

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

VICTOR HUGO GRAÇA SILVA

**2,4-D NA REGENERAÇÃO DE *Passiflora edulis Sims. f. Flavicarpa Deg* À
PARTIR DE MERISTEMA APICAL**

**Uberlândia
AGOSTO - 2017**

VICTOR HUGO GRAÇA SILVA

**2,4-D NA REGENERAÇÃO DE *Passiflora edulis Sims. f. Flavicarpa Deg* À
PARTIR DE MERISTEMA APICAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Agronomia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção de grau de
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadora: Dra. Eliane Ribeiro Cardoso

**UBERLÂNDIA
AGOSTO - 2017**

VICTOR HUGO GRAÇA SILVA

**2,4-D NA REGENERAÇÃO DE *Passiflora edulis Sims. f. Flavicarpa Deg* À
PARTIR DE MERISTEMA APICAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Agronomia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção de grau de
Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora no dia 1 de Agosto de 2017

Dra. Simone Abreu Asmar
Membro da banca

Dra. Eliane Ribeiro Cardoso
Co-orientadora

Prof. Dr. José Magno Queiros Luz
Orientador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, José Rafael e Valéria de Fátima, pelo imenso apoio mesmo nas horas mais difíceis.

Aos dois, meu eterno amor.

Gostaria de agradecer ao meu professor e orientador José Magno Queiroz Luz por todo auxílio e conhecimento dados a mim, e também pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Gostaria de agradecer a Eliane Ribeiro Cardoso pela contribuição e disposição nesse trabalho.

Gostaria de agradecer ao Viveiro Flora Brasil pelo apoio e cooperação.

E também agradecer à todas pessoas que me ajudaram direta e indiretamente durante o curso.

Sem todos vocês nada disso teria acontecido.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de maracujá. Essa fruteira é de grande importância para o país gerando capital e empregos devido a demanda de mão-de-obra. A cultura apresenta problemas com viroses que ocasionam o endurecimento dos frutos, gerando perda de qualidade e produtividade. Neste contexto, com a justificativa de se obter futuramente um protocolo de limpeza clonal e de produção em larga escala de mudas sadias futuramente, o objetivo desta pesquisa foi testar o efeito do 2,4-D na regeneração do meristema apical de plantas adultas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa, Deg*) em meio de cultura. Os ápices caulinares foram desinfestados e excisados a um comprimento de 2 mm e os meristemas foram regenerados em meio cultura de Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0.0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.2, 2.4, 3.0, 3.6, e 4.2 mL L⁻¹) e uma dose fixa de BAP de 1.0 mg L⁻¹ em todos os tratamentos. Os frascos contendo os meristemas foram incubados no escuro por 60 dias. As culturas foram então subcultivadas em meio MS para diferenciação. Foi feita a repicagem a cada duas semanas ou conforme a necessidade. A regeneração do tecido desenvolvido foi muito lenta devido ao tamanho reduzido do meristema. Avaliou-se dois diâmetros - D1 e D2 - e a massa fresca (MF). Verificou-se que houve diferenças significativas entre as dosagens para as variáveis analisadas. Como no teste de regressão os modelos não se ajustaram às médias observadas, foi realizado o teste de Scott-Knott (5%). Concluiu-se, que os diâmetros são maiores nas doses de 0.0 mL L⁻¹ e 1.8 mL L⁻¹ da solução de 2,4-D. Para a massa fresca as doses que geraram maiores pesos foram as de 0.0, 2.2, 2.4, 1.2 e 4.2 mL L⁻¹ que se mostraram estatisticamente iguais. Sendo assim, não é recomendado o uso de 2,4-D para a regeneração pois a testemunha apresentou resultados iguais e melhores em relação a presença do fitorregulador. Porém há necessidade de mais estudos em relação ao uso do 2,4-D na regeneração *in vitro* de maracujá, devido à poucas informações sobre o mesmo.

Palavras-chave: 2,4-D, micropropagação, maracujá.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of passion fruit. This fruit is of great importance for the country generating capital and jobs due to demand for labour. The culture presents problems with viruses that causes the woodiness effect in the fruit, leading to loss of quality and productivity. In this context, with the justification of obtaining a clonal cleaning protocol and a large-scale production of healthy seedlings in the future, the objective of this research was to test the effect of 2,4-D on regeneration of the apical meristem of adult plants of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa Sims, Deg*) in the culture medium. The shoot Apex were excised and desinfested to a length of 2 mm and the meristem cells were regenerated in culture Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (0.0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.2, 2.4, 3.0, 3.6 and 4.2 mL L⁻¹) and a fixed dose of 1.0 mg L⁻¹ BAP in all treatments. The vials containing the meristem cells were incubated in the dark for 45 days. The cultures were then sub cultivated in MS for differentiation. The repricing was done every two weeks or as needed. Tissue regeneration development was very slow due to the small size of the meristem. Two diameters were evaluated - D1 and D2 - and the fresh mass (MF). It was found that there were significant differences between the means scores of dosages for the analyzed variables. In the Regression test, no models adjusted to the means observed, so the Scott-Knott test (5%) was used. It was concluded that the diameters are higher in doses of 0 mL L⁻¹ and 1.8 mL L⁻¹ of solution 2,4-D. For the fresh mass the doses that generated higher weights were those of 0.0, 2.2, 2.4, 1.2 and 4.2 mL L⁻¹ showed statistically equal. Therefore, it is not recommended the use of 2,4-D for regeneration because the witness showed results similar and better than when there is presence of phyto regulator. However there is a need for further studies in relation to the use of 2,4-D on *in vitro* regeneration of passion fruit, due to little information about it.

