em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas. Para esta última variável foi atribuída a seguinte escala de notas: 1- folhas totalmente verdes; 2- folhas verde claras e 3- folhas amareladas (início da senescência).

Cada combinação de concentração e avaliação foi considerado um ensaio de uniformidade. Em cada um destes, foram simulados 19 tamanhos de parcelas nos ensaios de uniformidade, em que cada planta foi considerada como uma unidade básica até 15 plantas por unidade básica, desta forma os tamanhos variaram de 1 a 15 plantas por parcelas, com número de parcelas variando de 30 a 2, respectivamente (Tabela 1). Para as parcelas simuladas de diferentes formas com o mesmo tamanho, calcularam-se as médias dos coeficientes de variação.

O tamanho ótimo de parcela foi calculado pelo método da máxima curvatura modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963). Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa na qual ocorre o ponto de máxima curvatura, utilizando-se da expressão dada por: $X_0 = \exp\{[1/(2b+2)]\log[(ab)^2(2b+1)/(b+2)]\}$, em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER; LESSMAN, 1971).

Tabela 1. Tamanho da parcela, forma da parcela e número de parcelas totais para os ensaios de uniformidade de plantas de *P. Giberti* N. E. Brown *in vitro*.

Simulações	Tamanho	Forma	Número de parcelas
1	1	1x1	30
2	2	2x1	15
3	2	1x2	12
4	3	3x1	10
5	3	1x3	6
6	3	2+1	6
7	3	1+2	6
8	4	2x2	6
9	5	2x2+1	3
10	6	2x3	3
11	6	3x2	4
12	7	2x3+1	3
13	7	3x2+1	2
14	8	2x4	3
15	8	4x2	2
16	10	2x5	3
17	10	5x2	2
18	12	3x4	2
19	15	3x5	2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos que possibilitaram melhor desenvolvimento dos explantes foram os dos meios de cultura enriquecidos com 1 mg L^{-1} ou 2 mg L^{-1} de nitrato de prata (Tabela 2). As avaliações mais tardias, principalmente aos 90 dias, também propiciaram maiores desenvolvimento dos explantes, exceto para coloração das folhas que não se detectou diferenças significativas entre as avaliações.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de determinação (R^2) da função de curvatura e os valores das estimativas do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0) para os ensaios de uniformidade (cada combinação das concentrações de nitrato de prata com as avaliações).

Em média os valores maiores tamanhos de parcela foram encontrados na variável numero de raízes (19,27) e os menores valores na variável coloração de folhas

(6,28) (Tabela 3). Este fato é esperado, pois a variável número de raízes, em geral, possui maior variabilidade do que a coloração das folhas.

Tabela 2. Valores médios para comprimento das brotações (cm), número de raízes, número de folhas e coloração de folhas de *Passiflora giberti* N. E. Brown. em função das concentrações de nitrato de prata (g L^{-1}) aos 30, 60 em 90 dias de cultivo.

