

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

LUCIANA SABINI DA SILVA

**MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DE FISÁLIS COM POTENCIAL
ECONÔMICO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2020

LUCIANA SABINI DA SILVA

**MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES DE FISÁLIS COM POTENCIAL
ECONÔMICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Dr^a Fabíola Villa
Coorientadora: Dr^a Luciana Alves Fogaça

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Sabini da Silva, Luciana
Micropropagação de espécies de fisális com potencial econômico / Luciana Sabini da Silva; orientador(a), Fabíola Villa; coorientador(a), Luciana Alves Fogaça, 2020.
29 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Cultura de tecidos. 2. Meio de cultura. 3. Physalis.
I. Villa, Fabíola. II. Alves Fogaça, Luciana. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

LUCIANA SABINI DA SILVA

Micropropagação de espécies de fisális com potencial econômico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADA pela seguinte banca examinadora:

Orientadora - Fabiola Villa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Daniele Guarenti Rorato

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Suzana Stefanetto

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Daniel F. da Silva

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Marechal Cândido Rondon, 20 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida que guiam e protegem a minha jornada.

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

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) que me conceberam a oportunidade da realização da pós graduação, aos professores que contribuíram para minha formação e a PUCPR, que me forneceu a estrutura física para a realização desse trabalho.

À minha orientadora Dr^a Fabíola Villa que dividiu comigo sua experiência e conhecimento e guiou os meus passos na Pós-Graduação, deixo aqui minha gratidão e admiração. Ao Daniel Fernandes da Silva, que me ajudou desde o início dessa jornada.

Aos meus colegas do GEF (Grupo de Estudos em Fruticultura e Floricultura), que contribuíram para a realização desse trabalho e tornaram esses anos mais leves e divertidos. Agradeço a amizade que construímos Giovana Ritter, Tatiane Eberling, Fernanda Jaqueline Menegusso e Edvan Costa da Silva, vocês foram bons amigos, venceram comigo obstáculos e comemoraram comigo as conquistas dessa trajetória.

À minha família. Meus pais Luciano da Silva e Carla Sabini, que são meus exemplos de perseverança e sempre apoiaram minhas escolhas e torceram para que eu conquistasse meus sonhos. Aos meus avós Marli e Dorly da Silva que contribuíram com meus estudos e oraram todos dos dias por mim. Ao Kaue Poletto Murara, pela compreensão, paciência, companheirismo e apoio durante esses anos.

Muito obrigada.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”

Augusto Cury

RESUMO

SILVA, Luciana Sabini da Silva. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro – 2020. **Micropropagação de espécies de fisális com potencial econômico.** Orientador: Dr^a Fabíola Villa. Coorientadora: Dr^a Luciana Alves Fogaça.

Técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação, têm sido consideradas ferramentas promissoras à produção de mudas de qualidade em larga escala. Este estudo teve como objetivo avaliar protocolos de assepsia, bem como a composição e concentração de meios de cultivo no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de espécies de fisális. Quatro experimentos foram conduzidos *in vitro*. No experimento I foram utilizadas sementes de 3 espécies de fisális (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*) x 3 protocolos de assepsia (I = solução Twin 20 por 5 minutos + álcool 70% por 30 segundos + hipoclorito de sódio por 3 minutos, II = álcool 70% por 30 segundos + hipoclorito de sódio por 3 minutos, III = álcool 70% por 3 minutos + hipoclorito de sódio por 10 minutos). Durante 30 dias avaliou-se a cada 4 dias a contaminação fúngica e bacteriana e a porcentagem de germinação. No experimento II foram utilizados explantes de 2 espécies de fisális (*Physalis peruviana* e *P. minima*) x 4 concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 60 L⁻¹). No experimento III foram utilizados 3 meios de cultura (MS, Knudson e WPM) e explantes 3 espécies de fisális (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*). O experimento IV foi realizado com explantes de 2 espécies de fisális (*Physalis peruviana* e *P. minima*) x 4 concentrações de meio de cultura MS (0, 50, 75 e 100%). Para os experimentos II, III e IV após 30 dias foram avaliados: número de plântulas regeneradas, brotações, folhas e raízes, comprimento da maior raiz (cm) e parte aérea (cm), biomassa fresca e seca das plântulas (g). Todos os protocolos de assepsia foram eficientes para o controle de fungo e bactéria. A germinação de *P. ixocarpa* não teve interferência pelo protocolo utilizado, *P. peruviana* obteve maiores valores de germinação quanto realizados os protocolos I e II e *P. minima* quando usados os protocolos I e III. As concentrações de sacarose próximas a 50 g L⁻¹ favoreceram o estabelecimento de *P. peruviana* de aproximadamente 20 g L⁻¹ favoreceram o estabelecimento de *P. minima*. O meio de cultura MS é o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de *P. peruviana*, *P. minima* e *P. ixocarpa*. O meio de cultivo na concentração de 100% obteve melhores valores nos parâmetros de desenvolvimento *in vitro* avaliados para as espécies *P. peruviana* e *P. minima*.

Palavras-chave: *Physalis* sp. Cultura de tecidos. Assepsia. Meios de cultura. Sacarose.

ABSTRACT

SILVA, Luciana Sabini. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February – 2020. **Micropropagation of physalis species with economic potential.** Advisor: Dr^a Fabíola Villa. Co-Advisor: Dr^a Luciana Alves Fogaça.

In vitro cultivation techniques, such as micropropagation, have been considered promising tools for the production of quality seedlings on a large scale. The objective of this work was evaluate asepsis protocols, composition and concentration of culture media in the *in vitro* establishment of physalis species. Four experiments were conducted *in vitro*. In experiment I, seeds of 3 species of physalis (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* and *P. minima*) were used x 3 asepsis protocols (I = Twin 20 solution for 5 minutes + 70% alcohol for 30 seconds + sodium hypochlorite for 3 minutes, II = 70% alcohol for 30 seconds + sodium hypochlorite for 3 minutes, III = 70% alcohol for 3 minutes + sodium hypochlorite for 10 minutes). For 30 days, fungal and bacterial contamination and the percentage of germination were evaluated every 4 days. In experiment II, 3 culture media (MS, Knudson and WPM) and explants 3 species of fisális (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* and *P. minima*) were used. In experiment III, explants of 2 species of physalis (*Physalis peruviana* and *P. minima*) x 4 concentrations of MS culture medium (0, 50, 75 and 100%) were used. In experiment IV, explants of 2 species of physalis (*Physalis peruviana* and *P. minima*) x 4 sucrose concentrations (0, 15, 30 and 60 L⁻¹) were used. For experiments II, III and IV after 30 days were evaluated: number of seedlings, shoots, leaves and roots, length of the largest root (cm) and aerial part of plant (cm), fresh and dry seedling biomass (g). The experimental design was completely randomized, in a 3 x 3 (experiments I and II) and 2 x 4 (experiments III and IV) factorial scheme, containing 5 repetitions, 1 glass per repetition and 5 seeds per glass. Protocols II and III were appropriate for *P. peruviana* germination, and I and III for *P. minima*, the three protocols were efficient for controlling fungi and bacteria. Sucrose concentrations close to 50 g L⁻¹ favored the establishment of *P. peruviana* of approximately 20 g L⁻¹ favored the establishment of *P. minima*. The culture medium MS is the most suitable for the *in vitro* establishment of *P. peruviana*, *P. minima* and *P. ixocarpa*. The culture medium at 100% concentration obtained better values in the *in vitro* development parameters evaluated for the species *P. peruviana* and *P. minima*.

Keywords: *Physalis* sp. In vitro culture. Asepsis. Culture media. Sucrose.

LISTA DE FIGURAS**Artigo I.**

Figura 1. Número de plântulas regeneradas [A], número de brotações [B], comprimento de plântula (cm) [C], número de folhas [D], comprimento da maior raiz (cm) [E], número de raízes [F], biomassa fresca de plântulas (g) [G] e biomassa seca de plântulas (g) [H] de espécies de fisális, em função da concentração de sacarose (0, 15, 30 e 60 g L⁻¹). 14

Artigo II.

Figura 1. Número de brotações [A], comprimento de plântula (cm) [B], número de folhas [C], comprimento da maior raiz (cm) [D], número de raízes [E], biomassa fresca de plântulas (g) [F] e biomassa seca de plântulas (g) [G] de espécies de fisális, em função da concentração de meio de cultura MS (0, 50, 75 e 100%).....26

LISTA DE TABELAS**Artigo I.**

Tabela 1. Germinação (%) de sementes *in vitro* de espécies de fisális (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%) em três protocolos de assepsia. 13

Artigo II.

