

Germinação in vitro de sementes de maracujazeiro-amarelo

In vitro germination of yellow passion fruit seeds

Savana Iribarem Costa¹, Andrio Spiller Copatti², Igor Cavalcante de Albuquerque³,
Camila Schwartz Dias⁴, Paulo Mello-Farias⁵

Resumo

Sementes de maracujazeiro apresentam dormência sob condições in vitro, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes. Sendo assim, objetivou-se analisar aspectos da germinação in vitro de sementes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), quanto à escarificação e o efeito do uso do regulador de crescimento ácido giberélico (AG₃). Sementes de frutos maduros foram lavadas em água corrente, friccionadas à mão e, posteriormente, colocadas para secar à sombra por cinco dias. Após foram imersas em solução contendo as doses de AG₃ (0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg.L⁻¹), onde permaneceram por 24h. Passado este período, foi feita a desinfestação e posteriormente as mesmas foram preparadas segundo os tratamentos físicos no tegumento (escarificado e intacto). As sementes foram inoculadas em meio de cultura ½ MS, contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas e mantidas em BOD sob condições controladas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2 (dose x tratamento físico), com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de cinco tubos de ensaio. A avaliação foi realizada diariamente e ao final de 45 dias, sendo observados a porcentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG). Maiores médias para as variáveis analisadas foram obtidas com a utilização de escarificação das sementes utilizando-se 125 mg.L⁻¹ e 0 mg.L⁻¹ de AG₃, respectivamente. A escarificação da extremidade de sementes proporciona maiores médias para as variáveis analisadas em sementes de maracujazeiro-amarelo. A imersão das sementes em solução contendo o regulador de crescimento AG₃ por 24h não obteve efeito sobre as variáveis analisadas.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; escarificação; AG₃.

Abstract

¹Doutoranda em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado – UFPel

²Doutorando em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado – UFPel

³PhD Candidate in molecular plant pathology – University of Saskatchewan – Canadá

⁴Mestranda em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado – UFPel

⁵Professor, Dr. Fruticultura de clima Temperado – UFPel

Passion fruit seeds present dormancy under in vitro conditions, causing low and desuniform germination rates. Therefore, aimed to analyze the in vitro germination of yellow passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa), scarification and the effect of growth regulator use gibberellic acid (GA₃). Seeds from mature fruits were washed in water, were rubbed by hands and then put to dry in the shade for five days. After that, they were immersed in a solution containing GA₃ doses (0, 25, 50, 75, 100 and 125 mg.L⁻¹), where they remained for 24 hours. After, it was made disinfection and subsequently they have been prepared in accordance with physical treatments in the integument (scarified and intact). Seeds were inoculated on ½ MS medium containing half the minerals and vitamins concentrations and maintained in growth chamber under controlled conditions. Experimental design was completely randomized in a factorial 6x2 (dose x physical treatment), with four replicates, each consisting of five test tubes. Evaluation was performed daily, and after 45 days percentage of germinated seeds and germination speed index was observed. The highest averages for variables analyzed were obtained with seeds scarification using 125 mg.L⁻¹ and 0 mg.L⁻¹ GA₃. Seed end scarification provides higher averages for the variables analyzed in Passiflora edulis f. flavicarpa. The immersion of seeds in a solution containing growth regulator GA₃ for 24 hours had no effect on the variables analyzed.

Keywords: *Passiflora edulis f. flavicarpa; scarification; GA₃.*

Introdução

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, que inclui mais de 630 espécies, das quais a maior parte é representada pelo gênero *Passiflora* e habita as regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (OLIVEIRA, 1987; VANDERPLANK, 1996). Apesar disso, a espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. é a responsável por 95% dos pomares no Brasil, devido à excelente qualidade e rendimento de suco, e também pelo vigor, produtividade, e as condições ecológicas para seu cultivo no país (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

Para algumas espécies de maracujazeiro, o estabelecimento dos bancos ativos de germoplasma (BAGs) in vitro tem sido bem sucedido, principalmente para espécies que exigem produção de matrizes livres de vírus, com a vantagem da economia de espaço e simplificação nos procedimentos de intercâmbio e quarentena de plantas. Contudo, a falta de protocolos de regeneração in vitro não tem permitido, ainda, o uso extensivo deste processo de manejo de germoplasma (CARVALHO et al., 2012).

Plântulas germinadas in vitro podem constituir ótima fonte de explantes para estudos de morfogênese. Porém, as sementes do maracujazeiro apresentam

dormência sob condições *in vitro*, ocasionando taxas de germinação baixas e desuniformes (JUNGHANS; VIANA; JUNGHANS, 2006).