Nitrato de prata	Avaliação (dias)			Média
	30	60	90	
Comprimento das brotações (cm)				
0	1,1367 Bc	1,3367 ABb	1,7167 Ac	1,3967 c
1	2,2667 Ca	4,4400 Ba	6,7767 Aa	4,4944 a
2	1,7138 Bb	2,0862 Ba	2,5138 Ab	2,1046 b
4	1,2400 Abc	1,3633 Ab	1,4267 Ac	1,3433 c
8	1,3241 Abc	1,4414 Ab	1,5276 Ac	1,4310 c
Média	1,5365 C	2,1385 B	2,8027 A	
Número de folhas				
0	0,4667 Ad	0,9000 Ad	1,2000 Ad	0,8556 c
1	6,0000 Ca	9,5000 Ba	13,7333 Aa	9,7444 a
2	5,7931 Ca	9,8966 Ba	10,8276 Ab	8,8391 a
4	2,2333 Bc	4,9667 Ac	4,9667 Ac	4,0556 b
8	2,9310 Bb	5,5172 Ab	5,3793 Ac	4,6092 b
Média	3,4730 C	6,1351 B	7,2095 A	
Número de raízes				
0	0,0000 Ab	0,0000 Ab	0,1667 Ab	0,0556 b
1	0,2333 Bb	0,8333 Aa	1,1000 Aa	0,7222 a
2	0,4483 Ba	1,0000 Aa	1,3448 Aa	0,9310 a
4	0,0000 Ab	0,0000 Ab	0,0000 Ab	0,0000 b
8	0,0000 Ab	0,0000 Ab	0,0345 Ab	0,0115 b
Média	0,1351 B	0,3649 A	0,5270 A	
Coloração das folhas				
0	1,6667 Aa	1,6667 Aa	1,8571 Aa	1,7368 a
1	1,4483 Aab	1,6897 Aa	1,6667 Aa	1,6023 a
2	1,1379 Ab	1,1379 Ab	1,1379 Ab	1,1379 c
4	1,0909 Ab	1,1250 Ab	1,1739 Ab	1,1304 c
8	1,4348 Aab	1,3333 Aab	1,2727 Aab	1,3485 b
Média	1,3028 A	1,3486 A	1,3604 A	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores mínimos e máximos para tamanho de parcela e mínimo para coeficiente de determinação foram encontrados no meio sem nitrato de prata (tratamento 1) (Tabela 3). Os menores valores foram encontrados na variável coloração das folhas aos 60 dias de avaliação (2,96 plantas/parcela e 52%) e os maiores valores foram obtidos na variável número de raízes 36,21 plantas/parcela. O maior valor de

coeficiente de determinação (97%) foi encontrado na variável número de raízes, na avaliação aos 90 dias.

O método da máxima curvatura modificado apresentou boa precisão de ajuste com valores médios de R^2 variando de 85 % a 92%.

Tabela 3 - Coeficientes de determinação (R^2) e estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_0) para a espécie *P. giberti* N. E. Brown. ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis: comprimento das brotações em cm (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF).

Tratamentos	Avaliação (dias)	CB		NR		NF		CF		Média	
		X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2	X_0	R^2
1 – MS + 0 mg de Nitrato de Prata	30	7,91	0,90	-	-	21,14	0,92	6,74	0,87	11,93	0,90
	60	12,25	0,95	-	-	22,84	0,91	2,96	0,52	12,68	0,79
	90	16,23	0,94	36,21	0,94	21,62	0,91	7,88	0,53	20,49	0,83
	Média	12,13	0,93	36,21	0,94	21,87	0,91	5,86	0,64	15,03	0,84
2 – MS + 1 mg de Nitrato de Prata	30	7,73	0,87	15,82	0,91	6,74	0,92	7,22	0,94	9,38	0,91
	60	11,42	0,87	19,80	0,93	8,93	0,87	5,28	0,92	11,36	0,90
	90	11,66	0,87	20,04	0,90	7,96	0,83	6,29	0,95	11,49	0,89
	Média	10,27	0,87	18,55	0,91	7,88	0,87	6,26	0,94	10,74	0,90
3 – MS + 2 mg de Nitrato de Prata	30	6,39	0,90	14,27	0,83	6,75	0,87	6,37	0,86	8,45	0,88
	60	7,78	0,92	8,26	0,85	8,90	0,90	5,69	0,91	7,66	0,91
	90	8,65	0,90	19,11	0,91	9,98	0,97	5,42	0,91	10,79	0,92
	Média	7,61	0,91	13,88	0,86	8,55	0,91	5,83	0,89	8,97	0,90
4 – MS + 4 mg de Nitrato de Prata	30	4,22	0,96	23,88	0,97	10,63	0,96	5,02	0,93	10,94	0,96
	60	5,28	0,91	8,26	0,87	9,65	0,93	6,35	0,92	7,39	0,91
	90	5,62	0,92	8,26	0,87	9,62	0,91	6,80	0,86	7,58	0,89
	Média	5,04	0,93	13,47	0,91	9,97	0,93	6,06	0,90	8,63	0,92
5 – MS + 8 mg de Nitrato de Prata	30	6,65	0,93	24,05	0,92	10,33	0,90	5,72	0,94	11,69	0,92
	60	5,96	0,94	8,26	0,87	11,59	0,85	8,26	0,87	8,52	0,88
	90	5,60	0,95	35,85	0,94	12,45	0,92	8,26	0,87	15,54	0,92
	Média	6,07	0,94	22,72	0,91	11,46	0,89	7,42	0,90	11,92	0,91
Média dos tratamentos	30	6,58	0,91	15,60	0,73	11,12	0,91	6,21	0,91	10,48	0,91
	60	8,54	0,92	8,92	0,70	12,38	0,89	5,71	0,83	9,52	0,88
	90	9,55	0,92	23,89	0,91	12,33	0,91	6,93	0,82	13,18	0,89
	Média	8,22	0,92	16,14	0,78	11,94	0,90	6,28	0,85	11,06	0,89
Média geral		8,22	0,92	19,27	0,90	11,94	0,90	6,28	0,85	11,06	0,89

