

REVISTA CERES

Setembro e Outubro de 2003

VOL.L N°291

Viçosa – Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DO MARACUJAZEIRO¹

José Maria Moreira Dias²
Marcio Akira Couceiro³
Gizella Machado Ventura²
Dalmo Lopes de Siqueira²
Júlio César de Lima²

RESUMO

A utilização de plântulas germinadas *in vitro*, como fonte de segmentos de hipocótilo, é bastante promissora, pois as sementes ao serem desinfestadas originam plântulas axênicas. Outras vantagens de se utilizarem plântulas obtidas via semínifera é sua elevada juvenilidade, proporcionando segmentos de hipocótilo e de ápices, os quais, como explantes, podem apresentar alta resposta morfogênica nos cultivos *in vitro*. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar o efeito do álcool 70% v/v e de soluções com diferentes concentrações de ácido hipocloroso (0,00; 0,25; 0,50 e 1,00% v/v) em três tempos de imersão (5, 10 e 15 min), no processo de desinfestação das sementes, com ou sem tegumento, e estabelecer uma técnica eficiente para eliminação da dormência, visando à obtenção de plântulas que fornecerão explantes com qualidade superior para trabalhos de

¹ Aceito para publicação em 28.01.2003. Parte da tese de mestrado apresentada pelo segundo autor à Universidade Federal de Viçosa.

² Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n. 36571-000 Viçosa, MG.

³ Ex-aluno do curso de Mestrado em Fitotecnia da UFV.

cultivos *in vitro*. Foram conduzidos dois experimentos: no primeiro, a concentração de 0,5% v/v de ácido hipocloroso na solução desinfestante, por cinco minutos, foi a que propiciou a melhor germinação e baixa contaminação. No segundo, as sementes de maracujazeiro com o tegumento intacto apresentaram absoluta incapacidade de germinar, ao contrário daquelas desprovidas de tegumento, em que 97% germinaram; as sementes com tegumento escarificado, trincado e parcialmente removido apresentaram resultados intermediários, mostrando algum tipo de dormência relacionada ao tegumento. Concluiu-se que o melhor foi a utilização de sementes sem tegumento, desinfestadas com solução de ácido hipocloroso 0,5% v/v, por cinco minutos, não havendo necessidade de pré-desinfestação com álcool 70% v/v.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, dormência, explante.

ABSTRACT

DESINFESTATION AND GERMINATION *IN VITRO* OF PASSIONFRUIT SEEDS

The use of seedlings germinated *in vitro* as a source of hypocotyl segments is very promising, because the desinfestation of seeds can eliminate problems of internal contamination. Another advantage of using plants from seeds is their high juvenility, favoring hypocotyl segments, which, as explants, will be able to present a high morphogenic answer to *in vitro* cultivation. This work aimed to determine the effect of 70% v/v alcohol and different concentrations of hypochlorous acid (HClO), at varied time periods of immersion, on seed desinfestation. Another objective was to establish an efficient technique to eliminate the dormancy caused by their tegument, to obtain seedlings. This phase was divided into two experiments: in the first one, seeds without tegument were used and desinfested with 0.5% v/v HClO solution, for 5 minutes, providing the best germination and low contamination. In the second experiment, the seeds with intact teguments did not germinate. However, 97% of the seeds without tegument germinated; the seeds with scarified, cracked and partially removed tegument presented intermediate results and some dormancy related to the tegument. It was concluded that the best protocol developed was the use of seeds without tegument, desinfested with 0.5% v/v HClO solution, for 5 minutes, with no need for pre-desinfestation using 70% v/v alcohol.

Key words: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, dormancy, explant.

INTRODUÇÃO

A cultura de células e tecidos vegetais pode contribuir de forma decisiva na propagação e no melhoramento genético do maracujazeiro. No primeiro caso, propiciando rápida propagação *in vitro* de indivíduos idênticos à planta-matriz, o que permitirá homogeneidade cultural e o rompimento de possíveis barreiras de pragas e doenças durante a formação das mudas. No segundo, o cultivo *in vitro*, por um lado, auxilia o melhoramento clássico e, por outro, propicia o emprego de biotecnologias, visando ao melhoramento das características agronômicas e comerciais

desta fruteira. Entretanto, é necessário estudar o potencial morfogênico dos diferentes tipos possíveis de explantes, em distintas idades ontogênicas, e determinar meios de cultivo adequados e eficientes para alcançar tal objetivo.

Em geral, quanto mais juvenil é o tecido vegetal, mais responsivo ele será ao processo morfogênico (9, 13). Assim, plântulas provenientes de sementes podem constituir ótima fonte de explantes para estudos de morfogênese.

Uma maneira vantajosa de se obterem plântulas é a germinação *in vitro*, porém é importante estabelecer o protocolo de desinfestação, de modo a permitir alta taxa de germinação, formando plântulas vigorosas, uniformes e isentas de microrganismos.

Diversos tipos de explantes foram utilizados nos cultivos *in vitro* de espécies de *Passiflora* (1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 28), porém em apenas cinco trabalhos (3, 4, 5, 12, 17) os autores utilizaram germinação *in vitro* de sementes para a obtenção de plântulas. Não obstante, em testes prévios, mesmo as sementes recém-obtidas não germinam ou apresentam baixa porcentagem de germinação, e as plântulas produzidas apresentam grande variação de vigor e de comprimento, fato também observado por Hall et al. (11).

A utilização de plântulas germinadas *in vitro*, como fonte de segmentos de hipocótilo, é bastante promissora, pois a contaminação é eliminada ao se desinfestarem as sementes, produzindo plântulas axênicas. Outras vantagens de se utilizarem plântulas provenientes de sementes é sua elevada juvenilidade, proporcionando segmentos de hipocótilo, que como explantes podem apresentar alta resposta morfogênica nos cultivos *in vitro*.

Considerando a desinfestação de sementes, alguns trabalhos realizam uma pré-desinfestação com álcool 70%, por tempo de exposição variando de 40 segundos até cinco minutos (3, 4, 5, 17). Quanto à solução desinfestante, foram utilizadas soluções com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, com concentrações que variam de 0,14 até 3,5% (3, 4, 5, 12, 17).