Dentre os reguladores de crescimento, as giberelinas (AGs) estão diretamente relacionadas à germinação de muitas sementes, uma vez que sua aplicação exógena promove a expressão dos genes que controlam a síntese das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares do endosperma, induzindo o crescimento do embrião e estimulando o processo germinativo (CARVALHO et al., 2012). Segundo Cardoso (2004), as AGs contrabalanceiam a inibição imposta pelo ácido abscísico, provocando um aumento endógeno de AGs, que torna evidente sua participação na superação da dormência das sementes. O tipo de AG mais utilizado *in vitro* é o ácido giberélico (AG₃) (BRAUN et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Algumas espécies da família Passifloraceae possuem dormência em suas sementes, ocasionada pelo mecanismo de controle da entrada de água para o seu interior, devido à dureza do tegumento, necessitando de tratamentos para sua superação (MORLEY-BUNKER, 1974), sendo importante estudar o processo de escarificação na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo.

Para a cultura do maracujazeiro, não existem informações suficientes sobre a germinação *in vitro*, demonstrando a importância deste tipo de estudo na contribuição para o sucesso da fase de estabelecimento *in vitro* que precede a micropropagação por meio de explantes derivados de sementes. O objetivo foi estudar aspectos da germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro-amarelo quanto à presença ou ausência de escarificação e utilização do regulador de crescimento AG₃.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2014.

Os tratamentos foram constituídos de seis doses de ácido giberélico (AG₃) (0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg.L⁻¹) e dois tratamentos físicos no tegumento (intacto e escarificado), totalizando 12 tratamentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x2 (dose x tratamento físico), com quatro repetições, onde cada repetição foi constituída de cinco tubos de ensaio, contendo uma semente cada tubo.

As sementes utilizadas foram oriundas de frutos maduros de maracujazeiro-amarelo seleção 'Ovalado Grande' da EPAGRI, provenientes de plantas cultivadas no campo experimental do Centro Agropecuário da Palma (CAP), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, latitude 31°52'00" S, longitude 52°21'24" W e 13 m de altitude.

Os frutos foram cortados ao meio, onde se extraiu de sua cavidade central as sementes juntamente com os restos placentários, que foram despejados sobre uma peneira de malha fina. Para a remoção completa do envoltório e do arilo das sementes, as mesmas foram friccionadas à mão e subsequentemente promoveu-se lavagem em água corrente. Executada esta operação de extração dos envoltórios e do arilo das sementes, as mesmas foram distribuídas uniformemente sobre um papel toalha e deixadas secar à sombra por cinco dias.

Transcorridos os dias, as sementes foram imersas em solução contendo as doses de AG₃ testadas no experimento, onde permaneceram por 24h. Após este período, as sementes foram primeiramente imersas por três minutos em solução de etanol a 70% sob agitação, objetivando-se a desinfestação superficial, e posteriormente, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% com duas gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Na sequência, o material desinfestado foi lavado três vezes com água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar, para posterior isolamento.

As sementes foram preparadas segundo os tratamentos físicos no tegumento em: escarificado (no lado oposto à região afilada das sementes, seccionadas com auxílio de bisturi) e intacto (o tegumento da semente não foi submetido a tratamento físico), sendo as mesmas inoculadas em meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962, contendo metade das concentrações de sais minerais e vitaminas), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (150x20 mm) contendo 10 mL de meio de cultura.

Os tubos foram fechados com papel alumínio, selados com filme de PVC transparente e colocados em BOD no escuro a uma temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento da germinação da semente. Durante o período de avaliação do experimento, não observou-se contaminação das sementes.

As variáveis analisadas foram o percentual de sementes germinadas (G%) aos 45 dias, e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme a fórmula sugerida por Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, onde: G1, G2, Gn = número de sementes germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Para a avaliação do IVG, a contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente, considerando-se como germinadas, as sementes com no mínimo 2 mm de raiz primária, até os 45 dias.

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, à independência dos resíduos por análise gráfica. Para as variáveis de germinação e IVG foi necessária a transformação $\sqrt{(x+0,5)}$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos da escarificação foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$). Os efeitos das doses foram avaliados por modelos de regressão linear ($p \leq 0,05$), conforme segue:

$$y = a + bx;$$

$$y = y_0 + ax + bx^2;$$

onde: y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = doses de AG_3 (mg.L^{-1}).