Keywords: 2,4-D, Micropropagation, passion fruit.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1.	MARACUJAZEIRO.....	11
2.2.	CULTURA DE TECIDOS	13
2.2.1.	CULTURA DE TECIDO EM MARACUJAZEIRO	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1.	MATERIAL VEGETAL	16
3.2.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.	CONCLUSÃO.....	22
6.	PROJEÇÕES FUTURAS.....	22
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de determinação (R^2) linear, quadrático e cúbico para as variáveis D1, D2 e MF obtidos pelo teste de regressão.....	20
Tabela 2. Análise estatística do crescimento dos explantes no final do experimento - diâmetro 1 (D1) em cm, diâmetro 2 (D2) em cm e massa fresca (MF) em g.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Médias observadas na avaliação do diâmetro 1 (D1) em cm em relação às doses utilizadas.....	19
Figura 2. Médias observadas na avaliação do diâmetro 2 (D2) em cm em relação às doses utilizadas.....	19
Figura 3. Médias observadas na avaliação da massa fresca (MF) em g em relação às doses utilizadas.....	20

1. INTRODUÇÃO

O maracujá-amarelo, *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa, Deg.*, é uma fruteira tropical nativa, e o seu cultivo teve alta ascensão no país, desde seu início na década de 70, quando o Brasil nem era tido com um dos principais produtores, até os dias de hoje, como o maior produtor. Entretanto, esse vertiginoso crescimento não teve o acompanhamento de pesquisas que sustentassem tecnicamente a cultura (SILVA, 2000). A cultura demonstrou expressão econômica à partir de 1986, com aumento considerável na área cultivada e na produção, o que levou à profissionalização da atividade (RIZZI et al., 1998).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá produzindo 694.539 mil toneladas por ano, em uma área de 51.187 mil hectares e com uma produção nacional média de 13,662 toneladas por hectare (IBGE, 2015). O maracujazeiro-azedo representa cerca de 97% da área cultivada no Brasil (FERRAZ & LOTT, 2006), sendo que 60% desta produção é destinada ao consumo *in natura* e o restante destinado a industrialização (MELETTI, 2011). A fruta é rica em vitamina C, cálcio e fósforo (FERRARI, 2004), além de possuir valor medicinal, em função de suas propriedades terapêuticas e farmacológicas, como a maracujina, a passiflorine e a calmofilase que são especialidades farmacêuticas de amplo uso como sedativos e antiespasmódicos (MEDEIROS et al., 2009). Sendo assim, o maracujazeiro apresenta importância econômica com sua participação no mercado de hortifruti devido suas características físico químicas e fármaco terapêutico (CAVICHOLI et al., 2008), como também pela elevada produtividade e aceitação do suco pelos consumidores, sem descartar o mercado internacional (SOUZA et al., 2002).

A propagação do maracujazeiro pode ser sexuada, por meio de sementes, ou assexuada, pela utilização da estaquia, enxertia e cultura de tecidos (WAGNER JUNIOR et al., 2006).

Comercialmente, a propagação do maracujazeiro é feita, na grande maioria, por sementes, pela simplicidade e rapidez, como também, por ser mais econômica, todavia ela não garante a manutenção das características da planta mãe, tendo uma grande variabilidade. Ainda assim, a obtenção de mudas vigorosas e com alta qualidade através dessas sementes depende de características genéticas e qualidade/sanidade das mesmas.

Observa-se que as técnicas de cultura *in vitro* oferecem uma boa alternativa nesses casos, devido a possibilidade de produzir, em grande escala, clones selecionados de variedades com interesse comercial (FREITAS, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo testar o efeito do 2,4-D na regeneração do meristema apical de plantas adultas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa, Deg*) em meio de cultura, visando a produção *in vitro* de mudas comerciais e de plantas matrizes utilizadas para produção de sementes, ambas livres de agente fitopatogênicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MARACUJAZEIRO

O maracujá pertence à família Passifloraceae, da ordem Passiflorales, do gênero *Passiflora*, atingindo 580 espécies, que estão distribuídas nos trópicos, nas Américas, Ásia e África, sendo que, entre essas, 150 são nativas do Brasil, onde 60 são aproveitadas de alguma maneira (OLIVEIRA, 1987; TEIXEIRA, 1994). Mesmo com toda essa variedade, 97 % dos cultivos comerciais são da espécie *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa, Deg.* (maracujá-amarelo ou azedo) e *Passiflora edulis Sims* (maracujá-roxo). O maracujá-amarelo é mais cultivado no Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Austrália, Hawai e nas Ilhas Fiji, enquanto que a produção do maracujá-roxo está mais presente na Austrália, no Sri Lanka, na Índia, na Nova Zelândia e na África do Sul (SILVA, 2002).

Na década de 90, grupos multidisciplinares de pesquisa, em diferentes centros nacionais, lançaram as primeiras cultivares de maracujá, focados, inicialmente, apenas no aumento da produtividade da cultura, para suprir os altos custos de produção. Até o ano 2000, a maioria dos novos pomares era implantada com sementes de frutos selecionados pelos próprios produtores, sendo essas, obtidas de plantios anteriores ou de frutos do mercado atacadista (MELETTI, 2011). À partir de 2000, houve várias pesquisas voltadas, não somente a maior produção, como também, para a obtenção de cultivares resistentes à doenças e pragas com a utilização de novas tecnologias, multiplicidade de métodos e, mais recentemente, com a adoção de ferramentas

importantes para o melhoramento genético, como a biotecnologia. Um exemplo de pesquisa que utiliza métodos biotecnológicos, ainda em curso, é da transformação genética de plantas de maracujá-amarelo com a finalidade de obter cultivares resistentes ao vírus de endurecimento do fruto, causado pelos vírus Passionfruit Woodiness Virus (PWV) e Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus (CABMV) (FALEIRO et al., 2005; MONTEIRO-HARA et al., 2011).