Tabela 1. Número de plântulas regeneradas (NPR), número de brotações (NB), número de folhas (NF) e comprimento das plântulas (CP) de espécies de fisális, em meios de cultura....24

Tabela 2. Número de raízes e biomassa seca da parte aérea (g) para espécies de fisális em meios de cultura.....25

Tabela 3. Número de plântulas regeneradas para espécies de fisális27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	ARTIGO I	3
2.1	RESUMO	3
2.2	ABSTRACT	4
2.3	INTRODUÇÃO.....	4
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.4.1	Experimento I	5
2.4.2	Experimento II.....	6
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
2.5.1	Experimento I	7
2.5.2	Experimento II.....	8
2.5.3	Conclusão	10
2.5.4	Agradecimento	10
2.5.5	REFERENCIAS	10
3	ARTIGO II.....	15
3.1	RESUMO	15
3.2	ABSTRACT	16
3.3	INTRODUÇÃO.....	16
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.5.1	Experimento I	18
3.5.2	Experimento II.....	19
3.6	CONCLUSÃO.....	21
3.7	AGRADECIMENTOS	21
3.8	REFERÊNCIAS	21
4	CONCLUSÕES GERAIS	28

1 1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 O fisális é considerado um fruto exótico com grande potencial econômico, devido a
4 adaptação as diversas condições edafoclimáticas brasileiras. Sua presença em mercados e
5 feiras mostram uma tendência de consumo da população que busca uma alimentação mais
6 saudável e diversificada. Por ter alto valor agregado, a produção de frutos é uma alternativa
7 para pequenos produtos que necessitam maior renda por área de produção.

8 O principal método de propagação de fisális é pela via sexuada, uma vez que essa
9 frutífera apresenta grande quantidade de sementes e alta taxa de germinação. Porém esse
10 método proporciona mudas de alta variabilidade genética, resultando mudas com diferença de
11 crescimento, vigor, desempenho e produção de frutos, características que não são
12 interessantes para pomares comerciais.

13 A cultura de tecidos propõe obtenção plantas em larga escala, qualidade fitossanitária
14 e alta fidelidade genética, características desejáveis para a implantação de pomar comercial.
15 Entre os desafios dessa técnica está dominar as variadas etapas como o estabelecimento e a
16 multiplicação *in vitro*.

17 A contaminação é um fator determinante no estabelecimento *in vitro*, diversos
18 protocolos são utilizados para a assepsia do material vegetal, entre eles, os mais comuns são o
19 etanol e o hipoclorito, que atuam de diferentes maneiras levando a morte de fungos e
20 bactérias.

21 O sucesso da multiplicação *in vitro*, depende da composição do meio de cultura, que é
22 constituído elementos essenciais para o crescimento das plantas como minerais e vitaminas,
23 proporcionando o controle de crescimento de tecidos e regulando o desenvolvimento *in vitro*.
24 Uma das formas de controlar essas respostas é através da concentração de macro e
25 micronutrientes que compõe os meios de cultura, existem diversos tipos de meio adaptados
26 para diferentes espécies, que se diferem sobretudo na constituição de nutrientes, entre os
27 comumente usados está o meio MS.

28 No meio de cultivo deve ser acrescentada uma fonte de carboidrato, como a sacarose.
29 Essa tem a função de fornecer energia e atua diretamente no desenvolvimento da plântula,
30 quando em concentração inadequada leva a redução da fotossíntese causando redução do
31 crescimento.

32 Considerando a complexidade das etapas da micropropagação que envolvem
33 diversos fatores (genótipo, meio de cultura, pH, fonte de carbono, entre outros), ajustes do

34 protocolo para multiplicação *in vitro* de espécies de fisális, são necessários para que a técnica
35 seja desenvolvida e garanta a disponibilidade de material propagativo de boa qualidade
36 fitossanitária, homogeneidade de plântulas e alta fidelidade genética.
37

38 2 ARTIGO I

39

40 **Protocolos de assepsia e sacarose no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de**
41 **espécies de fisális**

42

43 **Asepsis protocol and sucrose in the establishment and *in vitro* multiplication of**
44 **species of physalis**

45

46 **Luciana Sabini da Silva¹ Fabíola Villa^{1*} Daniel Fernandes da Silva²**

47 **Edvan Costa da Silva¹ Giovana Ritter¹ Tatiane Eberling¹**

48

49 (Elaborado segundo as normas da revista Ciência Rural)

50

51 **RESUMO**

52

53 Este estudo teve como objetivo avaliar protocolos de assepsia e concentrações de
54 sacarose para a micropropagação de espécies de fisális. Os experimentos foram conduzidos *in*
55 *vitro*, onde para o experimento I foram utilizadas sementes de 3 espécies de fisális (*Physalis*
56 *peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*) x 3 protocolos de assepsia (I = solução Twin 20 por 5
57 minutos + álcool 70% por 30 segundos + hipoclorito de sódio por 3 minutos, II = álcool 70%
58 por 30 segundos + hipoclorito de sódio por 3 minutos, III = álcool 70% por 3 minutos +
59 hipoclorito de sódio por 10 minutos). Durante 30 dias avaliou-se a cada 4 dias a contaminação
60 fúngica e bacteriana e a porcentagem de germinação. No experimento II foram utilizados
61 explantes de 2 espécies de fisális (*Physalis peruviana* e *P. minima*) x 4 concentrações de
62 sacarose (0, 15, 30 e 60 L⁻¹), após 30 dias foram avaliados: número de plântulas regeneradas,
63 brotações, folhas e raízes, comprimento da maior raiz (cm) e parte aérea da planta (cm),
64 biomassa fresca e seca das plântulas (g). Todos protocolos foram adequados para germinação
65 de *P. ixocarpa*, os protocolos II e III foram adequados para germinação *P. peruviana*, e I e III
66 para *P. minima*, os três protocolos foram eficientes para controle de fungo e bactéria. As

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

² Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

67 concentrações de sacarose próximas a 50 g L⁻¹ favoreceram o estabelecimento de *P.*
68 *peruviana* de aproximadamente 20 g L⁻¹ favoreceram o estabelecimento de *P. minima*.

69

70 **Palavras-chave:** *Physalis* sp. Cultivo *in vitro*. Contaminação. Sacarose.

71

72 **ABSTRACT**

73

74 The objective of this work was evaluated asepsis protocols and sucrose concentrations for the
75 micropropagation of physalis species. The experiments were conducted *in vitro*. In the
76 experiment I seeds of 3 species of physalis (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* and *P. minima*)
77 were used x 3 asepsis protocols (I = Twin 20 solution for 5 minutes + alcohol 70 % for 30
78 seconds + sodium hypochlorite for 3 minutes, II = 70% alcohol for 30 seconds + sodium
79 hypochlorite for 3 minutes, III = 70% alcohol for 3 minutes + sodium hypochlorite for 10
80 minutes). For 30 days, fungal and bacterial contamination and germination percentage were
81 evaluated every 4 days. In experiment II, explants of 2 species of physalis (*Physalis*
82 *peruviana* and *P. minima*) x 4 sucrose concentrations (0, 15, 30 and 60 L⁻¹) were used, after
83 30 days were evaluated: number of seedlings, shoots, leaves and roots, length of the largest
84 root (cm) and aerial part of plant (cm), fresh and dry seedling biomass (g). All protocols were
85 appropriate for germination of *P. ixocarpa*, II and III were appropriate for *P. peruviana*
86 germination, and I and III for *P. minima*, the three protocols were efficient for controlling
87 fungi and bacteria. Sucrose concentrations close to 50 g L⁻¹ favored the establishment of *P.*
88 *peruviana* of approximately 20 g L⁻¹ favored the establishment of *P. minima*.

89

90 **Key words:** *Physalis* sp. *In vitro* culture. Contamination. Sucrose.

91

92 **INTRODUÇÃO**

93

94 Técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação, têm sido consideradas
95 ferramentas promissoras para a produção de mudas em larga escala permitindo obter grande
96 número de plantas em um curto espaço de tempo, com qualidade fitossanitária,
97 homogeneidade de plântulas e alta fidelidade genética (OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto
98 na produção de mudas micropropagadas é necessário dominar todas as etapas, como o
99 estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização (MASCARENHAS et al.,
100 2019).

101 Os primeiros estágios do cultivo *in vitro*, apresentam algumas limitações, onde a
102 maior dificuldade é obter tecidos livres de contaminações fúngicas e bacterianas. Para a
103 redução destas contaminações, os produtos mais utilizados são o hipoclorito de sódio e álcool
104 70%. Esses podem ter eficiência variada, sendo necessária à adequação do protocolo de
105 desinfestação, de acordo com a espécie, cultivar e sensibilidade do tecido a ser desinfestado
106 (BHARTI et al., 2019).

