

REGINA CANESTRARO KOCH

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Passiflora actinia*  
HOOKER POR MEIO DA MICROPROPAGAÇÃO  
E DA ESTAQUIA SEMILENHOSA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração - Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette.

CURITIBA

1999

REGINA CANESTRARO KOCH

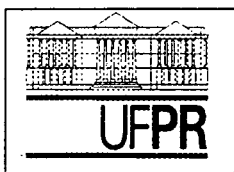
PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Passiflora actinia* HOOKER POR MEIO  
DA MICROPROPAGAÇÃO E DA ESTAQUIA SEMILENHOSA

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós -  
Graduação, em Agronomia, Área de Concentra-  
ção — Produção Vegetal, Setor de Ciências  
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette.

CURITIBA

1999



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL

**P A R E C E R**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **REGINA CANESTRARO KOCH**, sob o título "**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Passiflora actinia* HOOKER POR MEIO DE MICROPROPAGAÇÃO E DE ESTAQUIA SEMILENHOSA**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 16 de junho de 1999.

Professor Dr. Enio Pedrotti  
Primeiro Examinador

Professor Dr. Adauto Bellarmino Pereira Netto  
Segundo Examinador

Professor Dr. Edelclaiton Daros  
Terceiro Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi  
Quarto Examinador

Professor Dr. Flávio Zanette  
Presidente da Banca e Orientador

Aos meus pais,

Roberto Roland Koch, *in memoriam*

e Zoraide Aidê Canestraro Koch.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Zanette, pela oportunidade de realizar este mestrado, bem como pela sua orientação e ensinamentos transmitidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi, pela orientação profissional e científica, altamente qualificada, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, e mais ainda, pela amizade ampla e sincera, e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. João Carlos Possamai pela orientação estatística na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Armando Carlos Cervi pela classificação botânica da espécie.

Aos professores Dra. Marguerite G. G. Quoirin, Dra. Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima, Ruy Inácio Neiva de Carvalho, Luiz Doni Filho e Dr. Aducto Belarmino de Pereira Netto pelas valiosas sugestões prestadas durante a realização deste trabalho, pelo apoio, e constante incentivo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Laboratório de Micropropagação Vegetal, da Biblioteca do Setor de Ciências Agrárias e do Laboratório de Informática especialmente ao Wagner da Silva pelos auxílios prestados, bem como pelo apoio e amizade.

À meu pai Roberto Roland Koch, *in memoriam*, por sua dedicação e exemplo de vida.

À minha mãe Zoraide Aidê Canestraro Koch e ao meu irmão Roberto Canestraro Koch por toda compreensão, estímulo e apoio incondicionais durante o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
<b>2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA</b> .....	4
2.1.1 Enquadramento taxinômico.....	7
<b>2.2 PROPAGAÇÃO SEXUADA</b> .....	7
<b>2.3 PROPAGAÇÃO ASSEXUADA</b> .....	10
<b>2.3.1 Micropropagação</b> .....	12
2.3.1.1 Desinfestação.....	17
2.3.1.2 Estabelecimento da cultura.....	20
2.3.1.3 Multiplicação e alongamento.....	22
2.3.1.4 Enraizamento.....	23
2.3.1.5 Transplântio e aclimação de mudas.....	24
2.3.1.6 Meio de cultura e condições de crescimento.....	25
<b>2.3.2 Estaquia</b> .....	30
2.3.2.1 Bases anatômicas e fisiológicas da propagação por estaquia.....	30
2.3.2.2 Técnicas de tratamento das estacas.....	35

2.3.2.3 Propagação por estaquia do maracujazeiro.....	41
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	50
3.2 EXPERIMENTOS DE MICROPROPAGAÇÃO.....	50
3.2.1 Fonte de explantes.....	50
3.2.2 Meio de cultura e condições de crescimento.....	52
3.2.3 Delineamento experimental.....	53
3.2.4 Acimatação das mudas.....	53
3.3 EXPERIMENTOS DE ESTAQUIA.....	54
3.3.1 Fonte de material.....	55
3.3.2 Experimento com AIB.....	55
3.3.3 Experimento com etanol.....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
4.1 MICROPROPAGAÇÃO.....	57
4.1.1 Número de raízes emitidas por plântula.....	58
4.1.2 Número de folhas emitidas por plântula.....	62
4.1.3 Número de brotações emitidas por plântula.....	62
4.1.4 Número médio de abscisão foliar por plântula.....	66
4.1.5 Comprimento médio por plântula.....	68
4.1.6 Taxa de sobrevivência.....	70
4.2 ESTAQUIA SEMILENHOSA.....	72
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>

<b>6 PERSPECTIVAS PARA O FUTURO.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS DE <i>Passiflora actinia</i> 30 DIAS APÓS O TRANSPLANTIO PARA CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.....	70
TABELA 2 - EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE <i>Passiflora actinia</i> , APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.....	72
TABELA 3 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE <i>Passiflora actinia</i> , APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.....	76

## LISTA DE FIGURAS

1. *Passiflora actinia* HOOKER: hábito (X0,5); a, DETALHE DA FLOR (X1) LEG. R. KUMMOROV 101 (MBM). CERVI (1997).....6
2. ASPECTO DAS PLÂNTULAS DE *Passiflora actinia* EM MEIO DE CULTURA MS COMPLEMENTADO COM AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>); BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), OU AMBOS HORMÔNIOS NAS MESMAS QUANTIDADES.....59
3. NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, NA 1ª E 2ª REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....60
4. NÚMERO MÉDIO DE FOLHAS EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....63
5. NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....64
6. NÚMERO MÉDIO DA ABSCISÃO FOLIAR POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....67
7. COMPRIMENTO MÉDIO (CM) DAS BROTAÇÕES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.....69
8. A - ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS PROPAGADAS IN VITRO DE *Passiflora actinia* EM BANDEJAS DE ISOPOR NA CASA DE VEGETAÇÃO. B - MUDAS DE *Passiflora actinia* PROPAGADAS IN VITRO DESENVOLVENDO-SE EM AMBIENTE CONTROLADO.....71
9. ESTACAS ENRAIZADAS DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB (0,250, 500 E 1000 MG L<sup>-1</sup>), APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.....73

10. AUMENTO NO NÚMERO DE RAÍZES EMITIDAS POR ESTACA DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE AIB, APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.....75
11. ESTACAS ENRAIZADAS DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL. A - SEM-TRATAMENTO; B - ÁGUA; C – ETANOL 10%; D - ETANOL 30%; E - ETANOL 50%; F - ETANOL 70% .....77

## RESUMO

Este trabalho foi feito para estudar a propagação de *Passiflora actinia* Hooker, uma espécie frutífera comestível e nativa do Paraná, visando a sua preservação e valorização econômica da biodiversidade. Para os experimentos *in vitro* foram coletados frutos maduros, dos quais foram extraídas as sementes e armazenadas em frascos fechados sob refrigeração. Como fonte de explantes foram utilizadas plântulas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. A assepsia das sementes foi realizada pela imersão em etanol 10% por 1 minuto seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos. As plântulas com 4 a 5 folhas foram segmentadas e colocadas no meio de cultura básico MS, suplementado com BAP (Benzilaminopurina) ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB (Ácido indol butírico) ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou ambos os reguladores. O delineamento foi inteiramente casualizado com 36 repetições e 3 a 4 explantes por frasco, sendo considerado cada frasco como uma parcela. O material foi avaliado até a segunda repicagem. No meio MS com BAP ocorreu intensa multiplicação dos segmentos utilizados, sendo normal a formação de tufos, e eventual formação de raízes. No meio MS com AIB ocorreu a formação de raízes na base das brotações e o alongamento das plântulas, que apresentavam ótimo aspecto de desenvolvimento. No meio MS com BAP e AIB ocorreu a multiplicação de quase todos os segmentos, mas com menor proporção do que os cultivados no meio MS com AIB. Neste meio as brotações ocorreram em forma de tufos com pouca formação de raízes. Na estaquia semilenhosa foram conduzidos dois experimentos para verificar o efeito de diferentes concentrações de AIB e de etanol. No experimento com AIB foram testadas as seguintes concentrações: 0, 250, 500 e  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ . No experimento com etanol os tratamentos foram: testemunha, água, e etanol 10%, 30%, 50% e 70%. Todos os tratamentos foram aplicados por imersão da base das estacas (2 cm) durante 1 minuto. Em ambos os experimentos o delineamento foi em blocos ao acaso com 5 repetições e 20 estacas por parcela. A avaliação foi feita sete semanas após a instalação. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, em ambos os experimentos, para todas as variáveis analisadas, com exceção do número de raízes emitidas por estaca para as concentrações de AIB, que apresentou uma regressão linear significativa. A porcentagem de enraizamento foi elevada, sendo em média 90% no experimento com AIB e 70% no experimento com etanol. Portanto, a *Passiflora actinia* pode ser propagada por meio de estacas semilenhosas sem a necessidade de utilização de reguladores de crescimento. Logo, conclui-se que estas formas de propagação de *Passiflora actinia* são viáveis para a produção clonal de mudas.

## ABSTRACT

This work was made to study the propagation of *Passiflora actinia* Hooker, an edible and native fruit species of Paraná state, seeking its preservation and valuing its biodiversity economically. For the *in vitro* experiments mature fruits were collected, of the which were extracted the seeds and stored in flasks closed under refrigeration. As explants source was used plantlets obtained starting from seeds germinated *in vitro*. The asepsis of the seeds was accomplished by the immersion in ethanol 10% for 1 minute proceeded by the immersion in solution of hipoclorite of sodium 2,5% for 30 minutes. The plantlets with 4 to 5 leaves was segmented and placed in the basic middle of culture (MS), added with BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) or both regulators. The delineation was made completely randomized with 36 repetitions and 3 to 4 explants for flask, being considered each flask as a portion. The material was evaluated until the second transplant. In the basic middle added with BAP happened intense multiplication of the used segments, being normal the tufts formation, and eventual formation of rootses. In the basic middle added with AIB happened the formation of rootses in the base of the branchings and the lengthening of the plantlets that presented, great development aspect. In the basic middle added with BAP and AIB happened the multiplication of almost all the segments, but with smaller proportion than the cultivated in the basic middle added with AIB. In this middle the branchings happened in tufts form with little formation of rootses. In the semihardwood cuttings two experiments were driven to verify the effect of different concentrations of AIB and of ethanol. In the experiment with AIB the following concentrations were tested: 0, 250, 500 and  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ . In the experiment with ethanol the treatments were: testimony, water, ethanol 10%, 30%, 50% and 70%. All the treatments were applied for immersion of the base of the cuttings (2 cm) for 1 minute. In both experiments the delineation was made in randon blocks with 5 repetitions and 20 cuttings for portion. The evaluation was made seven weeks after the installation. Significant differences were not observed among the treatments, in both experiments, for whole the analyzed variables, except for the number of rootses emitted by cutting for the concentrations of AIB, that it presented a significant lineal regression. The rooting percentage was elevated, being on the average 90% in the experiment with AIB and 70% in the experiment with ethanol. Therefore, the *Passiflora actinia* can be spread by means of semihardwood cuttings without the use of growth regulators. Therefore, it is ended that these forms of propagation of *Passiflora actinia* are viable for the production clonal of dumb.

## 1 INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae é representada por cerca de 14 gêneros, com espécies herbáceas ou lenhosas, normalmente trepadeiras, com distribuição preponderantemente tropical, ocorrendo nas Américas, Ásia, Índia, África, Ilhas do Pacífico, Madagascar, compondo cerca de 600 espécies (SÃO JOSÉ et al., 1994).

Os mesmos autores, afirmam que no Brasil o gênero *Passiflora* é o mais representativo da família, composto por cerca de 400 a 500 espécies. Destas, 100 a 200 são autóctones, marcadamente na região centro-norte, onde esta frutífera encontra excelentes condições ecológicas para seu cultivo.

O maracujazeiro tem grande importância pelo valor decorativo de suas flores, pelas qualidades gustativas de seus frutos e pelas qualidades farmacodinâmicas e alimentares de seu suco, cascas, sementes, flores e folhas. As ações sedativa, analgésica, antiespasmódica, hipotensora e tranqüilizante, devida à presença de flavonóides, tem sido confirmada em várias pesquisas. Na indústria farmacêutica, encontra-se facilmente à venda produtos como "Maracujina", "Passiflorine" e "Calmofilase", de aplicação sedativa e antiespasmódica.

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de maracujá. Para atender a crescente demanda, tem-se procurado desenvolver e adotar novas tecnologias de produção de mudas. É importante ressaltar, que ainda não existe uma cultivar definida de qualquer espécie de maracujazeiro no mercado, impedindo a garantia de comercialização de suas sementes, isto explica a dificuldade de encontrá-las à venda. Estima-se que aproximadamente 60% da safra nacional, acaba sendo

consumida como fruta *in natura* e que área plantada no país é de cerca de 25.000 ha. Existem muitos problemas enfrentados pelos fruticultores que cultivam o maracujazeiro e, um deles relaciona-se com a forma de propagação (SÃO JOSÉ, et al., 1994).

No Brasil, o maracujazeiro pode ser propagado de duas maneiras: forma gâmica, que é a sexuada ou reprodutiva, feita por meio de sementes; forma agâmica ou vegetativa, que é assexuada, feita por meio de estaquia, mergulhia ou enxertia.

No Brasil e em vários países, a multiplicação em escala comercial é feita por meio de sementes, mesmo que também possa ser realizada por enxertia e estaquia (SÃO JOSÉ e NAKAGAWA, 1988).

O processo assexuado, como o de estaquia, é utilizado quando se deseja manter determinadas características especiais de uma planta, tais como precocidade, boa produtividade, resistência à pragas e doenças (MANICA, 1981).

A micropropagação tem um papel importante na aceleração do processo de obtenção de mudas, suprindo o mercado com material homogêneo, saudável, de boa qualidade, além do excelente estado fitossanitário.

A propagação vegetativa permite a produção de grande quantidade de mudas clonadas e, com estas, é possível instalar pomares homogêneos, com plantas de potencial conhecido, ou seja, sem variabilidade quanto à época de frutificação, produtividade e qualidade de seus frutos. Para as espécies que apresentam problemas de auto-incompatibilidade, como o maracujazeiro, se faz necessário o interplântio de clones diferentes para assegurar a produção.

VANDERPLANK (1996), afirma que *Passiflora actinia* tolera temperaturas tão baixas quanto -5°C (24°F), sendo também possivelmente um bom porta-enxerto

para *Passiflora alata* e *Passiflora quadrangularis*. Por isto, devido às condições climáticas do estado do Paraná onde normalmente ocorrem geadas, é de grande importância preservar e domesticar esta espécie que é muito apreciada por animais e já é explorada por extrativismo.

Este trabalho, visa a preservação de uma espécie frutífera comestível, nativa do primeiro planalto paranaense e, com isto, valorizar economicamente a biodiversidade.

O objetivo geral deste trabalho, foi o de estabelecer um protocolo para obtenção de mudas clonadas de maracujazeiro amarelo nativo (*Passiflora actinia*), por meio da micropropagação e da estaquia, visando a utilização comercial da espécie.

Os objetivos específicos foram: testar o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação e enraizamento de *Passiflora actinia in vitro* e testar o efeito de concentrações de AIB e etanol no enraizamento de estacas semilenhosas de *Passiflora actinia*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No que diz respeito à revisão bibliográfica, os estudos foram baseados em outras espécies de *Passiflora*, uma vez que trabalhos publicados com *Passiflora actinia* são muito escassos.

### 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE ESTUDADA

PRAZERES (1989), afirma que a *Passiflora actinia* geralmente é encontrada no interior das florestas, estendendo seus ramos sobre as copas das árvores, sendo portanto, uma planta heliófita. Sua área de dispersão no Estado do Paraná, está restrita ao primeiro planalto onde é frequentemente encontrada em capões, capoeiras e matas de galeria, e raramente é encontrada na Serra do Mar. Apesar dos frutos serem comestíveis e muito adocicados, não são comercializados, devido a suas pequenas dimensões. Esta espécie é uma planta trepadeira, inteiramente glabra, apresentando caule sub-cilíndrico, filiforme e muito flexível. Possui estípulas foliáceas, reniformes com 1,0 a 4,0 cm de comprimento e 0,5 a 2,0 cm de largura, sendo inteiras, de ápice acuminado e base arredondada, com nervura reticulada e excêntrica. As folhas são simples, inteiras, longo-ovadas, sub-peltadas, de base arredondada, geralmente heptonervadas, sendo de consistência membranácea, com 3,0 a 10,0 cm de comprimento e até 8,0 cm. de largura; os pecíolos possuem até 5,0 cm de comprimento; sendo delgados e geralmente providos de três pares de nectários

extra-florais, sendo um par junto a base do limbo, um mediano e outro próximo à inserção da folha no caule. Nota-se ainda, a presença de gavinhas axilares bastante resistentes. As flores são solitárias, axilares e encontram-se sobre um pedúnculo articulado e delgado de até 3,5 cm de comprimento. O fruto é globoso e de coloração amarela quando maduro. As sementes apresentam formato aproximadamente ovalado com até 0,5 cm de comprimento, possuindo arilo carnáceo e testa ornamentada com diminutos retículos.

De acordo com VANDERPLANK (1996), esta planta, também conhecida por anêmona-do-mar, é nativa do sul do Brasil, com sua floração iniciando em novembro e estendendo-se até fevereiro. Apesar do estilo das flores serem muito semelhantes com as de *Passiflora quadrangularis*, o desenvolvimento da planta inteira é muito menor, e são mais satisfatórias como plantas de vaso ou de outra forma de cultivo controlado. Possivelmente também é um bom porta-enxerto para *Passiflora alata* e *Passiflora quadrangularis*.

CERVI (1997), observou que *Passiflora actinia* Hooker (FIGURA 1) é uma espécie heliófita e seletiva higrófita, ocorrendo principalmente no interior da floresta com luz difusa. É raro, mas é possível encontrá-la também na orla florestal, nas capoeiras e capoeirões, cujos frutos são bastante apreciados pelo homem, pássaros e outros pequenos animais. Notou-se também, que este maracujazeiro floresce no final de setembro até dezembro e sua frutificação ocorre de dezembro a fevereiro. No Brasil é encontrado no Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Paraná.

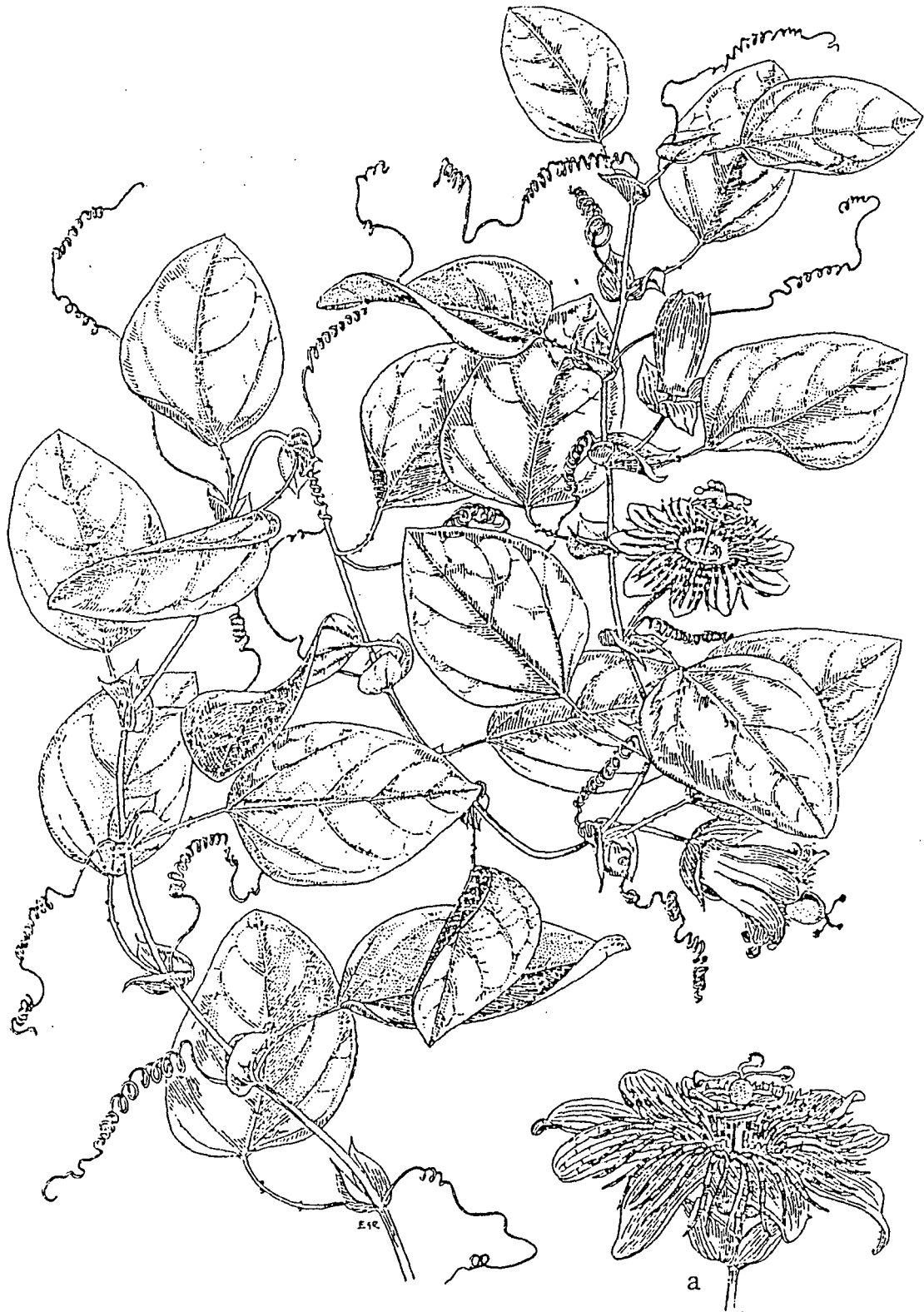


FIGURA 01 - *Passiflora actinia* HOOKER: HÁBITO (X0,5); a, DETALHE DA FLOR (X1) LEG. R. KUMMROW 101 (MBM). CERVI (1997).

