

MEIO DE CULTURA E TIPO DE EXPLANTE NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE MARACUJAZEIRO ⁽¹⁾

GLÁUCIA AMORIM FARIA ⁽²⁾; MARIA ANGÉLICA PEREIRA DE CARVALHO COSTA ^(3*);
CARLOS ALBERTO DA SILVA LEDO ⁽⁴⁾; TATIANA GÓES JUNGHANS ⁽⁴⁾;
ANTÔNIO DA SILVA SOUZA ⁽⁴⁾; MARIO AUGUSTO PINTO DA CUNHA ⁽⁴⁾

RESUMO

O Brasil é um dos principais centros de dispersão da variabilidade genética do gênero *Passiflora*. Sua auto-incompatibilidade aliada à incidência de doenças do sistema radicular e da parte aérea, desmatamentos e monocultivos promovem perda de material genético. Tendo-se em vista o risco de erosão genética, torna-se necessário a conservação da variabilidade em bancos de germoplasma, de grande interesse no melhoramento de plantas. Estudos em relação ao tipo de explante e concentração dos meios de cultivo são necessários para se determinar protocolo de estabelecimento e conservação *in vitro* de germoplasma de maracujá. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da concentração dos sais e nutrientes do meio MS e tipos de explantes no estabelecimento e crescimento das espécies de maracujazeiro *Passiflora giberti* N. E. Brown, *P. edulis* Sims e *P. laurifolia* L. Em cada espécie de *Passiflora* havia características próprias quanto ao desenvolvimento *in vitro*. O meio de cultura MS completo e os segmentos nodais que continham a segunda gema axilar tiveram melhores resultados em relação às demais.

Palavras-chave: *Passiflora* spp., posição da gema, micropropagação.

ABSTRACT

CULTURE MEDIUM AND TYPE OF EXPLANT IN THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF PASSION FRUIT SPECIES

Brazil is one of the main centers of genetic variability dispersion of the *Passiflora* genera. Its self incompatibility as well as disease incidence in its leaves and root system and, deforestation and monocultivation, promote loss of genetic material. Considering the risk of genetic erosion, the conservation of the variability in germplasm banks, which is of great interest in plant breeding, is necessary. Studies regarding the type of explant and concentration of the culture media are necessary in order to determine protocols of establishment and *in vitro* conservation of passion-fruit germplasm. The objective of the present work was to evaluate the influence of the salt and nutrient concentration in the MS culture medium and types of explants in the establishment and growth of the Passion fruit species: *Passiflora giberti* N. E. Brown, *P. edulis* Sims and *P. laurifolia* L. Each *Passiflora* species presented its own characteristics regarding *in vitro* development. The complete MS medium and nodal segments the second axillary bud promoted better development of the genotypes studied.

Key words: *Passiflora* spp., bud position, micropropagation.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 16 de novembro de 2005 e aceito em 23 de abril de 2007.

⁽²⁾ Faculdade de Ciência e Tecnologia Albert Einstein, Cruz das Almas (BA). Doutoranda em Agronomia da FEIS/UNESP, Av. Brasil, 56, 15385-000. Ilha Solteira (SP). E-mail: glauciaamorim@yahoo.com.br

⁽³⁾ Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais da UFRB, 44380-000, Cruz das Almas (BA). E-mail: mapcosta@ufba.br

(*) Autora correspondente.

⁽⁴⁾ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 44380-000, Cruz das Almas (BA). E-mail: ledoc@cnpmf.embrapa.br, tatiana@cnpmf.embrapa.br, assouza@cnpmf.embrapa.br, maugusto@cnpmf.embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional. A evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) possibilitou ao Brasil se destacar como maior produtor mundial. Entretanto, a produtividade nacional ainda é baixa, cerca de 14 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (IBGE, 2006), devido a problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência do uso de cultivares superiores.