107 Em produção de mudas *in vitro*, Nascimento et al. (2018), usando o processo de
108 desinfestação com álcool 70% e NaClO obtiveram 100% de controle de fungos e bactérias e
109 total sobrevivência de plântulas de pessegueiro. Palei et al. (2017) controlaram 100% da
110 contaminação com hipoclorito de sódio em seguimentos nodais de morangueiro.

111 Quando a espécie estiver estabelecida *in vitro* é necessário determinar a concentração
112 de carboidrato, que serve como fonte de energia e suplementa o meio de cultura, atuando no
113 controle da pressão osmótica das células vegetais e afetando significativamente o
114 desenvolvimento dos explantes. Em particular a sacarose é considerada uma importante fonte
115 de carbono e energia, sendo o carboidrato mais comum na seiva do floema. Além disso, está
116 envolvida no controle de processos de desenvolvimento da planta (HUT et al, 2016).

117 As espécies de fisális, por apresentarem características genéticas distintas podem ter
118 comportamentos diferentes aos estímulos *in vitro*. Diante disso, este estudo teve como
119 objetivo avaliar protocolos de assepsia e concentrações de sacarose para a micropropagação
120 de espécies de fisális.

121

122 MATERIAL E MÉTODOS

123

124 Experimento I

125

126 As sementes de fisális utilizadas nesse experimento foram oriundas de frutos
127 maduros, coletados no Banco de Germoplasma, mantido na Universidade Estadual do Oeste
128 do Paraná (Unioeste), *Campus* Marechal Cândido Rondon (PR). As espécies (*Physalis*
129 *peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*) foram devidamente identificadas e encontram-se
130 catalogadas junto ao Herbário da Unioeste (HUNOP, *Campus* Cascavel).

131 Os frutos foram levados ao Laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade
132 Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* Toledo (PR), onde foram retiradas as sementes e
133 deixadas secar por 7 dias em temperatura ambiente. Após esse período as sementes foram
134 levadas à câmara de fluxo laminar modelo BIOSEG 09, lavadas com água destilada e

135 dispostas nos protocolos de assepsia por imersão em: I = solução Twin 20 por 5' + álcool
136 70% (A70) por 30'' + hipoclorito de sódio (NaClO) por 3', II = A70 por 30'' + NaClO por 3',
137 III = A70 por 3' + NaClO por 10'. Após os procedimentos, as sementes foram lavadas 4 vezes
138 em água destilada e autoclavada.

139 Após a sanitização, foram alocadas 5 sementes por frasco de vidro, com capacidade
140 total de volume de 300 mL, contendo 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE &
141 SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia®) e pH = 5,8,
142 ajustado antes da autoclavagem. Durante 30 dias avaliou-se a contaminação fúngica e
143 bacteriana existente a cada 4 dias. Quando observada a contaminação em uma semente, as
144 demais que não apresentavam contaminação foram transferidas para um novo frasco.

145 O delineamento experimental utilizado nesse experimento foi inteiramente ao acaso,
146 em esquema fatorial 3 x 3 [métodos de assepsia x *Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* e *P.*
147 *minima*], contendo 5 repetições, representadas por 1 frasco com 5 sementes.

148 Os vidros foram tampados com papel alumínio e autoclavados a 121°C e 1,2 atm de
149 pressão, durante 20'. Após a autoclavagem, foram vedados com filme plástico de PVC, a fim
150 de evitar contaminações e mantidos em estantes de madeira (45 x 30 cm), em sala de
151 crescimento, com fotoperíodo de 16 h luz e temperatura ± 24°C.

152 Os dados obtidos nos experimentos foram tabulados e aplicado o teste de
153 normalidade Shapiro-Wilk. Posteriormente foram submetidos à análise de variância e as
154 médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, sendo transformadas
155 para $(Y+1,0)^{0,5}$ quando necessário. Para a análise dos resultados utilizou-se programa
156 estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

157

158 **Experimento II**

159

160 Nesse experimento foram utilizados explantes de plantas pré-estabelecidas *in vitro*,
161 provenientes de sementes. Os explantes oriundos da terceira repicagem foram excisados com
162 auxílio de bisturi, em câmara de fluxo laminar, em placas de petri. Estes continham 1,5 cm de
163 comprimento, duas gemas axilares opostas e um par de folhas.

164 Os fatores de estudo foram representados por quatro concentrações de sacarose,
165 sendo essas 0, 15, 30 e 60 g L⁻¹, para duas espécies de fisális (*P. peruviana* e *P. minima*). Foi
166 utilizada a concentração de 100% de meio de cultura MS, acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar
167 (Himedia®) e pH = 5,8, ajustado antes da autoclavagem.

168 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema
169 fatorial 4 x 2 [concentrações de sacarose x espécies de fisális], contendo 5 repetições,
170 representadas por 1 frasco com 5 sementes.

171 Após 30 dias da montagem do experimento, avaliou-se o número de plântulas
172 regeneradas, brotações, folhas e raízes. Com o auxílio de uma régua foi avaliado o
173 comprimento da maior raiz (cm) e parte aérea da planta (cm), por meio de pesagem em
174 balança analítica foram avaliadas a biomassa fresca e seca das plântulas (g). Para se obter a
175 biomassa seca as plântulas foram colocadas em sacos brancos de papel devidamente
176 identificados e levadas à estufa de ventilação forçada, a 65°C por 48 h.

177 Os vidros foram tampados com papel alumínio e autoclavados a 121°C e 1,2 atm de
178 pressão, durante 20'. Após a autoclavagem, foram vedados com filme plástico de PVC, a fim
179 de evitar contaminações e mantidos em estantes de madeira (45 x 30 cm), em sala de
180 crescimento, com fotoperíodo de 16 h luz e temperatura $\pm 24^\circ\text{C}$.

181 Os dados obtidos nos experimentos foram tabulados e aplicado o teste de
182 normalidade Shapiro-Wilk. Posteriormente foram submetidos à análise de variância e análise
183 de regressão a 5% de probabilidade de erro, sendo transformadas para $(Y+1,0)^{0,5}$, quando
184 necessário, utilizou-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

185

186 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

187

188 **Experimento I**

189

190 Na Tabela 1 são apresentados os dados de germinação (%), contaminação fúngica
191 (%), bacteriana (%) e contaminação total (%) em sementes de espécies de fisális, onde,
192 verificou-se efeito significativo para o primeiro fator para as espécies *P. peruviana* e *P.*
193 *minima*.

194 Melhores resultados na germinação (%) *in vitro* foram observados para *P. peruviana*,
195 quando se utilizaram os protocolos II e III. Estatisticamente, as sementes desta espécie
196 obtiveram os mesmos resultados nestes dois protocolos, porém, quando o protocolo II é
197 empregado, nota-se que o tempo de exposição e manuseio das sementes foi menor, sendo uma
198 opção mais rápida e eficiente.

199 Para sementes de *P. minima*, o protocolo II teve a menor porcentagem de
200 germinação quando comparado estatisticamente com os demais. As maiores porcentagens de
201 germinação ocorreram quando utilizados os protocolos I e III, que não se diferiram

202 estatisticamente. Quando empregado o protocolo III é possível reduzir um reagente no
203 controle dos patógenos, fato que facilita o processo de assepsia e favorece a preservação
204 ambiental, visto que esse reagente precisará ser descartado após o uso.

205 Para *P. ixocarpa*, não houve diferença estatística para a germinação entre os
206 protocolos utilizados. Essa espécie apresentou baixo porcentual de germinação (no máximo
207 52%) quando comparada com as demais espécies que chegaram até 100%. Estudos realizados
208 por Chaves et al. (2005), mostraram que a taxa de germinação de *P. peruviana* foi reduzida,
209 quando se usaram soluções com hipoclorito de cálcio na assepsia de sementes, provavelmente
210 devido à alta contaminação fúngica. Fungos são os principais microrganismos responsáveis
211 pela destruição das sementes ou perda de vigor, esses tornam-se saprófitos e parasitas de
212 plântulas (CARVALHO & NAKAGAWA, 2012).

213 As diferenças na taxa de germinação das sementes entre os distintos trabalhos são
214 causadas pela combinação de diversas substâncias de assepsia. Pinheiro et al. (2016), notaram
215 redução na contaminação fúngica e aumento no potencial germinativo em sementes *Cedrela*
216 *fissilis* e no comprimento das plântulas, quando utilizaram o NaClO para assepsia.

217 A baixa taxa de contaminação total (%) e a eficiência de todos os protocolos para
218 esse fator pode ser explicada pela sucessão de produtos utilizados na assepsia das sementes.
219 Além disso, pressupõe-se que, há uma combinação entre cloro e a proteína da membrana dos
220 microrganismos, que formam compostos tóxicos, levando à inibição de enzimas essenciais
221 para a sobrevivência (MACHADO & FERNANDES, 2018). O álcool 70% é apontado como
222 desinfetante e, segundo Tomazzi et al. (2019), quando presente nessa concentração apresenta
223 evaporação lenta, potencializando a sua ação de desnaturação de proteínas nas células
224 microbianas quando em contato com microrganismos.