### 2.1.1 Enquadramento taxinômico:

Sistema de Arthur Cronquist:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub Classe: Dilleniidae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae A. C. de Jussieu ex Kurith.

Gênero: *Passiflora* L.

Espécie: *Passiflora actinia* Hooker

## 2.2 PROPAGAÇÃO SEXUADA

Segundo MANICA (1981), o maracujazeiro pode ser propagado por meio de sementes, que é a propagação gâmica, sexuada ou reprodutiva. Atualmente, esta é a técnica mais empregada em escala comercial pelos produtores no Brasil.

Entretanto, este método apresenta a desvantagem da germinação não ser sincronizada, havendo relatos desta ocorrer no período de dez dias até seis semanas, fato este que dificulta a formação de mudas, devido à desuniformidade destas (SÃO JOSÉ, 1991).

Segundo AKAMINE et al. (1956), as sementes de maracujá amarelo podem ser semeadas logo após a sua extração, a partir dos frutos maduros. Pode-se antecipar a germinação, removendo-se a mucilagem.

As Passifloraceas são incluídas MORLEY-BUNKER (1974), na família de plantas cujas sementes apresentam dormência devido aos mecanismos de controle de entrada de água para o interior da semente. Todavia, de acordo com o mesmo autor, citado por SÃO JOSÉ (1991), pode-se ter a presença de reguladores de crescimento nos envoltórios da semente, havendo por isso a necessidade de estudos sobre o mecanismo de dormência nas sementes de maracujazeiro.

SÃO JOSÉ (1991), afirmam que logo após a colheita, as sementes apresentam alta germinação. No entanto, a germinação diminui rapidamente. WALES (1975) afirma que a viabilidade das sementes diminui com o tempo de armazenamento, lentamente até doze semanas, e depois mais rapidamente. Aos doze meses a germinação é muito baixa e insatisfatória, sendo que foi verificada uma germinação de 25% das sementes. Quando as sementes são armazenadas por muito tempo em condições de baixa temperatura, isto não impede sua germinação mas diminui significativamente a sua percentagem de germinação. Normalmente, os agricultores retiram as sementes de seus próprios pomares, não levando em conta critérios de seleção que beneficiariam a produtividade.

Logo após a retirada das sementes dos frutos, as mesmas podem ser semeadas de imediato, sem proceder a sua lavagem, à eliminação da polpa e à secagem. Mesmo assim, é interessante realizar estes procedimentos já que aceleram a

germinação (AKAMINE et al., 1956; PIZA JUNIOR, 1966; HADDAD GARCIA e MILLAN FARINAS, 1975; ESQUIVEL e LABRADOR, 1977; SÃO JOSÉ e NAKAGAWA, 1988).

LUNA (1984) citado por RUGGIERO e CORRÊA (1978) e SÃO JOSÉ (1991) afirmam que a mucilagem das sementes pode ser retirada com a utilização de um liquidificador ligado por alguns segundos.

SÃO JOSÉ e NAKAGAWA (1988), estudaram a influência de várias técnicas de extração de sementes de maracujazeiro, quanto à qualidade fisiológica das mesmas e, notaram que o método fermentativo, prejudicava muito a qualidade das sementes, que foram avaliadas logo depois da extração. As que sofreram fermentação com arilo também tiveram sua qualidade prejudicada, quando comparadas às sementes que passaram por fermentação sem arilo. A extração do arilo, tanto manual quanto por ligações intermitentes do liquidificador, não afetou a qualidade.

CARVALHO (1974) afirmou que as sementes podem ser conservadas por vários anos, desde que sejam colocadas em sacos de papel e estes, dentro de sacos plásticos fechados e guardados em refrigerador doméstico (5-10°C).

SÃO JOSÉ (1987) pesquisou os efeitos de dois ambientes distintos de armazenamento, em condições naturais e em refrigerador, e verificou que a germinação não foi afetada significativamente pelo ambiente de armazenagem, mas todos os demais parâmetros foram prejudicados na condição de armazenamento em ambiente, enquanto que a condição de refrigerador (5-10°C) promoveu uma melhor conservação da qualidade fisiológica das sementes.

Depois da remoção dos arilos das sementes, estas devem passar por um processo de secagem antecedendo a semeadura ou apenas para armazená-las. Esta secagem pode ser feita em condições de sombreamento com bom arejamento por três a quatro dias (SÃO JOSÉ, 1991).

As sementes recém secas, devem ser armazenadas dentro de sacolas de polietileno bem fechadas, retirando-se todo ar possível dos invólucros. Depois disto, recomenda-se que sejam colocadas em geladeira doméstica em temperatura de 5 a 10°C, o que se consegue colocando-as na parte inferior da geladeira. Com estes procedimentos, as sementes podem ser armazenadas durante um ano aproximadamente, preservando qualidade de germinação e vigor (SÃO JOSÉ, 1991).

### 2.3 PROPAGAÇÃO ASSEXUADA

Na propagação vegetativa ou assexuada, as características da planta-mãe são perpetuadas pelo crescimento e multiplicação mitótica das células, e os gens apresentam uma cópia fiel da célula de origem. Portanto, qualquer planta com este tipo de origem, pode ser considerada uma extensão do ciclo de multiplicação das células somáticas de um indivíduo, sendo também denominada clone (GEORGE E SHERRINGTON, 1984).

De acordo com HARTMANN et al. (1990), um clone pode ser definido

como um material geneticamente uniforme derivado de um só indivíduo e que se propaga exclusivamente por meios vegetativos como estacas, divisões ou enxertos. Contudo, isto não significa que todas as plantas clonadas a partir de um único indivíduo, sejam necessariamente idênticas em todas as suas características. O fenótipo da planta resulta da interação de seu genótipo com o ambiente no qual ela se desenvolve. Portanto, num determinado clone, a aparência das plantas ou das flores e frutos podem variar um pouco nos diferentes indivíduos clonados devido ao clima, ao solo, às doenças ou outras causas.

RUGGIERO (1987) afirmou que a cultura do maracujazeiro, é propagada comercialmente apenas por via sexuada. A estaquia e a enxertia, métodos tradicionais de propagação vegetativa, são recomendados e muito utilizados para o maracujazeiro em outros países já há algum tempo.

OLIVEIRA (1987) confirma que a multiplicação de plantas selecionadas e o estabelecimento de plantios clonais uniformes, é proporcionado pela propagação vegetativa. No Brasil, a utilização deste método, ainda é praticado apenas no campo da pesquisa, sendo empregado principalmente na busca de resistência a doenças e na manutenção de bancos de germoplasma.

### 2.3.1 Micropropagação

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), afirmaram que a tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia, ocupando posição destacada na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e conservação de germoplasma e, em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários.

A propagação clonal realizada *in vitro*, é conhecida por micropropagação, termo proposto pela primeira vez por HARTMANN et al. (1990). Esta metodologia oferece muitas vantagens, tais como: grandes quantidades de plantas podem ser produzidas a partir de um único indivíduo, numa área reduzida e em curto espaço de tempo; possibilita a propagação de algumas espécies que são impossíveis de serem propagadas por outras técnicas de propagação vegetativa; a troca de germoplasma é bastante facilitada pelo transporte de plantas *in vitro* livre de doenças; a propagação *in vitro* pode ser iniciada, com pouca quantidade de material; um novo clone pode se tornar economicamente viável mais rapidamente; no decorrer da indução de brotações adventícias, os melhoristas vegetais podem conseguir mutações desejáveis. O cultivo *in vitro* é muito importante para estabelecer e manter bancos genéticos, e preservar germoplasmas selvagens que estejam ameaçados de extinção. Mesmo assim, esta técnica apresenta algumas desvantagens, tais como: alguns sistemas apresentam a estabilidade genética muito fraca; em algumas plantas a indução ao sistema de raízes é

bastante difícil. Algumas vezes as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, havendo necessidade de substituição por outras novas *in vivo*; dependendo do material, o isolamento asséptico é extremamente difícil; em alguns casos, a transferência do material do tubo de ensaio para o solo, exige cuidados especiais; o custo de execução deste método, é mais elevado do que a propagação feita por sementes ou estaquia.

Os procedimentos descritos a seguir, servem como guia geral para realizar a técnica de micropropagação: Estágio 0 - Seleção e preparação da planta parental; Estágio 1 - Estabelecimento de cultura asséptica; Estágio 2 - Produção de propágulos (fase de propagação); Estágio 3 - Preparação para crescimento em ambiente natural (solo); Estágio 4 - Transferência para ambiente natural. Dependendo do tipo de explante utilizado e de que modo foi manipulado, a micropropagação pode ser conduzida numa dessas duas maneiras: 1- Multiplicação pela da proliferação de gemas axilares apicais; 2- Multiplicação pela indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

De acordo com os mesmos autores, a primeira situação ocorre na maioria dos sistemas de micropropagação, envolvendo o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados, a quebra da dominância apical e a multiplicação das partes aéreas com a aplicação de citocinina exógena. As gemas axilares, que formam-se naturalmente nas inserções das folhas, são estimuladas a crescer, originando novas partes aéreas que por sua vez repetem o mesmo processo. Na segunda situação, existe um processo de diferenciação dos tecidos, no qual o balanço hormonal do meio de cultura promove a formação de nódulos meristemáticos. Este tipo de indução, pode ser alcançado de modo direto a partir do tecido do explante, que é a organogênese direta, ou pela

formação de calo e posterior nova-formação de células meristemáticas, que é a organogênese indireta.

Estes autores também afirmam que o plantio de clones selecionados e propagados vegetativamente, tem sido a base da fruticultura atual, e isto tem beneficiado significativamente as técnicas de micropropagação *in vitro*. O número de trabalhos realizados com cultura de tecidos de espécies do gênero *Passiflora*, ainda é considerado muito pequeno. Em princípio, espécies deste gênero não se mostram recalcitrantes e respondem bastante bem à aplicação de reguladores de crescimento, já tendo sido possível fechar o ciclo da micropropagação, isto é, isolamento de explantes, multiplicação, enraizamento e transplantio.

Existe um grande potencial morfogenético em segmentos caulinares não meristemáticos de *Passiflora edulis* e *Passiflora mollissima*, conforme foi demonstrado por MORAN ROBLES (1979). Depois de realizar testes com várias composições básicas de meios de cultura combinados com reguladores de crescimento, concluiu que o enraizamento é estimulado com a presença de AIA (ácido indolacético), e ainda que a presença de cinetina é importante para diferenciação de gemas e partes aéreas nas duas espécies.

GRATTAPAGLIA et al. (1988) afirmam que a organogênese direta é facilmente induzida em entre-nós e segmentos de gavinha de maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), em meios MS em presença de BAP (6-benzilaminopurina), e as gemas regeneradas podem ser utilizadas em seguida para multiplicação de plantas. E nestes casos, a fidelidade genética geralmente é bastante alta (WRIGHT e ALDERSON, 1980).

A regeneração de plantas de várias espécies de passifloráceas, foi estudada por SCORZA e JANICK (1978), que verificaram inicialmente que a citocinina BAP em combinação com o ANA (ácido naftalenoacético), estimulou a formação de partes aéreas em discos foliares e segmentos entrenodais, no caso de *Passiflora suberosa*, e o florescimento *in vitro*. Contudo, estudos posteriores destes mesmos autores, comprovaram que a citocinina exógena sozinha foi fundamental para a indução de organogênese. Foi bastante evidente que a formação de partes aéreas foi dependente de altas concentrações de BAP, enquanto que o florescimento foi maior na presença de baixas concentrações desta citocinina. As observações anatômicas indicaram que o BAP, apresentava efeito organogenético sobre os segmentos entrenodais, durante o estágio celular inicial de proliferação quando as zonas meristemáticas organizadas ainda estavam ausentes. Com isto, concluíram que há necessidade de apenas um dia de exposição ao BAP, possibilitando a regeneração das partes aéreas.

NAKAYAMA (1966) estudou a espécie ornamental *P. caerulea*, em trabalhos de cultura de tecidos, onde comprovou a dependência desta planta de cinetina para diferenciação de gemas. Novos clones foram regenerados a partir de segmentos do pecíolo por KLIMASZEWSKA (1981). MURALIDHAR e MEHTA (1982), afirmaram a possibilidade de propagação clonal desta espécie ornamental, na qual HAKKART e VERSLESYS (1981), empregaram a cultura meristemática para eliminar uma virose considerada latente. Esta mesma espécie de *Passiflora* também foi utilizada como sistema biológico para pesquisar mudanças dos níveis de poliaminas durante a indução de calo e a regeneração de partes aéreas e raízes em discos foliares *in vitro*

(DESAI e MEHTA, 1985).

De acordo com SÃO JOSÉ (1991), a cultura de tecidos é uma técnica com ampla aplicabilidade em fruticultura, principalmente no que diz respeito às técnicas de limpeza e propagação clonal. Isto se deve ao fato de que a maioria das espécies frutíferas propagadas assexuadamente, podem estar infectadas com uma ou mais viroses, ocasionando uma redução significativa na produtividade e na qualidade de seus produtos. Portanto, o processo de recuperação e estabelecimento de plantas livres de patógenos é muito importante, o que é feito via propagação clonal.

Apesar de vários autores destacarem o elemento potencial morfogenético das espécies de *Passiflora*, como de grande utilidade para a propagação vegetativa de plantas selecionadas, até hoje ainda não existem resultados concretos em termos de eficiência dos processos de multiplicação *in vitro*. Mesmo assim, várias etapas são necessárias para que a micropropagação de clones selecionados de maracujazeiro seja mais uma alternativa interessante, deixando de ser apenas objeto de estudo tornando-se uma necessidade. Isto será possível, a partir do momento em que haja material selecionado de clones superiores auto-compatíveis ou de compatibilidade cruzada. Por hora, uma vez que viroses e micoplasmas do maracujazeiro, mesmo sendo responsáveis por perdas apreciáveis em algumas regiões do país (KITAJIMA et al., 1986), não são transmitidas pelas sementes, a limpeza clonal via cultura de meristema não se faz necessária.

TSAY et al. (1984) realizaram experimentos para recuperar plantas haplóides partindo da cultura de anteras de híbridos superiores, onde observaram a formação de calo e eventualmente regeneração do sistema de raízes, mas não

conseguiram obter novas plantas.

SÃO JOSÉ (1991) cita que o grau de auto-incompatibilidade em *Passiflora edulis* normalmente é muito alto, isto dificulta ou pode até mesmo ser impossível obter linhagens homozigotas por sucessivas autofecundações, explicando as tentativas de obtenção destas linhagens de modo instantâneo empregando a cultura de anteras. Então, entre a população de plantas regeneradas, deve-se procurar selecionar aquelas que são homozigóticas para o alelo de autocompatibilidade e ainda devem demonstrar uma grande capacidade de combinação para produção de híbridos. Estes híbridos autocompatíveis, proporcionariam ao plantio comercial uma alta uniformidade, além de reproduzir parcial ou totalmente o genótipo superior do híbrido original empregado na cultura de anteras.

Tanto o maracujá amarelo quanto o roxo cultivados, ainda são espécies em domesticação, tendo uma grande variabilidade genética em vários caracteres economicamente importantes, e que ainda podem ser muito explorados.

#### 2.3.1.1 Desinfestação

A maior dificuldade desta etapa está em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado. Por isto são determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso desta fase do trabalho, principalmente no que se refere aos microorganismos endógenos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Os componentes do meio de cultura, bem como as condições físicas nas quais os explantes são incubados, formam um ambiente que favorece a proliferação de microorganismos, principalmente bactérias e fungos, os quais podem destruir totalmente as culturas (MROGINSKI e ROCA, 1991).

Os mesmos autores também afirmam que, evitar as contaminações com microorganismos é um dos aspectos fundamentais para que as culturas *in vitro* sejam bem sucedidas. Raramente consegue-se obter culturas totalmente estéreis, por causa disto deve-se descontaminar os explantes sem provocar injúrias aos tecidos.

Existem várias substâncias com ação germicida que podem ser aplicadas para desinfestar os explantes, como o cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio, merthiolate, isopropanol, nitrato de prata e o etanol, bem como os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio, que normalmente são os produtos mais usados (YEOMAN e MACLEOD, 1977; SWEET e BOLTON, 1979; GEORGE e SHERRINGTON, 1984; MOORE, 1986; MUDGE, 1986; VILLALOBOS e THORPE, 1991).

Geralmente o etanol é aplicado a 70% ou 80%, isto porque concentrações maiores são menos eficientes e ainda podem desidratar rapidamente os tecidos. O etanol acidificado (70% para pH 2,0), apesar de ser mais efetivo na desinfestação, é pouquíssimo utilizado por causa do seu efeito corrosivo em instrumentos metálicos (DODDS e ROBERTS, 1985). A ação do etanol nos tecidos não é apenas germicida, também é um surfactante cuja aplicação auxilia a ação de outros produtos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Dependendo da consistência dos tecidos, o tempo de exposição dos explantes aos germicidas varia muito. Normalmente não passa de algumas dezenas de segundos (BURGER et al., 1985; FREY e JANICK, 1991; OTONI e TEIXEIRA, 1991; FREY et al., 1992; NATHAN et al., 1992), mas quando se trata de sementes com tegumento lenhoso, pode chegar até alguns minutos (HAKMAN et al., 1985; LU e THORPE, 1987; VON ARNOLD e ERIKSSON, 1991).

Geralmente o cloro é muito utilizado na forma de hipoclorito de sódio, por ser facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária. Contudo, a variação na concentração de cloro ativo entre as diversas marcas comerciais é inconveniente, além da alteração normal que ocorre durante o tempo e condições de armazenagem (LEIFERT et al., 1991).

Normalmente, acrescenta-se algum tipo de tensoativo nas soluções à base de cloro, proporcionando melhor contato com a superfície dos tecidos. O produto mais usado é o Tween-20 nas concentrações de 0,01 a 0,1%, sendo possível substituí-lo por detergentes normais de cozinha. Na desinfestação dos explantes, quando o etanol é aplicado inicialmente não há necessidade de utilizar tensoativos, mas a agitação (80 a 150 rpm) dos explantes na solução germicida é bastante conveniente (MROGINSKI e ROCA, 1991).