Em relação às características fisiológicas do maracujazeiro amarelo, a *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa, Deg.*, nota-se que se trata de uma planta perene, de crescimento contínuo, podendo atingir de cinco a dez metros de comprimento. O sistema radicular é do tipo pivotante, pouco profundo, com maior parte de suas raízes concentradas na profundidade de 30 e 45 cm, com um raio de 60 cm a partir do tronco (URASHIMA, 1985, KLIEMANN et al., 1986; SOUSA, 2000). O caule é lenhoso na base e herbáceo no ápice (MELETTI & MAIA, 1999). Do caule brotam as gemas vegetativas, cada uma gerando uma folha e uma gavinha. A filotaxia é de folhas alternadas, que quando jovens a maioria delas têm forma ovalada. Quando atingem a fase adulta podem ser trilobadas ou não, com diferentes formas e tamanhos. As flores formadas nas axilas das folhas são hermafroditas, geralmente com cinco estames e três estigmas, e exigem mais que 11 horas de luz para florescer (CEREDA, 1973; MARTINS, 1998). Elas se abrem depois do meio-dia e permanecem abertas por um período de aproximadamente 4 a 5 horas. Cada axila de cada folha gera uma gema vegetativa e apenas uma flor que uma vez fechada não se abre mais. A primeira flor ocorre numa posição comparada ao 24º ou 25º nó após o aparecimento da primeira gavinha, e nos ramos laterais são observadas do 4º ao 7º nó contado à partir da base (KAVATTI, 1998). O fruto se trata de uma baga de forma oval, que geralmente possui o eixo horizontal menor que o vertical. A casca é coberta por uma camada delgada de cera que protege o mesocarpo duro e escamoso (MARTINS, 1998). No interior da casca encontram-se 100 a 150 sacos embrionários que contém o suco e as sementes (TSUBOI, 1990). As características físico-químicas e químicas dos frutos variam de acordo com a variedade, com o estágio de maturação e as condições edafoclimáticas do local (SILVA, 2002).

2.2. CULTURA DE TECIDOS

Cultura de tecidos vegetal é a ciência que estuda o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob meio artificial (GEORGE, 1993). Além de ser uma ferramenta que pite a clonagem de plantas em escala comercial, como também contribui na concretização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Tendo como resultado plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente. De modo geral, a cultura de tecidos tem como base a teoria da totipotência, em que uma única célula é capaz de se regenerar até se tornar um organismo inteiro, idêntico à matriz doadora (ALVES et al., 2008).

Segundo Cutler et al. (2009) a cultura de meristemas é o estabelecimento do domo meristemático apical. A brotação apical tipicamente cresce, originando um único broto. As células dos meristemas são parênquima não diferenciado em estado que é ideal para que aconteça a divisão celular. É dito também que assim que os meristemas são retirados da planta os mesmos devem ser inseridos em meio nutritivo, pois sua organização formal parece se romper. Há necessidade de que todos os estágios do processo sejam feitos de maneira asséptica para evitar a introdução de patógenos.

De acordo com Carvalho et. Al. (2006), O primeiro hormônio visto em plantas foi a auxina que se trata de um agente químico que regula o desenvolvimento vegetal de nós, raízes adventícias e formação de calo. As auxinas de maior utilização no *cultivo in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA). As citocininas são de uso básico e utilizadas corriqueiramente nos métodos de cultura de tecidos e são extremamente importantes para a biotecnologia. As citocininas participam na regulação de muitos processos do vegetal induzindo a divisão celular em calos na presença de auxina, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros (TAIZ & ZEIGER, 2004, apud, CARVALHO et. al. 2006)

Segundo Souza e Abreu (2007) a utilização do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), no meio de cultura como auxina sintética, auxilia na formação de calos e na formação de embriões somáticos.

Para Xu e Bewley (1992), auxinas em geral, mas principalmente o 2,4-D são extremamente importantes na indução da calogênese e células embriogênicas e na posterior remoção da auxina do meio de cultura.

Grattapaglia e Machado (1990) expuseram a indução da calogênese em meio com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos.

2.2.1. CULTURA DE TECIDO EM MARACUJAZEIRO

De acordo com Passos e Bernacci (2005), vários estudos têm sido realizados em diferentes aspectos da cultura *in vitro* de maracujá, incluindo: o desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento de plantas *in vitro*; clonagem; organogênese *in vitro* e cultura de células em suspensão, com o objetivo de dar sustentação para que outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética, possam ser aplicadas com sucesso. O estabelecimento de plantas de maracujá *in vitro* pode ser realizado utilizando explantes vegetativos, como ápices meristemáticos de caule, segmentos nodais, utilizando-se de gemas preexistentes no explante. Esse procedimento é vantajoso para se estabelecer plantas *in vitro*, visto que permite a escolha de genótipos superiores.

Biricolti e Chiari (1994) descrevem que utilizaram segmentos nodais em seus trabalhos com *Passiflora edulis f. edulis*, pois os ápices meristemáticos eram muito fracos para a esterilização.