225

226 **Experimento II**

227

228 Na Figura 1, estão apresentados dos resultados encontrados quando as espécies de
229 fisálias (*P. peruviana* e *P. minima*) foram cultivadas *in vitro* com contendo variação nas
230 concentrações de sacarose.

231 Observa-se que o número de plântulas regeneradas (Figura 1A), em *P. peruviana*,
232 subiu conforme foram aumentando as concentrações de sacarose e atingiu seu ponto máximo
233 em 44 g L⁻¹ com uma média de 5,00 plântulas regeneradas, após essa concentração houve
234 queda na regeneração. O mesmo comportamento ocorreu para *P. minima*, porém essa espécie

235 atingiu seu ponto máximo em 31 g L⁻¹ de sacarose com uma média de 4,9 plântulas
236 regeneradas e após esse valor começou a decair.

237 Quando avaliado o número de brotações (Figura 1B), *P. peruviana* foi crescente até
238 a concentração de 40 g L⁻¹ de sacarose, quando obteve o valor médio de aproximadamente 1,5
239 brotações, já *P. minima*, teve seu ponto máximo em 15 g L⁻¹ com 1,3 brotações, decaindo
240 com o aumento da concentração de sacarose.

241 Estudos realizados por Poothong e Junnumsra (2020), mostraram que a sacarose
242 reduzida nas concentrações de 1,5% e 3% em meio de cultura MS, aumentaram o número de
243 brotações para framboeseira, no entanto o comprimento de brotações foi maior quando não foi
244 adicionado sacarose ao meio de cultura.

245 O comprimento de plântula (Figura 1D) apresentou a maior média de crescimento de
246 explante (aproximadamente 10 cm) quando utilizado 45 g L⁻¹ de sacarose para *P. peruviana*.
247 Em *P. minima* o maior crescimento médio foi aproximadamente 5 cm, na concentração de 30
248 g L⁻¹ de sacarose.

249 A concentração de 15 g L⁻¹ (Figura 1C) favoreceu a quantidade de folhas de *P.*
250 *minima*, que nessa concentração atingiram o valor médio de aproximadamente 5 folhas por
251 explante. *P. peruviana* teve o valor máximo de folhas de 3,6, quando utilizado 60 g L⁻¹ de
252 sacarose.

253 O aumento na concentração de carboidrato, eleva o potencial osmótico do meio de
254 cultura, reduzindo a absorção de água e sais pela plântula (LEMES et al., 2016). Além disso, a
255 sacarose pode inibir a síntese de clorofila e reduzir a capacidade fotossintética, fatores que
256 juntos levam a redução de crescimento da plântula, porém, o processo fotossintético depende
257 da energia fornecida pela sacarose que possibilita a atividade normal das funções fisiológicas
258 das células (AYUB et al., 2019).

259 O número de raízes e o comprimento da maior raiz para *P. minima* foram melhores
260 na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, obtendo os valores de aproximadamente 3,5 raízes e
261 3,3 cm. Quando avaliado *P. peruviana*, a maior quantidade de raízes foi obtida quando
262 utilizado 60 g L⁻¹ de sacarose com aproximadamente 8 raízes por explante, já o maior
263 comprimento de raiz foi com 30 g L⁻¹ tendo em média 6 cm. Segundo Calvete et al. (2002), a
264 sacarose estimula a rizogênese *in vitro*, na ausência dela, não houve enraizamento em
265 explantes de morangueiro.

266 A biomassa fresca teve aumento até 40 g L⁻¹ para *P. peruviana* e 24 g L⁻¹ para *P.*
267 *minima*, após esses valores houve redução do peso de plântulas, porém quando avaliada a
268 biomassa seca, para ambas as espécies o maior valor obtido foi na concentração de 60 g L⁻¹ de

269 sacarose, o que sugere que nessa concentração ocorreu menor acúmulo de água e maior
270 acúmulo de sais.

271 Para a maioria dos parâmetros analisados *P. minima* teve seu desenvolvimento
272 favorecido em concentrações baixas de sacarose (entre 15 e 30 g L⁻¹) quando comparado aos
273 valores de *P. peruviana* (entre 45 e 60 g L⁻¹), o que indica que o genótipo das espécies
274 apresenta necessidades distintas para o desenvolvimento.

275

276 CONCLUSÕES

277

278 Os protocolos de assepsia não interferiram na germinação de *P. ixocarpa*.

279 Os protocolos II e III foram adequados para germinação *P. peruviana*, e I e III para
280 *P. minima*, os três protocolos foram eficientes para controle de fungo e bactéria.

281 As concentrações de sacarose próximas a 50 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹ favoreceram o
282 estabelecimento de *P. peruviana* e *P. mínima*, respectivamente.

283

284 AGRADECIMENTO

285

286 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
287 concessão de bolsa à primeira autora.

288

289 REFERÊNCIAS

290

291 AYUB, R.A. et al. Sucrose concentration and volume of liquid medium on the *in vitro* growth
292 and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. **Ciência e**
293 **Agrotecnologia**, v. 43, p. 1-8, 2019. doi: 10.1590/1413-7054201943007219.

294

295 BARTHI, N. et al. Effect of sterilization treatments on *in vitro* culture establishment of
296 tomato (*Solanum lycopersicum L.*). **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, p.
297 1165-1168, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/327919104>>
298 Acesso em: 05 nov. 2019.

299

300 CALVETE, E.O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro.
301 **Horticultura Brasileira**, v. 20, n.2, p. 186-191, 2002. doi: 10.1590/S0102-
302 05362002000200014.

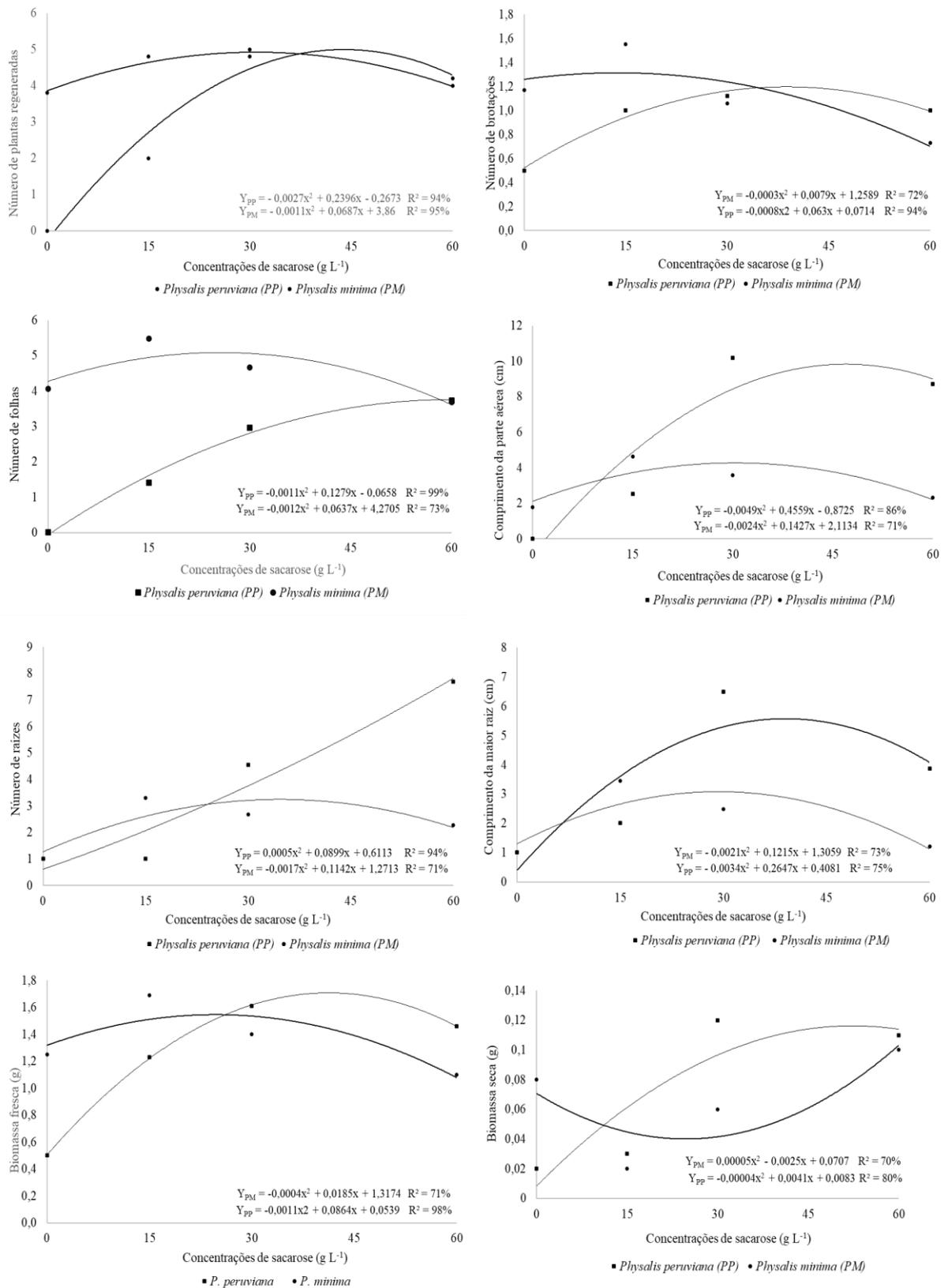
- 303 CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 4. ed.
304 Campinas: FUNEP, 2000. 588 p.
305
- 306 CHAVES, A.C. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L.
307 **Ciência & Agrotecnologia**, v. 29, p. 1281-1287, 2005. Disponível em:
308 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000600024>>. Acesso em: 01 out. 2019. doi:
309 10.1590/S1413-70542005000600024.
310
- 311 FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**,
312 v. 35, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <scielo.br/pdf/cagro/v35n6/a01v35n6.pdf>.
313 Acesso em: 01 out. 2019. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001.
314
- 315 HUT, Y. S. et al. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro*
316 germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. **Journal of Plant**
317 **Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 132-137, 2016. Disponível em:
318 <<http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.132>>. Acesso em: 02 out. 2019. doi:
319 10.5010/JPB.2016.43.1.132.
320
- 321 MACHADO, R.G.J. & FERNANDES, D.A. Assepsia e germinação *in vitro* de *Adenium*
322 *obesum*. **Connection**, v. 18, p. 102-110, 2018. Disponível em:
323 <<https://www.periodicos.univag.com.br/index.php/CONNECTIONLINE/issue/view/47>>.
324 Acesso em: 01 out. 2019. doi: 10.18312/1980-7341.
325
- 326 MASCARENHAS, L.M.S. et al. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa**
327 **Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-8, 2019. Disponível em:
328 <<http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4955603>>. Acesso em: 01 out. 2019.
329
- 330 MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with
331 tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. Disponível em:
332 <http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skooog1962.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.
333
334
335