A concentração das soluções desinfestantes varia muito, bem como a combinação dos ingredientes ativos e germicidas e tempo de exposição. Isto depende da consistência do tecido a ser desinfestado, logo a concentração da solução e o tempo de exposição devem ser executados de modo inversamente proporcional (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Os mesmos autores também afirmam que após a desinfestação, deve ser feita a lavagem com água destilada ou deionizada e autoclavada, sucessivamente. Esta fase do trabalho deve ser executada com muito cuidado, uma vez que a permanência de resíduos de cloro pode ser prejudicial aos tecidos comprometendo seu desenvolvimento.

Estes tratamentos com agentes desinfestantes, promovem a esterilização apenas dos tecidos que entram em contato com o produto. Portanto, estes procedimentos só obtêm sucesso, se os tecidos internos não forem prejudicados com sua ação e que não estejam contaminados (LEIFERT et al., 1991).

Quando o material a ser desinfestado apresenta superfícies muito irregulares, como reentrâncias em tegumentos de sementes ou grande quantidade de pêlos superficiais ou mucilagem, algumas medidas podem ser tomadas para permitir uma completa exposição dos tecidos e a não formação de bolhas de ar ao longo do material. Durante a imersão nas soluções, pode-se promover a agitação com agitadores horizontais ou magnéticos (FLANCLET e BOULAY, 1982).

#### 2.3.1.2 Estabelecimento da cultura

A cultura de sementes *in vitro*, possibilita a obtenção de explantes que apresentam excelente estado fitossanitário e fisiológico, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica (HU e WANG, 1983).

Ápices e gemas laterais isolados de plântulas germinadas em condições assépticas, embriões ou tecidos da semente são também utilizados como explantes iniciais na micropropagação. A grande disponibilidade de explantes sem contaminação, e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de reguladores de crescimento dos tecidos juvenis permitem a condução de inúmeros testes de meios nutritivos e condições ambientais de cultura. A variabilidade ao nível de genótipo e as diferenças fisiológicas entre os tecidos de uma plântula e de um meristema isolado de tecido menos juvenil limitam, contudo, a eficiência desta estratégia (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

O isolamento dos explantes deve ser realizado em câmara de fluxo laminar ou câmara asséptica. A manipulação do explante nesta primeira fase determina, em parte, sua sobrevivência e posterior desenvolvimento. Os principais cuidados a serem tomados dizem respeito à desidratação dos tecidos (HU e WANG, 1983).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura *in vitro* (CALDAS et al., 1990). A manipulação do balanço entre elas controla a morfogênese nos tecidos vegetais, conforme foi observado por (SKOOG e MILLER, 1957) em seu clássico trabalho com fumo.

O ácido indolbutírico (AIB) é a auxina mais eficiente na indução da formação de raízes nas culturas (DOODS e ROBERTS, 1985).

As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina, a BAP, a zeatina e a 2iP (Isopenteniladenina), sendo apenas as duas últimas citocininas naturais e possuem emprego limitado nos laboratórios comerciais, devido ao seu alto custo (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

### 2.3.1.3 Multiplicação e alongamento

As citocininas constituem o grupo de reguladores de crescimento indispensável para a quebra de dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares. O tipo de citocinina e a concentração influenciam de forma decisiva o sucesso da multiplicação *in vitro*. ZAERR e MAPES (1985) afirmaram que BAP é a citocinina mais potente para promover a proliferação das partes aéreas e economicamente melhores por ser a mais barata de todas. HU e WANG (1983) levantaram a frequência de utilização de cada citocinina em meios de isolamento para cerca de 100 espécies, e verificaram que a BAP é utilizada em 68% dos meios, a cinetina em 23% e a 2ip, zeatina e SD8339 em 9%.

O meio nutritivo contém, além de uma citocinina, uma baixa concentração de auxina. O ANA e o AIB são as auxinas mais frequentemente usadas (CHALUPA, 1987). A adição da auxina a um meio nutritivo sempre estimulou o crescimento das brotações axilares e o alongamento da parte aérea. A concentração de auxina usada em muitos meios nutritivos é baixa (0,02 a 0,10 mg.L<sup>-1</sup>). Embora o principal objetivo da fase de multiplicação é o de produzir o maior número possível de plantas no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos igualmente importantes devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. Outro aspecto essencial é a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas, o que vai determinar, em grande parte o sucesso da fase seguinte de enraizamento.

#### 2.3.1.4 Enraizamento

O objetivo desta etapa da micropropagação é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo assim, o posterior transplante para condições *ex vitro*.

O enraizamento nas espécies herbáceas geralmente é fácil. Quando esta etapa é realizada *in vitro*, as raízes são regeneradas em condições assépticas, onde a plântula inteira é transplantada.

Diluições das formulações básicas, utilizadas para multiplicação, têm na maioria das vezes, possibilitado melhor enraizamento. Diluições de 1/2, 1/3, 1/4 da concentração salina do meio MS são freqüentes nesta fase (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Diversas auxinas, sozinhas ou em combinações podem ser utilizadas no enraizamento. As concentrações variam conforme as espécies e o clone. As mais comumente usadas são o AIB, ANA e AIA (HU e WANG, 1983).

A rizogênese pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, e normalmente leva de uma a três semanas. Enquanto as duas primeiras fases, que às vezes são consideradas como se fossem uma só, respondem ou dependem de auxina, o crescimento e alongamento das raízes é inibido pela presença de auxina. A dificuldade num sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro*, na qual todas estas fases possam ocorrer normalmente e de preferência sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

### 2.3.1.5 Transplântio e aclimatação de mudas

A etapa de transplântio envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para a casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimatação e lignificação. Esta passagem é bastante crítica e, representa em alguns casos um fator limitante do processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

As plântulas obtidas *in vitro* apresentam uma série de deficiências anatmicas que dificultam o controle da transpiração, permitindo uma rápida perda de gua. Os estômatos são pouco funcionais e, respondem muito lentamente ao estresse hídrico e, a camada de cera protetora sobre as folhas  mínima ou inexistente, a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes ainda  precária para permitir um fluxo transpiratrio adequado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). As folhas obtidas *in vitro*, normalmente apresentam menos tecido paliçádico e mais tecido lacunoso, comparadas com folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação ou no campo (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1981; DONNELLY e VIDAVER, 1984), tendo também menor ocorrência de estrias cuticulares (PAULA, 1992). Além disso, a planta passa do estado heterotrófico para o estado autotrófico e, ainda sai das condições assépticas estando sujeita ao ataque de microorganismos.

Existem relativamente poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplântio e aclimatação, as dificuldades e as soluções encontradas durante este processo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). A manutenção de uma umidade relativa alta, desde a retirada das plantas do meio de cultura até se verificar a retomada do crescimento da planta, é um fator chave para sua sobrevivência até a

correção destas deficiências. A planta terá que se adaptar a uma umidade relativa mais baixa, além de maior luminosidade e temperatura variáveis.

DEBERGH e MAENE (1981) notaram que a parte do sistema de raízes formada *in vitro* é pouco ou não é funcional depois do transplântio, havendo necessidade de ser substituída por outra. O xilema acaba formando um sistema fechado na base das brotações, antes do desenvolvimento dos tecidos das raízes. Depois do enraizamento, as ligações vasculares entre os sistemas caulinar e de raízes, continuam mal formados até chegar a terceira semana do transplântio (ZIMMERMAN, 1988).

#### 2.3.1.6 Meio de cultura e condições de crescimento

Os autores GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), afirmaram que o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suas diluições e modificações tem apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, podem ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas inteiras, quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às

necessidades específicas *in vitro*. Também vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. O acréscimo de reguladores de crescimento, tem como principal objetivo, suprir as prováveis carências das quantidades hormonais endógenas nos explantes que foram isolados das regiões produtoras na planta-mãe. Ao mesmo tempo, este acréscimo estimula uma resposta como crescimento, alongamento ou multiplicação da parte aérea, mas isto depende diretamente do estado fisiológico dos explantes, bem como época do ano e estado geral da planta-mãe (ALTMAN e GOREN, 1977).

Dependendo do tipo de explante isolado, a adição de citocininas não é apenas favorável como necessária. Entre as citocininas disponíveis comercialmente, a BAP é a que geralmente apresenta os melhores resultados. As concentrações variam muito, pois isto depende do tipo e da espécie de explante, normalmente, meios contendo cerca de 0,05 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP têm sido empregados com excelentes resultados no cultivo de ápices caulinares de diversas espécies lenhosas e herbáceas (SÃO JOSÉ et al., 1994).

A adenina é muito utilizada nos meios de cultura, apresentando efeito semelhante ao de uma citocinina (CALDAS et al., 1990). Seu modo de ação ainda é desconhecido, mas na revisão feita por GEORGE e SHERRINGTON (1984), foi sugerida a hipótese de que este composto poderia servir como um substrato alternativo, ou fonte de nitrogênio reduzido, para a biossíntese natural de citocininas, que seriam mais efetivas em causar uma determinada resposta fisiológica, do que as citoconinas adicionadas ao meio.

O acréscimo de auxinas é necessário para suplementar a quantidade endógena sintetizada nas gemas. Segundo SMITH e MURASHIGE (1970), foi notado que as zonas produtoras de auxinas não são os meristemas propriamente ditos, mas sim os primórdios foliares e folhas em crescimento. Isto explica o motivo da presença da *auxina ser primordial* quando gemas maiores ou microestacas são utilizadas no cultivo, apresentando efeito na indução ao sistema de raízes.

A solidificação ou semi-solidificação dos meios de cultivo é obtida com a adição de ágar, que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas. A consistência do meio de cultura, depende da concentração do ágar utilizada, do pH, da concentração de sais e da presença de substâncias que interferem na gelatinização, como o carvão ativado (CALDAS et al.,1990). Apesar de ser amplamente utilizado nos meios de cultura, o ágar apresenta várias impurezas que podem interferir nos cultivos, sendo os efeitos de tais substâncias desconhecidos (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Os estádios da micropropagação, também são influenciados por fatores físicos como temperatura, umidade, intensidade luminosa e fotoperíodo além do meio de cultura (GEORGE e SHERINGTON, 1984).

A faixa ideal de temperatura, para o desenvolvimento da maioria das espécies de regiões temperadas encontra-se entre 20 e 28°C (FIORINO e LORETI, 1987). Temperaturas superiores a 30°C são desfavoráveis não apenas para as plantas, como também porque aumentam a evaporação de água no meio, tornando-o mais concentrado, podendo resultar numa toxidez (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Em alguns casos flutuações na temperatura diária, variando de 6 a 8°C, podem ser desfavoráveis, se a temperatura for mais alta durante o período de luz. Também é importante ressaltar, que cada espécie vegetal necessita de temperatura ótima para crescimento. Por causa disso, eventualmente o crescimento de algumas espécies pode ser prejudicado, quando diversas espécies estão sendo cultivadas numa única sala, inevitavelmente estarão sujeitas à mesma temperatura (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Os mesmos autores, afirmam que para as plantas realizarem dois processos fundamentais, dependem diretamente da luz, e são a fotossíntese e a fotomorfogênese. A fotossíntese de plantas mantidas *in vitro* é muito pequena, tornando-as dependentes de uma fonte externa de sacarose. Isto explica a maior importância da luz, pelo seu efeito sobre a morfogênese. O comprimento de onda, a densidade do fluxo e o fotoperíodo são as características da luz que mais influem no processo de morfogênese. Esta influência pode ocorrer diretamente sobre as culturas, ou indiretamente, manifestando-se nas culturas subsequentes (ECONOMOU e READ, 1987).

Eventualmente, a luz pode inibir o início das divisões celulares dos explantes *in vitro*, bem como do desenvolvimento de calos. Mas para o desenvolvimento de tecidos organizados, geralmente a exposição à luz é necessária (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Para a maior parte das espécies a incubação com intensidades luminosas de 20 a 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  é suficiente. A luz é fornecida por lâmpadas fluorescentes dos

tipos branca-fria ou grolux, ou até mesmo combinando as duas, proporcionando um espectro luminoso mais amplo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Normalmente, empregava-se o lux para expressar a densidade do fluxo luminoso que incide sobre uma superfície. Também pode ser expressa por lúmem por metro quadrado ( $\text{lu.m}^{-2}$ ). Para fazer a conversão das unidades de lux para densidades de fluxo de fótons ( $\mu \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) basta dividir o valor de lux por 83 para a luz incandescente, por 80 para a luz branca fria e por 59 para a grolux (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

As espécies vegetais, bem como os tipos de explantes empregados, respondem de modo diferente ao fotoperíodo (ECONOMOU e READ, 1987). Contudo, um fotoperíodo com dias longos, geralmente de 16 horas de luz (FITCHET, 1987), é normalmente utilizado para evitar a indução de dormência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Além de influenciar o desenvolvimento da parte aérea, a luminosidade também afeta o processo da rizogênese. A formação das raízes e de brotações, pode ser diretamente influenciada pela densidade luminosa, ou indiretamente dependendo da condição em que os cultivos estão sendo submetidos (ECONOMOU e READ, 1987).

## 2.3.2 Estaquia

### 2.3.2.1 Bases anatômicas e fisiológicas da propagação por estaquia

Na propagação por estacas, uma parte do talo, da raiz ou da folha é separada da planta mãe e, colocada em condições ambientais favoráveis e induzidas a formar raízes e talos, produzindo assim uma nova planta independente que é idêntica à planta da qual tem procedência. Em estacas de ramos, são obtidos segmentos contendo gemas apicais e laterais com o objetivo de serem colocadas em condições adequadas para enraizamento (HARTMANN et al., 1990).

A utilização de estacas semi-lenhosas, é uma técnica muito empregada para propagar espécies frutíferas de clima temperado, cujas raízes formadas são denominadas adventícias, uma vez que não tem origem embrionária (FACHINELLO, et al., 1994).

Na propagação por meio de estacas de caule, é necessário que se forme apenas um novo sistema de raiz adventícia, desde que exista um sistema potencial de brotos, ou seja, uma gema. Esta capacidade regenerativa de toda a estrutura da planta, uma propriedade de praticamente todas as células vivas das mesmas, é notada em vários sistemas de células e tecidos e, esta capacidade depende de duas características celulares fundamentais das plantas. Uma é a totipotência, que significa que cada célula viva da planta contém a informação genética necessária para reconstituir todas as partes e funções da planta. A outra é a dediferenciação, que é a capacidade celular previamente desenvolvida e diferenciada, de retornar à condição

meristemática e desenvolver um novo ponto de crescimento. Como estas características são mais pronunciadas em algumas células e partes da planta do que em outras, o propagador deve fazer algumas manipulações oferecendo condições apropriadas para regeneração da planta (HARTMANN et al., 1990).

Normalmente, forma-se um calo na extremidade basal da estaca quando colocada em condições ambientais que favorecem o enraizamento, apresentando-se como uma massa irregular de células parênquimatosas com vários estádios de lignificação. O crescimento do calo parte de células da base da estaca na região do câmbio vascular, apesar de que células do córtex e da medula também podem contribuir para a sua formação. É muito comum que as raízes apareçam a partir do calo e, isto leva a crer que a formação do mesmo é fundamental para o sistema de raízes, apesar disto, ambos apresentam processos independentes, mesmo que envolvam divisão celular; o fato de ocorrerem simultaneamente deve-se à sua dependência de condições internas e ambientais semelhantes (HARTMANN et al., 1990).

REINES e McALPINE (1959), HEAMANS e OWENS (1972), BRUTSCH (1977), BLAZICH e HESEN (1979), afirmaram que o calo cicatricial é essencialmente um tecido que resulta da ação das auxinas endógenas, as quais, apresentam interação com as condições ambientais determinadas para o enraizamento, e estas condições para a formação e desenvolvimento de ambos são muito similares.

De acordo com GIROUARD (1969), KOMISSAROV (1969) e HEAMANS e OWENS (1972), morfológicamente o calo é resposta de atividade extra cambial, apesar de haver participação celular de tecidos vivos, tais como o colênquima, o parênquima

cortical, o felogênio, os parênquimas axial e radial do xilema e floema secundários. Da desdiferenciação destes tecidos e da atividade extra cambial, resulta uma grande massa disforme de parênquima caloso e nesta podem ser encontrados vários conjuntos de traqueóides curtos, mas sem a presença de elementos do vaso lenhoso, envolvidos por câmbios locais. KOMISSAROV (1969) afirmou que em seguida, a estaca forma um sistema vascular o qual é ligado ao tecido caloso por meio de cordões irregulares de traqueóides, câmbio e floema, que se formam por desdiferenciação direcional das células parenquimáticas do calo.

Em algumas espécies a formação do calo é, ao que tudo indica, um precursor da formação de raízes adventícias e, o surgimento de raízes adventícias a partir do tecido do calo, tem sido associada a espécies de difícil enraizamento (HILLER, 1951; DAVIES et al.1982;).

Conforme HARTMANN et al. (1990), o processo de desenvolvimento do sistema de raízes adventícias em estacas caulinares pode ser dividido em três fases: iniciação de grupos de células meristemáticas; diferenciação destes grupos celulares em primórdios de raízes reconhecíveis; desenvolvimento e emergência de raízes novas, incluindo a ruptura de outros tecidos do caule e formação de conexões vasculares com os tecidos condutores da estaca. Na maioria das plantas a formação das raízes só ocorre depois que tenha sido feita a estaca. No caso de estacas caulinares, a origem da maior parte das raízes adventícias encontra-se nos grupos celulares que tem capacidade de retornar à condição meristemática.

CLINE e NEELY (1983) observaram que quando uma estaca é preparada, as células vivas na superfície do corte são expostas e ocorre uma resposta de

cicatrização do ferimento. Este processo de regeneração das raízes ocorre em três fases. Logo se forma uma camada necrosada como resultado das células externas mortas, fechando o ferimento com um material muito parecido com a cortiça (suberina), bloqueando o xilema com resina. Esta camada auxilia na proteção da superfície do corte contra dessecação e patógenos. Atrás desta camada, as células vivas dividem-se depois de alguns dias e uma camada de células parenquimatosas (calo) forma uma periderme de ferimento. Algumas células próximas ao câmbio vascular e floema dividem-se e iniciam raízes adventícias.

Existem quatro fases das mudanças que ocorrem no desenvolvimento anatômico na formação das raízes adventícias: desdiferenciação de células diferenciadas específicas; formação de primórdios de raízes a partir de determinadas células próximas aos feixes vasculares, que se tornaram meristemáticos por desdiferenciação; desenvolvimento posterior destes primórdios de raízes em primórdios organizados de raízes; crescimento e emergência dos primórdios de raízes para fora através de outro tecido do ramo, além da formação da conexão vascular entre o primórdio da raiz e os tecidos vasculares da própria estaca (GIROUARD, 1969).

As auxinas exercem sua função na diferenciação celular para a formar o calo na extremidade basal da estaca (BLEASDALE, 1984). De acordo com WEAVER (1972), a diferenciação meristemática num primórdio de raiz é a primeira fase para formar raízes adventícias. Conforme SKOOG e TSUI (1951), o modelo de diferenciação produzido num meristema será influenciado pela proporção entre auxina e citocinina e ainda entre outras substâncias, como a adenina, que promove divisão celular. Quando a quantidade de auxina é elevada em relação à citocinina ou à adenina, formam-se

primórdios de raízes, quando é intermediária, só ocorre formação de calo, e, quando é baixa não ocorre formação de calo nem enraizamento, somente gemas foliares.

Nas plantas herbáceas, as raízes adventícias normalmente originam-se externamente aos feixes e entre os feixes vasculares, mas os tecidos envolvidos no local de origem podem variar muito, e isto depende do tipo da planta (PRIESTLEY e SWINGLE, 1929).

As estações do ano influenciam muito a formação de raízes adventícias, principalmente devido à existência de inibidores endógenos (NANDA, 1968; ELIASSON, 1969; GIROUARD, 1969, PATON, 1970; ROBERTS e FUCHIGAMI, 1973).

HARTMANN et al. (1990) afirmaram que o enraizamento relaciona-se diretamente com o estado fisiológico da planta mãe e a lignificação dos ramos quando são coletados. Normalmente são observadas diferenças anuais no enraizamento por causa das mudanças que ocorrem nestes aspectos de um ano para outro (TRIONE et al., 1963).

BLOCH (1943) relatou que em estacas de ramos os brotos formam-se na extremidade distal, que é a região mais próxima do ápice do broto, e raízes na extremidade proximal, esta região é mais próxima da coroa ou junção do broto com o sistema de raízes. Foi demonstrado por VÖCHTING (1978) citado por HARTMANN (1990), que os tecidos dos ramos são fortemente polarizados, e esta propriedade pode ser atribuída aos componentes celulares individuais, pois não importava a proporção da estaca, a regeneração foi consistentemente polar.