Nakayama (1966), em um dos mais antigos trabalhos sobre cultivo *in vitro* de *Passiflora*, descreve o estabelecimento de *Passiflora caerulea L.* com brotos e relata as dificuldades de se trabalhar com explantes mais velhos, devido à contaminações dos mesmo, uma vez que eles acumulavam microrganismos endofíticos que inevitavelmente se desenvolviam no meio de cultura.

No caso de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, o primeiro trabalho relatado sobre a multiplicação vegetativa de gemas axilares para essa espécie foi feito por Moran Robles (1979), que constatou a necessidade de duas fases para o estabelecimento da cultura, a primeira fase com a presença de cinetina e a segunda contendo AIA.

A regeneração de gemas é esperada com apenas a adição de citocinina ao meio de cultura (SCORZA & JANICK, 1976). Para Moran Robles (1979), isso ocorre, pois, a quantidade endógena de auxina no explante já é suficiente para estabelecerem equilíbrio necessário a diferenciação. Tal hipótese é reforçada por Dornelas e Vieira (1994), já que ao adicionarem 1 mg L⁻¹ de ANA havia inibição da regeneração de brotos mesmo em meio contendo 4 mg L⁻¹ de BAP.

Dornelas e Vieira (1994) tiveram sucesso no estabelecimento *in vitro* de plantas de cinco espécies de *Passiflora* (*Passiflora amethystina*, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, *Passiflora giberti*, *Passiflora maliformis* e *Passiflora mollissima*), utilizando como explantes ápices meristemáticos de caule. Os explantes foram cultivados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), na metade das concentrações de seus componentes, sem a adição de hormônios ou água de coco.

Para Reis et al. (2003), um fator que pode interferir no desenvolvimento de gemas à partir de segmentos nodais *in vitro* é a concentração de etileno no frasco de cultura. A produção e o acúmulo de etileno nos frascos pode se dar por alguns motivos, como: o uso de auxina no meio de cultura; o tipo de tampa usada, já que algumas não permitem a apropriada troca gasosa; os procedimentos de assepsia.

Segundo Passos e Bernacci (2005), há muitos estudos publicados sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora*, no entanto o assunto está longe de estar finalizado. Um dos principais que levam a essa conclusão é a variação da resposta entre genótipos que tem sido extensivamente descrita na literatura. Como também, as diferentes respostas obtidas por conta dos vários explantes utilizados, das diversas condições ambientais de incubação como luz, temperatura e fotoperíodo, tipos de frascos de cultura, meios de cultura e suas variações, somente para citar alguns.

A micropropagação, à partir de meristemas pré-existentes, brotos axilares ou segmentos nodais, tem sido aplicada para propagação clonal (DREW, 1997), limpeza viral (HUANG et al., 1997) e como fonte de células e tecidos. Para a conservação de germoplasma, os protocolos foram estabelecidos (DORNELAS & VIEIRA, 1994), mas a tecnologia não tem sido utilizada em bancos oficiais, embora promissora para compor coleções de acessos silvestres.

Para Grattapaglia (1998), acrescentar fitorreguladores aos meios de cultura tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz e orientar a morfogênese ou organogênese dos tecidos.

De acordo com Ribas (2000), o cultivo em sistema que se alterna entre meios suplementados e não suplementados com fitorreguladores parece afetar positivamente no enraizamento dos brotos regenerados. Ele explica também que ao otimizar técnicas de regeneração *in vitro* na cultura do maracujá, haverá a possibilidade de se obter clones selecionados de maracujá amarelo em grande escala, gerando novos ensaios de transformação genética com a introdução de genes agronomicamente desejáveis,

ultrapassando barreiras de incompatibilidade genética que são características dessa espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

O trabalho ocorreu em dois locais diferentes para cada etapa do mesmo, primeiramente no Viveiro Flora Brasil em Araguari - Minas Gerais e em seguida no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), na cidade de Uberlândia - Minas Gerais, e foi executado do dia 3 de Março de 2016 até 19 de Agosto de 2016.

O meio de cultura utilizado foi um meio MS 100% em pó - Murashige and Skoog Media Phytotechnology Laboratories ® - MS, com adição de vitaminas Sigma Cel Cuture Murashige and Skoog modified Vitamin, a qual continha (em mg mL⁻¹): 2,0 de glicina, 100,0 de mio-inositol, 0,5 de ácido nicotínico, 0.5 de piridoxina e 0.1 de tiamina.

Foram preparadas 216 tampas com membrana filtrante desenvolvida por Saldanha et al. (2012). Cada tampa foi furada com o auxílio de um furador de bancada com 1 cm de diâmetro. As membranas foram preparadas com 3 camadas de fita microporosa e uma com PTFE. As tampas com membrana filtrantes foram necessárias para evitar o acúmulo de gás etileno gerado pelos explantes. As tampas iriam permitir certa troca gasosa sem que o meio ou o explante fosse contaminado. Com as tampas prontas e após colocar o meio pronto nos frascos, os mesmos foram esterilizados em autoclave.

O experimento foi constituído por nove tratamentos, com 24 repetições, totalizando 216 parcelas. Cada tratamento foi preparado separadamente e o pH aferido para 5,8 para cada tratamento e o volume completado para 1200 mL por tratamento.

Os ápices caulinares foram coletados de plantas adultas presentes no pomar clonal da empresa Viveiro Flora Brasil Ltda (Araguari-MG), do cultivar FB-200 -

“Yellow Master” mantidas em estufas antiafídica. Os ápices foram imersos em solução de Tecsaclor às 0,3% e álcool 70% ambos durante 1 minuto seguido de três enxágues com água esterilizada e então foram reduzidos (0,2 a 0,4 mm com no máximo 3 primórdios foliares) utilizando seringas com agulhas de insulina e levados para câmara de fluxo laminar. O meristema foi extraído com o auxílio de um bisturi e pinça em estereomicroscópio do tipo “lupa” devidamente esterilizada em fluxo laminar. Os meios foram distribuídos em frascos de 263 mL que receberam 50 mL do meio em cada frasco.