- 336 NASCIMENTO, D.C. et al. Germination and development of “Precocinho” peach embryos:
337 asepsis and use of PPMTM in culture medium. **Journal of Experimental Agriculture**
338 **International**, v. 22, p. 1-7, 2018. Disponível em:
339 <<http://dx.doi.org/10.9734/JEAI/2018/41065>>. Acesso em: 04 nov. 2019. doi:
340 10.9734/JEAI/2018/41065.
341
- 342 OLIVEIRA, L.M. et al. Estabelecimento *in vitro* e crescimento inicial de *Physalis angulata*
343 (Solanaceae). **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2013. Disponível em:
344 <<http://dx.doi.org/10.13102/scb323>>. Acesso em: 01 out. 2019. doi: 10.13102/scb323.
345
- 346 PALEI, S. et al. Effect of surface sterilant for reducing microbial contamination of field
347 grown strawberry explants intended for *in vitro* culture. **International Journal of Chemical**
348 **Studies**, v. 5, p. 1476-1479, 2017. Disponível em
349 <<http://www.chemijournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartV/5-4-208-558.pdf>>. Acesso
350 em: 04 nov. 2019. doi: 10.22271/chemi.
351
- 352 PINHEIRO, C.G. et al. Efeito da assepsia superficial na germinação e incidência de fungos
353 em sementes de espécies florestais. **Pesquisa Brasileira Florestal**, v. 36, p. 253-260, 2016.
354 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4336/2016.pfb.36.87.1234>>. Acesso em: 01 out. 2019.
355 doi: 10.4336/2016.pfb.36.87.1234.
356
- 357 POOTHONG. S.; JUNNUMSRA, I. *In vitro* mineral nutrients and sucrose affecting growth
358 and development of micropropagated red raspberry shoots. **Thai Journal of Science and**
359 **Technology**, v. 9, p. 119- 128, 2020. doi: 10.14456/tjst.2020.10.
360
- 361 TOMAZZI, Y. et al. Métodos de assepsia de sementes de feijão. **Revista de Agroecologia e**
362 **Desenvolvimento Sustentável**, v. 14, p. 229-237, 2019. doi: 10.18378/rvads.v14i2.6353.
363

364 Tabela 1. Germinação (%) de sementes *in vitro* de espécies de fisális (*Physalis peruviana*, *P.*
365 *ixocarpa* e *P. minima*), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%) em três
366 protocolos de assepsia.

Protocolos de assepsia	Germinação <i>in vitro</i> de sementes (%)**		
	Espécies de fisális		
	<i>P. peruviana</i>	<i>P. ixocarpa</i>	<i>P. minima</i>
I	44,0 bB*	52,0 ^{ns}	88,0 aA
II	72,0 a	36,0 ^{ns}	40,0 b
III	88,0 aA	32,0 ^{ns}	100,0 aA
CV(%)	22,57		
Contaminação fúngica (%)**			
I	5,0 ^{ns}	15,0 ^{ns}	30,2 ^{ns}
II	15,0 ^{ns}	5,0 ^{ns}	31,0 ^{ns}
III	5,0 ^{ns}	38,0 ^{ns}	8,0 ^{ns}
CV(%)	40,48		
Contaminação bacteriana (%)**			
I	2,45 ^{ns}	2,88 ^{ns}	2,59 ^{ns}
II	2,45 ^{ns}	2,45 ^{ns}	2,45 ^{ns}
III	2,45 ^{ns}	2,45 ^{ns}	2,88 ^{ns}
CV(%)	23,54		
Contaminação total (%)			
I	3,32 ^{ns}	4,63 ^{ns}	5,23 ^{ns}
II	4,37 ^{ns}	3,32 ^{ns}	5,41 ^{ns}
III	3,32 ^{ns}	6,16 ^{ns}	3,93 ^{ns}
CV(%)	38,59		

367 *Letras minúsculas diferem estatisticamente entre si na coluna e maiúsculas na linha, pelo
368 teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. ns = não significativo. **Dados transformados
369 para raiz quadrada de x+1.



370

371 Figura 1. Número de plântulas regeneradas [A], número de brotações [B], comprimento de
 372 plântula (cm) [C], número de folhas [D], comprimento da maior raiz (cm) [E], número de
 373 raízes [F], biomassa fresca de plântulas (g) [G] e biomassa seca de plântulas (g) [H] de
 374 espécies de fisális, em função da concentração de sacarose (0, 15, 30 e 60 g L⁻¹).

375

376

377

378 **3 ARTIGO II**

379

380 **Composição e concentrações de meio de cultivo na micropropagação de espécies**
381 **de fisális**

382

383 **Composition and concentrations of culture medium in the micropropagation of**
384 **physalis species**

385

386 (Elaborado segundo normas da revista Ciência Rural)

387

388 **Luciana Sabini da Silva¹ Fabíola Villa^{1*} Daniel Fernandes da Silva²**

389 **Edvan Costa da Silva¹ Giovana Ritter¹ Tatiane Eberling¹**

390

391 **RESUMO**

392

393 Técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação, têm sido consideradas
394 métodos promissores para a produção de mudas de qualidade em larga escala. O objetivo
395 deste trabalho foi avaliar a composição e concentração de meios de cultura na multiplicação
396 *in vitro* de espécies de fisális. Foram realizados dois experimentos *in vitro*. No experimento I,
397 foram utilizados 3 meios de cultura (MS, Knudson e WPM) e explantes de 3 espécies de
398 fisális (*Physalis peruviana*, *P. ixocarpa* e *P. minima*). No experimento II, foram utilizados
399 explantes de 2 espécies de fisális (*Physalis peruviana* e *P. minima*) x 4 concentrações do
400 meio de cultura MS (0, 50, 75 e 100%). Para ambos, as avaliações foram realizadas após 30
401 dias, foram avaliados: número de plântulas regeneradas, brotações, folhas e raízes,
402 comprimento da maior raiz (cm) e parte aérea (cm), biomassa de plântulas frescas e secas (g).
403 O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 x 3 (experimento
404 I) e 2 x 4 (experimento II), contendo 5 repetições, 1 vidro por repetição e 5 explantes por
405 vidro. O meio de cultura MS foi o mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de *P.*
406 *peruviana*, *P. minima* e *P. ixocarpa*. O meio de cultura na concentração de 100% obteve

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

² Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

407 melhores valores nos parâmetros de desenvolvimento *in vitro* avaliados para as espécies *P.*
408 *peruviana* e *P. minima*.