De acordo com SILVA (1985), a polaridade é causada pela produção de algumas substâncias reguladoras de crescimento, estas por sua vez, quando se

movimentam numa direção determinada, concentram-se e promovem o crescimento do calo e das raízes. Estes efeitos, são observados tanto em plantas de fácil como de difícil propagação por meio de estaquia.

Quando segmentos do tecido são cortados, a unidade fisiológica é afetada e, isto deve causar a redistribuição de alguma substância, provavelmente da auxina, sendo responsável pelas diferentes respostas notadas nas superfícies adjacentes. A correlação da polaridade da iniciação do sistema de raízes com o movimento auxínico tem sido observada em vários experimentos (THIMANN, 1935; SKOOG e TSUI, 1948; WARMKE e WARMKE, 1950; MAINI, 1968; ROBINSON e SCHWABE, 1977). Sabe-se também, que a polaridade no transporte da auxina varia em intensidade em tecidos diferentes. O movimento polar das auxinas é um processo de transporte ativo e aparentemente é uma atividade secretora, que ocorre nas células parenquimatosas do floema (LEOPOLD, 1964).

A presença foliar nas estacas é primordial, uma vez que exercem grande influência estimuladora na iniciação do sistema de raízes, isto é devido ao fato, de produzirem carboidratos que resultam da atividade fotossintética (HARTMANN et al., 1990).

#### 2.3.2.2 Técnicas e tratamento das estacas

Geralmente, estacas de madeira semilenhosa são obtidas de plantas perenifólias ou caducifólias, onde os ramos do ano são coletadas durante os meses de

verão, imediatamente após um período de crescimento com madeira parcialmente lignificada, sendo que muitas espécies frutíferas tem sido propagadas desta forma. As estacas são feitas com cerca de 7 a 15 cm de altura, deixando folhas na extremidade superior e removendo as da parte inferior. Frequentemente são usadas as extremidades terminais dos ramos para fazer as estacas, mas as porções basais dos ramos também podem ser induzidas ao enraizamento. É necessário que as estacas de madeira semi-lenhosa com folhas sejam colocadas para enraizamento em condições que reduzam ao mínimo a perda de água pelas folhas. Nas propagações comerciais é comum colocá-las sob nebulização. O calor e os tratamentos feitos com reguladores de crescimento também são benéficos, bem com o tipo de substrato empregado (HARTMANN et al., 1990).

Quando é dado à planta algum tratamento hormonal, os resultados dependem diretamente da condição fisiológica da estaca e do balanço entre as substâncias aplicadas e as que estão naturalmente nas plantas (TIZIO et al., 1963).

Algumas concentrações de determinadas substâncias que ocorrem naturalmente, têm propriedades hormonais sendo mais benéficas que outras. Distinguindo entre hormônios e reguladores de crescimento das plantas, é possível afirmar que todos os hormônios regulam o crescimento, mas nem todos os reguladores de crescimento são hormônios. Existem várias classes destas substâncias, entre elas as auxinas, citocininas, giberelinas e etileno. Destas, as auxinas são as que apresentam maior efeito na formação do sistema de raízes. Ainda existem outras substâncias que ocorrem naturalmente e, não estão bem definidos, provavelmente também participam da formação do sistema de raiz adventícia (KRUL, 1968).

Foi relatado por BHATTACHARYA et al. (1985), que etanol, metanol e acetona são largamente utilizados na extração de reguladores de enraizamento das plantas, mencionando a importância do etanol bem como de outros ácidos alifáticos no crescimento e senescência das mesmas.

Após o tratamento ter sido feito nas estacas, é muito importante a escolha de um meio ou substrato de enraizamento adequado, que proporcione um bom desenvolvimento das mesmas e, geralmente os experimentos são conduzidos em casa de vegetação.

De acordo com HARTMANN et al. (1990), este meio de enraizamento deve desempenhar três funções: fornecer boa sustentação no local durante o experimento; fornecer boa umidade às estacas; e dar uma boa aeração à base das estacas.

O substrato adequado para enraizamento foi definido por COUVILLON (1988), como aquele que retém quantidade suficiente de água evitando o murchamento permanente da estaca e, quando saturado, apresenta porosidade o bastante para aeração das mesmas.

Foi relatado por HARTMANN et al. (1990), que o ferimento permite maior absorção de água e de reguladores de crescimento.

Conforme SMITH (1936) e HANSEN e NYMANN (1974), as condições ambientais proporcionadas para o enraizamento, ou mesmo empregadas como forma de pré-tratamento das estacas, também são responsáveis em determinar maior ou menor porcentagem de raízes formadas, tais como temperaturas amenas e fotoperíodos longos ou curtos, dependendo da espécie.

A umidade do substrato deve ser mantida para evitar a redução de perdas por evapotranspiração. HARTMANN et al. (1990), notaram que a manutenção de alta umidade do ar também favorece as estacas, pelo fato de reduzir significativamente a transpiração foliar. Apesar da presença das folhas ser importante como estímulo para a formação do sistema de raízes, isto pode diminuir o teor de água nas estacas de tal maneira que pode provocar a morte das plantas antes de enraizarem. Os sistemas de propagação devem proporcionar o seguinte: manutenção de atmosfera com baixa demanda de evaporação, reduzindo perdas de água pela transpiração e evitando com isso grandes déficits hídricos; manutenção de temperaturas adequadas para metabolizar a regeneração necessária na base da estaca; e manutenção de níveis luminosos adequados para realização da fotossíntese e produção de carboidratos.

KOMISSAROV (1969) notou que a temperatura para o enraizamento das estacas difere dependendo da necessidade de cada espécie, da época de propagação, do nível de lignificação das estacas, bem como das condições climáticas do local.

HARTMANN et al. (1990) observaram que temperaturas mais adequadas para o enraizamento da maioria das plantas estão entre 21°C e 27°C durante o dia, e cerca de 15°C durante a noite, mesmo que algumas espécies enraízem melhor em condições de temperaturas mais baixas.

Quanto à luz HARTMANN et al. (1990), indicam que a ausência de luminosidade é benéfica para a iniciação dos primórdios de raízes. KOMISSAROV (1969) afirmou que a intensidade luminosa a ser utilizada para o enraizamento das estacas depende do grau de lignificação das mesmas e de suas reservas nutricionais,

sendo necessária maior intensidade para as estacas pouco lignificadas.

AVERY e JOHNSON (1947) afirmam que são muitas as substâncias que atuam induzindo a formação de raízes adventícias e, a maioria do grupo das auxinas, como o AIB, o ANA (ácido naftaleno acético) e o AIA (ácido indol acético).

Normalmente, o AIB é a substância que geralmente produz melhores resultados, logo em seguida vem o ANA e o AIA de acordo com (WEAVER, 1972; BLEASDALE, 1984; SALISBURY e ROSS, 1985 e JARVIS, 1986). AUDUS (1963) afirmou que estes resultados são devidos à maior estabilidade química e menor mobilidade do AIB na estaca.

Foi observado por CHAPMAN e HUSSEY (1980), que o AIB é preferido pela vantagem de ser um produto de baixa toxicidade, o que permite uma variedade muito grande de concentrações, além de sua eficácia em estimular o enraizamento em diversas espécies, mesmo tendo uma atividade auxínica mais fraca, pois é degradado pelas plantas lentamente.

HARTMANN et al. (1990) notaram que aplicações exógenas de auxina proporcionam maior percentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento e, a ação de reguladores de crescimento para indução ao sistema de raízes varia de acordo com a espécie e com a cultivar. Por isto, algumas espécies enraízam bem melhor com sua aplicação, enquanto outras respondem fracamente ou ainda adversamente (CHRISTOPHER, 1958).

O regulador de crescimento AIB, está envolvido em muitas atividades na planta como desenvolvimento caulinar, ativação de células cambiais e formação de raízes adventícias (WENT, 1934; LAIBACH e FISCHNICH, 1935; THIMANN, 1935;

KRAUS, et al., 1936; citados por HARTMANN, 1990).

Pela técnica de imersão, a auxina é diluída em álcool e, as extremidades basais das estacas são imersas nesta solução apenas por pouco tempo, logo em seguida são colocadas para enraizar. Este método apresenta muitas vantagens sobre outros, uma vez que não há necessidade de muitos equipamentos para mergulhar as estacas. Além disto, é possível obter melhores resultados, uma vez que a absorção da solução das estacas não é afetada por outros fatores no ambiente. A mesma solução pode ser usada repetidamente em milhares de estacas, mas devem ser muito bem fechadas por causa da evaporação alcoólica e, é evidente que isto muda a concentração da solução. É recomendável que seja usada apenas uma parte da solução de cada vez, devido à necessidade de uso imediato e, sempre descartar o restante e nunca acrescentá-la à solução original. Deve-se procurar sempre utilizar soluções recém preparadas, já que em poucos dias perdem seu efeito e assim evita a contaminação. Uma das várias aplicações práticas da fisiologia das auxinas, é de promover a iniciação ao sistema de raízes nas estacas, como já foi comprovado em vários experimentos, formando um dos grupos de substâncias reguladoras de crescimento das plantas, que apresentam uma das maiores intervenções na regeneração de órgãos (HARTMANN et al., 1990).

### 2.3.2.3 Propagação por estaquia do maracujazeiro

SÃO JOSÉ et al. (1994) afirmaram que a propagação vegetativa realizada por meio de métodos de enxertia e estaquia proporcionam boas expectativas no cultivo de maracujazeiro no Brasil, principalmente no que diz respeito à vida útil desta cultura que está diminuindo nos últimos anos devido a problemas fitossanitários, especialmente em relação aos patógenos fúngicos do solo e outros de origem desconhecida. Este tipo de propagação assexuada também pode ser justificada por ser muito comum a existência de plantas, dentro de um mesmo pomar, altamente produtivas e outras com produtividade baixa. Portanto, as plantas matrizes selecionadas devem apresentar características desejáveis como alta produção, teores elevados de suco e brix, entre outros, que poderão ser reproduzidas por mudas clonadas. Esta técnica tem sido aplicada em maracujazeiros para multiplicação de plantas matrizes (clonagem) perpetuando características especiais.

A melhor época para realizar estaquia é quando a planta se encontra em crescimento ativo, mas sem estar produzindo frutos (AKAMINE et al., 1954). FEICHTINBER JUNIOR (1985) afirmou que a melhor época do ano para fazer estaquia é a que vai de agosto à setembro, coincidindo com o início de brotação de primavera. A melhor época de estaquia é o início da brotação de primavera (RUGGIERO e MARTINS, 1987).

Em escala comercial as mudas são formadas, no Brasil e em muitos países produtores, por meio de sementes (via sexuada). Sem fornecedores comerciais, a maioria dos produtores as retiram de plantas de seus próprios pomares, a baixo

custo, sem os critérios de seleção que poderiam elevar a produtividade (MELETTI e NAGAI, 1992). As mudas também podem ser obtidas por via vegetativa por meio de enxertia e estaquia (SÃO JOSÉ e NAKAGAWA, 1988).

CEREDA e PAPA (1989) afirmam que a vida assexual encurta a fase juvenil da planta, antecipando a produção. Como a vida útil do maracujazeiro está se reduzindo a cada ano, a precocidade conferida pela estaquia seria fundamental para se obter boas produtividades.

GACHANJA (1975) notou que como o enraizamento das estacas depende muito das condições ambientais, época do ano e escolha das mesmas, normalmente, não apresentam enraizamento regular, e isto pode ser amenizado pela retirada de estacas de ramos em vegetação, com gemas em desenvolvimento.

SINGH et al. (1963) recomenda estacas maduras, com o diâmetro mínimo de um lápis, contendo três a cinco gemas bem desenvolvidas.

No processo de estaquia, recomenda-se o uso da parte intermediária do ramo, seccionando-se estacas com 3 a 4 gemas (TORRES et al., 1976 citado por MELETTI e NAGAI, 1992).

Num experimento, TORRES et al. (1976) cortou estacas apical, mediana e basal, eliminando as folhas superiores e as inferiores tiveram 3/4 dos limbos cortados, a porção entre o segundo e o terceiro nó foi mergulhada em água por 36 horas, as que foram mergulhadas em água corrente e outro lote testemunha foram plantadas em caixas contendo areia esterilizada em câmara de nebulização. Neste trabalho, foi verificado que os primórdios de raízes nas estacas do maracujazeiro, originam-se a partir do seio do calo formado na extremidade das mesmas e, endogenamente nos

prolongamentos dos raios lenhosos. As estacas lavadas apresentaram desenvolvimento inicial das raízes mais evidente e pronunciado, quando comparado com o desenvolvimento das estacas não lavadas; as estacas do ápice responderam à lavagem, com desenvolvimento inicial das raízes mais evidente e uniforme; as medianas apenas apresentaram calo e as basais, raízes uniformes, em roseta, em toda a extensão do calo, porém com pouco desenvolvimento inicial. Portanto, as estacas da porção apical dos caules (7° ao 8° entrenós) enraizaram melhor que estacas das porções mediana e basal (do 11° ao 13° e do 15° ao 17° entrenós, respectivamente).

A técnica de estaquia apresenta vantagens quando empregadas em variedades de maracujá bem estabelecidas, o emprego de estacas contendo três entrenós, retirados da parte central dos ramos e no período de crescimento vegetativo, apresentam melhor enraizamento (CARVALHO, 1965).

SÃO JOSÉ et al. (1994) afirmaram que estacas contendo 2 a 4 nós apresentando meia folha ou folhas inteiras, enraízam facilmente, sem reguladores de crescimento ou sistemas mais sofisticados de enraizamento das estacas.

TORRES et al. (1976), recomendam o uso de estacas da parte intermediária dos ramos apresentando dois ou três entrenós. RUGGIERO (1987) notou que estacas com folhas, em condições de câmara de nebulização atingiram 70,6%, 58,6%, 80,0%, 57,3%, 56,0% e 33,0% de enraizamento, para estacas com um nó e meia folha, um nó e uma folha, dois nós e duas meias folhas, dois nós e duas folhas, três nós e três meias folhas e estacas com três nós e três folhas respectivamente.

MANICA (1981) afirmou que o maracujá roxo pode ser propagado por estaquia, mas o método mais empregado para propagação do maracujá melão (*Passiflora quadrangularis*), é usando estacas de 40 a 60 cm, retirando-se 2/3 das folhas da parte inferior da estaca, que são plantadas diretamente no campo, no verão em número de duas por cova. Depois do enraizamento, caso as duas estacas se desenvolvam, elimina-se uma, deixando-se a mais vigorosa.

Conforme CHAPMAN (1963), para realizar a propagação por estaquia deve-se procurar usar a parte intermediária do ramo contendo dois entrenós, o enraizamento pode ser acelerado com o uso de AIB.

O uso deste regulador de crescimento no processo baseia-se em trabalhos de JARVIS e BOOTH (1981), KASIMOVA e EMITH (1981), BASSUK e HOWARD (1981), XU ZHANG (1981), BOWER E FRASER (1984) citados por CEREDA e PAPA (1989) que afirmaram, após trabalhar com várias espécies de plantas, que a melhor formação de raízes ocorreu quando usaram este regulador de crescimento. AUDUS (1963) observou que as estacas que não receberam regulador de crescimento, apresentaram taxa de enraizamento de 30 a 60%, que pode ser elevada usando AIB.

CEREDA e PAPA (1989), trabalhando com *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, testaram diferentes concentrações de AIB: 0 (15 minutos em água), 1000 mg.L<sup>-1</sup> (2 horas), 2500 mg.L<sup>-1</sup> (1 hora) e 5000 mg.L<sup>-1</sup> (10 minutos) e três épocas de estaquia: março, junho e outubro. As estacas foram preparadas realizando o capeamento com uma fita escura sobre uma seção de 3 cm da base dos ramos. Posteriormente as estacas foram colocadas em bandejas de isopor contendo

vermiculita e levadas para uma câmara de nebulização. Notou-se que nas três épocas a melhor taxa de enraizamento para o *P. edulis f. flavicarpa* foi encontrada com o emprego do capeamento sem AIB. No caso de *P. alata*, a melhor taxa de enraizamento obteve-se sem o capeamento e sem regulador.

Conforme ADRIANCE e BRISON (1967), HARTMANN et al. (1990), e KOMISSAROV (1969) os substratos para enraizamento devem proporcionar umidade, arejamento e pH adequados às bases das estacas, e ainda estarem livres de contaminação fúngica ou bacteriana, e apresentarem um custo razoável facilitando a remoção das estacas enraizadas com um mínimo de danos às raízes.

HANGER (1961) notou que várias plantas difíceis de enraizar podem ser largamente influenciadas pelo meio de enraizamento, não apenas em sua porcentagem de estacas enraizadas, mas também na qualidade do sistema de raízes. KOMISSAROV (1969) afirmou que para escolher o substrato deve-se levar em conta os caracteres biológicos da planta e ainda há necessidade de serem feitos mais experimentos com as várias espécies de plantas nos diferentes meios. Muitos materiais podem ser usados como substratos, tais como areia de diversos tipos, turfas de diferentes origens, diversas misturas de terra, vermiculita, água, entre outros.

MATSUMOTO e SÃO JOSÉ (1989) realizaram um experimento para verificar o enraizamento de estacas de *P. edulis f. flavicarpa* em diferentes substratos. Foram utilizadas estacas com dois nós da porção compreendida entre o 4° e 7° nó a partir da primeira folha aberta visível do ápice do ramo. Os três substratos testados foram: areia grossa, esterco curtido peneirado e carvão-vegetal. Não houveram

diferenças significativas entre os tratamentos. O enraizamento das estacas também foi elevado, acima de 80%.

MELETTI e NAGAI (1992) verificaram as condições mínimas necessárias para o enraizamento de sete espécies de maracujazeiro (*P. alata*, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. maliformis*, *P. incarnata*, *P. serrato-digitata*). A estaquia foi realizada em dois substratos: solo e areia lavada, usando estacas com e sem folhas. Os autores concluíram em seus experimentos que as espécies comerciais (*P. edulis f. flavicarpa* e *P. alata*) apresentaram os melhores índices de enraizamento, independente do substrato. As espécies selvagens mostraram dificuldade de enraizamento nas condições deste experimento. As folhas são determinantes no enraizamento, conferindo maior desenvolvimento e peso às raízes, maior número de brotações às estacas e melhor condição fitossanitária às mudas.

KOMISSAROV (1969) afirmou que tendo altas temperaturas do ar e elevadas taxas de transpiração, torna-se necessário o uso de aspersões freqüentes, que são obtidas com atomizadores controlados automaticamente por intervalos de tempo que variam de 1-2 até 15-20 minutos, tal processo é denominado nebulização artificial.

De acordo com BOSE e MANDAL (1972) e JOINER e GRUIS (1966) são empregados sistemas de nebulização para aumentar a porcentagem de enraizamento ao mesmo tempo que diminui o tempo gasto para iniciação e desenvolvimento do sistema de raízes.

Normalmente, são feitas aspersões freqüentes nas estacas, mantendo alta a umidade, evitando o ressecamento e morte antes de seu enraizamento. O teor ótimo

de umidade nas várias espécies depende de suas características biológicas e da idade (ADRIANCE e BRISON, 1967; BOSE e MANDAL, 1972; LEDERMAN, 1972; HARTMANN et al., 1990;.)

A nebulização provoca aumento da umidade relativa do ar e as folhas ficam cobertas por um filme d'água apresentando efeito benéfico adicional, diminuindo a temperatura foliar e aumentando a pressão de vapor d'água externa e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de transpiração (CAMERON e ROOK, 1974).

Controlar a temperatura é um importante fator no enraizamento de estacas (GARNER, 1958; ADRIANCE e BRISON, 1967; KOMISSAROV, 1969). Mesmo que temperaturas elevadas favoreçam o enraizamento de certas espécies, estimulam muito a taxa de transpiração, principalmente em estacas herbáceas e semi-lenhosas, o que pode causar a murcha e morte delas, a menos que sejam mantidas sob condições de alta umidade (ADRIANCE e BRISON, 1967; HARTMANN et al. 1990).