Assim, na literatura revisada, apenas os trabalhos mencionados detalham o processo de desinfestação. Vários outros (11, 13, 14, 18, 19, 21, 26, 28) o fazem somente no caso de explantes extraídos de partes vegetativas de plantas cultivadas a céu aberto ou em casa de vegetação. Quanto à desinfestação de sementes, somente Biricolti e Chiari (3), Dornelas e Vieira (4, 5), Kantharajah e Dodd (12) e Mohamed et al. (17) mencionam sua utilização. Embora aparentemente sementes do maracujazeiro não apresentem dormência quando colocadas para germinar no campo (15, 25), não tem sido este o comportamento *in vitro*. Em distintos laboratórios da Universidade Federal de Viçosa tem-se verificado

uma incapacidade completa das sementes intactas do maracujazeiro germinarem.

Os objetivos desse trabalho, portanto, foram: estudar o efeito do álcool 70% v/v e de diferentes soluções com concentrações de ácido hipocloroso, em distintos tempos de imersão, no processo de desinfestação das sementes de maracujazeiro, com ou sem tegumento, e estabelecer uma técnica eficiente para eliminação da dormência das sementes, visando à obtenção de plântulas vigorosas, uniformes e com arquitetura retilínea.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia (Setor de Fruticultura) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. As sementes utilizadas nos experimentos provieram de plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. cultivadas no pomar da Universidade. As plantas foram conduzidas segundo as práticas culturais normais inerentes à cultura.

Para a escolha da planta-matriz, levaram-se em consideração a alta produtividade, resistência a pragas e doenças, frutos grandes, pesados, de coloração uniforme, com casca fina, cavidade interna completamente preenchida e alto rendimento em suco (16).

A extração das sementes deu-se a partir de frutos maduros obtidos de uma única planta. As sementes foram tratadas com cal para a remoção do arilo e, posteriormente, enxaguadas em água de torneira para a eliminação da cal e restos de mucilagem. Em seguida, foram colocadas para secar à sombra por três dias.

As sementes extraídas de cada fruto foram armazenadas separadamente, evitando a mistura de sementes de distintos frutos, visando reduzir a variabilidade genética das plântulas a serem obtidas. Em geral, sementes de um único fruto eram suficientes para a montagem dos experimentos, que ocorreu logo após a secagem delas.

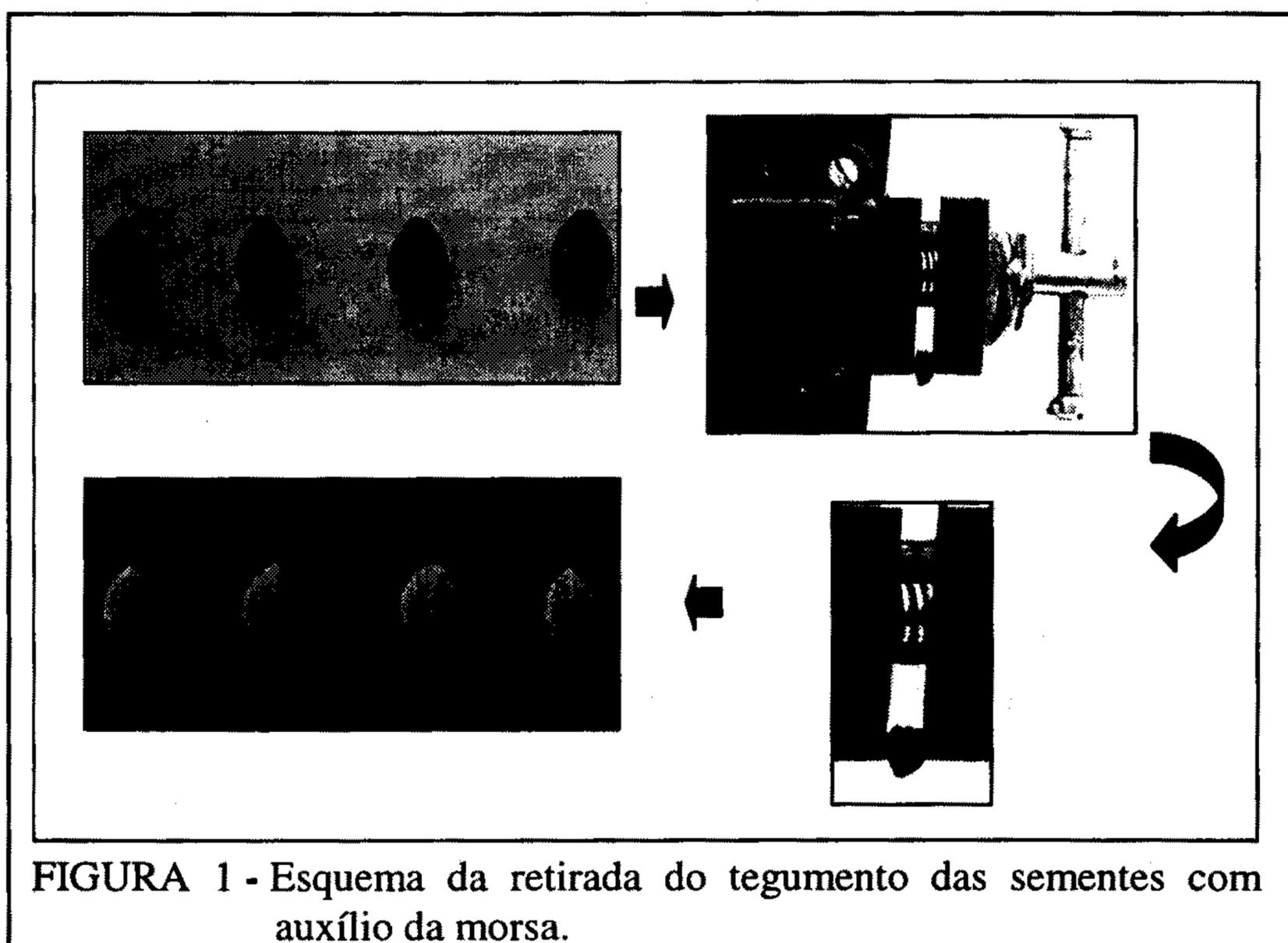
Foram montados dois experimentos. No primeiro, avaliaram-se a concentração de ácido hipocloroso e o tempo de imersão eficientes na desinfestação das sementes, com ou sem quebra de tensão superficial pelo tratamento com álcool 70% v/v. Em razão da dormência das sementes da família Passifloraceae (8), cujo mecanismo é o controle da entrada de água no interior das sementes, pelo tegumento impermeável, ocasionando problemas para germinação *in vitro*, objetivou-se no segundo experimento avaliar o efeito de diferentes tratamentos na quebra de dormência, a fim de uniformizar e otimizar a germinação.