A adoção de híbridos hortícolas resistentes e tolerantes a moléstias, bem como o uso de porta-enxertos resistentes podem solucionar os problemas de produção. As espécies *P. laurifolia* L., *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. giberti* N. E. Brown podem ser promissoras para futuros trabalhos de melhoramento, quer pela criação de híbridos, quer por meio da utilização como porta-enxertos de maracujá-amarelo.

Apesar de grande potencial morfo genético das espécies de *Passiflora*, até o momento, resultados concretos em termos de eficiência de protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro* não foram obtidos para a maioria das espécies. Alguns fatores têm contribuído para isso, dentre eles a variação da resposta entre genótipos, principalmente quando são utilizadas espécies selvagens, não cultivadas, que possuem grande variabilidade genética.

Uma vez que as diversas espécies de maracujazeiro respondem diferentemente a estímulos visando à indução da morfogênese, para o planejamento de experimentos que visem à conservação *in vitro* de germoplasma deve-se conhecer a via de regeneração (organogênese ou embriogênese somática), a região do explante que responde ao estímulo e a presença ou ausência de calo.

A organogênese *in vitro* pode ser definida como o processo pelo qual células e tecidos vegetais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo ou radicular, cujo sistema vascular está freqüentemente conectado com o tecido de origem. Pode ocorrer diretamente a partir de células do explante original ou, indiretamente, via formação de calos. Na embriogênese são obtidos embriões somáticos, caracterizados como estruturas bipolares não conectadas ao explante pela vascularização (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*. Alguns autores relatam o cultivo *in vitro* de espécies de maracujá, utilizando como explantes segmentos

nodais e internodais (KANTHARAJAH e DODD, 1990; DREW, 1991; FARIA e SEGURA 1997); gemas apicais (SCORZA e JANICK, 1980; DREW, 1991; FARIA e SEGURA, 1997; JUNGHANS et al., 2002), protoplastos (DORNELAS, 1995; OTONI et al., 1996); primórdios de brotos (KAWATA et al., 1995) e discos foliares (MONTEIRO-HARA, 2000).

A grande maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Passiflora* foi realizada com *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* com ênfase à indução e multiplicação de gemas através de segmentos nodais, internodais e discos foliares (MONTEIRO-HARA, 2000). Recentemente, segundo TAKAHASHI (2002), a organogênese tem sido relatada para as espécies *P. amethystina*, *P. giberti* N. E. Brown, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. molissima*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. suberosa*.

A micropropagação em Passifloraceae tem sido descrita por MORAN ROBLES (1978), KANTHARAJAH e DODD (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*. Inclusive FREITAS (1997) considera que a micropropagação oferece uma boa alternativa para essa cultura, pois podem ser produzidos, em grande escala, clones selecionados de variedades com interesse comercial, a exemplo das espécies citadas anteriormente.

Em geral, o tipo de explante mais utilizado na micropropagação do maracujazeiro são os segmentos nodais (KANTHARAJAH e DODD, 1990; DREW, 1991; KAWATA et al., 1995; FARIA e SEGURA 1997) e ápices caulinares (FARIA e SEGURA, 1997; JUNGHANS et al., 2002). A grande vantagem desse tipo de explante é que por envolver órgãos meristemáticos pré-formados, propicia 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 pode ser utilizada 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. Essa característica, apesar de desejável para trabalhos de melhoramento, é extremamente prejudicial quando da conservação e multiplicação clonal, pois a estabilidade genética deve ser mantida.

DORNELAS e VIEIRA (1994) foram os primeiros a descreverem a regeneração de plantas em espécies de *Passiflora* por meio da organogênese direta, utilizando como explante cotilédone, hipocótilo e segmento foliar.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de meios de cultura e tipos de explantes

no estabelecimento e crescimento das espécies de maracujazeiro *Passiflora giberti* N. E. Brown, *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia* L.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em laboratório no período de fevereiro a julho de 2003. Para este estudo foram utilizados os acessos caracterizados de *Passiflora giberti* N.E. Brown, *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. laurifolia* L. do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em Cruz das Almas (BA).