BOSE e MANDAL (1972), afirmaram que temperaturas ambientes de 22 a 35°C são consideradas como ideais para estacas de difícil enraizamento e para as espécies em geral, 21 a 27°C são consideradas como satisfatórias, mesmo que algumas plantas enraízem melhor a baixas temperaturas. As variações de temperaturas entre o dia e a noite parecem não afetar o enraizamento das estacas (CAMERON e ROOK, 1974).

ADRIANCE e BRISON (1967) notaram que geralmente sob condições de alta umidade as doenças proliferam rapidamente. Portanto, são imprescindíveis cuidados sanitários, evitando o estabelecimento de doenças nas estacas. De acordo

com JOINER e GRUIS (1966), a nebulização ainda apresenta outras desvantagens, como a de causar o lixiviamento de elementos essenciais e de constituintes orgânicos necessários aos processos metabólicos normais ao enraizamento.

Temperaturas altas do meio favorecem o enraizamento de estacas, bem como o desenvolvimento de doenças fúngicas, já as temperaturas baixas têm efeito contrário. A temperatura ideal é inferior à exigida para enraizamento, portanto, ainda existe necessidade de conseguir-se temperatura ótima, a fim de balancear os efeitos (CAMERON e ROOK, 1974); LENDERMAN 1972.)

De acordo com ADRIANCE e BRISON, (1967) e KOMISSAROV (1969), para a formação do sistema de raízes das estacas, além de umidade e calor, os produtos da fotossíntese são muito importantes no início do processo. HARTMANN et al. (1990) afirmaram que o período de intensidade luminosa deve ser suficientemente grande para que sejam formados mais carboidratos do que a quantidade gasta na respiração.

RUGGIERO (1987) observou que a intensidade luminosa necessária às estacas de uma mesma planta, depende do grau de lignificação e das reservas nutritivas que apresenta. As estacas que apresentam pouca lignina e substâncias de reserva, necessitam de uma intensidade luminosa maior do que as semi-lignificadas ou lignificadas. Elevando a temperatura, a iluminação necessária aumenta tanto quanto a perda de nutrientes pela respiração e, as estacas de plantas adultas precisam de intensidade luminosa maior do que as plantas de um ano.

Nos experimentos realizados na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia foram obtidos percentuais de enraizamento superiores a 90% em qualquer época

do ano. Antes de colocar a estaca no substrato, foi realizado um corte transversal rente à gema inferior para facilitar a formação de calos e diferenciação das raízes e ainda o ressecamento das estacas foi evitado, saturando a umidade relativa do ar. A formação do sistema de raízes pode ser significativamente beneficiada, com o enterrio das estacas diretamente em tubetes, e estes, submetidos a nebulização intermitente, isto evita a necessidade de transplântio das estacas enraizadas para outro recipiente e até mesmo a aclimatação, evitando também danificar o sistema de raízes formado (SÃO JOSÉ, 1991).

ALMEIDA et al. (1991) compararam nas condições de Vitória da Conquista-BA, o comportamento de maracujazeiros propagados por via sexuada e vegetativa, onde observaram que não houveram diferenças significativas de crescimento das plantas até 120 dias após o plantio, e ainda que, a qualidade dos frutos não foi afetada.

SÃO JOSÉ et al. (1994) comparando mudas obtidas por sementes e por estacas e outras plantas no campo notaram que de modo geral, a qualidade dos frutos medidos não foi afetada pela origem das mudas.

O enraizamento das estacas representa um impulso ao desenvolvimento da cultura, por contribuir para a obtenção de lavouras muito superiores às atuais (MATSUMOTO e SÃO JOSÉ, 1989; RUGGIERO, 1987). Novos pomares seriam formados a partir da mistura de clones altamente produtivos e com alta qualidade de frutos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

Os experimentos de micropropagação foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da UFPR em Curitiba-PR.

Os experimentos de estaquia foram instalados na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da UFPR em Curitiba-PR.

#### 3.2 EXPERIMENTOS DE MICROPROPAGAÇÃO

##### 3.2.1 Fonte de explantes

Para realizar a micropropagação de *Passiflora actinia* foram selecionadas algumas plantas adultas de ocorrência espontânea, na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná, localizada no Município de Pinhais-PR.

Nos meses de novembro e dezembro de 1997, foram coletados frutos maduros destas plantas e levados para o laboratório. As sementes foram extraídas dos

frutos maduros e a mucilagem foi retirada com a utilização de liquidificador doméstico. Aproximadamente 1,0 kg de massa contendo sementes, suco e resíduos placentários foi colocado no copo do aparelho, tendo seu volume completado com água, realizando-se em seguida ligações intermitentes do liquidificador na rotação mais baixa, evitando deste modo causar danos mecânicos às sementes. Em seguida, o volume do copo foi despejado sobre uma peneira onde as sementes foram lavadas com água de torneira. Este processo foi repetido por cerca de cinco a sete vezes, procurando eliminar todos os resíduos remanescentes possíveis. Logo após este processo, o material foi colocado sobre várias folhas de papel jornal e secas à sombra durante uma semana, sendo que o papel foi trocado todos os dias. No caso de ainda haver resíduos no material, estes foram retirados com pinças e bisturis à seco. Depois disto, as sementes foram armazenadas em frascos de vidro bem fechados e colocadas na geladeira na temperatura de 4 a 6°C.

Como fonte de explantes foram utilizadas plântulas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*, as quais foram segmentadas antes de serem colocadas no meio de cultura. A assepsia das sementes foi realizada pela imersão em etanol 10% por 1 minuto, em seguida foi feita a imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, sempre em agitação e lavagem em água esterilizada por 4 vezes. A germinação foi realizada em frascos de vidro com cerca 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro contendo algodão umedecido com água deionizada esterilizada, os quais foram fechados com papel alumínio. As condições ambientais para a germinação das sementes foram as mesmas da sala de crescimento.

### 3.2.2 Meio de cultura e condições de crescimento

A solução estoque de sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos do meio MS foi preparada, conforme foi estabelecido por VASIL e HILDEBRANT (1966). A água utilizada nos meios de cultura e no preparo das soluções estoque foi previamente deionizada.

Depois do preparo do meio de cultura, o pH foi ajustado em 5,8 com NaOH 1N ou HCl 1N, antes da esterilização. Em seguida, o meio foi distribuído em frascos de vidro com capacidade para 210 ml (6 cm de diâmetro e 8,5 cm de comprimento), nos quais foram colocados aproximadamente 35 ml de meio de cultura por frasco, que foram vedados com papel alumínio.

As plântulas contendo 4 a 5 folhas foram segmentadas e colocadas num meio de cultura básico MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e ambos reguladores nas mesmas quantidades.

Os meios de cultura foram autoclavados sob pressão de 1,5 atm e temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos.

Desde o isolamento até a aclimatização, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob controle de fotoperíodo, luminosidade e temperatura. O fotoperíodo foi de 16 horas. A luminosidade foi de  $25 \mu \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-fria e gro-lux. Os frascos com as culturas foram colocados em prateleiras a 35 cm de distância das lâmpadas. A temperatura ambiente foi mantida em  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Delineamento experimental

O esquema experimental foi inteiramente ao acaso com 36 frascos por tratamento contendo três explantes por frasco.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de raízes primárias/plântula, números de folhas/plântula, números de brotações/plântula, abscisão foliar (número de folhas que caíram) /plântula, e comprimento/plântula na primeira e segunda repicagens, com intervalo de 3 até 4 semanas. Na avaliação estatística, foi aplicado o teste de KRUSKAL-WALLIS (1952) citado por CAMPOS (1983), devido ao fato dos dados não serem paramétricos.

### 3.2.4 Aclimação das mudas

Para realizar a aclimação das mudas, foi coletado o horizonte A de um solo orgânico da Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná, localizada no Município de Pinhais-PR. Em seguida, foi feita uma mistura em partes iguais com este solo e com casca de arroz carbonizada, a qual foi autoclavada à 120°C durante 30 minutos. Esta mistura foi colocada em bandejas de semeadura de isopor com 128 células.

Depois de quatro semanas as plântulas foram retiradas dos frascos e, tiveram suas raízes lavadas com água corrente e cortadas quando ultrapassavam 0,5

cm de comprimento. Após o transplântio, as plântulas foram imediatamente colocadas sob nebulização, intermitente com intervalo de rega de 30 minutos.

### 3.3 EXPERIMENTOS DE ESTAQUIA

Foram instalados dois experimentos, um com AIB no dia 24 de junho de 1997 e outro com etanol no dia 7 de julho de 1997. Ambos foram instalados na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da UFPR em Curitiba - PR. Nos experimentos, os tratamentos foram aplicados pela imersão da base das estacas (cerca de 2 cm) nas soluções contendo o AIB e etanol durante 1 minuto.

A estaquia foi realizada em tubetes plásticos dentro de uma câmara de nebulização com intervalo de rega de 30 minutos. O substrato utilizado foi a mistura comercial "Plantmax".

Os experimentos foram avaliados 7 semanas após a instalação pelas seguintes variáveis: número de estacas enraizadas, número de folhas retidas, número de estacas brotadas, número de brotações por estaca e número de raízes por estaca.

### 3.3.1 Fonte de material

Para realizar a estaquia de *Passiflora actinia*, foram selecionadas plantas adultas de ocorrência espontânea, na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná, localizada no município de Pinhais-PR.

As estacas foram preparadas da porção intermediária dos ramos desprezando a porção apical, contendo 4 nós e 2 folhas inteiras nos nós superiores e apresentando cerca de 20 cm de comprimento.

### 3.3.2 Experimento com AIB

O experimento com AIB foi instalado com os seguintes tratamentos :

- 1) 0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB;
- 2) 250 mg.L<sup>-1</sup> de AIB;
- 3) 500 mg.L<sup>-1</sup> de AIB;
- 4) 1000 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

O AIB foi diluído em solução de álcool 50%, sendo que a testemunha foi tratada pela mesma solução de etanol.

O delineamento foi em blocos ao acaso com 5 repetições e com 20 estacas por parcela, os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey e pela análise de regressão polinomial. A homogeneidade das variâncias dos tratamentos foi testada pelo teste de Bartlett.

### 3.3.3 Experimento com Etanol

O experimento com etanol foi instalado com os seguintes tratamentos:

- 1) Testemunha sem imersão;
- 2) Água;
- 3) Etanol 10%;
- 4) Etanol 30%;
- 5) Etanol 50%;
- 6) Etanol 70%.

O esquema experimental foi o mesmo usado no experimento com AIB.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MICROPROPAGAÇÃO

As sementes colocadas para germinação, com o intuito de obter plântulas que serviriam como fonte de explantes para iniciar os experimentos de micropropagação, apresentaram uma desuniformidade na germinação que foi observada durante cerca de seis meses, as mesmas não apresentaram problemas de contaminação.

MORLEY-BUNKER (1974) afirmou que Passifloraceae estão incluídas numa família de plantas cujas sementes apresentam dormência causada pelos microorganismos de controle de entrada de água para o interior da semente e não apresentam germinação sincronizada.

Em testes preliminares as plântulas segmentadas, que foram colocadas em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento, não apresentaram nenhuma resposta organogênica, tornando-se inicialmente cloróticas e oxidando posteriormente. Devido a esta resposta não foram utilizadas testemunhas nos experimentos subsequentes.

GRATTAPAGLIA et al. (1990) constataram que as espécies deste gênero não tem se mostrado recalcitrantes e respondem bem à ação de reguladores de crescimento.

#### 4.1.1 Número de raízes primárias emitidas por plântula

No meio MS acrescido com AIB, ocorreu a formação de raízes na base das brotações e alongamento das plântulas, que apresentavam ótimo aspecto de desenvolvimento e expansão foliar. As plântulas que receberam este tratamento, alcançaram rapidamente o tamanho para aclimatação (FIGURA 2).

O tratamento com AIB foi significativamente superior aos outros na primeira repicagem, estimulando bastante a formação de raízes. Entretanto, na segunda repicagem não houve diferença entre os tratamentos, apesar do número de raízes ser maior no tratamento com AIB, como pode ser verificado na (FIGURA 3).

KANTHARAJAH e DODD (1990), estudaram o cultivo de microestacas provenientes de sementes germinadas *in vitro* de *Passiflora edulis*, onde testaram uma concentração bem maior de AIB ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para estimular a formação ao sistema de raízes, mas as plântulas não responderam a este tratamento, enraizando somente sob o efeito de ANA.

KAWATA et al. (1995) pesquisaram a micropropagação de *Passiflora edulis* a partir de brotos regenerados de calos obtidos *in vitro*, e testaram o meio MS complementado com concentrações diferentes de AIB, ANA e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxy-acético), onde verificaram a ocorrência de calos na extremidade basal, e raízes anormais. Num meio sem auxina os brotos desenvolveram-se muito bem, mas não alcançaram a formação de raízes. Contudo, quando foram usados somente brotos bem formados e colocados no meio MS sem reguladores de crescimento durante quatro semanas, ocorreu a formação de raízes numa taxa de mais de 80%.



FIGURA 2 - ASPECTO DAS PLÂNTULAS NA SEGUNDA REPIGAGEM DE *Passiflora actinia* EM MEIO DE CULTURA MS COMPLEMENTADO COM AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ); BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ); E AMBOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NAS MESMAS QUANTIDADES.

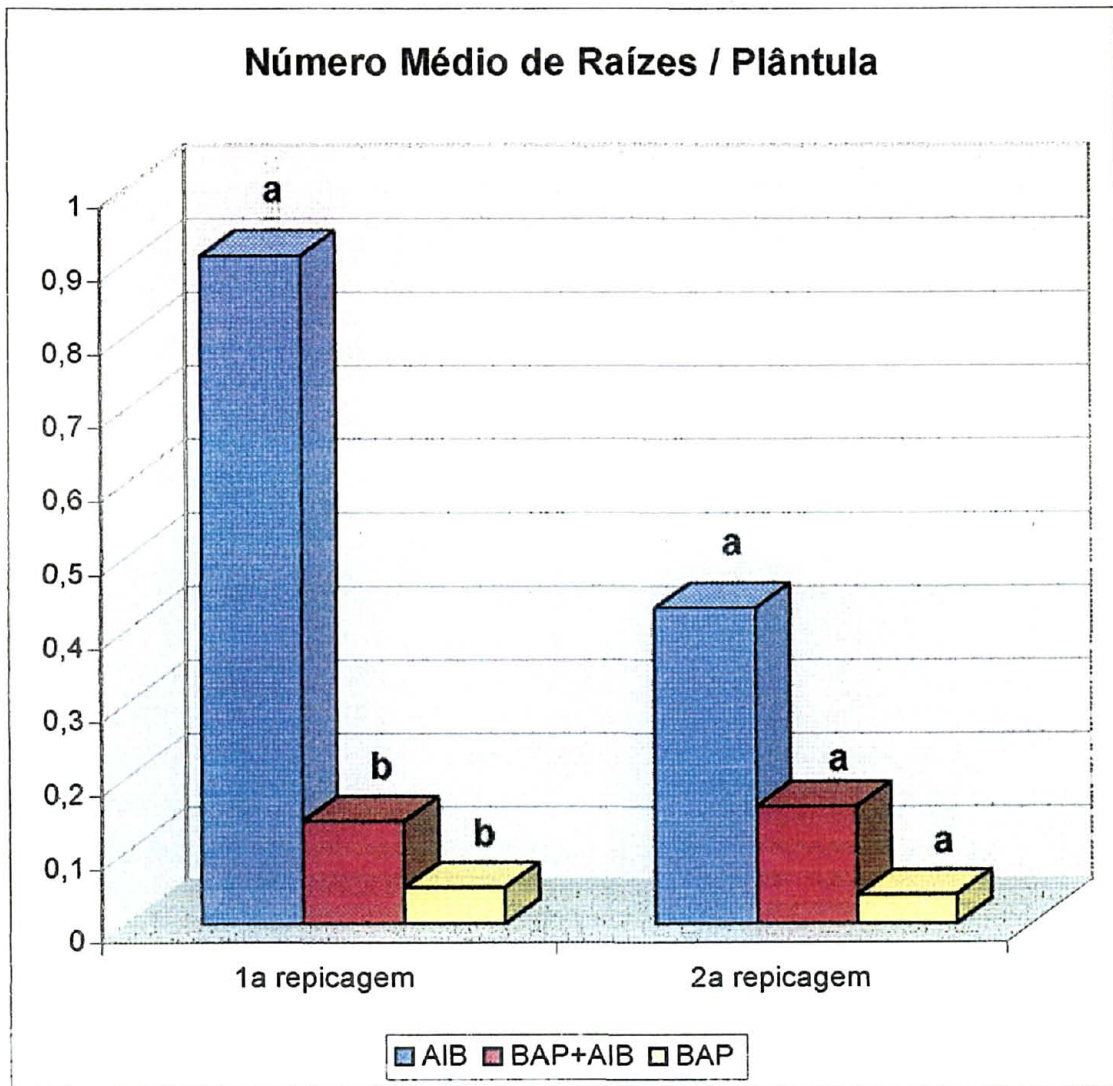


FIGURA 3 - NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) OU AMBOS, NA 1ª E 2ª REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.

VAZ et al. (1993) trabalharam com protoplastos da mesma espécie e constataram que plântulas obtidas *in vitro* devem ser colocadas em meio MS com a concentração de sais reduzida a metade contendo  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA para estimular a formação de raízes. Portanto, além de AIB foi necessário usar ANA para este tipo de formação em algumas espécies, o que não foi necessário para *Passiflora actinia*.

GRATTAPAGLIA et al. citados por SÃO JOSÉ (1991), conseguiram enraizar explantes de fontes diferentes em meio de cultura MS com a concentração de sais reduzida a metade complementado com AIB ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

No meio MS acrescido com ambos reguladores de crescimento e BAP, eventualmente ocorreu a formação de raízes sendo maior no primeiro tratamento, provavelmente devido à presença de AIB (FIGURA 3), e a menor formação de raízes foi observada no tratamento feito com BAP.

SCORZA e JANICK (1980) conseguiram uma boa formação de raízes em *Passiflora foetida* usando meio MS complementado com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, e também observaram primórdios de raízes em *Passiflora edulis* em meio MS contendo  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  tanto de BAP quanto de ANA.

Os resultados deste trabalho comparados com as publicações dos autores citados anteriormente sobre a formação de raízes, nota-se que o enraizamento foi obtido com uma concentração bem menor, e sem a necessidade da presença de outro hormônio, indicando que isto provavelmente depende da espécie.

#### 4.1.2 Número de folhas emitidas por plântula

Para estimular a produção de folhas por plântula, os tratamentos com BAP e BAP+AIB foram superiores em relação ao AIB, na primeira repicagem (FIGURA 4). Mas na segunda repicagem não foram mais verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, ocorrendo uma redução no número de folhas por plântula, em relação a primeira repicagem.

#### 4.1.3 Número de brotações emitidas por plântula

O tratamento com BAP foi superior aos demais para estimular as brotações, na primeira repicagem. Entretanto, este efeito desaparece na segunda repicagem, onde os tratamentos não diferiram (FIGURA 5).

