

**Definição do protocolo e técnicas estatísticas para otimizar o estabelecimento *in vitro* de  
*Passiflora foetida***

**Definition of protocol and statistical techniques to optimize the *in vitro* establishment of  
*Passiflora foetida***

**Definición de protocolo y técnicas estadísticas para optimizar el establecimiento *in vitro*  
de *Passiflora foetida***

Recebido: 17/10/2020 | Revisado: 25/10/2020 | Aceito: 26/10/2020 | Publicado: 29/10/2020

**Glauca Amorim Faria**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2474-4840>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [glauca.a.faria@unesp.br](mailto:glauca.a.faria@unesp.br)

**Luiz Henrique Silvério Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6455-5713>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [luiz.silverio@unesp.br](mailto:luiz.silverio@unesp.br)

**Beatriz Garcia Lopes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2605-6443>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: [biagarcialopes@gmail.com](mailto:biagarcialopes@gmail.com)

**Antônio Flavio Arruda Ferreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5879-8794>

Universidade Estadual do Mato Grosso, Brasil

E-mail: [arrudaferreira.af@gmail.com](mailto:arrudaferreira.af@gmail.com)

**Cíntia Patrícia Martins de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7069-0508>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [cintia.patricia@unesp.br](mailto:cintia.patricia@unesp.br)

**Paula Suares Rocha**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3642-0341>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [psr.ecotox@gmail.com](mailto:psr.ecotox@gmail.com)

**Taís Ferreira Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2518-0920>

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil

E-mail: [thayscosta@hotmail.com](mailto:thayscosta@hotmail.com)

**Enes Furlani Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4030-612X>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [enes.furlani@unesp.br](mailto:enes.furlani@unesp.br)

**Lucas Menezes Felizardo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9676-0623>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [lucas-one@hotmail.com](mailto:lucas-one@hotmail.com)

**Resumo**

*Passiflora foetida*, uma espécie de maracujá silvestre, tem sido pesquisado devido ao seu potencial farmacêutico e sua característica agrônômica de resistência ao *Fusarium* spp., possibilitando a sua utilização como porta-enxerto para espécies de maracujá suscetíveis a morte prematura. Assim, visando a propagação dessa espécie, a micropropagação é uma das formas mais utilizadas, sendo necessário a utilização de acessos de uma planta matriz para, por organogênese, gerar novas plântulas com o mesmo genótipo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo para a propagação *in vitro* de *P. foetida* pela indução de gemas por organogênese, testando-se duas concentrações de sais minerais do meio MS, sem adição de fitormônios. Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados gemas apicais e laterais obtidas a partir de plantas matrizes de *P. foetida*, cultivadas em casa de vegetação. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Aos 60 dias após a inoculação dos explantes foram avaliados: número de gemas, comprimento da brotação, número de folhas, escore de coloração, escore de desenvolvimento e número de raiz. Para garantir a precisão dos resultados foram realizadas técnicas estatísticas aplicadas à análise de dados e otimização dos resultados. O desenvolvimento das plantas por organogênese apresentou valores estatisticamente similares em ambas as concentrações, podendo concluir que o meio MS com metade das concentrações de nutrientes foi o mais viável para o estabelecimento *in vitro* dessa espécie.

**Palavras-chave:** Passifloraceae; Micropropagação; Organogênese.

## Abstract

*Passiflora foetida*, a species of wild passion fruit, has been investigated due to its pharmaceutical potential and its agronomic characteristic of resistance to *Fusarium* spp., enabling its use as a rootstock for passion fruit species susceptible to premature death. Thus, in order to perform the propagation of this species, micropropagation is one of the most used forms, being necessary the use of accessions of a matrix plant to, by organogenesis, generate new seedlings with the same genotype. Thus, the aim of the present study was to establish a protocol for the *in vitro* propagation of *P. foetida*, inducing the buds of this plant, by organogenesis, testing two concentrations of mineral salts from MS medium, without addition of phytohormones. For *in vitro* establishment, apical and lateral buds obtained from plants of *P. foetida*, grown in a greenhouse, were used. The experiments were carried out in a completely randomized design. Sixty days after inoculation of explants, the following criteria were evaluated: number of buds, length of sprouting, number of leaves, coloration score, developmental score and root number. To guarantee the accuracy of the results, statistical techniques were applied to data analysis and optimization of results. The development of plants by organogenesis showed statistically similar values in both concentrations, concluding that the MS medium with half concentrations of nutrients was considered the most viable for the *in vitro* establishment of this species.