Resultados e Discussão

Não houve interação entre os fatores testados, apenas nos fatores isoladamente. Observou-se diferença significativa quanto à escarificação, uma vez que as sementes que não foram escarificadas não germinaram mesmo com a adição de AG₃, até o período final da avaliação (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG), de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2017.

Dose (mg.L AG ₃)	Escarificação	
	Sem	Com
	G%	
0	0,00±0,00 *	85,00±9,57 ^{1/}
25	0,00±0,00 *	65,00±9,57
50	0,00±0,00 *	40,00±0,00
75	0,00±0,00 *	60,00±0,00
100	0,00±0,00 *	65,00±9,57
125	0,00±0,00 *	90,00±5,77
	IVG	
0	0,00±0,00 *	0,29±0,02
25	0,00±0,00 *	0,18±0,05
50	0,00±0,00 *	0,08±0,00
75	0,00±0,00 *	0,20±0,02
100	0,00±0,00 *	0,19±0,02
125	0,00±0,00 *	0,32±0,03

^{1/} Média de quatro determinações ± erro padrão. ^{ns} e * Não-significativo e significativo, respectivamente, pelo teste t (p≤0,05) comparando a escarificação dentro de cada dose.

Com relação à porcentagem de germinação, a maior média foi obtida quando foi feita a escarificação da extremidade das sementes e utilizada a dose de 125 mg.L⁻¹ de AG₃ (Figura 1A). Verificou-se que, para as sementes escarificadas, não houve diferença estatística entre as doses de AG₃ testadas, exceto para a dose de 50 mg.L⁻¹ que obteve a menor média. Carvalho et al. (2012) verificaram em relação à porcentagem de germinação, a maior média quando foi realizada a escarificação da extremidade de sementes secas com pinça e bisturi, sendo que para as sementes frescas, não houve diferença estatística entre a escarificação da extremidade da semente com lixa e com a utilização de pinça e bisturi. Gonçalves Neto et al. (2015) obtiveram maior porcentagem de germinação em *P. suberosa*,

acima de 80%, quando foi utilizado tratamento mecânico para superação da dormência das sementes.

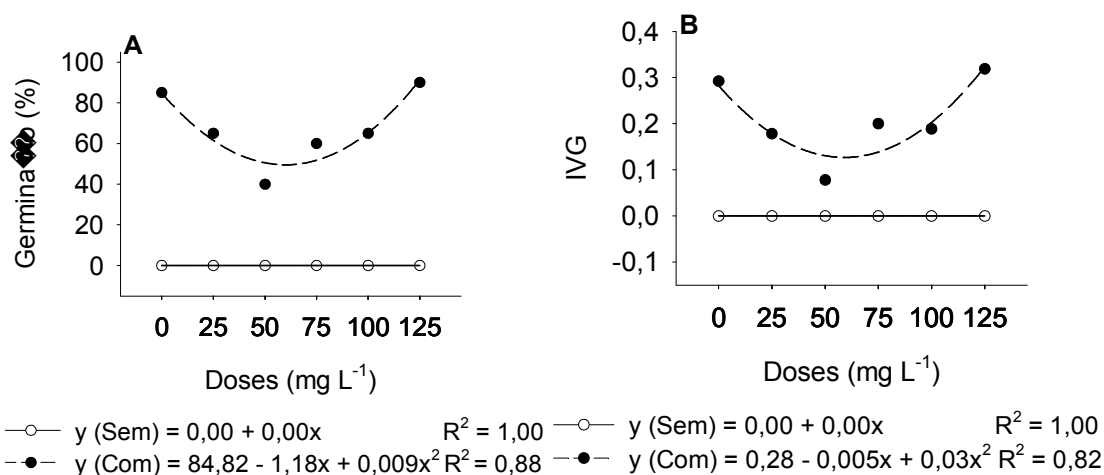


Figura 1 Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes de maracujazeiro-amarelo avaliados aos 45 dias. Pelotas-RS, 2017.

A ausência de escarificação ocasionou a não germinação das sementes, independente das doses de AG₃. Estes resultados corroboram com os encontrados por Carvalho et al. (2012), onde observou-se que a ausência de escarificação proporcionou as menores taxas de germinação e até mesmo a ausência de germinação, independentes das concentrações de AG₃ testadas. Baseado nos resultados deste trabalho pode-se inferir que o maracujazeiro-amarelo possui dormência extra-embriônica, superada por ação mecânica.