As sementes dessas espécies, 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 manejo das mudas.

Ainda em casa de vegetação, após os 60 dias de plantio, as plantas foram cortadas após a quarta gema axilar em relação ao ápice e levadas ao laboratório de cultura de tecidos onde foram desinfestadas com etanol 70% por 40 segundos e solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,2% por 15 minutos, e, em seguida, lavadas com água destilada esterilizada por quatro vezes.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizadas microestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo a gema apical ou gemas axilares. Os explantes foram cultivados em magentasã com 30 mL do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e com a metade das concentrações dos sais minerais e vitaminas, MS e ½MS, respectivamente, suplementados com 30 gL⁻¹ de sacarose e 2 gL⁻¹ de phytigelâ, ajustado a um pH de 5,8, autoclavado a 121 °C (1 kg m⁻²) e sem adição de regulador de crescimento. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 mE m⁻² s⁻¹.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições, no esquema fatorial 3 × 2 × 4, três espécies (*P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L.), duas concentrações de sais do meio de cultura (MS e ½ MS) e quatro tipos de explantes em função das posições das gemas (gema apical, 1.^a gema axilar, 2.^a gema axilar e 3.^a gema axilar), perfazendo um total de 24 tratamentos. A parcela experimental foi representada por uma magentaã contendo um explante. As avaliações foram realizadas aos 45, 75 e 105 dias após a incubação dos explantes em meio de cultura, sem subcultivos.

Avaliaram-se 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). Os dados foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado no esquema de parcela subdividida no tempo. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A variável - comprimento das brotações - foi transformada para $\ln(x + 10)$ e as variáveis - número de folhas e coloração da folha - foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$ visando ao atendimento das pressuposições da análise de variância. As análises foram realizadas utilizando o programa SAS - Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio de observações visuais, verificou-se a conversão dos explantes em microplantas, independentemente da espécie e da concentração do meio de cultura. Em nenhum dos tratamentos foi observada a oxidação dos explantes.

Houve 100% de contaminação bacteriana endofítica dos explantes com a 4.^a gema axilar; razão pela qual este tratamento não foi computado nas análises estatísticas (Figura 1). De modo geral, o grau de contaminação foi crescente à medida que a posição da gema se distanciava do ápice. As maiores contaminações foram detectadas nos segmentos nodais que continham a 2.^a e 3.^a gemas axilares respectivamente. A menor percentagem de contaminação dos explantes excisados das posições mais próximas da gema apical pode ser explicada, provavelmente, devido a presença de conexões plasmodesmáticas em dimensões diminutas nestas células e o ritmo ativo de divisões celulares nesta região, promovendo baixa concentração de bactérias nestas células (TORRES et al., 1998).

Os resultados revelam considerável variação no comprimento das brotações, número de raízes, bem como no número e coloração das folhas. Diferenças significativas foram observadas entre espécies, concentração do meio de cultura, tipo de explante e período de avaliação. Para coloração das folhas todas as fontes de variação foram significantes (P ≤ 0,05). As variáveis: comprimento das brotações, número de raízes e coloração da folha tiveram CV de 2,38%, 26,21% e 10,09% respectivamente. Para o número de folhas foi obtido alto valor do C.V., 124,43%, devido à discrepância entre as observações de um mesmo tratamento, característica inerente à variável em estudo (Tabela 1).

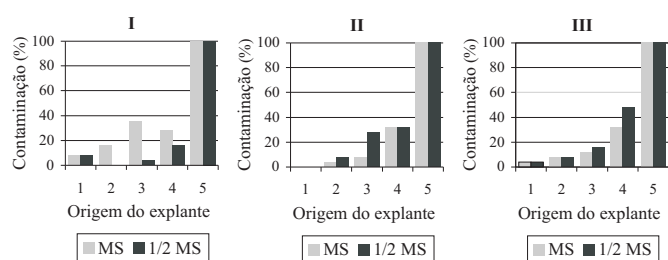


Figura 1. Porcentagem de contaminação das espécies *P. edulis Sims f. edulis* (I), *P. giberti N. E. Brown* (II) e *P. laurifolia L.* (III) em função da origem do explante e da concentração de sais do meio de cultura. 1 - gema apical; 2 - 1.^a gema axilar; 3 - 2.^a gema axilar; 4 - 3.^a gema axilar e 5 - 4.^a gema axilar.