**Keywords:** Passifloraceae; Micropropagation; Organogenesis.

## Resumen

*Passiflora foetida*, una especie de maracuyá silvestre, ha sido investigada por su potencial farmacéutico y su característica agronómica de resistencia a *Fusarium* spp., Permitiendo su uso como patrón para especies de maracuyá susceptibles de muerte prematura. Así, apuntando a la propagación de esta especie, la micropropagación es una de las formas más utilizadas, siendo necesario el uso de acceso de una planta matriz por organogénesis y generar nuevas plántulas con el mismo genotipo. Así, este estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *P. foetida* por inducción de yema por organogénesis, probando dos concentraciones de sales minerales del medio MS, sin añadir fitohormonas. Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron yemas apicales y laterales obtenidas de plantas de *P. foetida*, cultivadas en invernadero. Los experimentos se llevaron a cabo en un diseño completamente al azar. Sesenta días después de la inoculación de los explantes, se evaluó lo siguiente: número de yemas, longitud de brotación, número de hojas, puntuación de coloración, puntuación de desarrollo y número de raíces. Para garantizar la exactitud de los

resultados, se aplicaron técnicas estadísticas de análisis de datos y optimización de resultados. El desarrollo de plantas por organogénesis mostró valores estadísticamente similares en ambas concentraciones, concluyendo que el medio MS con la mitad de concentraciones de nutrientes fue considerado el más viable para el establecimiento *in vitro* de esta especie.

**Palabras clave:** Passifloraceae; Micropropagación; Organogénesis.

## 1. Introdução

O maracujazeiro, fruta nativa das américas, tem ganhado gosto no mercado exterior, porém, a passicultura vem sofrendo com problemas fitossanitários que prejudicam a produtividade, a qualidade e a oferta desse fruto no mercado.

A cultura do maracujá azedo (*Passiflora edulis*) é altamente vulnerável a doenças, sendo limitada principalmente por aquelas causadas por patógenos de solo, como no caso dos fungos *Fusarium spp.* e bactérias *Xanthomonas spp.* que atacam o sistema radicular e vascular, causando a morte prematura das plantas, diminuindo a produção e reduzindo a longevidade do pomar (Santos Filho et al., 2017; Cavichioli et al., 2011; Viana et al., 2010).

Contudo, a técnica de enxertia tem sido empregada como alternativa para suprimir esses problemas com doenças de solo, garantindo um ciclo maior da cultura mesmo em áreas de incidência desses microorganismos (Zucareli et al., 2014). Para isso, tem-se buscado espécies de maracujás silvestres com potencialidade de resistência a esses patógenos e características compatíveis com o maracujá azedo (Silva et al., 2015).

Conhecido popularmente de maracujá-de-cheiro, devido ao odor forte de suas brácteas e estípulas, o *Passiflora foetida* tem sido pesquisado em relação às suas características nutracêuticas, quanto ao seu potencial como porta-enxerto e em relação à sua resistência a doenças como a fusariose (Faleiro et al., 2019; Raja et al., 2018; Silva et al., 2017; Preisigke et al., 2017). Além disso, possui relevância dentro da farmacognosia devido às suas atividades antibióticas e fúngicas (Crochemore, 2003) como atividade inibitória para as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium* e para o fungo *Candida Albicans* (Melo Filho et al., 2018).

Devido a este fatores, o estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujá, pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais, vêm auxiliando pesquisadores na manutenção dos genótipos de espécies silvestres por meio de bancos de germoplasma, promovendo a manutenção de plantas com características genéticas e agrônômicas desejadas (Faleiro et al., 2019; Gutiérrez et al., 2011).

A cultura de tecidos vegetais é um método utilizado como uma alternativa para o cultivo e multiplicação de plantas silvestres e endêmicas, que pode ser aplicada para propagação rápida e massiva de plantas com interesse econômico, medicinal e agrônômico como o caso do *P. foetida* (Shekhawat et al., 2015).

A técnica de micropropagação, consiste na remoção e isolamento de uma parte vegetativa de uma planta matriz, que é inserida em meio de cultura para o seu desenvolvimento em condições assépticas e controladas de cultivo. Nessa metodologia, vários fatores podem influenciar no crescimento das plantas durante seu estabelecimento, como as condições do ambiente, o meio de cultivo, as concentrações de sais e o tipo de explante utilizado (Ferreira et al., 2019; Brandstetter et al., 2016).

A escolha do explante é extremamente importante para a micropropagação pois ele está diretamente ligado ao processo de organogênese, ou seja, a formação de novas células a partir do tecido vegetal cultivado, sendo uma das principais rotas utilizadas para propagação (Costa et al., 2019).