Foi utilizada uma solução de 2,4-D na concentração de 2 g L^{-1} . Dessa solução foram retiradas as doses utilizadas no experimento. O uso de 2,4-D foi realizado em 8 doses diferentes e uma testemunha onde todas eram seguidas de uma dose estática de BAP. Sendo assim, os tratamentos foram:

Testemunha = $0,0\text{ mL L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $0,6\text{ mL L}^{-1} = 4,6\text{ }\mu\text{M} = 1\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $1,2\text{ mL L}^{-1} = 9,1\text{ }\mu\text{M} = 2\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $1,8\text{ mL L}^{-1} = 13,6\text{ }\mu\text{M} = 3\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $2,2\text{ mL L}^{-1} = 16,6\text{ }\mu\text{M} = 3,7\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $2,4\text{ mL L}^{-1} = 18,1\text{ }\mu\text{M} = 4\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $3,0\text{ mL L}^{-1} = 22,6\text{ }\mu\text{M} = 5\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $3,6\text{ mL L}^{-1} = 27,1\text{ }\mu\text{M} = 6\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP;
 $4,2\text{ mL L}^{-1} = 31,7\text{ }\mu\text{M} = 7\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + 1 mg L^{-1} de BAP.

Os frascos contendo os meios com as respectivas doses foram autoclavados à pressão de 1 atm à 120°C durante 20 minutos. Para autoclavar os frascos foram utilizadas tampas normais, sem membrana filtrantes. As tampas com membranas foram autoclavadas separadamente dentro de um saco para proteção da integridade das membranas. Os meristemas excisados foram inseridos nos frascos, os mesmos foram transferidos para sala de crescimento (temperatura constante de $25^{\circ}\text{ C} \pm 2^{\circ}\text{ C}$) e envolvidos por tecido preto para serem mantidos em constante escuro por um período de 45 dias. Ao fim dos 45 dias, os explantes foram subcultivadas em meio MS sem o fitorregulador para haver diferenciação dos mesmos. Foram realizados subcultivos a cada 15 dias ou de acordo com a necessidade.

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a medição dos diâmetros foi utilizado um paquímetro e, para pesar os explantes, uma balança de precisão com cinco casas decimais. Outros equipamentos que auxiliaram nas avaliações foram: estereomicroscópio, pinça, solução de ácido ascórbico (para evitar a oxidação dos explantes quando estiverem fora dos frascos no meio de cultura). Todas as avaliações foram feitas em fluxo laminar devidamente esterilizado para evitar a contaminação dos explantes.

As análises basearam-se no tamanho e no peso do explante após o período de avaliação (cinco meses e 16 dias). Foram medidos dois diâmetros: um transversal (D1) e outro longitudinal (D2), ambos em cm, por se tratar de um calo sem formato definido, e a massa fresca (MF) em g.

O delineamento escolhido foi o inteiramente casualizado (DIC) pois o local de crescimento dos explantes (sala de crescimento) é um ambiente totalmente controlado onde todas as parcelas recebem os efeitos externos, de luz e temperatura, com a mesma qualidade e quantidade, de maneira homogeneia e controlada.

Para a avaliação estatística foi usado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o experimento testa diferentes doses de 2,4-D, foi feito o teste de regressão para os dados, entretanto, nenhum dos modelos se ajustaram às médias observadas. Como pode ser visto nos Figuras (1, 2 e 3), os pontos não seguem um modelo linear, quadrático ou cúbico, e se verificar a Tabela 1, é possível ver que nenhuma das variáveis obtiveram R^2 (coeficiente de determinação) maior ou igual a 70% em nenhuma das regressões avaliadas (linear, quadrática ou cúbica). Sendo assim, foi feito o teste de Scott-Knott a 5% de significância com as médias observadas.

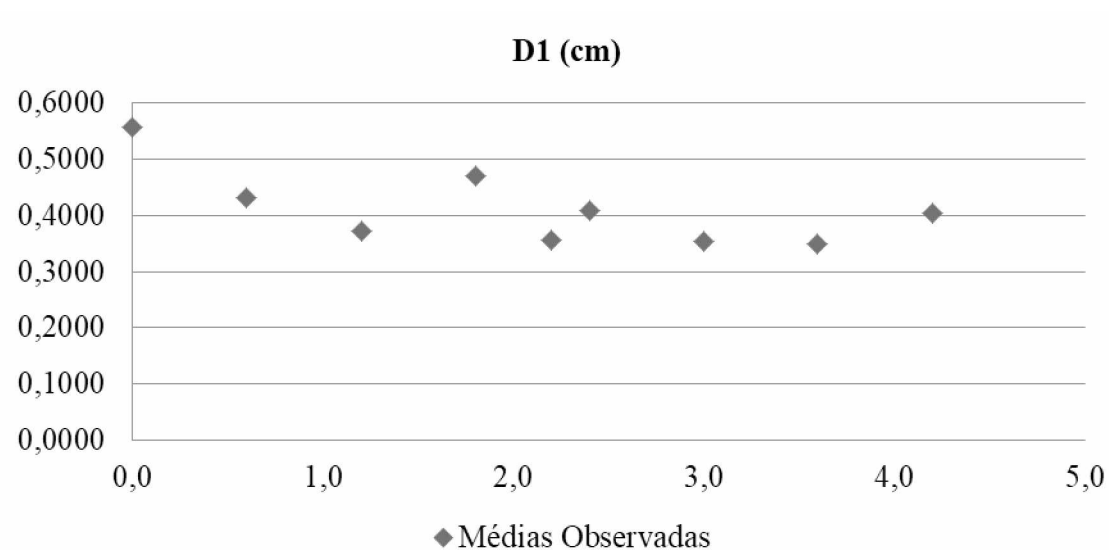


Figura 1. Médias observadas na avaliação do diâmetro 1 (D1) em cm em relação às doses utilizadas