DORNELAS e VIEIRA (1993) pesquisaram, a proliferação de ápices e regeneração de plântulas por meio de organogênese direta de algumas espécies de *Passiflora*, e verificaram que ocorreu a regeneração de brotos sem a fase de calo, usando apenas o BAP em MS. A concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA inibiu a regeneração de brotos, até mesmo em meio contendo  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. A melhor regeneração de brotos foi observada em MS contendo  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e o mínimo de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP foi necessário para promover organogênese a partir de hipocótilos derivados de tecidos. Os mesmos autores (1993), estudaram a regeneração de plantas a partir de culturas de protoplastos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.,

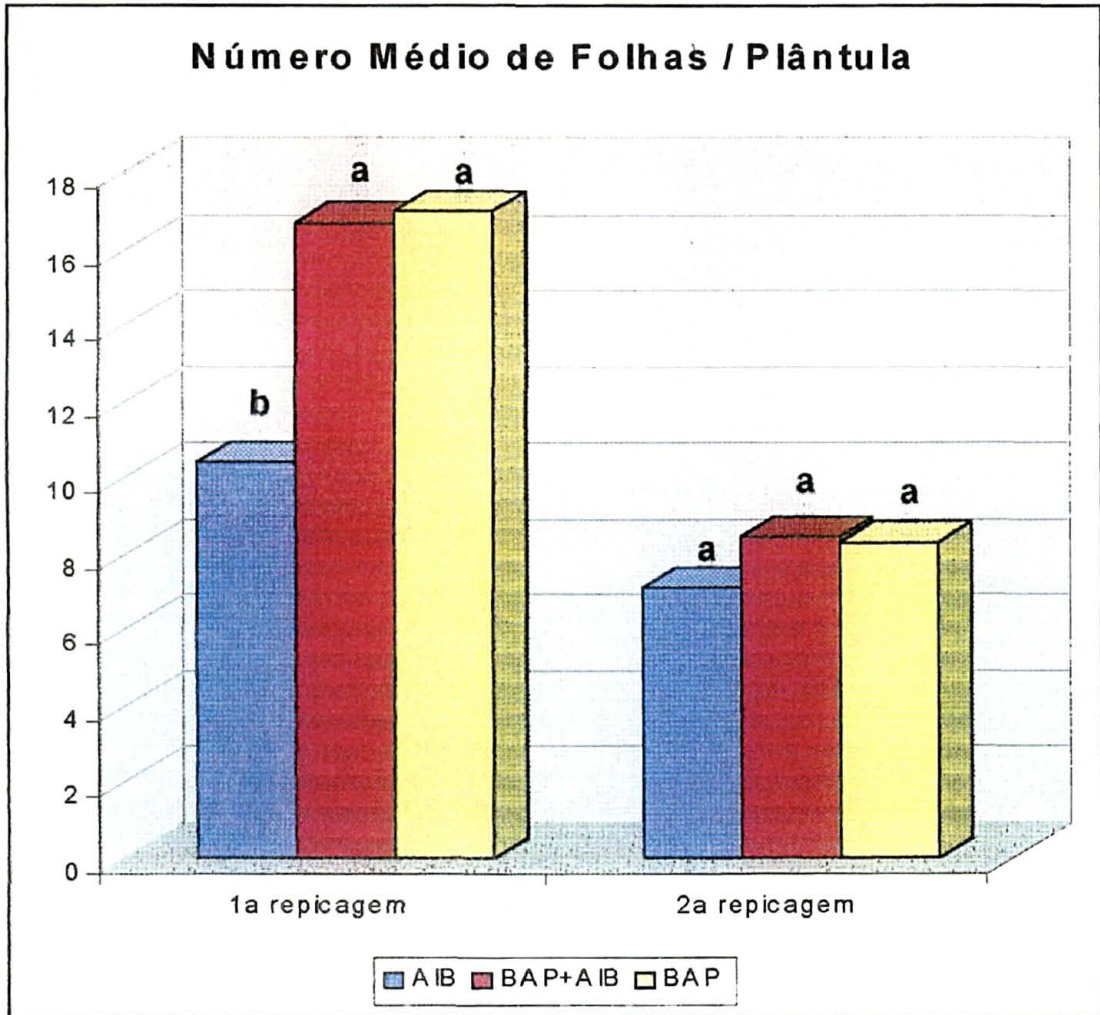


FIGURA 4 - NÚMERO MÉDIO DE FOLHAS EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.

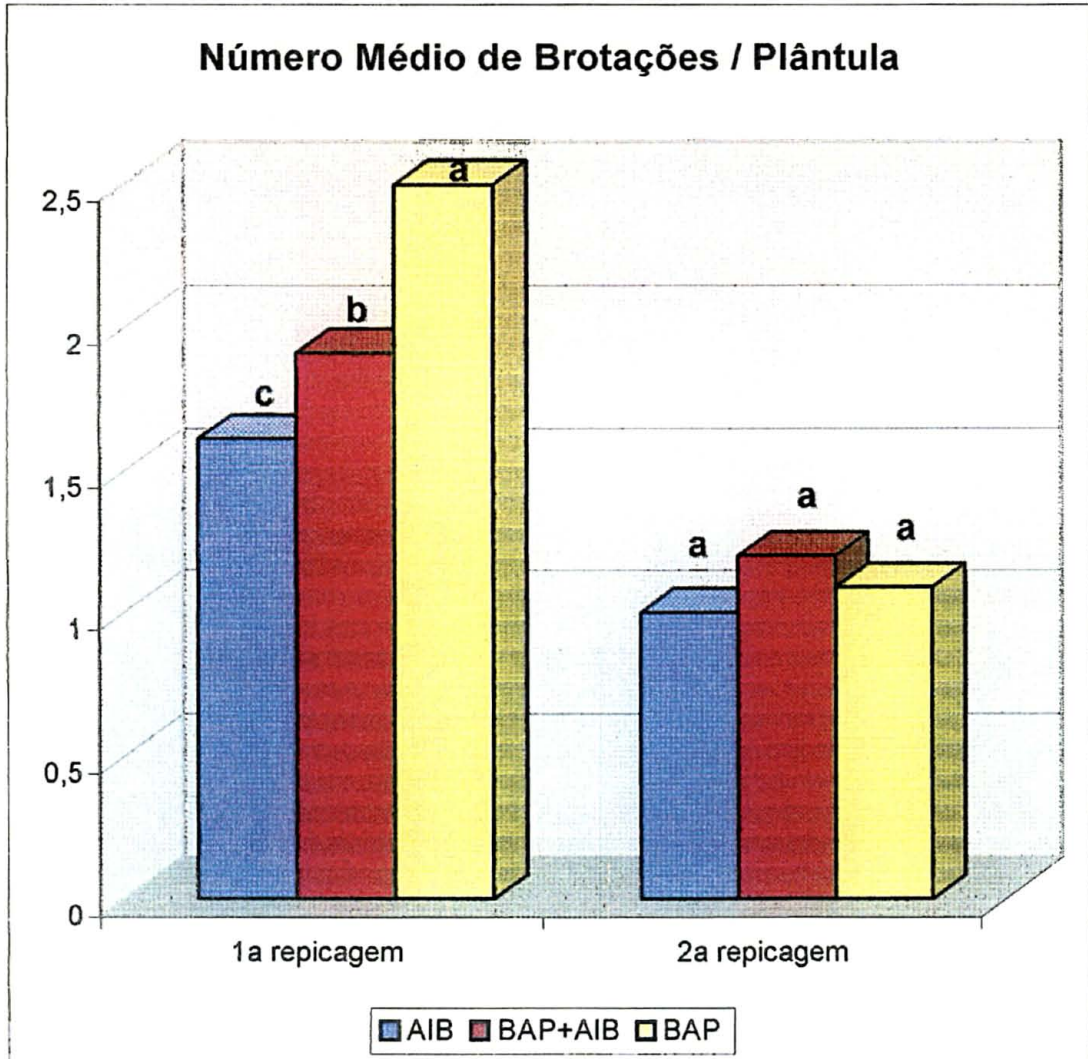


FIGURA 5 - NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) OU AMBOS, EM DUAS REPICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.

*Passiflora amethystina* e *Passiflora cincinnata*, onde constaram que o meio de cultura MS complementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP proporcionou boa regeneração de brotos, especialmente em *Passiflora cincinnata*. SCORZA e JANICK (1980) investigaram explantes de *Passiflora suberosa* obtidos *in vitro*, e verificaram que o tratamento de exposição ao BAP em concentrações diferentes e de apenas um dia, foi o suficiente para promover brotações. Os mesmos autores (1978) em seus estudos com Passifloraceas, em experimento com BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e/ou ANA ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), regeneraram flores e brotos *in vitro* na *Passiflora suberosa* em seis semanas.

GRATTAPAGLIA et al. (1988), conseguiram bons resultados isolando segmentos nodais, entrenodais e discos foliares em meio de cultura MS complementado com BAP ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo notada uma grande variação das respostas em função do clone .

MANDERS et al. (1994), num experimento com *Passiflora edulis*, observaram que mais de 70% de explantes foliares produziram grande quantidade de brotações em meio MS complementado com  $4,43 \mu\text{M}$  de BAP:

VAZ et al. (1993) pesquisaram *Passiflora edulis*, e em seus experimentos constataram que calos derivados de protoplastos cultivados em meio MS contendo  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA,  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e vitaminas adicionais, regeneraram brotos, estes por sua vez, quando foram cultivados em meio MS contendo  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP produziram outras brotações.

KANTHARAJAH e DODD (1990) verificaram o cultivo de segmentos nodais provenientes de sementes germinadas *in vitro* de *Passiflora edulis*, e notaram

que o meio MS complementado com  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, foi o melhor resultado obtido para indução de brotações.

VESTRI et al. (1990) estudaram o cultivo de brotações de *Passiflora coerulea* obtidas *in vitro* a partir de tecidos calosos onde foi aplicado  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e verificaram que a produção de brotos além de BAP foi dependente de ANA ou de 2,4-D, sendo que foi mais efetivo em presença de 2,4-D. Os resultados deste trabalho, na indução de brotações em microestacas foram prontamente obtidos utilizando  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, indicando em estudos anteriores com outras espécies que a necessidade de quantidades maiores de BAP ou da presença de outro hormônio dependem da espécie.

#### 4.1.4 Número médio de abscisão foliar por plântula

Quando os explantes não enraizaram e/ou permaneceram no meio de cultura por mais de 4 semanas, foi observada a ocorrência de clorose e muita abscisão foliar, e freqüentemente morriam. Normalmente também foi observada a formação de calos. Quanto a abscisão foliar nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa nas duas repicagens realizadas (FIGURA 6).

KANTHARAJAH e DODD (1990), sugeriram em seus experimentos que as plântulas cultivadas em meio MS suplementado com  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP e que permaneceram mais de quatro semanas no meio, apresentaram problemas de clorose e abscisão foliar, causando subseqüentemente a morte do explante, indicando que o acúmulo de BAP causa toxicidade.

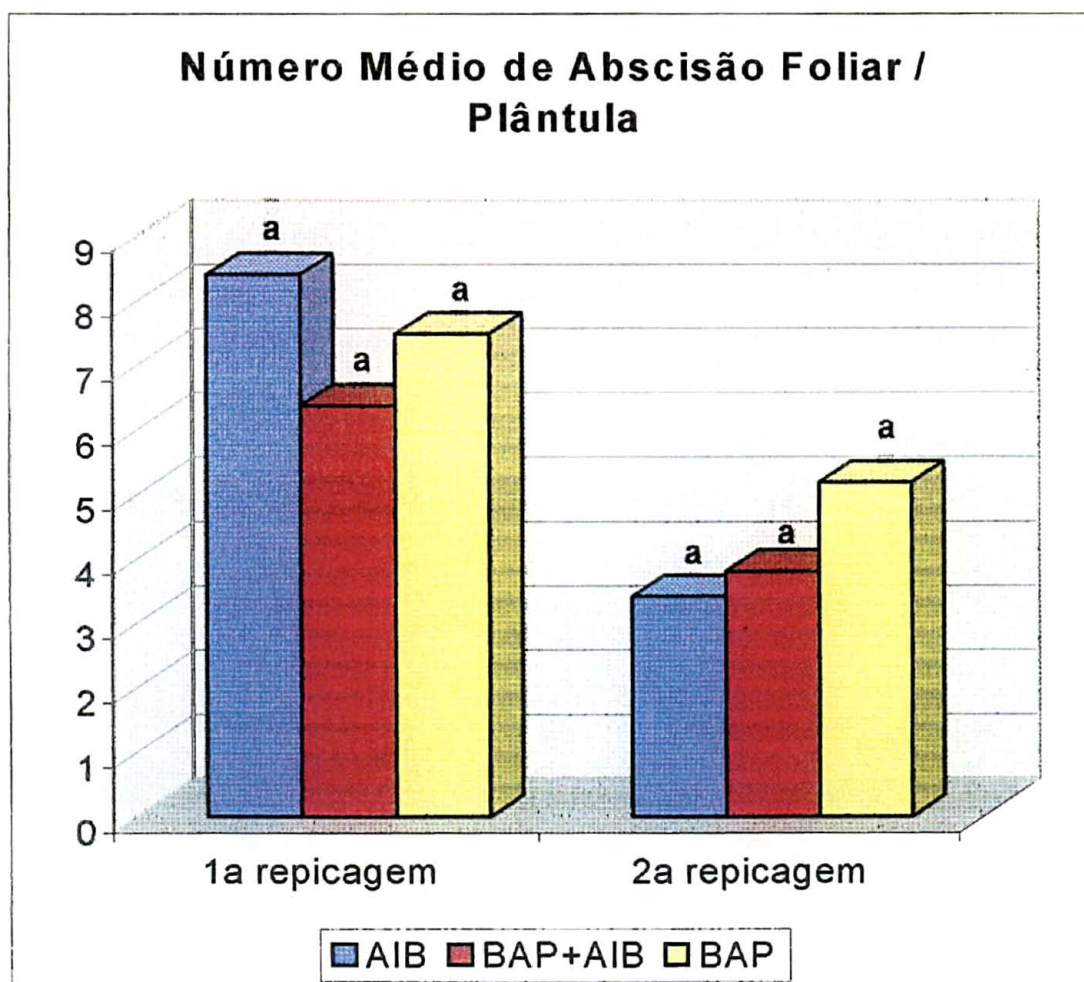


FIGURA 6 - NÚMERO MÉDIO DE ABSCISÃO FOLIAR POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) OU AMBOS, EM DUAS REPICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.

#### 4.1.5 Comprimento médio por plântula

No meio MS suplementado com BAP e AIB (FIGURA 2), foi observada uma boa multiplicação de folhas e de brotos e com resultados de suas médias sendo intermediários em relação aos outros tratamentos (FIGURAS 4 e 5), mas com menor comprimento do que os explantes cultivados no meio MS com AIB, tanto na primeira quanto na segunda repicagem (FIGURA 7).

GRATTAPAGLIA et al. citados por SÃO JOSÉ (1991) observaram em seus experimentos que quanto mais alongada fosse a parte aérea da plântula melhor o resultado de seu enraizamento.

O tratamento com AIB foi significativamente superior ao BAP e BAP + AIB, que não diferiram quanto ao comprimento médio das brotações, tanto na primeira quanto na segunda repicagem (FIGURA 7).

No geral, todos os parâmetros analisados apresentaram os melhores resultados na primeira repicagem do que na segunda, provavelmente devido ao fato de que o meio MS na concentração completa de seus sais, seja excessiva e/ou tóxica para *Passiflora actinia* sendo que nos trabalhos de VAZ et al, (1993) e DONELAS E VIEIRA (1994) foi utilizado meio MS com a concentração de sais reduzida à metade.

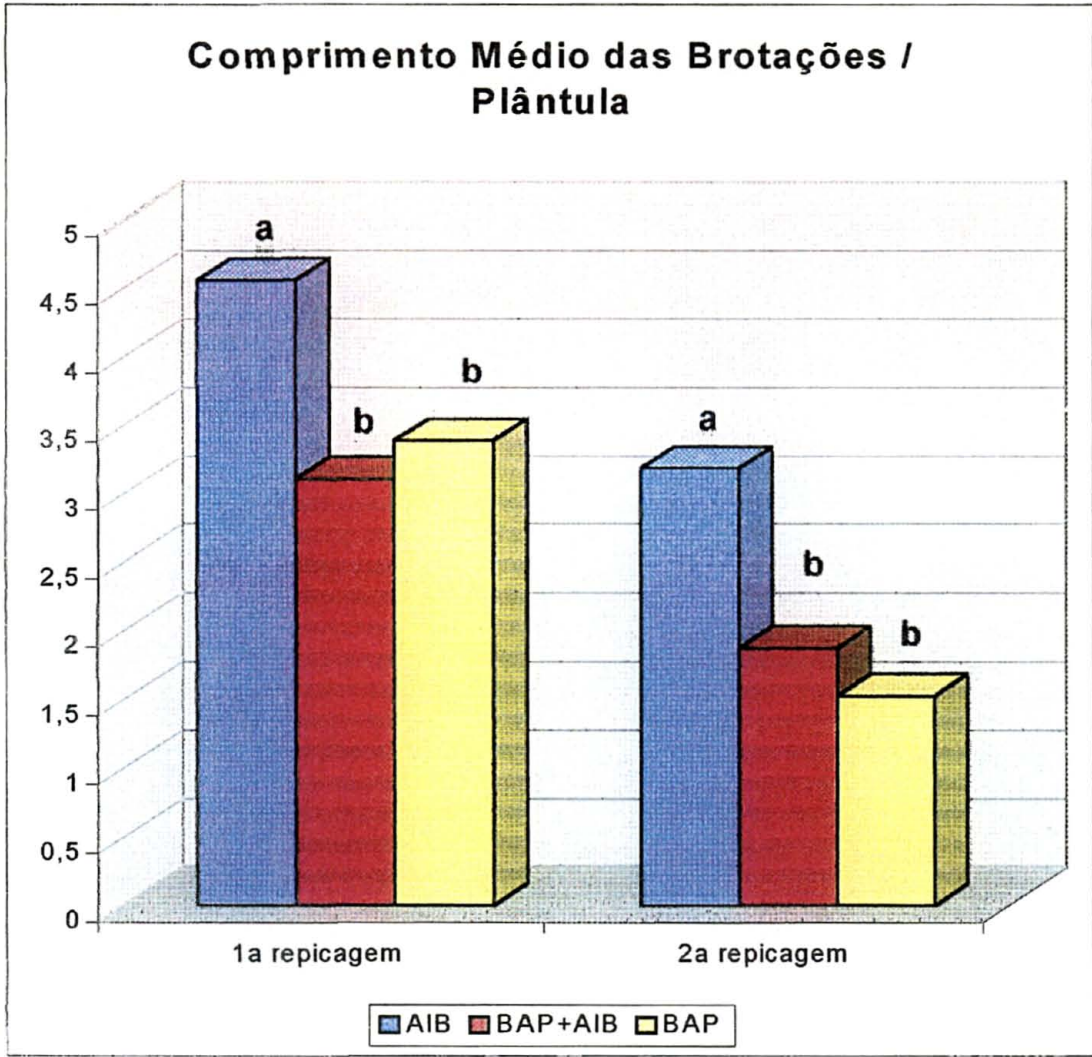


FIGURA 7 - COMPRIMENTO MÉDIO (CM) DAS BROTAÇÕES EMITIDAS POR PLÂNTULA DE *Passiflora actinia* CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS, EM DUAS REPLICAGENS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS.

#### 4.1.6 Taxa de sobrevivência

A taxa de sobrevivência das plântulas enraizadas (TABELA 1), foi maior naquelas que receberam o tratamento com AIB, provavelmente isto ocorreu devido ao fato das raízes apresentarem condições melhores de adaptação. E a menor taxa foi observada nas plântulas tratadas com BAP (FIGURA 8).

A sobrevivência média encontrada foi de 46,8%. Este índice não foi superior provavelmente devido as condições físicas do substrato utilizado, já que o estresse hídrico não ocorreu devido ao fato da manutenção do experimento ter sido realizado em câmara com nebulização.