Além disso, o meio de cultivo utilizado pode influenciar no estabelecimento e na multiplicação da planta *in vitro*, possuindo efeito direto sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, devendo ser considerado as melhores interações entre a espécie e a composição nutricional da solução (Brandstetter et al., 2016; Lemes et al., 2016). Há uma enorme variedade de meios de cultivo, sendo estes indicados para cada técnica da cultura de tecidos vegetais e espécies específicas, contudo o meio mais utilizado, tendo se tornado básico para a propagação *in vitro* da maioria das culturas é o proposto por Murashige e Skoog (MS) (Murashige; Skoog, 1962) e suas variações.

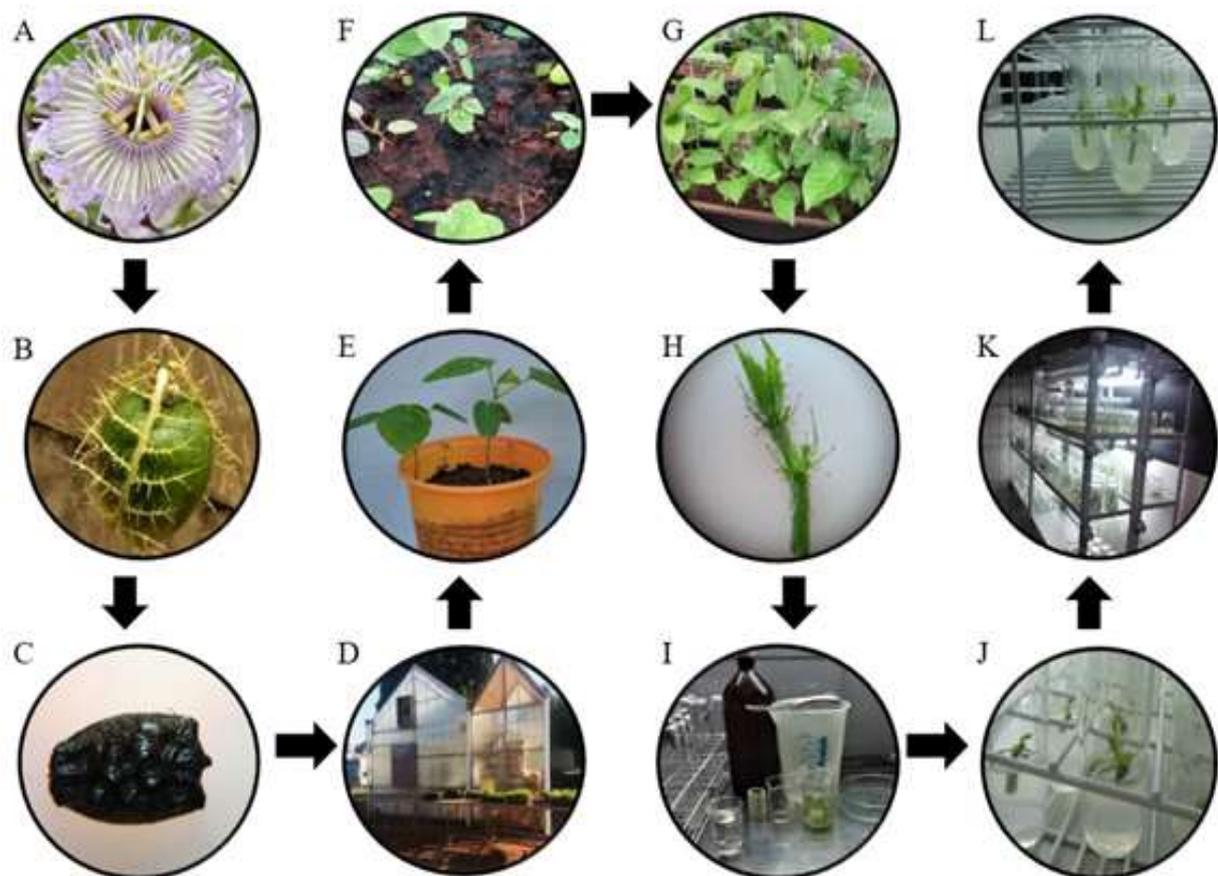
Visando a propagação *in vitro* para a espécie *P. foetida*, este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo de estabelecimento *in vitro* por meio da micropropagação de segmentos nodais de gemas apicais e axilares utilizando duas concentrações de meio MS. Para garantir precisão dos resultados foram realizadas técnicas estatísticas aplicadas à análise de dados e otimização dos resultados.

## 2. Metodologia

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e em casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Fitotecnia da UNESP/Campus de Ilha Solteira, localizada a 20°25'24,4" de latitude sul e 51°21'13,1" de longitude oeste, com altitude em torno de 337 metros.