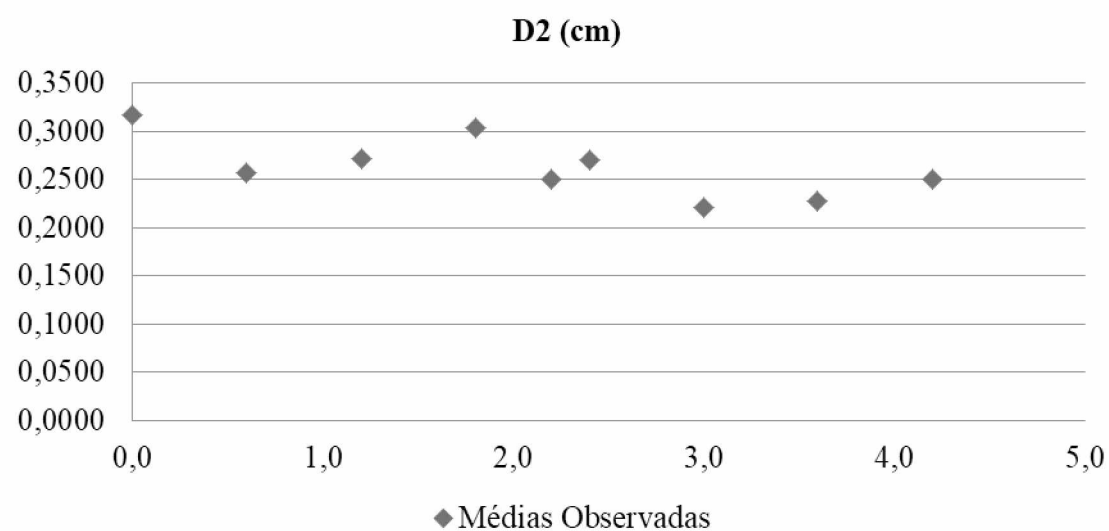


Figura 2. Médias observadas na avaliação do diâmetro 2 (D2) em cm em relação às doses utilizadas

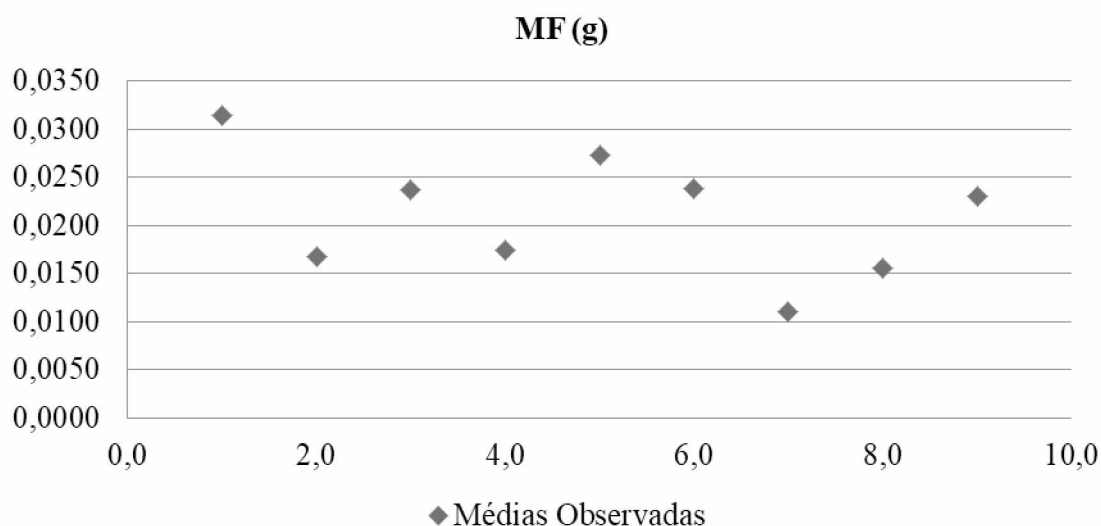


Figura 3. Médias observadas na avaliação da massa fresca (MF) em g em relação às doses utilizadas.

Tabela 1. Coeficientes de determinação (R^2) linear, quadrático e cúbico para as variáveis D1, D2 e MF obtidos pelo teste de regressão.

Variáveis	R^2 (%)		
	Linear	Quadrático	Cúbico
D1	41,56	62,52	63,66
D2	49,18	50,44	51,16
MF	16,23	21,97	21,98

Todas as variáveis (D1, D2 e MF) foram significativas, ou seja, os diâmetros e a massa fresca variaram para pelo menos duas doses.