Experimento 1- Eficiência da desinfestação de sementes

As sementes foram submetidas a duas desinfestações, com ou sem tegumento. A completa remoção do tegumento da semente para quebrar a dormência foi realizada com o auxílio da mini morsa. Na Figura 1 vê-se a posição correta da parte da semente que deve ficar em contato com a morsa, de modo a permitir alto rendimento operacional e não danificar, mecanicamente, as partes internas das sementes (24).

Posteriormente à retirada do tegumento, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar para a desinfestação.

Os tratamentos da primeira desinfestação foram: álcool 70% v/v ou água desionizada e autoclavada, em ambos os casos com imersão por um minuto. Na segunda desinfestação, os tratamentos constituíram-se de um esquema fatorial (4 x 3) + 1, sendo quatro concentrações de ácido hipocloroso: 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0% v/v por três tempos de imersão: 5, 10 e 15 minutos, mais a água desionizada estéril (0,0% HClO) como testemunha.



As soluções da segunda desinfestação das sementes foram obtidas utilizando-se soluções de hipoclorito de sódio contendo 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2% de cloro residual total (CRT), preparadas a partir de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária Globo[®]) com aproximadamente 2,3% de

CRT, expresso em Cl_2 , determinado pela técnica amido-iodo (10). Estas soluções de hipoclorito de sódio tiveram o pH ajustado para 7,5, utilizando-se HCl (1 mol L^{-1}), sendo acrescentadas três gotas de espalhante adesivo (Tween 20) para cada 100 mL de solução.

Assim, as soluções cloradas continham 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1% de ácido hipocloroso (HClO) expresso em Cl_2 , pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ HClO} = \frac{\% \text{ CRT}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pKa}}}, \text{ em que pKa HClO a } 30^\circ\text{C} = 7,5$$

O experimento foi montado seguindo esta ordem: primeira desinfestação, seguida de três enxaguaduras de 5, 10 e 10 minutos. Logo após, as sementes foram submetidas à segunda desinfestação, seguida de quatro enxaguaduras de 5, 10, 10 e 10 minutos, respectivamente, e posteriormente fez-se a semeadura individual em tubos de ensaio contendo meio MG (Figura 2).

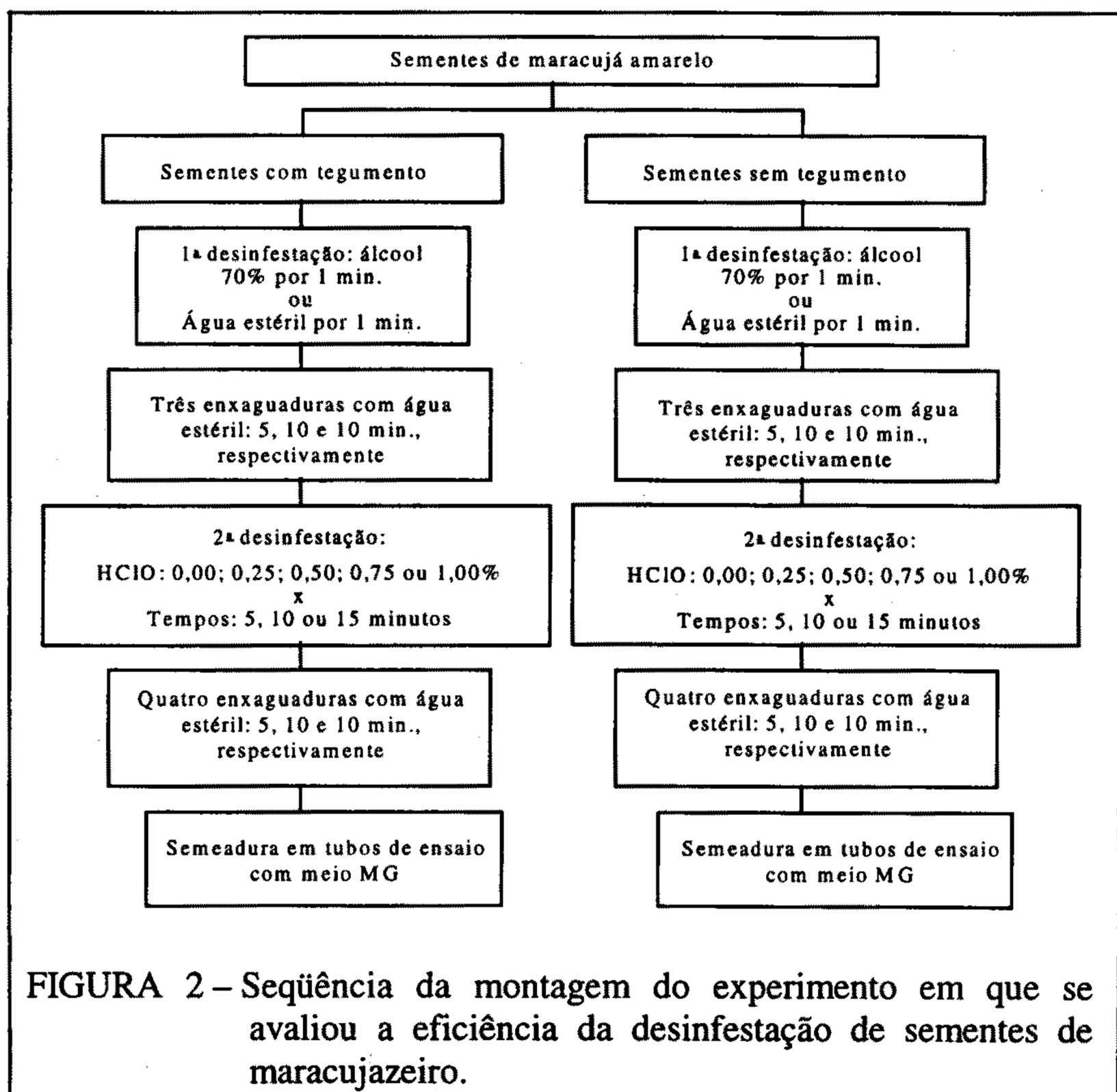


FIGURA 2 – Seqüência da montagem do experimento em que se avaliou a eficiência da desinfestação de sementes de maracujazeiro.