Os frutos de *Passiflora foetida* (Figura 1A e B) foram adquiridos da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Polo Regional Alta Paulista - Adamantina/SP, despolidos e a extração do arilo foi realizada com o auxílio de peneira de aço (1 mm) e água corrente. Após este procedimento, as sementes foram colocadas para secar sobre papel absorvente em condições laboratoriais, sombreado e com temperatura média de 28 °C por 48 horas, sendo posteriormente armazenadas em geladeira durante dois meses.

**Figura 1.** Processo para o estabelecimento *in vitro* de *Passiflora foetida*. A. Flor ; B. Fruto; C. Semente; D. Casa de vegetação; E. Germinação e emergência em copos plásticos; F. Transferência para vasos retangulares; G. Crescimento em casa de vegetação. H. Gema apical; I. Desinfestação em câmara de fluxo laminar; J. Inoculação em câmara de fluxo laminar; K. Sala de crescimento; L. Plântula de *P. foetida* desenvolvida *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Para o processo de escolha das sementes utilizadas na germinação foi realizada a biometria do material seminífero de *P. foetida*, mensurando-se o comprimento (mm), espessura (mm) e largura (mm) com auxílio de paquímetro digital (0,05 mm) e massa das

sementes (g) em balança de precisão (0,0001g). Para cada característica calculou-se a estatística descritiva, foram gerados gráficos de Boxplot e curvas de densidade pelo *software* R versão 3.6.1 (R Development Core Team, 2019). As sementes escolhidas para germinação foram as que apresentavam valores correspondentes ao intervalo interquartil (IQ) por não sofrerem efeito direto de valores discrepantes.

Após a escolha das sementes (Figura 1C), em casa de vegetação do tipo ‘Pad & Fan’ com temperatura controlada em 28°C e umidade relativa do ar de 60% (Figura 1D), foi realizada a semeadura em copos plásticos de 200 mL preenchidos com substrato autoclavado (Topstrato HP®) à 1 cm de profundidade (Figura 1E).

Aos 45 dias após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos retangulares com dimensões de 47 x 15 x 20 cm (comprimento x altura x largura) (Figura 1F), preenchidos com substrato composto por solo (Tabela 1) e esterco bovino na proporção 3:1 (v:v), acrescido de 3 kg de superfosfato simples e 1 kg de KCl por 1 m<sup>3</sup> de solo.

**Tabela 1.** Análise química do solo coletado na profundidade de 0-0,20 m utilizado para formação das plantas matrizes de *P. foetida*.

<b>P*(resina)</b> <b>mg dm<sup>-3</sup></b>	<b>MO</b> <b>g dm<sup>-3</sup></b>	<b>pH(CaCl<sub>2</sub>)</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Al<sup>3+</sup></b>	<b>H+Al</b>	<b>SB</b>	<b>CTC</b>
2,0	13,0	4,5	1,3	4,0	2,0	2,0	18,0	7,3	25,3
<b>V</b>	<b>M</b>	<b>S-SO<sub>4</sub></b>	<b>B</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>		
	<b>%</b>								
29,0	21,50	5,0	0,08	0,8	31,0	7,9	1,0		

\*P = fósforo disponível; M.O = matéria orgânica do solo; pH = acidez ativa; K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> = potássio, cálcio e magnésio trocáveis, respectivamente; Al<sup>3+</sup> = acidez trocável; H+Al = acidez potencial; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca de cátions a pH 7,0; V = saturação por bases; M = saturação por alumínio; S-SO<sub>4</sub> = sulfato; B = boro; Cu = cobre; Fe = ferro; Mn = manganês; Zn = zinco. Fonte: Laboratório de Fertilidade do Solo, UNESP, Ilha Solteira/SP. Fonte: Elaborado pelos autores.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados como fontes de explantes segmentos nodais apicais (Experimento I) e axilares (Experimento II) obtidos das matrizeiras conduzidas em casa de vegetação (Figura 1G). Em laboratório os explantes (Figura 1H) foram submetidos à desinfestação em etanol a 70 % por 40 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, solução com Lysoform® a 50% por 5 minutos e realizado, posteriormente, o triplo enxágue com água deionizada autoclavada na câmara de

fluxo laminar (Figura 1I).

Após serem desinfestadas, os segmentos nodais apicais e axilares foram padronizados com 1 cm de comprimento e inoculados na posição vertical (Figura 1J) em tubos de ensaio com 20 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Os tratamentos utilizados foram compostos pelo meio MS com 100 % da concentração dos nutrientes minerais (MS) e com 50 % da concentração (½ MS) (Tabela 2), ambos suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH ajustados em 5,8; gelificado com 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel<sup>®</sup> e autoclavados a 121 °C (1 kg cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos.