Pode-se observar na Tabela 2 que para D1 a dose de 0,0 mL L⁻¹ de 2,4-D, ou seja, sem a auxina sintética e somente com o fitorregulador BAP, foi o tratamento que gerou maior aumento, seguida pela dose de 1,8 mL L⁻¹. Já para D2 o que ocorre é um pouco diferente, já que ambas doses de 0,0 e 1,8 mL L⁻¹ foram as que mais afetaram positivamente o crescimento do meristema. Para MF o resultado foi que as doses de 0,0, 2,2, 2,4, 1,2, e 4,2 foram as que obtiveram maiores pesos.

Sendo assim, analisando os resultados mais a fundo, temos que a testemunha (0,0 mL L⁻¹ de 2,4-D) seria a mais indicada pois levou ao crescimento do explante sem que houvesse perda de peso no processo.

Tabela 2. Análise estatística do crescimento dos explantes no final do experimento - diâmetro 1 (D1) em cm, diâmetro 2 (D2) em cm e massa fresca (MF) em g..

D1		D2		MF	
Doses	Médias	Doses	Médias	Doses	Médias
0,0	0,5583 a	0,0	0,3166 a	0,0	0,0315 a
1,8	0,4708 b	1,8	0,3041 a	2,2	0,0273 a
0,6	0,4304 c	1,2	0,2722 b	2,4	0,0238 a
2,4	0,4083 c	2,4	0,2708 b	1,2	0,0237 a
4,2	0,4045 c	0,6	0,2565 b	4,2	0,0230 a
1,2	0,3722 c	2,2	0,2500 b	1,8	0,0174 b
2,2	0,3550 c	4,2	0,2500 b	0,6	0,0168 b
3,0	0,3541 c	3,6	0,2272 b	3,6	0,0156 b
3,6	0,3500 c	3,0	0,2208 b	3,0	0,0111 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Para Moran Robles (1979), a quantidade endógena de auxina presente no explante já é suficiente para o estabelecimento de um equilíbrio necessário para que haja a diferenciação. No presente experimento, foi levado em consideração o tamanho extremamente reduzido do explante utilizado, de 2 à 3 mm, para justificar o uso de fitorregulador. Como foi salientado por Grattapaglia (1998), adicionar fitorreguladores aos meios de cultura tem como objetivo principal corrigir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes.

Dornelas e Vieira (1994), perceberam que ao adicionarem 1 mg L⁻¹ de ANA (auxina) havia inibição da regeneração de brotos mesmo em meio contendo 4 mg L⁻¹ de BAP (citocinina).

Reis et al. (2003), observaram que o desenvolvimento *in vitro* do explante pode ser comprometido pela produção e acúmulo de etileno nos frascos, e também que essa produção pode se agravar com o uso de auxinas no meio de cultura, pelos procedimentos de assepsia e pelo tipo de tampa utilizada. Como foi utilizada tampas que permitem trocas gasosas, teoricamente, o gás etileno não seria um problema, entretanto, visto que o uso de auxinas pode aumentar a produção do gás, é possível que a quantidade de gás dentro dos frascos foi maior que a capacidade das membranas de filtrar e realizar a troca de gases entre os frascos e o ambiente.

Seguindo essa lógica, o estudo de Reis et al. (2003) também pode ser usado para justificar o que foi visto por Dornelas e Vieira (1994).

Ribas (2000) explica a importância de estudos sobre a regeneração *in vitro* de maracujá, pois assim será possível obter clones selecionados de maracujá amarelo em grande escala, gerando novos ensaios de transformação genética com a introdução de

genes agronomicamente desejáveis. O presente trabalho gera mais informações sobre a regeneração *in vitro* de maracujá, ampliando mais os conhecimentos sobre o assunto.

5. CONCLUSÃO

Houve maior crescimento dos explantes na testemunha e no tratamento com a dose de 1,8 mL L⁻¹ de 2,4-D, dispensando assim o seu uso no desenvolvimento inicial dos meristemas;

Há necessidade de mais estudos em relação ao uso do 2,4-D na regeneração *in vitro* de maracujá, devido à pouca informação sobre o mesmo.

6. PROJEÇÕES FUTURAS

Com a realização de mais estudos deseja-se obter um protocolo para a realização de Limpeza Clonal do maracujá e outro para a obtenção de clones selecionados em larga escala.

Utilização de biorreatores que, quando comparado a micropropagação tradicional, possui vantagens como: menor tempo para realização do processo; há redução dos custos com mão-de-obra, já que os explantes não precisam ser manipulados ou sub-cultivados; danos causados por estresses gasoso (excesso de etilino ou falta de oxigênio) são controlados; redução, de maneira significativa, do custo total por unidade regenerada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. DE O.; PAULA, J. C. R. DE.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A. DE.; MENDONÇA, M. R.;. **A Cultura de Tecidos na Agricultura**. I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí, 2008

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. **Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis f. edulis***. Advances Horticultural Science, v. 8, p. 171-175, 1994.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. **Considerações Gerais Sobre Organogênese**. Documentos 150. Embrapa Algodão, Campina Grande, 15p. 2006.

CAVICHIOLO, J.C.; RUGGIERO, C.; VOLPE, C.A. **Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 649-656, 2008.

CEREDA, E. **Observações sobre a conservação “in natura” do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*, Deg.)**. Tese (doutorado) Faculdade de Ciência Agrárias, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 152p, 1973.

CUTLER, D.F., BOTHA, T., STEVENSON, D.WM. **Anatomia Vegetal – Uma abordagem aplicada**. São Paulo, ArtMed Editora, 304p. 2011

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

DREW, R. A. Micropropagation of Passiflora species (Passionfruit). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation**. V. Berlin: Springer Verlag, p.135-149. 1997.

FALEIRO, F.G; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, v. 1, 677 p. 2005.