409

410 **Palavras-chave:** *Physalis* sp. Cultura de tecidos. Contaminação. Meios de cultura. Sacarose

411

412 **ABSTRACT**

413

414 *In vitro* cultivation techniques, such as micropropagation, have been considered
415 promising methods for the production of quality seedlings on a large scale. The objective of
416 this work was evaluate the composition and concentration of culture media in the *in vitro*
417 multiplication of physalis species. Two experiments were conducted *in vitro*. In experiment I,
418 3 culture media (MS, Knudson and WPM) and explants 3 species of physalis (*Physalis*
419 *peruviana*, *P. ixocarpa* and *P. minima*) were used. In experiment II, explants of 2 species of
420 fisális (*Physalis peruviana* and *P. minima*) x 4 concentrations of MS culture medium (0, 50,
421 75 and 100%) were used. For both, the evaluations were carried out after 30 days, were
422 evaluated: number of seedlings, shoots, leaves and roots, length of the largest root (cm) and
423 aerial part of plant (cm), fresh and dry seedling biomass (g). The experimental design was
424 completely randomized, in a 3 x 3 (experiment I) and 2 x 4 (experiment II) factorial scheme,
425 containing 5 repetitions, 1 glass per repetition and 5 seeds per glass. The culture medium MS
426 is the most appropriate for the *in vitro* establishment of *P. peruviana*, *P. minima* and *P.*
427 *ixocarpa*. The culture medium at 100% concentration obtained better values in the *in vitro*
428 development parameters evaluated for the species *P. peruviana* and *P. minima*.

429

430 **Keywords:** *Physalis* sp. *In vitro* culture. Contamination. Culture media. Sucrose.

431

432 **INTRODUÇÃO**

433

434 A micropropagação é uma forma de multiplicação de plantas que possibilita a
435 obtenção de mudas sadias, em grande quantidade e em curto prazo de tempo. Para que essa
436 seja viável, deve-se utilizar o meio de cultura apropriado e a concentração de sais de que a
437 espécie necessita, assim, aperfeiçoando o processo de multiplicação (ROGRIGUES et al.,
438 2013).

439

440 Os meios nutritivos utilizados na cultura de tecidos fornecem substâncias essenciais
para o crescimento dos tecidos vegetais e controlam o padrão de desenvolvimento das

441 plântulas, quando o meio se torna inadequado pode causar sintomas de deficiência nutricional,
442 distúrbios fisiológicos e até a morte dos explantes (OLIVEIRA et al., 2013). Apesar do MS
443 favorecer o crescimento e desenvolvimento de frutíferas *in vitro*, outras composições mais
444 diluídas em relação aos nutrientes têm sido estudadas, como WPM e Knudson (VILLA et al.,
445 2009).

446 As espécies de fisális apresentam características morfoanatômicas distintas (SILVA
447 et al., 2015). Dentro do mesmo gênero e mesma espécie, os genótipos podem responder
448 diferentemente aos processos *in vitro* (COSTA et al., 2015). Essas características são
449 complexas e podem indicar diferenças nas exigências nutricionais, concentração de
450 reguladores de crescimento, local de excisão, tipo de tecido e genótipo e conseqüentemente
451 interferindo na taxa de multiplicação no cultivo *in vitro* (MASCARENHAS et al., 2019).

452 Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a composição e
453 concentração de meios de cultivo na multiplicação *in vitro* de espécies de fisális.

454

455 MATERIAL E MÉTODOS

456

457 O experimento I consistiu em três meios de cultura [MS, Knudson (KNUDSON,
458 1946), WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980)] e três espécies de fisális (*Physalis peruviana*,
459 *P. minima* e *P. ixocarpa*). Os meios de cultura foram acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose,
460 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®]) e pH = 5,8, ajustado antes da autoclavagem.

461 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema
462 fatorial 3 x 3 [meios de cultura x espécies de fisális]. Contendo 5 repetições, 1 frasco por
463 repetição e 5 explantes de uma espécie por frasco.

464 Após a análise do experimento I definiu-se o meio de cultura que apresentou
465 características adequadas para o estabelecimento das espécies de fisális *in vitro*. Assim o
466 experimento II foi constituído por 4 concentrações de meio MS (0, 50, 75 e 100%) e duas
467 espécies de fisális (*P. peruviana* e *P. minima*). Os meios de cultura foram acrescidos de
468 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®]) e pH = 5,8, ajustado antes da autoclavagem.

469 O delineamento utilizado nesse experimento foi inteiramente ao acaso, em esquema
470 fatorial 4 x 2 [concentrações de meio de cultura x espécies de fisális], contendo 5 repetições, 1
471 frasco por repetição e 5 explantes de uma espécie por frasco.

472 Em ambos os experimentos foram utilizadas plantas pré-estabelecidas *in vitro*,
473 provenientes de sementes. Os explantes oriundos da terceira repicagem foram excisados com

474 auxílio de bisturi, em câmara de fluxo laminar, em placas de petri. Estes continham 1,5 cm de
475 comprimento, duas gemas axilares opostas e um par de folhas.

476 Após 30 dias da montagem dos experimentos, avaliaram-se o número de plântulas
477 regeneradas, brotações, folhas e raízes. Com o auxílio de uma régua foi avaliado o
478 comprimento da maior raiz (cm) e comprimento total da plântula (cm), por meio de pesagem
479 em balança analítica foram avaliadas a biomassa fresca e seca das plântulas (g). Para se obter
480 a biomassa seca das plântulas, foram colocadas em sacos brancos de papel devidamente
481 identificados e levadas à estufa de ventilação forçada, a 65°C por 48 h.

482 Os dados obtidos nos experimentos foram tabulados e aplicado o teste de
483 normalidade Shapiro-Wilk. Posteriormente foram submetidos à análise de variância e análise
484 de regressão para dados quantitativos, a 5% de probabilidade de erro, sendo transformadas
485 para $(Y+1,0)^{0,5}$, quando necessário. Para a análise dos resultados utilizou-se o Sisvar
486 (FERREIRA, 2011).

487

488 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

489

490 **Experimento I**

491

492 Na Tabela 1 verificam-se os resultados para número de plântulas regeneradas,
493 brotações, folhas, comprimento das plântulas e da maior raiz e biomassa fresca da parte aérea.
494 Em relação ao número de plântulas regeneradas (Tabela 1), quando comparados os meios de
495 cultura, nota-se que para *Physalis peruviana* não houve diferença estatística, em *P. ixocarpa*
496 teve maior número de plântulas regeneradas quando em meio MS. Em *P. minima* teve o
497 menor número de plântulas regeneradas quando em meio Knudson.

498 Quando analisadas as brotações (Tabela 1), para *P. minima* não houve diferença
499 entre o meio WPM e MS. Essa variável teve o mesmo comportamento para *P. peruviana* e *P.*
500 *ixocarpa*, sendo o MS o meio que proporcionou maior número de brotações para as
501 respectivas espécies.

502 Segundo Jesus et al. (2010), o meio MS é mais concentrado em nitrogênio quando
503 comparado com o WPM e Knudson, o que influencia na síntese de citocininas endógenas,
504 resultando em diferentes números de brotações por segmento nodal das espécies, resultados
505 que foram encontrados com as espécies de fisális estudadas.

506 Quando analisado o número de folhas (Tabela 1), para as espécies avaliadas, o meio
507 de cultura MS foi considerado adequado, quando comparado ao WPM e Knudson. Oliveira et

508 al. (2013) obtiveram um valor médio do número de folhas de *Physalis angulata in vitro*,
509 semelhante ao encontrado no presente trabalho.

510 Verificou-se maior comprimento das plântulas em meio MS para as três espécies
511 estudadas (Tabela 1). Araújo et al. (2016) afirmam que o meio MS tem alto teor de macro e
512 micronutrientes quando comparado com os demais meios. Entre os macronutrientes, além do
513 nitrogênio, o cálcio apresenta quatro vezes a concentração comparado aos outros meios. O
514 cálcio atua na zona meristemática, no processo de divisão celular, participando na formação
515 de estruturas pécticas da nova parede celular que surge entre as células recém formadas,
516 interferindo diretamente no crescimento das plantas (KERBAUY, 2012).

517 Além disso, em trabalhos com espécies frutíferas *in vitro*, como amoreira-preta,
518 abacaxizeiro e caçarizeiro, os autores observaram bom desenvolvimento tendo maior número
519 de folhas, brotações e comprimento destas plântulas, quando propagadas em meio de cultivo
520 MS (LEITZKE et al., 2010; OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2016; ARAUJO et al., 2016).