O meio de cultivo para germinação das sementes (MG) constituiu-se dos sais nutrientes de MS (20), acrescido de 3% p/v de sacarose. Antes da adição de 0,8% p/v de ágar (Vetec[®]), a solução teve seu pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, mediante o uso de KOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ou HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Posteriormente, alíquotas de 10 mL desse meio foram distribuídas por tubo de ensaio de 25 x 135 mm. Em seguida, a boca dos tubos foi fechada com tampa transparente de polipropileno, e a borda protegida com filme transparente de PVC (Rolopac[®]). O meio foi em seguida autoclavado a 121°C , pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 15 minutos, para sua esterilização.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram cultivadas no meio, com temperatura equivalente à do ambiente. Em seguida, os tubos foram, de novo, vedados.

Na sala de cultivo, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, as sementes foram inicialmente incubadas no escuro até sua germinação (aproximadamente dez dias). Posteriormente, as plântulas foram transferidas, nesta mesma sala, para fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram[®], luz do dia, 40 W), permanecendo por mais 20 dias.

O experimento foi instalado segundo o esquema de parcelas subdivididas, no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições, tendo os tratamentos da 1^a desinfestação (álcool 70% v/v e água, ambos por um minuto) constituído os tratamentos da parcela, e os da 2^a desinfestação (ácido hipocloroso: 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0% v/v por três tempos de imersão: 5, 10 e 15 minutos mais a água como testemunha), os da subparcela.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo (dez dias no escuro, seguidos de 20 dias sob luz), sendo avaliadas a contaminação e a germinação. A primeira foi avaliada mediante a porcentagem de tubos contaminados, e a segunda por meio de notas: 1 = semente não-germinada e 2 = semente germinada.

A análise estatística constituiu-se da análise de variância com desdobramento dos graus de liberdade dos efeitos significativos.

Experimento 2 – Efeito da remoção do tegumento na quebra de dormência das sementes

Os tratamentos constituíram-se da remoção total ou parcial do tegumento (Figura 3), sendo: 1 = sementes com tegumento trincado; 2 = sementes com tegumento parcialmente removido; 3 = sementes sem tegumento; 4 = sementes com tegumento escarificado; e 5 = sementes com tegumento intacto. O trincamento e a remoção total ou parcial do

tegumento foram realizados mediante o auxílio da minimorsa, enquanto a esscarificação foi realizada com lixa d'água número 100 (Figura 3).

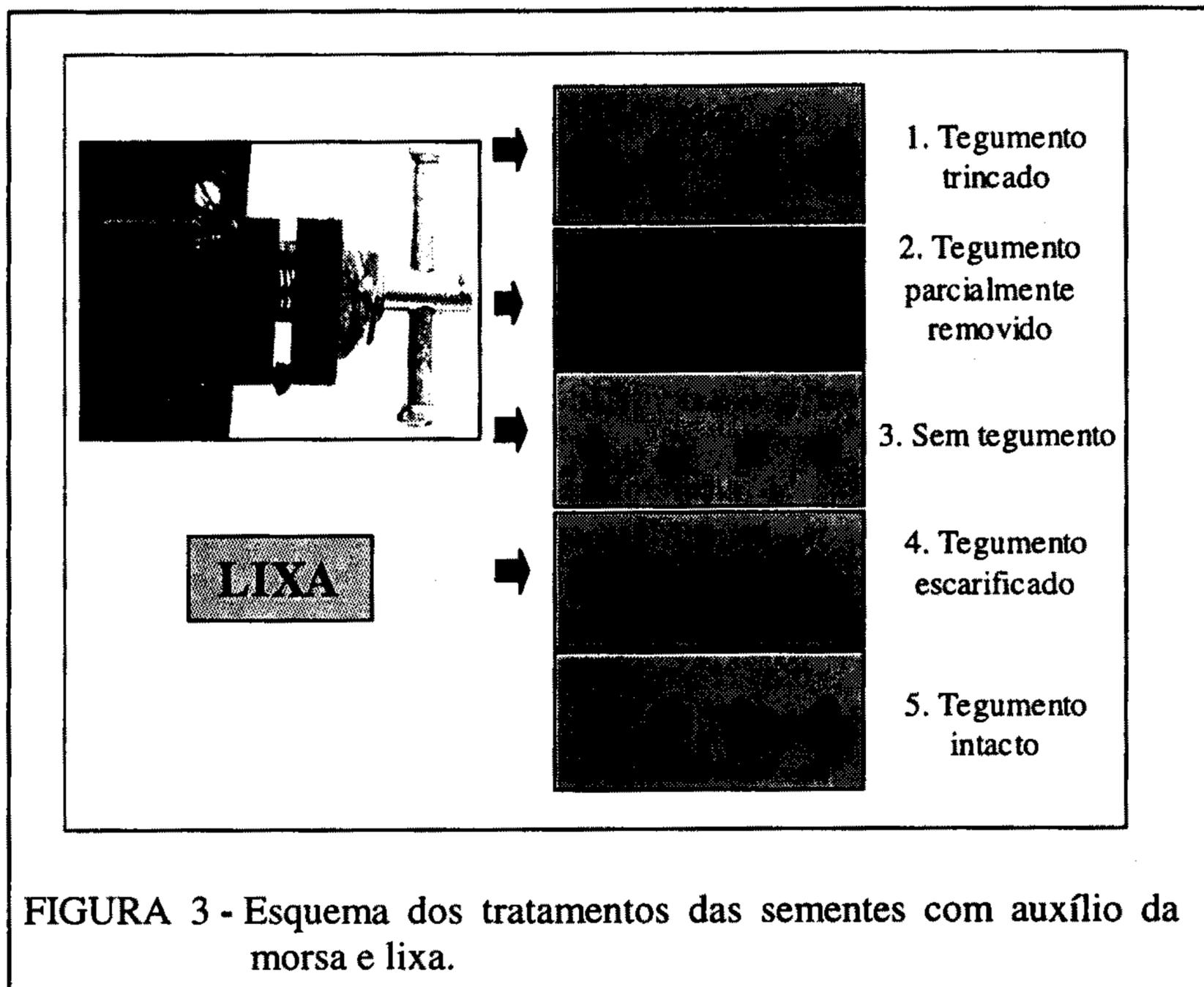


FIGURA 3 - Esquema dos tratamentos das sementes com auxílio da morsa e lixa.

Posteriormente, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar para a sua desinfestação, de acordo com o melhor resultado do experimento anterior.

O meio de cultivo para a germinação (MG) das sementes e o seu preparo foram os já descritos anteriormente.

As sementes foram cultivadas em tubos de ensaio de 25 x 135 mm, uma por tubo, contendo 10 mL do meio por tubo. Após a semeadura, os tubos de ensaio foram fechados, conforme descrito no Experimento 1.