Observa-se um comportamento diferenciado entre os genótipos estudados com relação ao comprimento das brotações. O valor mais elevado para comprimento das brotações (2,45cm) foi verificado para espécie *P. giberti N. E. Brown*, diferindo significativamente do *P. edulis Sims f. edulis* e *P. laurifolia L.* Considerando as concentrações do meio de cultura, o MS completo sustentou o maior desenvolvimento das brotações, exceto para a espécie *Passiflora edulis Sims f. edulis* em que não foi verificada diferença significativa em relação às duas concentrações de sais do meio (Tabela 2). Portanto os

resultados revelaram que o comportamento *in vitro* foi diferenciado entre as espécies. Resultados semelhantes foram relatados por GUZZO et al. (2004), ao verificarem que embriões de *P. apetala*, *P. candida*, *P. coriacea*, *P. subrotunda*, *P. mayarum* e *P. morifolia* germinaram em meio MS e não houve nenhum sinal de desenvolvimento no meio de cultura B5. ISUTSA (2004), avaliando o estabelecimento e desenvolvimento de *P. edulis f. flavicarpa* e *P. edulis Sims f. edulis* em meio de cultura MS verificou que *P. edulis f. flavicarpa* conseguiu melhor desenvolvimento, enraizamento e maior grau de sobrevivência no processo de micropropagação.

O suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura é essencial para sistemas de cultivo *in vitro*, variando conforme a espécie vegetal e o processo de cultivo (MONTEIRO-HARA, 2000). O meio MS é utilizado com sucesso na regeneração de microplantas para a maioria das espécies. KANTHARAJAH e DODD (1990) e KAWATA et al. (1995) obtiveram melhores respostas para desenvolvimento e multiplicação de gemas caulinares da espécie *P. edulis Sims f. edulis* em meio MS suplementado com 0,23 mg L⁻¹ de BAP e 0,20 mg L⁻¹ de AIB. FARIA e SEGURA (1997) regeneraram e enraizaram com sucesso microplantas, a partir de gemas axilares da espécie *P. edulis f. flavicarpa* em meio MS na ausência de reguladores de crescimento.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para comprimento das brotações (CB), em cm, número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração da folha (CF), das espécies *P. edulis Sims f. edulis*, *P. giberti N. E. Brown* e *P. laurifolia L.*

FV	GL	Quadrado médio			
		CB ⁽²⁾	NR	NF ⁽³⁾	CF ⁽³⁾
Espécie (E)	2	0,0649**	0,4977*	9,3973ns	1,6882**
Meio (M)	1	0,2672**	0,6590*	306,7872**	1,3754**
Tipo do explante (TE)	3	0,0200**	0,5095*	16,2339*	0,2457*
E x M	2	0,0442**	0,9537**	8,6975ns	0,4766**
E x TE	6	0,0396**	0,0651ns	15,2359**	0,2199*
M x TE	3	0,0305**	0,1561ns	13,7554*	0,2933*
E x M x TE	6	0,0114*	0,1035ns	5,4045ns	0,2206*
Erro a	490 (284) ⁽¹⁾	0,0043	0,1585	4,3903	0,0779
Avaliação (A)	2	0,0997**	1,3115**	23,0254**	0,3356**
E x A	4	0,0026**	0,4662**	18,7690**	0,2953**
M x A	2	0,0136**	0,2323**	0,5658ns	0,1455**
TE x A	6	0,0005ns	0,0790ns	2,0969ns	0,1858**
E x M x A	4	0,0024**	0,2044**	13,5108**	0,2347**
E x TE x A	12	0,0008ns	0,0692ns	1,3548ns	0,2312**
M x TE x A	6	0,0008ns	0,0643ns	2,3615ns	0,3391**
E x M x TE x A	12	0,0010ns	0,0488ns	2,5324ns	0,2548**
Erro b	940 (267) ⁽¹⁾	0,0007	0,0445	1,826	0,0213**
CV (%)		2,38	26,21	124,43	10,09