521 Quando avaliada a biomassa fresca, o comportamento foi semelhante para o meio MS
522 que apresentou melhores resultados para as três espécies, quando comparado ao Knudson e
523 WPM (Tabela 1). Esses aspectos mostram que o meio de cultura favoreceu a assimilação de
524 nutrientes, o que pode explicar o melhor desempenho das plantas em meio MS.

525 As avaliações que não apresentaram interação significativa estão apresentadas na
526 Tabela 2, sendo essas, número de raízes e biomassa seca de plântula. Observa-se que o
527 número de raízes foi menor para *P. ixocarpa*, quando comparada com as demais espécies e o
528 mesmo comportamento se repete para biomassa seca da parte aérea.

529 O meio de cultivo MS proporcionou maior quantidade de raízes, sendo superior ao
530 Knudson e WPM, os quais não diferiram estatisticamente entre si. A presença de boro
531 influencia no enraizamento, promovendo síntese de ácido-indolacético (AIA) e atua
532 translocação da auxina natural, esse combinado com outros nutrientes, que estão em maior
533 quantidade no meio MS, propiciaram melhor resultado de enraizamento (PASQUAL, 2001).

534 Os maiores valores de biomassa seca foram encontrados em meio MS, que é mais
535 concentrado em sais e nutrientes, a massa seca é um importante atributo de crescimento e o
536 mais utilizado e significativo, pois determina o aumento de massa acumulada na formação de
537 um órgão ou da planta toda sem levar em consideração o conteúdo em água (MOCHINI et al,
538 2019).

539

540 **Experimento II**

541

542 O fator avaliado número de plântulas regeneradas que não apresentou interação e por
543 isso foi avaliado separadamente na Tabela 2, onde observa-se que a espécie *P. minima* teve
544 maior número de plântulas regeneradas comparada com *P. peruviana*.

545 A Figura 1A apresenta o número de brotações de *P. peruviana* e *P. minima* em
546 concentrações de meio MS, observa-se que ambas as espécies tiveram maiores valores de
547 brotações quando em meio na concentração de 100%, crescendo de maneira linear. Na Figura
548 1B nota-se que o comprimento de plântula para *P. minima* obteve crescimento linear
549 conforme o aumento da concentração de meio chegando o seu valor máximo de crescimento
550 de aproximadamente 3,0 cm em 100% de meio de cultura. Por outro lado, em *P. peruviana*
551 nota-se que não houve diferença significativa no crescimento de acordo com a variação de
552 meio de cultura.

553 O nitrogênio é o nutriente em maior concentração no meio MS, esse tem relação com
554 o desenvolvimento de plântulas, e é componente estrutural da molécula de clorofila. Quando
555 em deficiência, causa amarelecimento e redução do desenvolvimento da planta, devido à
556 inibição da síntese de clorofila, resultando a diminuição da fotossíntese e consequentemente
557 da síntese de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento (KERBAUY, 2012).

558 Para o número de folhas (Figura 1C), é possível verificar que as duas espécies
559 aumentaram a quantidade de folhas conforme o aumento da concentração de meio de cultura.
560 *P. minima*, teve seu maior número de folhas em 100% de meio de cultura, com
561 aproximadamente 7 folhas, enquanto que, *P. peruviana* obteve no máximo 3 folhas quando
562 em meio 100%.

563 O fósforo presente no meio de cultura, atua diretamente na expansão foliar. A
564 incorporação desse nutriente depende do genótipo de cada espécie. Costa et al. (2015),
565 observaram que, maior número de folhas foi obtido no meio MS, porém não entraram
566 diferenças estatísticas quando utilizaram meio MS com $\frac{1}{2}$ nitratos trabalhando com
567 manjeriço híbrido, indicando que outros fatores podem interferir nessas características, além
568 da concentração de sais.

569 O comprimento da maior raiz (Figura 1D), para *P. peruviana* não teve diferença
570 estatística quando variada a concentração de meio de cultura. Para *P. minima*, apesar de ter
571 variado pouco o comprimento, seu maior valor foi aproximadamente 1,5 cm quando em 100%
572 de meio de cultura. Segundo Lemes et al. (2016), as plântulas apresentam necessidade de
573 baixas concentrações de nitrogênio na formação de raízes, e a concentração de altos níveis de
574 sais pode afetar negativamente o desenvolvimento de raízes, portanto, o enraizamento pode
575 estar relacionado a características de resposta de cada espécie aos estímulos *in vitro*.

576 Quanto ao número de raízes não houve interação espécie x concentração de meio de
577 cultivo, por isso o foi avaliado somente o fator concentração de meio de cultivo (Figura 1E).
578 Observa-se que o número de raízes teve uma tendência de crescimento de acordo com o
579 aumento da concentração de meio de cultura que é propiciada devido a maior concentração de
580 micronutrientes promotores de enraizamento, como o boro (PASQUAL et al., 2001).

581 Para biomassa fresca e seca de plântula não foi observada diferença estatística entre
582 as concentrações para *P. peruviana*. Para *P. minima*, os maiores valores de biomassa fresca e
583 seca foram encontrados em 100% de meio de cultura, tendo aproximadamente 1,8 e 1,2 g
584 respectivamente, o que demonstra que nessa concentração ocorreu maior acúmulo de água e
585 sais para essa espécie.

586

587 CONCLUSÕES

588

589 O meio de cultura MS é o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de *P.*
590 *peruviana*, *P. minima* e *P. ixocarpa*. O meio de cultivo MS na concentração de 100%
591 apresentou melhores valores nos parâmetros de desenvolvimento *in vitro* avaliados para as
592 espécies *P. peruviana* e *P. minima*.

593

594 AGRADECIMENTOS

595

596 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
597 concessão de bolsa à primeira autora.

598

599 REFERÊNCIAS

600

601 ARAUJO, M.C.R. et al. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media,
602 antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1771-
603 1780, 2016. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/144415>>.
604 Acesso em: 01 out. 2019.

605

606 COSTA, A.S.M. et al. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de
607 manjeriço. **Revista Scientia Plena**, v. 11, p. 1-13, 2015. Disponível em:
608 <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/2269>>. Acesso em: 01 out. 2019.

609

- 610 FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**,
611 v. 35, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <scielo.br/pdf/cagro/v35n6/a01v35n6.pdf>.
612 Acesso em: 01 out. 2019.
- 613
- 614 JESUS, A.M.S. et al. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios
615 de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v. 11, p. 431-436, 2010.
616 Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/237043386>>. Acesso em: 01 out.
617 2019.
- 618
- 619 KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.
- 620
- 621 KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid**
622 **Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946. Disponível em
623 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S22368906200700010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S2236890620070001000400018&lng=en)
624 [000400018&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S2236890620070001000400018&lng=en)>. Acesso em: 04 nov. 2019.
- 625
- 626 LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Influência do meio de cultura, tipo e
627 concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira.
628 **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 352-360, 2010. Disponível em:
629 <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542010000200012&script=sci_abstract&tlng=](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542010000200012&script=sci_abstract&tlng=pt)
630 [pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542010000200012&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 01 out. 2019.
- 631
- 632 LEMES, C.S.R. et al. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia*
633 *flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, p. 499-505, 2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150368.
- 634
- 635 LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*,
636 *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society**
637 **Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980. Disponível em:
638 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000111&pid=S14137054200700040](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000111&pid=S1413705420070004001600014&lng=pt)
639 [001600014&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000111&pid=S1413705420070004001600014&lng=pt)>. Acesso em: 04. nov. 2019.
- 640
- 641 MASCARENHAS, L.M.S. et al. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa**
642 **Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-8, 2019. Disponível em:
643 <<http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4955603>>. Acesso em: 01 out. 2019.

- 644 MOCHINE, B.P. et al. Diagnose visual de potássio e ferro no crescimento inicial de mudas de
645 *Physalis ixocarpa* L. **Agropecuaria Científica no Semiárido**, v. 15, n. 4, p. 315-323, 2019.
646
- 647 MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with
648 tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. Disponível em:
649 <http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Scoog1962.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.
650
651
- 652 OLIVEIRA, L.S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal
653 Brasileira**, v. 33, p. 439-453, 2013.
654
- 655 OLIVEIRA-CAUDURO, Y. et al. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in
656 vitro* e *ex vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, p. 53-60, 2016.
657
- 658 PASQUAL, M. **Meios de cultura**. 1. ed. Lavras: UFLA, 2001. 74 p.
659
- 660 RODRIGUES, A.F. et al. Caracterização física, química e físico-química de *Physalis*
661 cultivada em casa de vegetação. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1411-1414, 2013.
662
- 663 SILVA, D.F. et al. Morfoanatomia do caule de espécies do gênero *Physalis*. **Revista de
664 Ciências Agroveterinárias**, v. 14, p. 38-45, 2015.
665
- 666 VILLA, F. et al. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1,
667 modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 468-472, 2009.
668

669

670 Tabela 1. Número de plântulas regeneradas (NPR), número de brotações (NB), número de folhas
671 (NF) e comprimento das plântulas (CP) de espécies de fisálias, em meios de cultura.