As sementes foram incubadas em sala de cultivo à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e no escuro, permanecendo por 20 dias, quando se avaliou o experimento.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições, sendo a parcela experimental constituída de um tubo de ensaio. Foram avaliadas as porcentagens de germinação das sementes e de plântulas vigorosas, arquitetura retilínea e comprimento maior ou igual a 7 cm, tamanho mínimo adequado para se obterem cinco segmentos de hipocótilo com aproximadamente 1,2 cm de comprimento

cada um, a serem utilizados em experimentos posteriores, referentes ao processo de organogênese.

RESULTADOS

Experimento 1

O tratamento prévio das sementes sem tegumento com álcool 70% v/v ou com água estéril não teve efeito na contaminação. Já os tratamentos da segunda desinfestação afetaram significativamente a contaminação, conforme demonstram as interações dupla: água (testemunha com 0,0% HClO) x HClO (com diferentes concentrações deste ácido) e tripla: primeira desinfestação x (HClO) x tempo de imersão (Quadro 1).

Nas sementes com tegumento, a contaminação não foi influenciada pelos tratamentos da primeira desinfestação. Na segunda, houve efeito significativo do tempo e das interações: primeira desinfestação x (HClO); água (testemunha com 0,0% HClO) x (HClO) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Resumo da análise de variância da porcentagem de contaminação e de germinação de sementes de maracujá, com ou sem tegumento, submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação				
F.V.	G.L.	Quadrados médios		
		Com tegumento Contaminação	Sem tegumento Contaminação	Sem tegumento Germinação
1ª desinfestação	1	0,0708 ^{ns}	0,0348 ^{n.s.}	0,7171*
Resíduo A	18	0,2564	0,0843	0,1527
HclO	3	0,0708 ^{ns}	0,0267 ^{n.s.}	0,4687 ^{n.s.}
Tempo	2	0,2042 *	0,0788 ^{n.s.}	0,2410 ^{n.s.}
1ª desinfestação x HClO	3	0,1486**	0,2175 ^{n.s.}	1,3118**
1ª desinfestação x tempo	2	0,0292 ^{ns}	0,1154 ^{n.s.}	1,0110**
HClO x tempo	6	0,0375 ^{ns}	0,2336 ^{n.s.}	0,4046 ^{n.s.}
Água x HClO	1	1,5364**	10,6046**	1,3671*
1ª desinf. x HClO x tempo	6	0,0403 ^{ns}	0,2911*	0,1694 ^{n.s.}
Resíduo B	215	0,0490	0,1133	0,2126

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F
 * significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F
 ns: não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

As sementes desprovidas de tegumento, tratadas na segunda desinfestação apenas com água estéril (testemunha com 0,0% v/v HClO) e

independentemente da primeira desinfestação, apresentaram 80% de tubos contaminados, enquanto aquelas com tegumento apresentaram 35% de contaminação (Figura 4). Essa diferença talvez possa ser explicada pelo fato de as sementes sem tegumento apresentarem sua superfície envolvida por fina camada gelatinosa, dificultando a eliminação dos microrganismos, quando foram tratadas e enxaguadas somente com água estéril. Já as sementes com tegumento, por apresentarem superfície lisa e rígida, quando tratadas e enxaguadas com água estéril, permitem maior eliminação dos microrganismos.

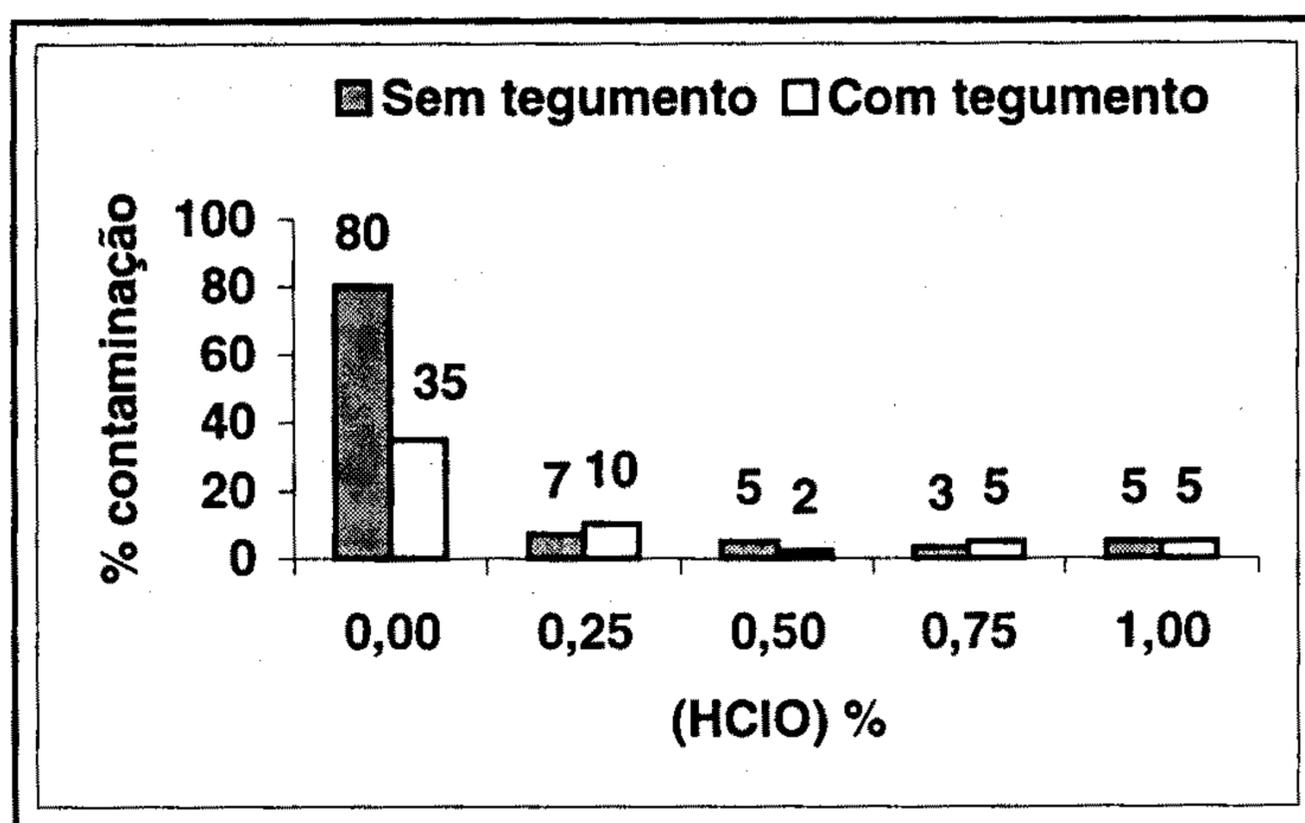


FIGURA 4 - Porcentagem de contaminação de sementes de maracujá, com e sem tegumento, em função das concentrações de HClO.