FERRARI, R.A., COLUSSI, F., AYUB, R.A. **Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - Aproveitamento das Sementes**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.26, n.1, p.101-102. 2004.

FERREIRA, D. F.; **SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística**. Revista Symposium. Lavras, MG, v. 6, p. 36-41, 2008.;

FERRAZ, J.V.; LOT, L. **Fruta para consumo in natura tem boa perspectiva de renda**. In: AGRIANUAL 2007: anuário da agricultura brasileira. Maracujá. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, p. 387-388. 2006.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The Technology, 2 ed. Wilts, England, p. 574, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Cap. 2. p.99-169, 1990

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa - CNPH. v.1, p.43-76, 1998

HUANG, B. H.; YANG, Y. S.; WENG, S. W.; CHEN, B. S.; CHANG, C. A.; CHEN, Y. W.; CHANG, L. R. **Study on the growth of passion fruit tissue culture plants**. Taichung, 1997.

IBGE. **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, RJ, v.42, p.22, 2015.

KLIEMANN, H. J., CAMPELO JÚNIOR, J. H., AZEVEDO, J. A., GUILHERME, M.R, GENÚ, P. J. C. **Nutrição mineral e adubação do maracujazeiro**. In: HAAG, H. P. Nutrição Mineral e Adubação de fruteiras tropicais. Campinas: Fundação Cargill . p.247-284, 1986.

MARTINS, D. P. **Resposta do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims Var. *flavicarpa* Deg) a lâminas de irrigação e doses de nitrogênio e potássio**. Campos dos Goytacases, 1998, Tese (Doutorado) Centro de Ciências e tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

MEDEIROS, J.D.S. **Ensaio toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v.19, n. 2a, p. 394-399, 2009.

MELETTI, L.M.M. **Avanços na cultura do maracujá no Brasil**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.33, n.spel, p. 83-91, 2011.

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

MONTEIRO-HARA, A.; JADÃO, A.S.; MENDES, B .M.J.; TREVISAN, F.; REZENDE, J. A. M.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M.; PIEDADE, S. M. S. **Genetic Transformation of Passion flower and Evaluation of R1 and R2 Generations for Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus**. Plant Disease, St Paul, v. 95, n.8, p. 1021-1025, 2011.

MORAN-ROBLES, M. J. **Potential morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* Var. *flavicarpa* Deg. et *P. mollissima* Baileyen culture in vitro**. Turrialba, v. 29, p. 224-228, 1979.

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

NAKAYAMA, F. **Cultivo in vitro de tejidos de Passiflora caerulea**. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, v. 42, n. 1, p. 63-74, 1966.

OLIVEIRA, J.C. **Melhoramento genético do maracujazeiro**. In: RUGGIERO, C (Ed). A cultura do maracujá. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.218-246.

PASSOS, I. R. da S.; BERNACCI, L. C. **Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora spp.*)**: Maracujá : germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2005. Cap.-15, p. 361-383.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. **Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors**. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, v. 39, p. 618-622, 2003.

RIBAS, A. F. **Estudos sobre cultura de tecidos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* DEG.)**. Curitiba, 2000.

RIZZI, L. C., RABELLO, L. A, MOROZINI FILHO, W., SAVASAKI, E. T., KAVATI, R. **Cultura do maracujá azedo**.Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SSA,1998. 23p. (Bol. Técnico, 235).

SALDANHA, C. W., OTONI, C. G., AZEVEDO, J. L. F. de, DIAS, L. L. C., RÊGO, M. M. do, OTONI, W. C. **A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Plant Cell Tiss Organ Cult. P. 413–422, 2012

SCORZA, R., JANICK, J. **Tissue culture in *Passiflora* L.** 24 Annu. Congr. Amer. Soc. Hort. Sei. Trop. Reg. p. 179-183, 1976.

SILVA, A. A. G. da. **Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.): aspectos relativos à fenologia, demanda hídrica e conservação pós-colheita**. Botucatu, 2002 xii, 98 f.

SILVA, J. R. da; OLIVEIRA, H. J. de. **Nutrição e adubação do maracujazeiro amarelo**. INFORME AGROPECUÁRIO. 206ed.: , 2000, v. 21, p. 52-58.

SOUSA, V. S. **Níveis de irrigação e doses de potássio aplicadas via fertirrigação por gotejamento no maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims Var. *flavicarpa* Deg.)** Piracicaba, 2000, 145p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; LIMA, A.A.; COELHO, E.F. Comercialização. In: LIMA, A. de A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa-Informação Tecnológica, p. 91-96, 2002

SOUZA, K. C. A. de.; ABREU, H. dos S. **Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação**. Floresta e Meio Ambiente. v.14, n.1, p. 93 - 109, 2007

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TEIXEIRA, C. G. Cultura. In: ITAL - Campinas (Ed.) **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas, 1994. p. 1-142

TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 27 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180), 2006.

URASHIMA, A. S. **Aspectos fonológicos do marucajazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims Var. *flavicarpa* Deg.)**. Botucatu: UNESP 1985. 83p. dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Agrônômicas Universidade Estadual Paulista.

XU, N.; BEWLEY, J.D. **Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning eletron microscopy**. Plant Cell Reports, V. 11, p.279-284, 1992.

WAGNER JÚNIOR, A.; ALEXANDRE, R.S.; NEGREIROS, J.R.S.; PIMENTEL, L.D.; SILVA, J.O.C.; BRUCKNER, C.H. **Influência do substrato na germinação e**

desenvolvimento inicial de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg), Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 30, n. 4, p. 643-647, 2006..