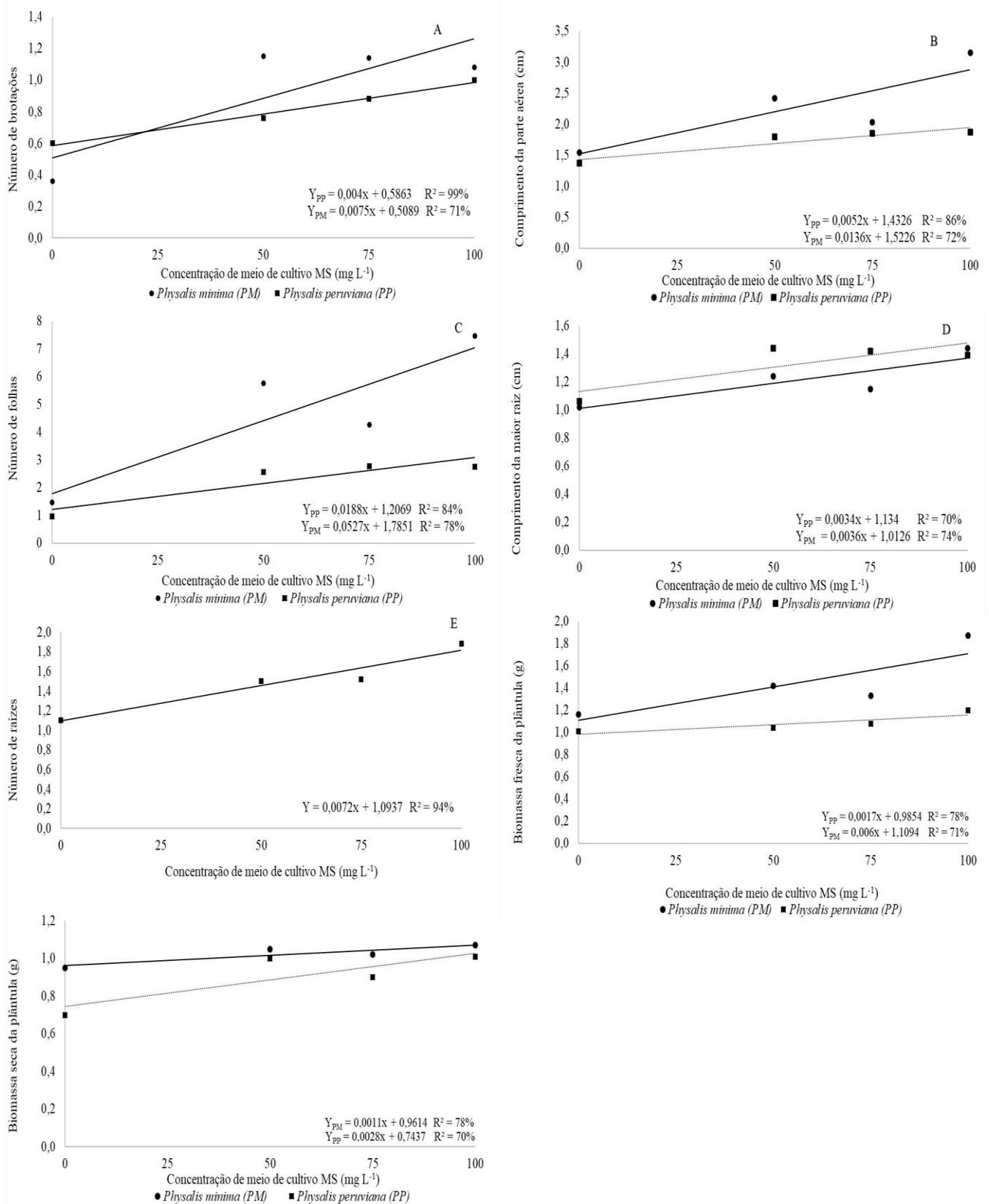
Espécies de fisálias	Meios de cultivo		
	Knudson	MS	WPM
	Número de plantas regeneradas		
<i>Physalis peruviana</i>	4,20 aA*	5,00 aA	5,00 aA
<i>Physalis ixocarpa</i>	0,01 bB	5,00 aA	0,01 bB
<i>Physalis minima</i>	0,80 bB	4,20 aA	4,40 aA
CV(%)	16,71		
	Número de brotações**		
<i>Physalis peruviana</i>	1,17 abAB	1,33 bA	1,04 bB
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,00 bB	1,68 aA	1,00 bB
<i>Physalis minima</i>	1,20 aB	1,53 aA	1,41 aA
CV(%)	10,03		
	Número de folhas**		
<i>Physalis peruviana</i>	1,84 aB	2,41 bA	1,76 bB
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,00 bB	2,99 aA	1,00 aB
<i>Physalis minima</i>	1,64 aC	3,03 aA	2,19 aB
CV(%)	16,70		
	Comprimento das plântulas (cm)**		
<i>Physalis peruviana</i>	2,07 aB	3,17 aA	2,01 aB
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,00 cB	2,55 bA	1,00 bB
<i>Physalis minima</i>	1,47 bC	2,89 abA	2,13 aB
CV(%)	14,12		
	Comprimento da maior raiz (cm)**		
<i>Physalis peruviana</i>	1,29 a	2,88 aA	1,10 a
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,00 a	1,43 c	1,00 a
<i>Physalis minima</i>	1,23 a	2,07 bA	1,22 a
CV(%)	23,08		
	Biomassa fresca de plântula (g)		
<i>Physalis peruviana</i>	1,17 aB	1,62 aA	1,13 bB
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,00 bB	1,24 bA	1,00 bB
<i>Physalis minima</i>	1,07 abC	1,61 aA	1,34 aB
CV(%)	8,68		

672 *Letras minúsculas diferem estatisticamente entre si na coluna e maiúsculas na linha, pelo teste de
673 Tukey, a 5% de probabilidade de erro. **Dados transformados para raiz quadrada de x+1. ns = não
674 significativo.
675

676 Tabela 2. Número de raízes e biomassa seca da parte aérea (g) para espécies de fisális e meios de
677 cultura.

Espécies de fisális	Número de raízes**	Biomassa seca de plântulas (g)
<i>Physalis peruviana</i>	1,99 a*	1,04 a
<i>Physalis ixocarpa</i>	1,41 b	1,01 b
<i>Physalis minima</i>	1,87 a	1,04 a
Meio de cultivo		
WPM	1,43 b	1,02 b
Knudson	1,43 b	1,01 b
MS	2,41 a	1,06 a
CV(%)	24,91	

678 *Letras minúsculas diferem estatisticamente entre si na coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de
679 probabilidade de erro. **Dados transformados para raiz quadrada de x+1.



680

681 Figura 1. Número de brotações [A], comprimento de plântula (cm) [B], número de folhas [C],
 682 comprimento da maior raiz (cm) [D], número de raízes [E], biomassa fresca de plântulas (g) [F] e
 683 biomassa seca de plântulas (g) [G] de espécies de fisális, em função a concentração de meio de
 684 cultura MS (0, 50, 75 e 100%).

685

686 Tabela 3 - Número de plântulas regeneradas para espécies de fisális.

Espécies de fisális	NPREG**
<i>Physalis minima</i>	2,34 a*
<i>Physalis peruviana</i>	1,35 b
CV (%)	12,91

687 *Letras minúsculas diferem entre si na coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

688 **Dados transformados em raiz quadrada de $x+1$. NPREG = número de plantas regeneradas.

689 4 CONCLUSÕES GERAIS

690

691 Todos os protocolos foram adequados para a germinação de *P. ixocarpa*. Os protocolos II e
692 III foram adequados para germinação *P. peruviana*, e I e III para *P. minima*, os três protocolos
693 foram eficientes para controle de fungo e bactéria. As concentrações de sacarose próximas a 50 g L⁻¹
694 favoreceram o estabelecimento de *P. peruviana* de aproximadamente 20 g L⁻¹ favoreceram o
695 estabelecimento de *P. minima*.

696 O meio de cultura MS é o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de *P. peruviana*,
697 *P. minima* e *P. ixocarpa*. O meio de cultivo na concentração de 100% obteve melhores valores nos
698 parâmetros de desenvolvimento *in vitro* avaliados para as espécies *P. peruviana* e *P. minima*.