** e *: significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste de F respectivamente. ns: não significativo. ⁽¹⁾relativo à variável CF. ⁽²⁾transformado para ln(x + 10). ⁽³⁾transformado para raiz(x + 0,5).

Tabela 2. Valores médios para o comprimento das brotações, 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 (cm)				
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	-

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.

Verificou-se melhor desenvolvimento do sistema radicular quando os explantes da espécie *P. laurifolia* L. foram cultivados em meio MS. Reduzindo-se a concentração dos sais do MS no meio de cultura, a espécie *P. edulis* f. *edulis* foi mais eficiente no processo da rizogênese, enquanto em *P. giberti* N. E. Brown houve um enraizamento similar para ambos os meios testados (Tabela 2). Esses dados reforçam a influência das espécies nas respostas *in vitro*, uma vez que cada espécie possui características únicas, determinadas por fatores genéticos, e portanto as condições para seu cultivo *in vitro* são diferenciadas.

Os valores médios para a coloração das folhas em função dos meios de cultura e das espécies (Tabela 2), revelam que apenas para *P. edulis* Sims f. *edulis* o meio não proporcionou diferença significativa. Para as demais espécies, o meio MS completo proporcionou melhor aspecto das microplantas. No meio MS completo a espécie *P. laurifolia* L. foi a que obteve valor mais próximo de 1, significando que nesse meio foi observado maior número de folhas verdes. Para o meio ½ MS, todas as espécies diferiram estatisticamente, sendo *P. laurifolia* L. a que obteve maior número de folhas verdes seguido por *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. giberti* N. E. Brown.

Além do meio de cultura, o tipo de explante também é um fator importante a ser considerado no estabelecimento do cultivo *in vitro*. Verificou-se que, para *P. edulis* Sims f. *edulis*, os segmentos nodais que continham a 2.^a e 3.^a gemas axilares tiveram maior comprimento das brotações (Tabela 3). Quanto à *P.*

giberti N. E. Brown os segmentos nodais que continham a gema apical, 1.^a e 2.^a gemas axilares não diferiram estatisticamente entre si, porém os segmentos nodais que continham a gema apical e a 1.^a gema axilar foram superiores às demais posições. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os tipos de explantes no crescimento das brotações para a espécie *P. laurifolia* L. Essas diferentes respostas possivelmente estão relacionadas com o nível endógeno dos diferentes reguladores de crescimento. A auxina, por exemplo, é um tipo de regulador vegetal produzido principalmente nos tecidos vegetais de órgãos aéreos, regiões apicais e transportada de célula a célula e chegam as raízes provavelmente através do floema (CASTRO e VIEIRA, 2001), formando, portanto, um gradiente de concentração ao longo do caule.

O número de folhas expandidas ao longo do período de cultivo e a coloração definem a qualidade das microplantas, podendo ser indicativos na escolha do tipo de meio e explante mais adequado para o estabelecimento *in vitro*. Na tabela 3, observa-se que o tipo de explante não influenciou o número de folhas para a espécie *P. laurifolia* L. ($P \leq 0,05$). Na espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, nos segmentos nodais que continham a 2.^a e 3.^a gemas axilares, apesar de não diferirem significativamente dos segmentos nodais que continham a 1.^a gema axilar, verificou-se número de folhas superior aos que continham a gema apical. Na espécie *P. giberti* N. E. Brown os segmentos nodais que continham a 1.^a gema axilar foram superiores aos demais.