No entanto, essa diferença não foi tão marcante quando os dois tipos de sementes (com e sem tegumento) foram tratados com distintas concentrações de ácido hipocloroso, ambos mostrando índices baixos de contaminação (aproximadamente 5%). Destaque-se que as diferentes concentrações ensaiadas de HClO mostraram semelhante capacidade germicida, não distinguindo entre si.

As sementes com o tegumento intacto não germinaram, indicando algum tipo de dormência induzida por este tegumento, que pode estar relacionada aos mecanismos de controle de entrada de água para o interior da semente ou às substâncias inibidoras do crescimento presentes nos envoltórios da semente (27). Assim, os resultados discutidos a seguir são referentes, somente, às sementes desprovidas de tegumento.

A porcentagem de germinação das sementes foi influenciada pelos tratamentos da primeira desinfestação e pela interação destes com as concentrações de HClO e com os tempos de imersão da segunda desinfestação e também da interação dupla água x HClO (Quadro 1).

Na primeira desinfestação a imersão das sementes em álcool 70% v/v reduziu significativamente a porcentagem de germinação (apenas 47% germinaram), comparativamente ao tratamento com água estéril, com 59% de germinação.

A porcentagem de germinação das sementes tratadas com água na primeira desinfestação aumentou até a concentração de 0,55% de HClO, tendendo a decrescer a partir daí (Figura 5), possivelmente pelo fato de os componentes internos das sementes serem danificados pelas concentrações mais elevadas do ácido hipocloroso. Por outro lado, quando, na primeira desinfestação, as sementes foram tratadas com álcool 70% v/v, a taxa de germinação cresceu linear e positivamente conforme se aumentava a concentração de HClO da segunda etapa da desinfestação (Figura 5a).

Em relação ao tempo de imersão das sementes na solução clorada da segunda desinfestação, a germinação daquelas tratadas com álcool 70% v/v na primeira desinfestação teve comportamento linear negativo com o aumento do tempo de imersão; logo, o tempo de cinco minutos mostrou-se superior. Entretanto, as sementes tratadas com água na primeira desinfestação apresentaram comportamento idêntico nos diferentes tempos de imersão (Figura 5b). Na Figura 5, pelo sistema de notas, os valores nos gráficos variam de 1 a 2, pois foram adotadas as notas: 1 = sementes não-germinadas e 2 = semente com germinação normal.