(-) não houve dados suficientes para análise.

Para o comprimento das brotações, nota-se que ao longo dos períodos de avaliação houve um aumento no tamanho de parcela calculado, com exceção no

tratamento 5 (8 mg de nitrato de prata) que ocorreu um decréscimo ao longo desse período.

O tratamento 4 (4 mg de nitrato de prata) apresentou, em média, o menor valor de tamanho de parcela (8,63 explantes/parcela) e o tratamento 1 (sem nitrato de prata) apresentou o maior valor (15,03 explantes/parcela) (Tabela 3).

Dutra et al. (2003) trabalhando com micropropagação *in vitro* de crisântemo, verificaram que o tamanho ótimo de parcela experimental era constituído dois tubos de ensaio e que números superiores a esse valor, tanto de tubos quanto de repetições, não alteram a precisão experimental. No entanto, a utilização de pequeno número de unidades experimentais pode trazer insegurança às pesquisas, que são sujeitas a interferência de vários fatores não previsíveis e com isso ocorrer a perda de algumas informações e comprometer a qualidade de resultados.

Com relação ao método da máxima curvatura modificado utilizado, este apresenta a vantagem de estabelecer uma relação entre coeficiente de variação e tamanho da parcela, sendo esta descrita por uma equação de regressão de fácil interpretação, a qual propicia ajustes com altos valores de coeficiente de determinação, como os encontrados nesse trabalho, aumentando a confiabilidade das estimativas. Entretanto apresenta a desvantagem de não considerar os custos do experimento, o que dentro de certos limites, desde que estes custos não sejam tão elevados, podem ser desprezados, o que não irá afetar a precisão do experimento.

CONCLUSÃO

Levando-se em consideração que o número de raízes não é uma variável de grande importância no desenvolvimento *in vitro* e tomando-se como base as outras variáveis, de maneira geral, para experimentos que visam o desenvolvimento *in vitro* de Passiflora, o tamanho ótimo de parcela deve ser de 12 plantas ou explantes por parcela, considerando-se a espécie estudada e as variáveis importantes avaliadas.

REFERÊNCIAS

DUTRA, L.F.; CIRILLO, M.A.; FRÁGUAS, C.B.; ARAUJO, A.G. de; PEREIRA, A.R.; SOARES, G.A.; PASQUAL, M.; FERREIRA, D.F.; RODRIGUES, V.A. Micropropagação de crisântemo: tamanho ótimo da parcela experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14, CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 170.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.

FISHER, R. A. **The design of experiments**. 7.ed. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1960. 248p.

HENRIQUES NETO, D. **Estimativas de tamanho e forma de parcelas experimentais para avaliação do rendimento de grãos em trigo**. 2003. 138 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

LESSMAN, K.J.; ATKINS, R.E. Comparisons of planning arrangements and estimates of optimum hill plot for grain sorghum yield tests. **Crop Science**, Madison, v.3, p.477-481, 1963.

LUDFORD, P.M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer, Academic Publishers, 1995. p. 725-750.

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, p.648-650, 1971.

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

ROUSTAN, J.P., LATCHÉ, A., FALLOT, J. Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.140, p.485–488, 1992.

STEEL, R.G.D.; J.H. TORRIE; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3.ed. Boston: WCB/McGraw-Hill, 1997. 666p.