Tabela 3. Valores médios para o comprimento das brotações, número de folhas e coloração das folhas, em função dos tipos de explantes para as espécies. *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L.

Posição	Espécie			Média
	<i>P. edulis</i>	<i>P. giberti</i>	<i>P. laurifolia</i>	
Comprimento das brotações (cm)				
Gema apical	1,1601 cC	2,5510aA	1,6771 aB	1,8150 b
1. ^a gema axilar	1,7522 bcB	2,6014 aA	1,8598 aB	2,0797 ab
2. ^a gema axilar	2,6392 aA	2,5463 abA	1,6937 aB	2,2839 a
3. ^a gema axilar	2,3543 abA	1,9495 bAB	1,2768 aB	1,9221 ab
Média	1,9376 B	2,4451 A	1,6633 C	-
Número de folhas				
Gema apical	0,6449 bA	0,9530 abA	1,1143 aA	0,9063 b
1. ^a gema axilar	1,0074 abA	1,4184 aA	1,5152 aA	1,3130 a
2. ^a gema axilar	1,4000 aA	0,9421 abA	1,2143 aA	1,1853 ab
3. ^a gema axilar	1,3217 aA	0,4158 bB	0,9383 aAB	0,9091 b
Média	1,0727 A	0,9727 A	1,2213 A	-
Coloração das folhas				
Gema apical	1,8772 aA	2,0233 aA	1,0758 bB	1,5964 b
1. ^a gema axilar	1,7692 aA	1,9200 aA	1,1250 bB	1,5615 b
2. ^a gema axilar	1,9041 aA	1,9615 aA	1,1290 bB	1,6149 b
3. ^a gema axilar	2,0746 aA	1,7778 aA	2,0000 aA	2,0283 a
Média	1,9084 A	1,9531 A	1,2261 B	-

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.

De acordo com a tabela 3, apenas na espécie *P. laurifolia* L. foi observada diferença estatística ($P \leq 0,05$), sendo os segmentos nodais que continham a gema apical, 1.^a e 2.^a gemas axilares foram superiores aos que continham a 3.^a gema axilar, com maior número de folhas verdes. Somente nos segmentos nodais que continham 3.^a gema axilar não houve diferença estatística entre as espécies. Nas outras posições de gemas, a espécie *P. laurifolia* L. obteve valores mais próximos de 1, o que significa maior número de folhas verdes.

Quanto à influência do meio de cultura no desenvolvimento dos explantes, em função dos tipos de explantes e dos meios de cultura, verifica-se que o maior comprimento das brotações foi obtido no meio MS, exceto para a gema apical. Dentre os explantes responsivos nesse meio os segmentos nodais que continham a 1.^a e 2.^a gemas axilares destacaram-se em relação aos demais, diferentemente do observado para o meio ½ MS, onde não se observou diferença, independentemente da natureza do explante (Tabela 4).

Os valores médios para o número de folhas mostrados na tabela 4 mostram que para o meio ½ MS

não houve diferença em relação à posição da gema. Para o meio MS os segmentos nodais que continham a 1.^a e 2.^a gemas axilares foram estatisticamente superiores ($P \leq 0,05$) aos demais.

Quanto aos valores médios para a coloração das folhas (Tabela 4), pode-se notar que o meio ½ MS foi o único com diferença em relação à coloração de folhas ocasionada pelo tipo de explante; os segmentos nodais que continham a gema apical, 1.^a e 2.^a gemas axilares foram estatisticamente superiores aos que continham a 3.^a gema axilar, com valores mais próximos de 1, ocasionando maior número de folhas verdes. Só houve diferença significativa entre os meios para os segmentos nodais que continham a gema apical e 3.^a gema axilar. Em ambas, no meio MS completo foi observado maior número de folhas verdes.