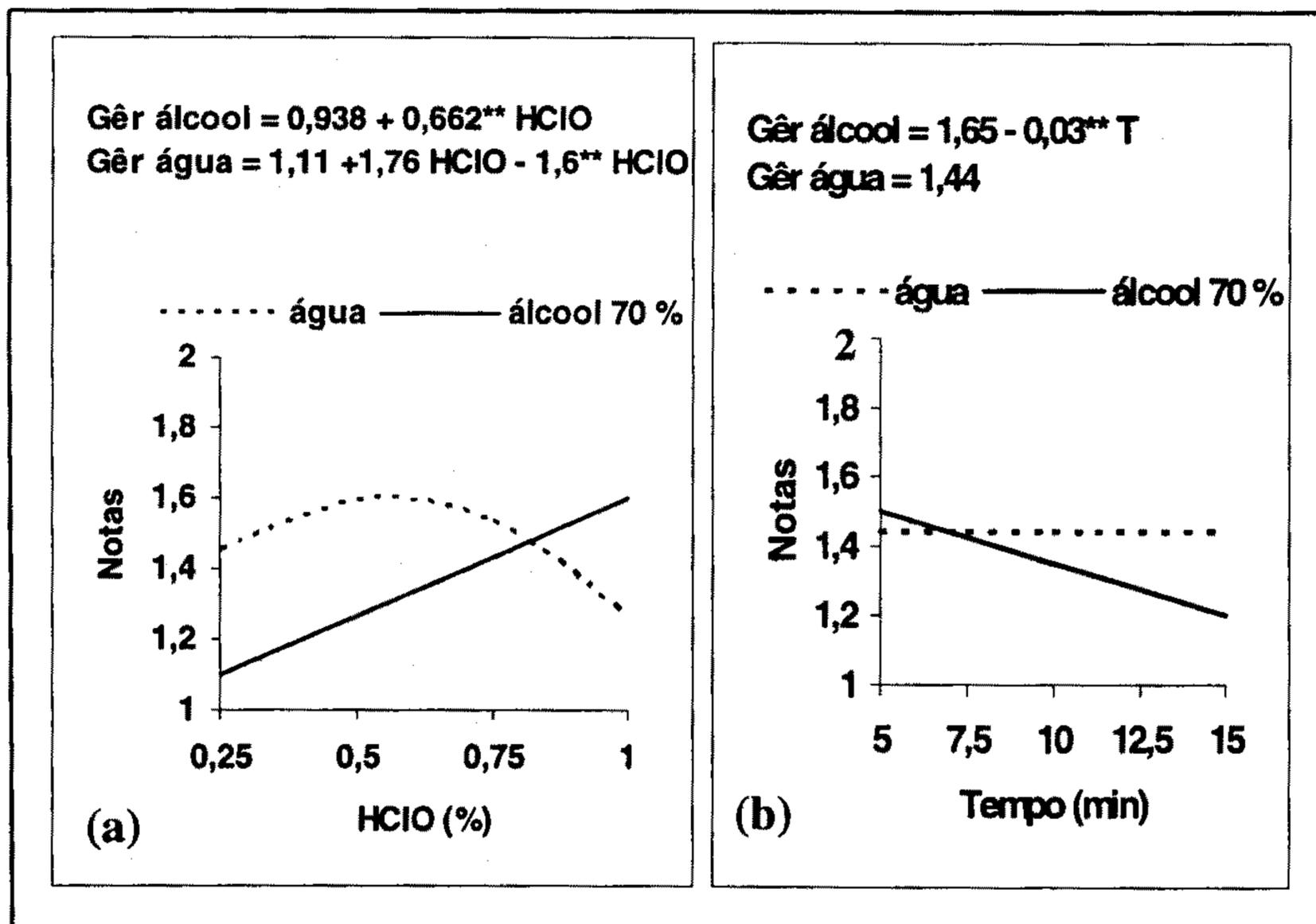
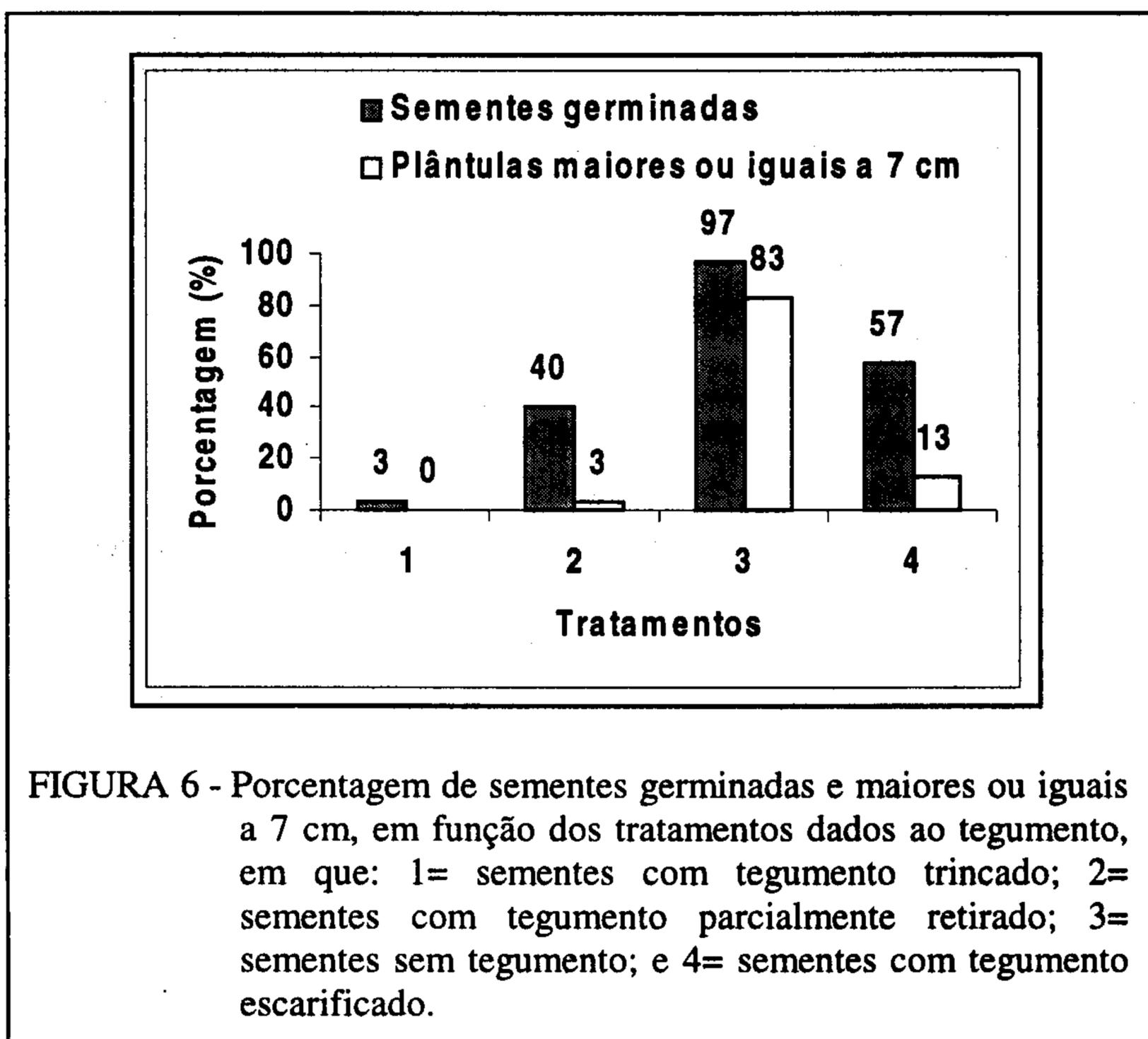


FIGURA 5 – Média das notas atribuídas à germinação das sementes (Ger) (1= semente não-germinada; 2= semente germinada), desprovidas do tegumento, em função das concentrações de HClO (a) e o tempo de desinfestação (b), na segunda desinfestação.

Experimento 2

Os distintos modos de preparo das sementes para a quebra de dormência influenciaram sua germinação e o desenvolvimento das plântulas (Figura 6). Assim como no primeiro experimento, as sementes com o tegumento intacto não germinaram.

As maiores porcentagens de germinação (97%) e de plântulas com comprimento igual ou maior que 7 cm (83%) foram alcançadas quando se utilizaram sementes desprovidas de tegumento. Nas sementes com o tegumento escarificado, o segundo melhor tratamento, esses valores foram respectivamente de 57 e 13% (Figura 6).



A retirada completa do tegumento, além de proporcionar maior índice de germinação, foi fundamental para a obtenção de plântulas mais vigorosas e com arquitetura retilínea e tamanhos desejáveis. Os demais tratamentos produziram baixa porcentagem de plântulas com este padrão (Figura 6).

DISCUSSÃO

Dos trabalhos revisados, apenas cinco cultivaram *in vitro* sementes de espécies de *Passiflora* para a obtenção de plântulas, visando à extração de explantes: Biricolti e Chiari (3), Dornellas e Vieira (4, 5), Kantharajah e Dodd (12) e Mohamed et al. (17).

Segundo Dornellas e Vieira (4, 5), Kantharajah e Dodd (12) e Mohamed et al. (17), foi possível se obterem plântulas germinadas *in vitro*, utilizando sementes providas de tegumento, resultado que está em desacordo com o obtido neste trabalho, sendo esta dificuldade de germinação também descrita no caso do maracujazeiro amarelo por Biricolti e Chiari (3), e do híbrido de *Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. por Hall et al. (11).

Dos trabalhos referidos, em quatro foi usado o álcool para pré-desinfestação, com os tempos de imersão variando de 40 segundos a 5 minutos (3, 4, 5, 17). Neste trabalho, a pré-desinfestação com álcool 70% v/v mostrou-se prejudicial ao processo de germinação.