Neste trabalho, as sementes foram capazes de germinar independentemente da adição do regulador de crescimento AG₃, não constituindo assim um caso de dormência embriônica, porém mostrando-se necessária a escarificação. Esses resultados são contrários aos de autores que observaram incremento na germinação das sementes de várias espécies do gênero *Passiflora* quando da utilização de reguladores de crescimento (FERREIRA, 1998; ZONTA et al., 2005; FERRARI et al., 2008; LIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2010; COSTA et al., 2010), inclusive com a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* (FERREIRA, 1998). Entretanto, a necessidade do rompimento do tegumento para ocorrência da germinação verificada neste trabalho, corrobora com trabalhos realizados com Passifloráceas (ZONTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; GONÇALVES NETO et al., 2015).

Os maiores índices de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos para sementes com escarificação de suas pontas, com as concentrações de 125 mg.L⁻¹ e 0 mg.L⁻¹ de AG₃ (Figura 1B), não diferindo estatisticamente. As demais doses apresentaram comportamento semelhante, sendo a menor média observada quando foi utilizada a dose de 50 mg.L⁻¹. Quanto à escarificação (Tabela 1), houve diferença significativa entre os tratamentos físicos realizados no tegumento, não havendo sementes germinadas para o cálculo do IVG nas sementes não escarificadas. Carvalho et al. (2012), observaram maiores médias para IVG em sementes frescas e secas com escarificação de suas pontas. Assim como os resultados obtidos para percentagem de germinação in vitro, os mesmos autores verificaram que a ausência de escarificação propiciou a velocidade mais lenta para sementes frescas e secas.

Em experimento realizado por Lima et al. (2006), o índice de velocidade de emergência (IVE) de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi de 8,85 dias, sendo inferior às demais espécies, que apresentaram uma menor velocidade de emergência. Confirmando os resultados obtidos no presente trabalho, corroborando com os resultados de Lima et al. (2006), verifica-se que, para tornar a germinação in vitro de *P. edulis* f. *flavicarpa* viável, devem-se utilizar métodos de superação de dormência.

Conclusões

A escarificação da extremidade das sementes proporciona maiores médias para a germinação e índice de velocidade de germinação de *P. edulis* f. *flavicarpa* independente da dose de AG₃. A imersão das sementes em solução contendo o regulador de crescimento AG₃ por 24h não afeta a germinação in vitro de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

BRAUN, H.; LOPES, J.C.; SOUZA, L.T.; SCHMILDT, E.R.; CAVATTE, R.P.Q.; CAVATTE, P.C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.

CARDOSO, V.J.M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 386-408, 2004.

CARVALHO, M.A. de F.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; PORTO, J.M.P.; HERRERA, R.C.; STEIN, V.C. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, maio/jun. 2012.

COSTA, C.J.; SIMÕES, C.O.; COSTA, A.M. **Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação de dormência de sementes de *Passiflora setacea* D. C.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010, 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 271).

FERRARI, T.B.; FERREIRA, G.; MISCHAN, M M.; PINHO, S.Z. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): fases e efeito de reguladores vegetais. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 65-74, set. 2008.

FERREIRA, G. **Estudo da embebição e do efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloraceas**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998, 139p.

GONÇALVES NETO, L.P.; BOAVENTURA, V.J.; FONSECA, J.S.T.; CRUZ, C.P.P. Análise biométrica e quebra de dormência de sementes de três espécies de *Passiflora*. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2015.

JUNGHANS, T.G.; VIANA, A.J.C.; JUNGHANS, D.T. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá *gibertii* com e sem tegumento parcialmente removido. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006, Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRuralRJ, p. 191, 2006.

LIMA, A. de A.; CALDAS, R.C.; SANTOS, V. da S. Germinação e crescimento de espécies de maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 125-127, 2006.

LIMA, C.S.M.; BETEMPS, D.L.; TOMAZ, Z.F.P.; GALARÇA, S.P.; RUFATO, A.R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, jan./dez. 2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010, 55p.

MORLEY-BUNKER, M.J.S. **Some aspects of seed dormancy with reference to Passiflora spp. and other tropical and subtropical crops**. London: University of London, 1974. 43 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
OLIVEIRA, J.C. Melhoramento. In: RUGGIERO, C. (ed.) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, p. 218-246, 1987.

ROUSSEEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

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

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge Press, 1996, 224p.

ZONTA, J.B.; SILVA, I.C.; DIAS, M.A.; CÔRREA, N.B.; LOPES, J.C. Germinação de sementes do maracujazeiro (*Passiflora alata* Dryand) submetidas a tratamentos físicos no tegumento e a pré-embebição em ácido giberélico (GA₃). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 5., 2005, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos, 2005.