No que se refere às diferentes épocas de avaliação, 45, 75 e 105 dias, verificou-se um comportamento crescente para o comprimento das brotações e número de raízes (Tabela 5). Dentro de cada época de avaliação a espécie *P. giberti* N. E. Brown obteve maior comprimento de brotações, exceto

aos 75 dias em que se comportou semelhantemente a *P. edulis* Sims f. *edulis*. As espécies *P. laurifolia* L. e *P. edulis* Sims f. *edulis* obtiveram melhor resposta para o processo da rizogênese.

Com relação à qualidade da parte aérea, observou-se apenas na espécie *P. giberti* N. E. Brown decréscimo no número de folhas ao longo do período de avaliação (Tabela 5). Outro aspecto observado foi o incremento de folhas senescentes a partir da segunda avaliação. Resultados semelhantes foram obtidos por JUNGHANS et al. (2002) e GONÇALVES et al. (2003), também trabalhando com microplantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Em cultura de tecidos, a produção em excesso de etileno pode levar ao acúmulo do regulador nos frascos de cultura, dificultando o desenvolvimento dos explantes e a morfogênese *in vitro*, resultando na senescência das folhas (TREVISAN, 2005). O maracujazeiro é uma espécie que produz alta taxa de etileno (LUDFORD, 1995) e sua presença refletiu na taxa

de regeneração *in vitro* do maracujazeiro amarelo (FARIA e SEGURA, 1997).

Independentemente do meio, verificou-se comportamento crescente para comprimento das brotações e número de raízes ao longo do período de avaliação (Tabela 6). Para comprimento das brotações o meio MS apresentou valores estatisticamente superiores. Para número de raízes foi observada superioridade do meio MS apenas na avaliação aos 150 dias. O meio MS completo foi o que proporcionou valores mais próximos de 1, com folhas com coloração verde mais intenso, diferindo estatisticamente do meio com a metade de concentração de sais, independente da época de avaliação. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por JUNGHANS et al. (2002) que, trabalhando com microplantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* comprovaram também que a maior percentagem de folhas verdes ocorreu no meio MS completo.

Tabela 4. Valores médios para o comprimento das brotações, número de folhas e coloração das folhas, em função dos tipos de explantes e meios de cultura para as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L.

Posição	Meio		Média
	MS	½ MS	
Comprimento das brotações (cm)			
Gema apical	1,9169 cA	1,7136 aA	1,8150 b
1. ^a gema axilar	2,6034 abA	1,5585 aB	2,0797 ab
2. ^a gema axilar	2,9858 aA	1,5859 aB	2,2839 a
3. ^a gema axilar	2,2119 bcA	1,6150 aB	1,9221 ab
Média	2,4243 A	1,6205 B	-
Número de folhas			
Gema apical	1,2347 bA	0,5794 aB	0,9063 b
1. ^a gema axilar	1,8922 aA	0,7366 aA	1,3130 a
2. ^a gema axilar	1,8525 aA	0,5217 aB	1,1853 ab
3. ^a gema axilar	1,1579 bA	0,6483 aB	0,9091 b
Média	1,5479 A	0,6217 B	-
Coloração das folhas			
Gema apical	1,4752 aB	1,7846 bA	1,5964 b
1. ^a gema axilar	1,5128 aA	1,6429 bA	1,5615 b
2. ^a gema axilar	1,5283 aA	1,7818 bA	1,6149 b
3. ^a gema axilar	1,6102 aB	2,5532 aA	2,0283 a
Média	1,5222 B	1,8945 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.