STORCK, L. **Estimativa para tamanho e forma de parcelas e número de repetições para experimentos com milho (*Zea mays* L.)**. 1979. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of passionfruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) *in vitro* organogenesis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 346-350, 2005.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura sobre estimativa de tamanho e forma de parcela envolvendo diferentes culturas e métodos, no Brasil e no mundo, é bastante significativa, contemplando um grande número de pesquisas realizadas. Mas, para o cultivo *in vitro* não foram encontrados resultados de pesquisas nacionais nem internacionais a esse respeito.

Aliado a isso, as espécies de maracujá apresentam comportamento diferenciado no cultivo *in vitro* assim como no campo, e as estimativas de tamanho de parcela podem variar com espécie, cultivar, porte da planta, local, idade, característica avaliada, número de plantas utilizadas na unidade básica. De acordo com Bake (1988) mesmo fixando determinada espécie vegetal, podem ocorrer variações no tamanho e forma ótimos da parcela.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que para experimentos *in vitro* com a espécie *P. giberti*, o tamanho ótimo de parcelas recomendado é o de 15 frascos com um explante para experimentos de estabelecimento, 10 frascos com um explante por parcela para experimentos de conservação e 13 frascos com um explante para experimentos de desenvolvimento. Para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, o tamanho ótimo de parcelas recomendado é o de 11 frascos com um explante para experimentos de estabelecimento e 26 frascos com um explante para experimentos de multiplicação. Para a espécie *P. laurifolia* L., o tamanho ótimo de parcela deve ser de 9 frascos com um explante para experimentos de estabelecimento e 34 frascos com um explante para experimentos de multiplicação, considerando as variáveis avaliadas em todos os experimentos. Portanto, os resultados alcançados poderão servir de subsídio para experimentos com a cultura de maracujazeiro *in vitro* sob as diferentes condições.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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, SP, 1988.

APÊNDICE

APÊNDICE 1. Exemplo de simulação dos resultados obtidos da variável número de folhas de *Passiflora giberti* aos 30 dias no meio MS (Valores obtidos em cada tamanho e forma de parcela)

n	tamanho	forma	média	variância	CV
89	1	1x1	1,91	4,33	108,97
48	2	2x1	1,81	2,85	93,48
50	2	1x2	1,79	2,60	90,13
30	3	3x1	1,70	2,06	84,51
30	3	1x3	1,88	1,76	70,62
25	3	2+1	1,89	2,51	83,62
25	3	1+2	1,71	2,34	89,56
25	4	2x2	1,79	1,76	74,06
15	5	2x2+1	2,26	2,33	67,64
15	6	2x3	2,09	2,25	71,85
15	6	3x2	1,84	1,35	62,90
10	7	2x3+1	2,01	0,77	43,79
9	7	3x2+1	2,22	2,11	65,38
10	8	2x4	2,06	0,68	40,04
10	8	4x2	1,86	0,59	41,38
10	10	2x5	1,87	0,64	42,75
10	10	5x2	1,86	0,62	42,28
6	12	3x4	2,10	0,46	32,26
6	12	4x3	2,21	0,94	43,99
6	15	3x5	1,91	0,21	24,10
6	15	5x3	2,11	0,32	26,90
4	16	4x4	2,21	0,42	29,24
3	18	3x6	1,94	0,10	16,61
3	18	6x3	2,31	0,73	36,98
4	20	4x5	1,91	0,28	27,84
4	20	5x4	2,09	0,27	24,98
4	25	5x5	1,88	0,15	20,61
2	30	5x6	1,98	0,13	18,20
2	30	6x5	1,97	0,06	12,14
2	50	5x10	1,91	0,02	6,58
2	50	10x5	1,88	0,13	19,44

APÊNDICE 2. Exemplo de simulação dos resultados obtidos da variável número de folhas de *Passiflora giberti* aos 30 dias no meio MS (Valores médios obtidos para cada tamanho de parcela)

tamanho	CV
1	108,97
2	91,80
3	82,08
4	74,06
5	67,64
6	67,38
7	54,58
8	40,71
10	42,51
12	38,13
15	25,50
16	29,24
18	26,80
20	26,41
25	20,61
30	15,17
50	13,01

APÊNDICE 3. Figura do exemplo de simulação dos resultados obtidos da variável número de folhas de *Passiflora giberti* aos 30 dias no meio MS (Valores médios obtidos para cada tamanho de parcela)