TABELA 1 - TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DAS PLÂNTULAS DE *Passiflora actinia* 30 DIAS APÓS O TRANSPLANTIO PARA CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO

Tratamento	Sobrevivência (%)
AIB	52,3
BAP + AIB	49,1
BAP	39,0

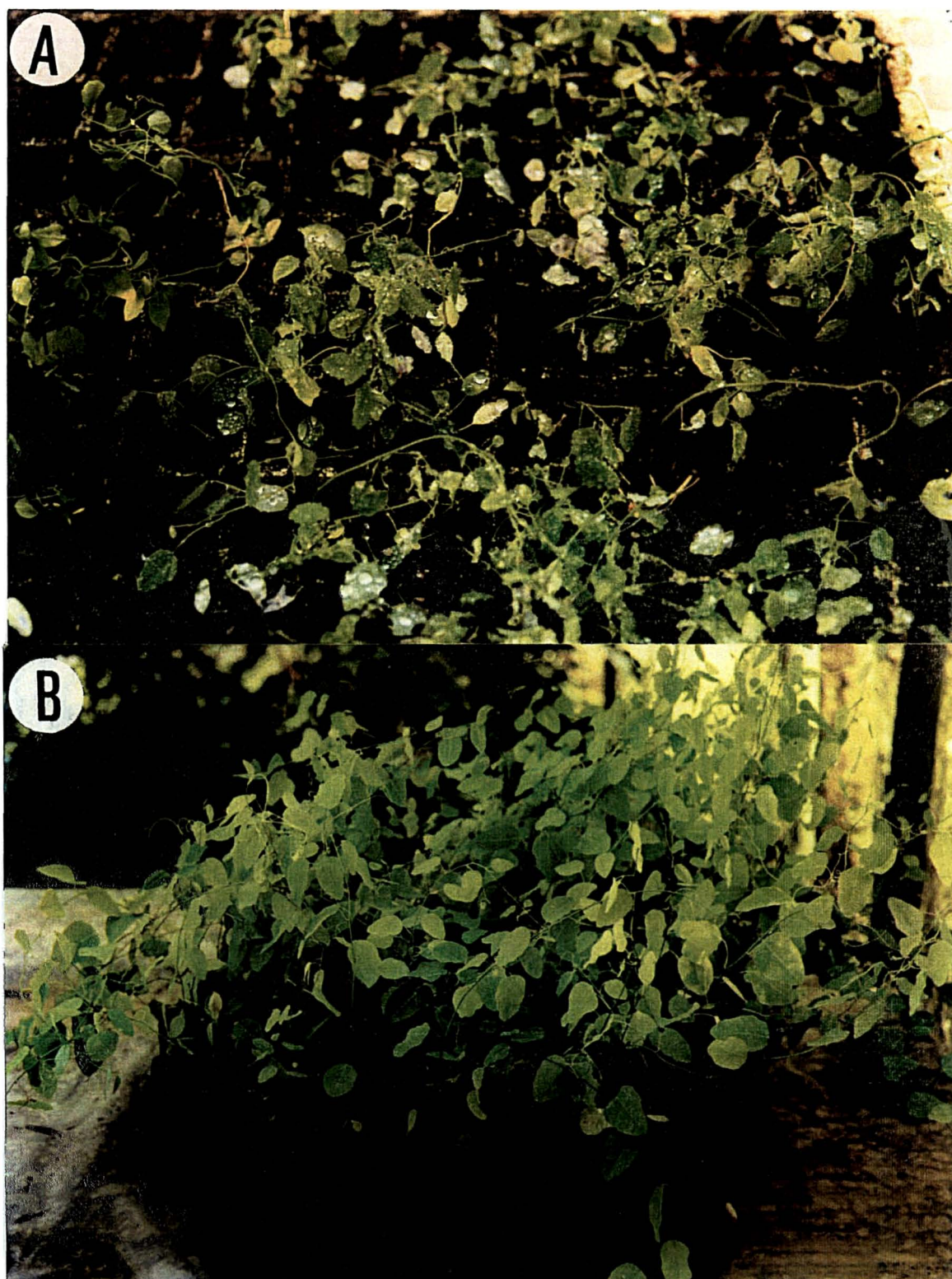


FIGURA 8 - A - ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS PROPAGADAS *in vitro* DE *Passiflora actinia* EM BANDEJAS DE ISOPOR NA CASA DE VEGETAÇÃO. B - MUDAS DE *Passiflora actinia* PROPAGADAS *in vitro* DESENVOLVENDO-SE EM AMBIENTE CONTROLADO.

## 4.2 ESTAQUIA SEMILENHOSA

As concentrações testadas de AIB (FIGURA 9) não apresentaram diferença significativa entre si para a porcentagem de enraizamento, retenção foliar, brotação e número de brotos por estaca (TABELA 2).

TABELA 2 - EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE *Passiflora actinia*, APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.

AIB (PPM)	ENRAIZAMENTO (%)	RETENÇÃO FOLIAR (%)	BROTAÇÃO* (%)	BROTOS / ESTACA (NÚMERO)
0	89 a	67,5 a	22 a	1,10 a
250	91 a	69,0 a	27 a	1,02 a
500	89 a	83,5 a	11 a	0,84 a
1000	91 a	79,5 a	20 a	1,08 a
C.V.(%)	8,5	14,6	7,9	29,5

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\* Dados originais transformados em  $\log(x + 10)$ .

O enraizamento encontrado para *P. actinia* foi em média 90%, semelhante ao encontrado por MATSUMOTO e SÃO JOSÉ (1989) e por SÃO JOSÉ (1991) para *P. edulis f. flavicarpa* e superior ao encontrado por CEREDA e PAPA (1989) para esta espécie e para *P. alata*.

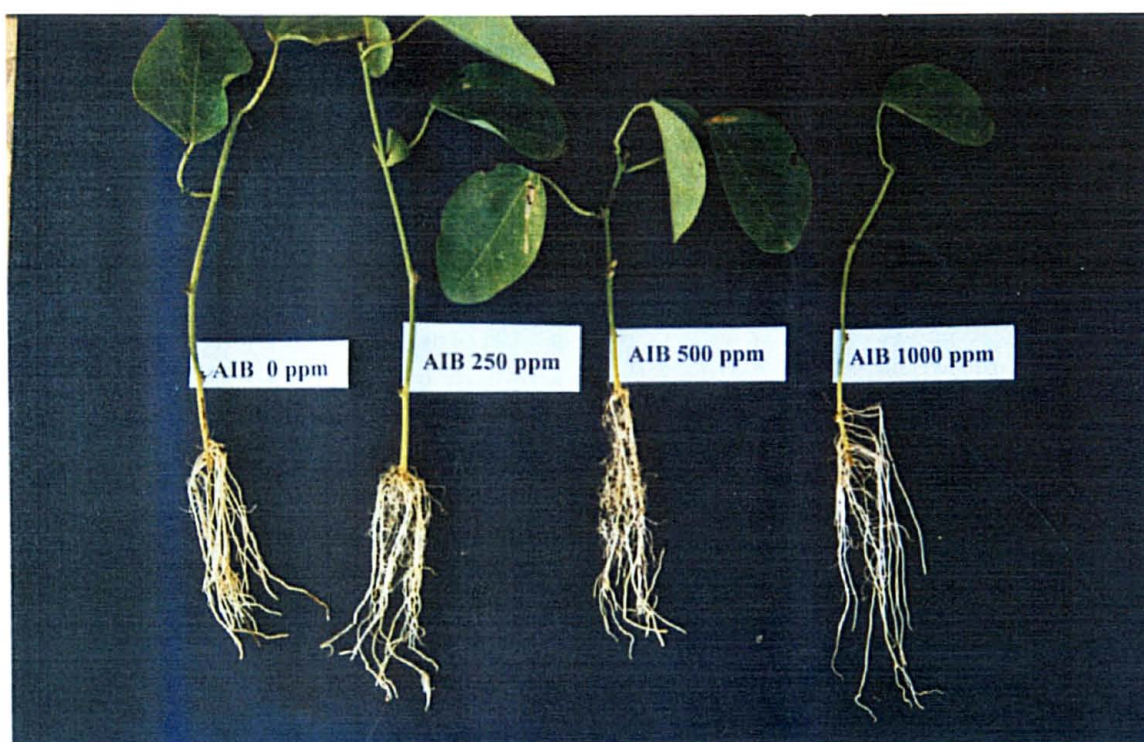


FIGURA 9 - ESTACAS ENRAIZADAS DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB (0, 250, 500 E 1000 mg.L<sup>-1</sup>), APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.

A retenção foliar foi em média 74%, o que deve ter contribuído para a obtenção da elevada taxa de enraizamento. MELETTI e NAGAI (1992) concluíram em seus experimentos, com sete espécies de maracujazeiro (*P. alata*, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. caerulea*, *P. maliformis*, *P. incarnata*, *P. serrato-digitata*), que as folhas são determinantes no enraizamento, conferindo maior desenvolvimento e peso às raízes, maior número de brotações às estacas e melhor condição fitossanitária às mudas. As estacas sem folhas deterioraram-se facilmente antes de enraizar. Estes resultados estão de acordo com as observações de ALMEIDA et al. (1991) para a espécie *P. edulis f. flavicarpa*, cuja presença da folha favoreceu o enraizamento.

A utilização do AIB apresentou um efeito significativo no aumento do número de raízes por estaca, sendo encontrada uma regressão linear significativa entre esta variável e a concentração de AIB (FIGURA 10). Na maior dose de AIB (1000 mg.L<sup>-1</sup>) foram encontradas em média 14,6 raízes por estaca.

GRATTAPAGLIA et al. citados por SÃO JOSÉ (1991), alcançaram um ótimo índice de enraizamento em estacas herbáceas com duas gemas de diversas fontes de maracujazeiros comerciais, aplicando AIB em concentrações variáveis desde 750 até 2000 mg.L<sup>-1</sup> em solução de talco contendo 4% de fungicida CAPTAN. Mesmo assim foi notada a ocorrência de contaminação e, as respostas ao tratamento variaram de acordo com o tipo de clone. Não foi observada nenhuma contaminação no decorrer dos experimentos desta dissertação.

Também foi montado um experimento com estacas dos ramos do ano anterior que são bastante lignificadas, as quais receberam os mesmos tratamentos com AIB e sob as mesmas condições, contendo quatro nós mas sem nenhuma folha.

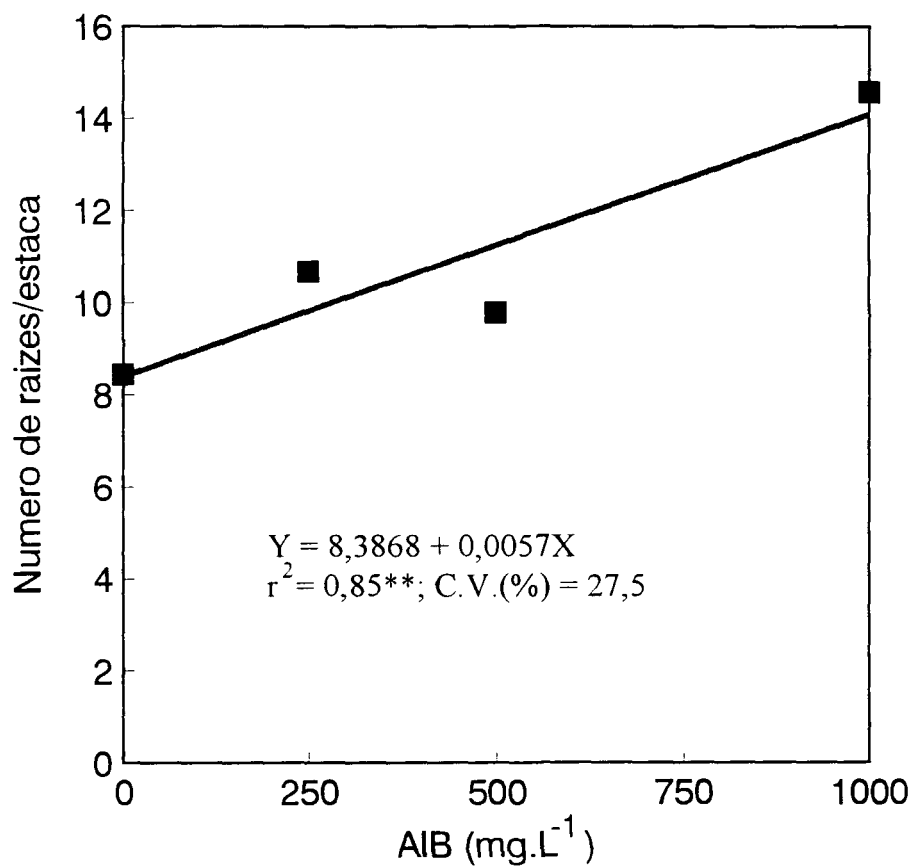


FIGURA 10 - AUMENTO NO NÚMERO DE RAÍZES EMITIDAS POR ESTACA DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB, APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO .

Porém, em nenhuma estaca foi verificada a emissão de raízes, e todas morreram após quatro meses de observação, indicando que as folhas são fundamentais para o enraizamento, como foi verificado por ALMEIDA et al. (1991), MELETTI e NAGAI (1992).

No experimento com etanol também não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para a porcentagem de enraizamento, retenção foliar, brotação, número de brotos por estaca e número de raízes por estaca (TABELA 3 e FIGURA 11).

ZANETTE (1995) verificou que o etanol apresentou ação estimuladora no enraizamento de estacas lenhosas de pereira Garber, sendo mais eficaz quando as estacas são pré-tratadas por imersão de 30 segundos numa solução a 20% (v/v), este efeito não foi observado no caso de *Passiflora actinia*.

TABELA 3 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE *Passiflora actinia*, APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.

TRATA- MENTOS	ENRAIZAMENTO (%)	RETENÇÃO FOLIAR (%)	BROTAÇÃO* (%)	BROTOS / ESTACA (NÚMERO)	RAÍZES / ESTACA (NÚMERO)
TESTEMUNHA	81 a	29,5 a	19 a	1,00 a	5,20 a
ÁGUA	65 a	30,5 a	8 a	1,06 a	5,27 a
ETANOL 10%	66 a	27,0 a	8 a	1,10 a	5,50 a
ETANOL 30%	74 a	32,0 a	8 a	0,80 a	5,85 a
ETANOL 50%	76 a	33,5 a	10 a	1,04 a	5,85 a
ETANOL 70%	63 a	25,5 a	12 a	1,10 a	5,25 a
C.V.(%)	13,9	27,9	11,9	38,5	20,1

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\*Dados orginais transformados em  $\log(x + 10)$ .



FIGURA 11 - ESTACAS ENRAIZADAS DE *Passiflora actinia* SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL. A - SEM TRATAMENTO; B - ÁGUA; C - ETANOL 10%; D - ETANOL 30%; E - ETANOL 50%; F - ETANOL 70%, APÓS SETE SEMANAS EM CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO.

Neste experimento o enraizamento foi um pouco inferior ao experimento com AIB, sendo encontrado em média 70% de estacas enraizadas. A retenção também foi mais baixa, ocorrendo em média 30% de folhas retidas.

Em ambos experimentos, foi observado que o enraizamento ocorreu tanto na base das estacas, como também nos entrenós. Este comportamento foi notado de forma aleatória, independente dos tratamentos testados.

## 5 CONCLUSÕES

A micropropagação de *Passiflora actinia* é viável para a produção de mudas, utilizando o seguinte protocolo: cultivo de segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

A propagação vegetativa de *P. actinea* pode ser realizada com sucesso por meio de estacas semilenhosas com 4 nós e duas folhas inteiras, sem o uso de reguladores de crescimento.

## 6 PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

No que diz respeito aos trabalhos de micropropagação, é necessário verificar se o meio de cultura MS com a concentração de sais reduzida à metade ou outros meios de cultura poderiam alcançar resultados mais efetivos, bem como outros tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

Ainda não foi estudado seu comportamento na enxertia ou como porta-enxerto, para outras espécies de maracujazeiro. Também é necessário verificar a sua resistência em relação ao frio, e acompanhar sua produtividade em plantios comerciais.

Existe muito trabalho a ser feito com este frutífera, o pomar estabelecido na Fazenda Experimental do Cangüiri da Universidade Federal do Paraná com as plantas propagadas por meio da micropropagação e da estaquia semilenhosa, necessitam de acompanhamento para verificar a domesticação da espécie, a qual, auxiliará amplamente a aprimorar o nível técnico da cultura de maracujazeiros no Brasil.

## **ANEXOS**

ANEXO 1 - RESULTADOS DOS PARÂMETROS ANALISADOS NA 1ª E 2ª REPIGAGENS DE *Passiflora actinia* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS SUPLEMENTADO COM BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,01 mg.L<sup>-1</sup>) OU AMBOS.

TRATAMENTO	Nº DE RAÍZES / PLÂNTULA		Nº DE FOLHAS / PLÂNTULA		Nº DE BROTAÇÕES / PLÂNTULA		ABSCISÃO FOLIAR / PLÂNTULA		COMPRIMENTO (CM) / PLÂNTULA	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
AIB	84,96 a	76,27 a	43,18 b	58,56 a	44,85 c	58,37 a	64,66 a	62,08 a	73,91 a	75,87 a
BAP + AIB	49,92 b	54,12 a	66,91 a	61,43 a	59,11 b	61,15 a	51,48 a	58,41 a	49,06 b	54,06 b
BAP	46,96 b	51,10 a	71,40 a	61,50 a	77,53 a	61,97 a	63,35 a	61,00 a	58,52 b	51,46 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de comparação de médias DMS. Dados transformados pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis.

ANEXO 2 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO AIB NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE *Passiflora actinia*.

CAUSA DE VARIÂNCIA	GL	QM				
		ENRAIZAMENTO (%)	RETENÇÃO FOLIAR (%)	BROTAÇÃO (%)	BROTOS / ESTACA (NÚMERO)	RAÍZES / ESTACA (NÚMERO)
TRATAMENTOS	3	6,666 <sup>NS</sup>	307,812 <sup>NS</sup>	0,247*	0,070 <sup>NS</sup>	34,918*
BLOCOS	4	18,750 <sup>NS</sup>	92,500 <sup>NS</sup>	0,547**	0,025 <sup>NS</sup>	8,643 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	12	58,750	119,791	0,070	0,088	8,971
TOTAL	19					

<sup>NS</sup> Não significativo.

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ANEXO 3 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO ETANOL NA ESTAQUIA SEMILENHOSA DE *Passiflora actinia*.

CAUSA DE VARIÂNCIA	GL	QM				
		ENRAIZAMENTO (%)	RETENÇÃO FOLIAR (%)	BROTAÇÃO (%)	BROTOS / ESTACA (NÚMERO)	RAÍZES / ESTACA (NÚMERO)
TRATAMENTOS	5	258,833 <sup>NS</sup>	45,333 <sup>NS</sup>	0,142 <sup>NS</sup>	0,063 <sup>NS</sup>	0,444 <sup>NS</sup>
BLOCOS	4	152,083 <sup>NS</sup>	213,750 <sup>*</sup>	0,044 <sup>NS</sup>	0,057 <sup>NS</sup>	2,217 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	20	97,583	68,875	0,125	0,153	1,218
TOTAL	29					

<sup>NS</sup> Não significativo.

<sup>\*</sup>Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRIANCE, G.W.; BRISON, F.R. **Propagation of horticultural plants**. 2. Ed. Bombay-N.D : McGraw-Hill Publishing, 1967. 298p.
2. AKAMINE, E.K.; HAMILTON, R.A.; NISHIDA, T. SHERMAN, G.D.; STOREY, W.B. **Passion culture**. University of Hawaii, 1954. 23p. (Extension Circular, 345).
3. AKAMINE, E.K.; BEAUMONT, J.H.; BOWERS, F.A.I.; HAMILTON, R.A.; NISHIDA, T.; SHERMAN, G.D.; SHOJI, K.; STOREY, W.B.; YEE, W.W.J.; ONSDORFF, T.; SHAW, T.N. **Passion fruit culture in Hawaii**. Hawaii : University of Hawaii, 1956. 35 p. (Extension Circular, 345).
4. ALMEIDA, L.P.; BOARETO, M.A.C.; SANTANA, R.G.; NASCIMENTO, G.M.; SOUZA, P.J.S.; SÃO JOSÉ, A.R. Estaquia comportamento de maracujazeiros (*P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) propagados por via sexual e vegetativa **Revista Bras. Fruticultura**, v. 13, n. 2, p. 153-156, 1991.
5. ALTMAN, A.; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. **Acta Hort.** n.1, p. 51-60, 1977.
6. AUDUS, L.J. The synthetic auxins. In: AUDUS, L. J. **Plant growth substances**. 2.ed. New York : Intersciences, 1963, p. 66-103.
7. AVERY, JR., G.S.; JOHNSON, E. B. **Hormones and horticulture: the use of special chemicals in the control of plant growth**. New York : McGraw-Hill, 1947, v. 2, p. 13-121. McGraw-Hill Publications in the Botanical Sciences.
8. BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, N.C.; BHATNAGAR, V.B. Effect of Ethanol, methanol and acetone on rooting etiolated cuttings of *Vigna radiata* in presence of sucrose and auxin. **Ann. Bot.**, v.55, p. 143-155, 1985.
9. BLAZICH, F.A.; HENSEN, C.W. A historical study of adventitious root formation in mung bean cuttings. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 104, n.1, p. 63-67, 1979.
10. BLEASDALE, J.K. Vegetative propagation. In : BLEASDALE, J.K. **Plant physiology in relation to horticulture**. 2.ed. Science in Horticulture Series. Houndmills: McMillann Education, cap. 4, 1984, p. 88-104.
11. BLOCH, R. Polarity in plants. **Bot. Rer.** v. 9, p. 261-310, 1943.
12. BOSE, T.K.; MANDAL, D.P. Mist propagation of tropical plants. **Indian Horticulture**, v. 17, n. 1, p. 25-26, 1972.

13. BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.
14. BRUTSCH, M.O. The anatomy of adventitious root formation in adult phase pecan (*Carya illinoensis* (Wang) K. Koch) stem cuttings. **HortScience**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 1977.
15. BURGER, D. W.; LIU, L., WU, L. Rapid micropropagation of *Paulownia tormentosa*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 4, p. 760-761, 1985.
16. CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990, p. 37-70.
17. CAMERON, R.J.; ROOK, D.A. Rooting stem cuttings of Radiata pine: environmental and physical aspects. **N.Z.J. For Sci.**, v. 4, n. 2, p. 291-298, 1974.
18. CAMPOS, H. **Estatística experimental não-paramétrica**, 4. ed. Piracicaba, S.P.: 1983, p. 203-211.
19. CARVALHO, A.M. de. **Instruções para a cultura do maracujá**. Campinas: I.A.C., 1965. (mimeografado) 7 p.
20. CARVALHO, A.M. Melhoramento da cultura do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ. (1. : 1971 : Campinas). **Anais** : Campinas : Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 2, 1974, p. 1-9.
21. CHALUPA, V. Temperature. In: BONGA, J. M. e DURZAN, D. J. (Eds.) **Cell and tissue culture in forestry. General principles and bio technology**. Dordrecht,: Martinus Nijhoff Publishers, v. 1, 1987, p. 142-151.
22. CHAPMAN, A.P.E.; HUSSEY, E.C. The value of plant growth regulators in the propagation of *Vitis champini* root stocks. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 31, n. 3, p. 250-253, 1980.
23. CHAPMAN, T. Passion fruit growing in Kenya. **Economic Botany**. v. 17, n. 3, p. 165-168, 1963.
24. CEREDA, E.D.; PAPA, R.C.R. Enraizamento de estacas das espécies de maracujazeiro *Passiflora alata* e *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. Sob nebulização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA (10. : 1989 : Fortaleza). **Anais**. Fortaleza : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1989, p. 375-378.

25. CERVI, A. C. Passifloraceæ do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*; **FONTQUERIA XLV**, Madrid, 1997, 92 p.
26. CHRISTOPHER, E.P. Plant propagation. In: CHRISTOPHER, E. P. ; **Introductory horticulture**. New York : McGraw-Hill Publications in the Agr. Sci., 1958 p. 107-140.
27. CLINE, M. N.; D. NEELY. The histology and histochemistry of the wound healing process in geranium cuttings. **Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 108, p. 452-496, 1983.
28. COUVILLON, G.A. Rooting responses to treatments **Acta Hort.**, Wageningen, n. 227, p. 187-196, 1988.
29. DAVIES, F. T., Jr.; J. E. LAZARTE; J. N. JOINER. Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. **Amer. Jour. Bot.**, v. 69, p. 804-811, 1982.
30. DEBERGH, P. C.; MAENE, L. T. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Sci. Hort.**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.
31. DESAI, H.; MEHTA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, and callus induction in cultured *Passiflora* discs. **Jour. Plant Physiol.**, v. 119, p. 45-53, 1985.
32. DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, 1984.
33. 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**, n. 3, p. 103-106, 1993.
34. DOODS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1985, 232 p.
35. ECONOMOU, A. S.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 751-754, 1987.
36. ELIASSON, L. Growth regulators in *Populus tremula* L.: distribution of auxin and growth inhibitors. **Physiol. Plant.**, v. 22, n. 6, p. 1288-1301, 1969.
37. ESQUIVEL, E. A.; LABRADOR, E. **Cultivo del maracuya**. Chiriqui, Panamá, 1977, 44 p.

38. FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas : Ed. da UFPEL, 1994, 179 p.
39. FEICHTINBER JUNIOR, W. **Enraizamento de diferentes tipos de estacas enfolhadas de maracujazeiro (*Passiflora edulis sims f. flavicarpa Deg.*) em câmara de nebulização**. (Trabalho de Graduação) 1985, 50 p.
40. FITCHET, M. Propagation by means of tissue culture technique. II Organ Culture. **Subtropica**, Pretoria, v. 8, n. 6, p. 10-16, 1987.
41. FIORINO, P.; LORETI, F. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 3, p. 353-358, 1987.
42. FLANCET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. **Aust. For. Res.**, v.13, p. 83-89, 1982.
43. FOSSARD, R. A.; BORNE, R. A. Vegetative propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muel by nodal culture *in vitro*. **Proc. Intl. Plant Prop. Soc.**, v. 26, p. 373-378, 1976.
44. FREY, L.; JANICK, J. Organogenesis in carnation. **Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.**, Alexandria, v. 116, n. 6, p. 1108-1112, 1991.
45. FREY, L.; SARANGA, Y.; JANICK, J. Somatic embryogenesis in carnation. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n.1, p. 63-65, 1992.
46. GACHANJA, S.P. Training and pruning of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) in Kenya. **Acta Horticulture** n. 49, p. 219-222, 1975.
47. GARNER, R.J. Propagation of wood plants by cuttings, recent research and its application to fruit tree rootstock. **J. Royal Horts. Soc.**, n.83. 33p, 1958.
48. GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley : Eastern Press., 1984, 709 p.
49. GIROUARD, R.M. Initiation and development of adventitious roots in stem cuttings of *Hedera helix*. Anatomical studies of the juvenile growth phase. **Can. J. Botany**, v. 45, p. 1877-1886, 1969.
50. GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L. S.; SILVA, J. R.; MACHADO, M. A. Cultura de tecidos e estaquia de maracujá. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MARACUJÁ **Anais** (3. : 1988 : Vitória da Conquista) Fundação Cargill, 1988.

51. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990, p. 99-169.
52. HADDAD GARCIA, O.; MILLAN FARIÑAS, M. **La parchita maracuya**. (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). Caracas, Fondo de Desarrollo Frutícola, 82 p, 1985. (Boletim Técnico, 2).
53. HAKKART, F.A.; VERSLUSYS, J.M.A. Virus in *Passiflora caerulea* eliminated by meristem culture Virus in *P. caerulea* door meristem culture. **Vakblad voor de Bloemisterij**, v. 36, p. 24-25, 1981.
54. HAKMAN, I.; FOWKE, L. C.; VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from imature embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). **Plant Science**, Berkeley, v. 38, p. 53-59, 1985.
55. HANGER, B.F. The propagation of *Coffea arabica* using intermetent mist. **Kenya Coffea**, v. 26, p. 337-373, 1961.
56. HANSEN, J.E. e NYMANN, R. Root formation of pea cutting in relation to irradiance of the stock plants. **Physiol. Plant**, v. 32, n. 2, p. 170-173, 1974.
57. HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. DAVIES JR., F.F. **Plant propagation: principles and practices**. 5 ed. New Jersey : Pretice Hall Career and Technology, 1990, 647p.
58. HEAMANS, J.C.; OWENS, J.W. Callus formation and root formation in stem cuttings of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco). **Can. J. for. Res.**, v. 121, p. 121-134, 1972.
59. HILLER, C. **A study of the origin and development of callus and root primordia of *Taxus cuspidata* with reference to the effects of growth regulator**. Ithaca, N.Y., 1951. Dissertação (Tese de Mestrado em Morfologia Vegetal) Cornell University, 86 p.
60. HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem shoot tip and bad culture. In: EVANS, D. A. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breedings**. New York : 1983, v.1, 60 p.
61. JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants by cuttings**. Dordrecht : Martinus Nijhoff. p. 191-222, 1986.

62. JOINER, J.N.; GRUIS, J.T. Leaching of mineral elements from cuttings and their possible replacement by foliar application while under mist. **Proc. Fla. Sta. Hort. Soc.**, v. 78, p. 399-404, 1966.
63. KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, n. 65, p. 337-339, 1990.
64. KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **J. Plant Physiol.**, v. 147, p. 281-284, 1995.
65. KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e micoplasmática em maracujazeiros no Brasil. **Fitopal. Bras.**, v. 11, p. 409-432, 1986.
66. KLIMASZEWSKA, K. Plant regeneration from petiole segments of some species in tissue culture. **Acta Agrobotanical**, v. 34, p. 5-28, 1981.
67. KOMISSAROV, D.A. Biological basis for propagation of woody plants by cuttings. Jerusalem, Israel. **Program for Scientific Translation**, 1969, 250 p.
68. KRUL, W. R. Increasead root initiation in pinto bean hypocotyls with 2,4-dinitrophenol. **Plant Physiol.** v. 3, p. 439-441, 1968.
69. LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, p. 452-469, 1991.
70. LENDERMAN, E. **Propagation on certain pome fruit species by cuttings.** Jerusalem, 1972. Dissertação (Tese de Mestrado). Rehovot of the Hebrew University, 55 p.
71. LEOPOLD, A. C. The polarity of auxin transport in *Meristems and Differentiation*, Brookhaven symposia in biology, Rpt. 16. Upton, N. Y. Brookhaven **Natl. Lab.**, p. 218-38, 1964.
72. LU, C.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis and plantled regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 297-302, 1987.
73. MAINI, J. S. The relationship between the origin od adventitious buds and the orientation of *Populus tremuloides* root cuttings. **Bul. Ecol. Soc. Amer.**, v.49, p. 81-82, 1968.

74. MANDERS, G.; OTONI, W. C.; VAZ F. B. d'UTRA, BLACKHALL, N. W.; POWER J. B.; DAVEY M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, n. 13, p. 697-702, 1994.
75. MANICA, I. - **Fruticultura tropical: 1. Maracujá** - São Paulo : Agronômica Ceres 1981, 160 p.
76. MATSUMOTO, S.N.; SÃO JOSÉ, A.R. : Influência de diferentes substratos no enraizamento de estacas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). In : CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. 10. : Fortaleza 1989. **Anais**. Fortaleza : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1989, p. 379-401.
77. MELETTI, L.M.M.; NAGAI, V. : Enraizamento de estacas de sete espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p.163-168, 1992.
78. MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogenetique des entrenoeuds de *Passiflora edullis* var. *flavicarpa* et de *P. mollissima* en culture in vitro. **Turrialba**, v. 29, n. 2 p. 224-228, 1979.
79. MOORE, G. A. In vitro propagation of *Citrus* rootstocks. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 300-301, 1986.
80. MORLEY-BUNKER, M.J.S. **Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp and other tropical and subtropical crops**. Londres : University of London, 1974, 43 p.
81. MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In: ROCA, W. M; MROGINSKI, L. A., (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali : CIAT. P., 1991, p. 19-40.
82. MUDGE, K. W. Micropropagation of mugo pine from embryonic and seedling explants. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 298-299, 1986.
83. MURALIDHAR, C.E.; MEHTA, A.R. Clonal propagation of three ornamental plants through tissue culture. In : **Plant Tissue Culture**. Association for Plant Tissue Culture, p. 693-694, 1982.
84. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantatum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
85. NAKAYAMA, F. Cultivo in vitro de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Ver. Fec. Ag. Nac.** La Plata, v. 42, p. 63-74, 1966.

86. NANDA, K. K. Seasonal rooting response of stem cutting of some forest trees species to auxins, **Ind. For.**, v. 94, n. 2, p. 154-162, 1968.
87. NATHAN, M. J.; GOH, C. J.; KUMAR, P. P. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 450-452, 1992.
88. OLIVEIRA, J.C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. Ed. **Cultura do maracujazeiro**. Ed. L. Summa: Ribeirão Preto, 1987, p. 218-246.
89. OTONI, W. C.; TEIXEIRA, S. L. Propagação clonal "*in vitro*" de *Citrus sinensis* (L.) Osb. Cv. Pêra, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis: I. Influência de citocininas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 38, n. 215, p. 17-24, 1991.
90. PATON, D. M. Rooting, of stem cuttings of *Eucalyptus* - a rooting inhibitors in adult tissues, **Austr. J. Bot.**, v. 18, n. 2, p. 175-183, 1970.
91. PAULA, S. R. **Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e comparação das folhas de plantas *in vitro* com as de casa de vegetação**. Curitiba, 1992. Dissertação (Mestrado em Morfologia Vegetal) - Universidade Federal do Paraná) 97p.
92. PAYAN, F. R.; MARTIN, F. W. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species **Euphytica**, v. 24, p. 706-716, 1975.
93. PIZA JUNIOR, C.T. **A cultura do maracujá**. Campinas: Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Assistência Técnica Especializada, Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, 1966. 102 p. (Boletim Técnico).
94. PRAZERES, L. C., **Estudo dos aspectos biológicos da flor e do sistema de reprodução de *Passiflora actinia* Hooker (Passifloraceae) na região metropolitana de Curitiba**. Curitiba, PR, 1989. Dissertação (Mestrado em Botânica – Universidade Federal do Paraná) 79p.
95. PRIESTLEY, J. H.; C. F. SWINGLE. Vegetative propagation from the standpoint of plant anatomy. **USDA Tech Bul.**, 1929, 151 p.
96. PURSS, G.S. Studies of the resistance of species of *Passiflora* to *Fusarium* wilt (*F. oxysporum* f. *passiflorae*). **Queensland J. Agric. Sci.** v. 15, p. 95-99, 1958.
97. REINES, M.; McALPINE, R.G. The morphology of normal callused and rooted dwarf slash pine. **Botanical Gazette**, v. 121, n. 2, p. 118-124, 1959.

98. ROBERTS, A. N.; FUCHIGAMI, L. H. Seasonal changes in auxin effects on rooting of Douglas-fir stem cuttings as related to the bud activity, **Phys. Plant.** v. 38, n. 2, p. 215-221, 1973.
99. ROBINSON, J. C.; W. W. SCHWABE. Studies on the regeneration of apple cultivars from root cuttings. II. Carbohydrate and auxin relations. **Jour. Hort. Sci.** v. 52, p. 221-233, 1977.
100. RUGGIERO, C.; CORRÊA, L.S. Propagação do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 2, Jaboticabal, 1978. **Anais.**, Jaboticabal : Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual de São Paulo : Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 24-29, 1978.
101. RUGGIERO, C. Considerações gerais sobre a cultura no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do Maracujazeiro.** Ed. L. Ribeirão Preto : Summa, 1987, p. 5-7.
102. RUGGIERO, C.; MARTINS, A. B.G. Implantação da cultura e propagação. In : RUGGIERO, C. (Ed.) **Maracujá.** Ribeirão Preto: Ed. L. Summa. 1987, p. 40-57.
103. SALISBURY, F.B.; ROOS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberilins. In : SALLISBURY, F. B. **Plant physiology.** Belmont : Wadsworth, 315 p., 1985.
104. SÃO JOSÉ, A. R. **Influência do método de extração na qualidade fisiológica de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)** Botucatu, 1987. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de São Paulo, 87 p.
105. SÃO JOSÉ, A.R. Propagação do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. **A cultura do maracujá no Brasil.** FUNEP/UNESP, 1991, p. 25-41.
106. SÃO JOSÉ, A.R.; ALMEIDA, L.P.; SANTANA, R.G.; SOUZA, P.J.S. Comportamento de maracujazeiros (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) propagados por via sexual e vegetativa. **Rev. Bras. Fruticultura**, v. 15, p. 159-164, 1994.
107. SÃO JOSÉ, A. R.; NAKAGAWA, J. Influência do método de extração na qualidade fisiológica de sementes de maracujazeiro amarelo. In : CONGRESSO DE FRUTICULTURA. (9. :1987 : Campinas) 1987. **Anais**, SBF, Campinas : 1988, p. 619-623.

108. SCORZA, R.; JANICK, J. Flowering from leaf discs of *Passiflora suberosa* *in vitro*. **Proc. Symp. Prop. Higher Plants Tissue Culture**. Knoxville, Tenn. 249 p., 1978.
109. SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 105, n. 6, p. 892-897, 1980.
110. SILVA, I.C. **Propagação vegetativa: aspectos morfofisiológicos**. Belém : CEPLAC/DEPEA, 1985.
111. SINGH, S.; KRISHNAMURTHI, S.; KATYAL, S.L. **Fruit culture in India**. Indian Council of Agricultural Research, New Dehli : 1963, 455 p.
112. SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. For Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-131, 1987.
113. SKOOG, F.; TSUI, G. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem and callus. **Amer. Jour. Bot.** v. 35, p. 782-787, 1948.
114. SKOOG, F.; TSUI, G. Growth substances and the formation of buds in plant tissues. In: SKOOG, F. **Plant growth substances**. Madison : Univ. Wisconsin Press, 1951, p. 263-285.
115. SMITH, A. Adventitious roots in stem cuttings of *Begonia maculata* and *Begonia semprevirens*. **Amer. J. Bot.**, v. 23, n. 7, p. 511-515, 1936.
116. SMITH, R. H.; MURASHIGE, T. *On vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **Amer. J. Bot.**, v. 57, p. 562-568, 1970.
117. STREET, H.E.; GRIFFITHS, D.J.; THRESHER, C.L.; OWENS, M. Ethanol as a carbon source for the growth on *Chorella vulgaris*. **Nature**. London, v. 182, p. 1360-1364, 1958.
118. SWEET, H. C. ; BOLTON, W. E. The surface descontamination of seeds to produce axenic seedlings. **Amer. J. Bot.** Columbus, v. 66, n. 6, p. 692 – 698, 1979.
119. TIZIO, R.; ALMEIDA PONS, G.; TRIONE, S. O.; TRIPPI, V. S. Estudios sobre enraizamento em vid. VII Auxinas inibidores y la capacidad rizógena de las estacas. **Phyton** v. 20, n. 1, p. 1-12, 1963.
120. TORRES, A. C.; PINHEIRO, R.V.R.; SHIMOYA, C. Anatomia da origem e do desenvolvimento de raízes adventícias em estacas de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa*). **Ceres**, v. 24, n. 131, p. 19-35, 1976.

121. TRIONE, S. O.; ALMEIDA PONS, G.; TIZIO, R.; TRIPPI, V. S. Estudios sobre enraizamiento en vid. VIII. Variación anual de la capacidad rizógena y su relación com tratamientos hormonales. **Phyton**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 1963.
122. TSAY, H.S.; HSU, J.Y.; YANG, T.P.; YANG, C.R. Anther culture of passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Res. Of China**, v. 33, n. 2, p. 126-131, 1984.
123. VADERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit** - 2<sup>nd</sup> ed. MIT Press 1996.
124. VASIL, J. K.; HILDEBRANDT, A. C. Variations of morphogenetic behaviour in plants tissue culture. I. *Cichorium endivia* Linn. Ann. J. Bot., v.53, p. 860-869, 1966.
125. VAZ F. B. d'Utra.; 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**, v. 2, p. 220-225, 1993.
126. VESTRI, F.; SCHIFF, S.; BENNICI A. *In vitro* shoot regeneration in *Passiflora coerulea*. **Acta Horticulturae**, n. 280, p. 105-106, 1990.
127. VILLALOBOS, A. V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A., (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali : CIAT, 1991, p. 127-141.
128. VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 870-874, 1991.
129. YEOMAN, M. M.; MACLEOD, A. J. Tissue (callus) cultures - techniques. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. Berkeley. : University of California Press, 1977, p. 31-59.
130. WALES, N. S. **Passion fruit**. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA, 1975, 20 p.
131. WARMKE, H. E.; G. L. WARMKE. The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*. **Amer. Jour. Bot.** v. 37, p. 272-280, 1950.
132. WEAVER, R. J. Rooting and propagation. In: WEAVER, R. J. **Plant growth substances in agriculture** San Francisco: Freeman, cap. 5, 1972, p. 118-145,

133. WRIGHT, N. A.; ALDERSON, P. G. The growth of tulip tissues in vitro. **Acta Hort.**, n. 109, 1980, p. 263-270.
134. ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In : BONGA, J. M.; e DIRZAN, D. J. (Ed.) **Tissue culture in forestry**. 2. ed. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, p. 231-255, 1985.
135. ZANETTE, F. **Propagação da pereira *Pirus communis* Var. Garber por estaquia lenhosa**. Curitiba, 1995. (Tese para o Concurso de Professor Titular de Fitotecnia, Universidade Federal do Paraná) 59 p.
136. ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulture**, Wageningen, n. 227, 1988, p. 489-499.