Tabela 5. Valores médios para o comprimento das brotações, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas, em função das espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L. e das épocas de avaliação

Espécie	Avaliação (dias)			Média
	45	75	105	
Comprimento das brotações (cm)				
<i>P. edulis</i>	1,3684 bC	2,1206 aB	2,3296 bA	1,9376 b
<i>P. giberti</i>	1,9191 aC	2,4942 aB	2,9395 aA	2,4451 a
<i>P. laurifolia</i>	1,3114 bC	1,6345 bB	2,0478 cA	1,6633 c
Média	1,5402 C	2,0892 B	2,4465 A	-
Número de raízes				
<i>P. edulis</i>	0,0760 aB	0,2353 abA	0,3491 bA	0,2196 ab
<i>P. giberti</i>	0,1676 aA	0,1395 bA	0,1916 cA	0,1660 b
<i>P. laurifolia</i>	0,0503 aC	0,3072 aB	0,6433 aA	0,3320 a
Média	0,0994 C	0,2264 B	0,3895 A	-
Número de folhas				
<i>P. edulis</i>	0,5614 bB	1,2544 aA	1,4083 aA	1,0727 a
<i>P. giberti</i>	1,1214 aA	0,9942 aAB	0,7964 bB	0,9727 a
<i>P. laurifolia</i>	0,8344 abC	1,1758 aB	1,6561 aA	1,2213 a
Média	0,8403 B	1,1403 A	1,2799 A	-
Coloração das folhas				
<i>P. edulis</i>	1,7500 aB	1,9583 aA	1,9608 aA	1,9084 a
<i>P. giberti</i>	1,7037 aB	2,0000 aA	2,0488 aA	1,9531 a
<i>P. laurifolia</i>	1,2963 bA	1,2716 bA	1,0882 bA	1,2261 b
Média	1,5291 B	1,7342 A	1,6967 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.

Tabela 6. Valores médios para o comprimento das brotações, em cm, número de raízes e coloração das folhas em função dos meios de cultura e das épocas de avaliações

Meio	Avaliação (dias)			Média
	45	75	105	
Comprimento das brotações				
MS	1,7462 aC	2,5294 aB	3,0016 aA	2,4243 a
½ MS	1,3343 bC	1,6541 bB	1,8799 bA	1,6205 b
Média	1,5402 C	2,0892 B	2,4465 A	-
Número de raízes				
MS	0,1032 bC	0,2688 aB	0,4980 aA	0,2891 a
½ MS	0,0956 aB	0,1843 aAB	0,2787 bA	0,1853 b
Média	0,0994 C	0,2264 B	0,3895 A	-
Coloração das folhas				
MS	1,3365 bB	1,5948 bA	1,5873 bA	1,5222 b
½ MS	1,8235 aB	1,9881 aA	1,8588 aA	1,8945 a
Média	1,5291 B	1,7342 A	1,6967 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.

4. CONCLUSÃO

Nas condições em que o trabalho foi executado, o meio de cultura MS completo e a utilização de segmentos nodais contendo a segunda gema axilar propiciaram o melhor desenvolvimento *in vitro* para as espécies estudadas.

REFERÊNCIAS

- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba - RS: Agropecuária, 2001. 132 p.
- DORNELAS, M. C. **Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp.** Piracicaba, 1995. 182 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 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, feb. 1994.
- 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, jul. 1991.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.
- FREITAS, I.M.N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Atas de Horticultura**. Vilamoura, v.18, p.103-106, 1997.
- 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. **Melhoramento e Qualidade de Vida**, Porto Seguro. 2003. (CD-ROM)
- 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.
- 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.; ANDRETTA, F.; LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.1, p. 108-113, jan/fev. 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Banco de Dados Agregados: produção agrícola municipal**. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>. Acesso em: julho de 2006.
- ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n.3, p. 395-400, fev. 2004.
- 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. XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura: **Os Novos Desafios da Fruticultura Brasileira**, Belém. 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, mar. 1990.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 281-284, 1995.
- 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.
- MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000, 82p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MORAN ROBLES, M. J. Multiplication vegetative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, n.10, p. 693-699, 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.
- OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 43, p. 157-164, 1996.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. v. 8.0. Vol. I. Cary NC: SAS Institute, Inc., 2000.
- SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Dordrecht, v. 105, p. 892-897, 1980.
- TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 127p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- TREVISAN, F. **Transformação genética do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos**. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 64p.