Nesses trabalhos, apenas um revela a concentração original de cloro ativo (12), enquanto apenas dois indicam a concentração de cloro ativo nas soluções de imersão (3, 17), sendo estas de 3,5 e 0,14% v/v, respectivamente. Neste trabalho, a concentração de 1,0% v/v de cloro residual total, que origina a concentração de 0,5% v/v de ácido hipocloroso na solução desinfestante, foi a que propiciou a melhor germinação e baixa contaminação.

Nos cinco trabalhos revisados (3, 4, 5, 12, 17) abordando desinfestação, os tempos de imersão nas soluções cloradas variaram de 10 a 20 minutos, sendo, neste trabalho, o tempo de 5 minutos o de melhor resultado.

Há que ressaltar, ainda, que apenas Kantharajah e Dodd (12) mencionam o percentual de frascos contaminados (5%) e de explantes mortos (10%), e apenas Biricolti e Chiari (3) relataram o percentual de sementes com tegumento que não germinaram *in vitro* (100%).

Nas distintas espécies de *Passiflora* e tipos de explantes empregados nos trabalhos, há discrepância dos materiais desinfestantes (álcool e hipoclorito) e, principalmente, das métodos (tempo de imersão, concentração original de imersão do cloro ativo e número de enxaguaduras). Além da omissão de detalhamento no Material e Métodos, resultados quantitativos praticamente inexistem quanto à porcentagem de contaminação, de mortalidade de explantes e quanto ao vigor e comprimento dos explantes sobreviventes do processo de desinfestação e cultivados *in vitro*.

Neste trabalho, em todos os casos em que se cultivaram *in vitro* sementes de maracujazeiro com o tegumento intacto, houve absoluta incapacidade destas em germinar, ao contrário das sementes desprovidas de tegumento, em que 97% germinaram. Duas hipóteses para o fato são o tegumento apresentar algum tipo de substância inibidora do crescimento ou este impedir a absorção de água. Em campo, a dormência não é verificada possivelmente pela variação de temperatura entre o dia e a noite e pelos microrganismos presentes nos substratos.

Quando o tegumento foi escarificado, 56% das sementes germinaram. A escarificação parece haver beneficiado o processo de embebição, porém a permanência do tegumento constituiu-se em barreira devido a algum tipo de substância reguladora, o que poderia ser explicado pelo fato de apenas 13% das sementes germinadas produzirem plântulas vigorosas com comprimento igual ou maior que 7 cm.

O menor poder germinativo das sementes com o tegumento trincado pode ser devido à baixa taxa de embebição; quando o tegumento foi parcialmente removido, a parte remanescente induziu a dormência, em razão de algum tipo de regulador de crescimento.

CONCLUSÕES

1) Não há necessidade da primeira desinfestação com álcool 70% v/v em sementes de maracujazeiro, com ou sem tegumento, quando utilizado o ácido hipocloroso.

2) O melhor resultado é obtido utilizando sementes de maracujazeiro sem tegumento, desinfestadas com solução de 0,5% de ácido hipocloroso por 5 minutos.

3) As sementes de maracujazeiro desprovidas do tegumento apresentam as maiores porcentagens de plântulas com características desejáveis, enquanto aquelas com o tegumento intacto não germinam, demonstrando algum tipo de dormência induzida por esse envoltório.

REFERÊNCIAS

1. BACCARIN, M.N.R.A. Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* sp. Piracicaba-SP, Escola Sup. de Agric. "Luiz de Queiroz", 1988. 101p. (Tese de mestrado).
2. BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M. & MENDES, B.M.J. Organogênese em segmentos internodais de maracujazeiro amarelo. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 14, Curitiba-PR, 1996. Resumos, IAPAR, 1996, p. 323.
3. BIRICOLTI, S. & CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Adv. Horticultural Science, 8:171-5, 1994.
4. DORNELAS, M.C. & VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Passiflora amethystina* Mikan. and *Passiflora cincinnata* Mast. Plant Cell Reports, 13:103-6, 1993.

5. DORNELAS, M.C. & VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36:211-7, 1994.
6. DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. & VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* sp. Plant Cell Reports, 15L:106-10, 1995.
7. FARIA, J.L.C. & SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. HortScience. 32:1276-7, 1997.
8. FERREIRA, G.; FOGAÇA, L.A. & MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. Revista Brasileira de Fruticultura, 23:160-3, 2001.
9. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA, 1998. p.183-260.
10. GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S. & EATON, A.D. Iodometric method I. In: Greenberg, A.E.; Clesceri, L.S. & Eaton, A.D. (eds.). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, American Public Health Association, 1995. p. 4-38.
11. HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M. & DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. Australian Journal of Botany, 48:673-80, 2000.
12. KANTHARAJAH, A.S. & DODD, W.A. In vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). Annals of Botany, 65:337-9, 1990.
13. KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M. & KURIYAMA, A. Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia. Journal Plant of Physiology, 147:281-4, 1995.
14. MANDERS, G.; OTONI, W.C.; D'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B. & DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 13:234-8, 1994.
15. MANICA, I. Fruticultura tropical: 1. Maracujá. São Paulo –SP, Editora Agronômica Ceres, 1981. 160p.
16. MELETTI, L.M.M. & BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: Bruckner, C.H. & Picanço, M.C. (eds.). Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre, Cinco Continentes, 2001. p.345-86.
17. MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T. & BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46:161-4, 1996.
18. MORAN-ROBLES, J.M. Multiplication végétative, in vitro, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et *Passiflora mollissima* Bailey. Fruits, 33:693-9, 1978.
19. MORAN-ROBLES, J.M. Potencial morphogénétique des entrenoues de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. et *Passiflora molissima* Bailey en culture *in vitro*. Turrialba, 29:224-8, 1979.
20. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-97, 1962.
21. NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. Revista de la Facultad de Agronomía, 42:63-76, 1966.
22. OTONI, W.C.; BLACKHALL, F.B.; VAZ, F.B.U.; CASALI, V.W.; POWER, J.B. & DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. Journal of Experimental Botany, 46:777-85, 1995.

23. OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. *Revista Ceres*, 42:461-8, 1995.
24. RÊGO, M.M. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 2002. (Informação pessoal).
25. SIQUEIRA, D.L. de & PEREIRA, W.E. Propagação. In: Bruckner, C.H. & Picanço, M.C. (eds.). Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre, Cinco Continentes, 2001. p.85-137.
26. SCORZA, R. & JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 105:892-7, 1980.
27. TSUBOI, M. & NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Científica*, 20:63-72, 1992.
28. VAZ, F.B.D.; SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. & POWER, J.B. Plant regeneration from mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Reports*, 12:220-5, 1993.