**Tabela 2.** Composição do meio Murashige & Skoog (MS) com 100 % da concentração dos nutrientes minerais (MS) e com 50 % da concentração (½ MS).

Nutrientes Minerais	MS	½ MS	Nutrientes Minerais	MS	½ MS
	mg L <sup>-1</sup>			mg L <sup>-1</sup>	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00	220,00	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,25	0,125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	85,00	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	8,60	4,30
KNO <sub>3</sub>	1900,00	950,00	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	13,90
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00	185,00	Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	37,20	18,60
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	825,00	Ácido nicotínico	0,50	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	Glicina	2,00	1,00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	Mio-inositol	100,00	50,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3,10	Piridoxina	0,50	0,25
KI	0,83	0,415	Tiamina	0,10	0,05
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30	11,15			

Fonte: Elaborado pelos autores.

Os segmentos nodais após serem inoculadas no meio MS, foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons de 22 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 2K).

Após 60 dias da inoculação (Figura 2L) foram avaliadas as variáveis: escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB) (cm), número de folhas (NF), escore de coloração (COR) e número de raízes (NR). As variáveis NG, NF e NR foram obtidas por meio de contagem direta do número viável de gemas, folhas e raízes, respectivamente. Já as variáveis ESCDES e COR foram obtidas com base na Escala de Escala de Desenvolvimento e Cores, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Escala de desenvolvimento e de cores utilizada para avaliação de explantes e plântulas de *P. foetida* inoculadas em meio Murashige & Skoog (MS) com 100 % da concentração dos nutrientes minerais (MS) e com 50 % da concentração (½ MS)

Escala de Desenvolvimento		Escala de Cores		
Identificação	Número	Cor	Identificação	Número
Planta completa (folhas e raízes)	5		Verdes escuras	5
Planta em desenvolvimento	4		Verdes médias	4
Brotos com folhas expandidas	3		Verdes claras	3
Formação de brotos	2		Verde-amareladas	2
Gema vigorosa	1		Amareladas	1

Fonte: Elaborado pelos autores.

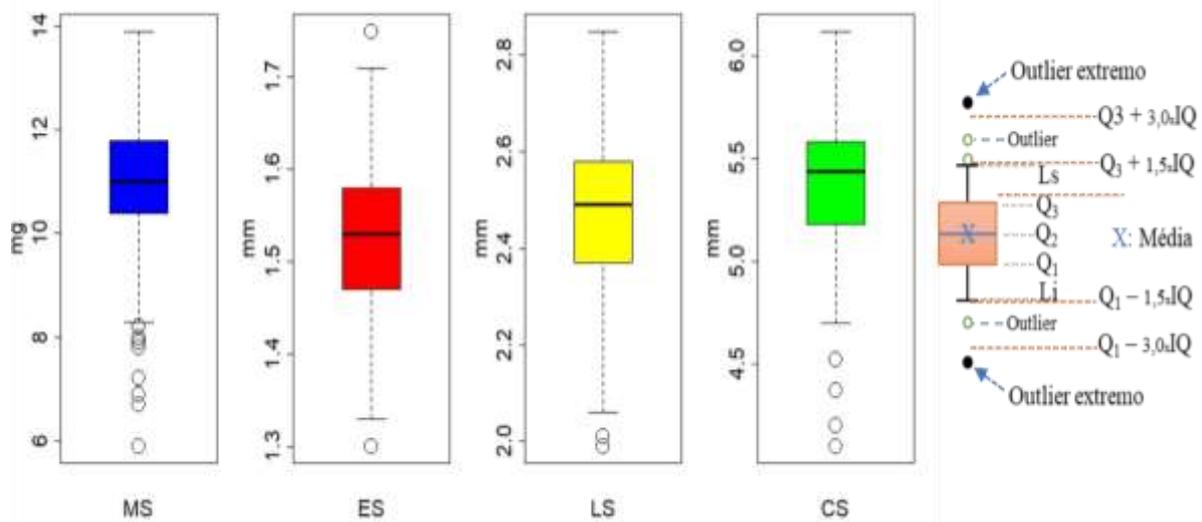
Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, para o Experimento I foram utilizadas 35 repetições e para o Experimento II 15 repetições, sendo cada repetição composta por um segmento nodal inoculado. A hipótese da normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e realizada a análise de variância (ANAVA), sendo aplicado o teste F a 5% de probabilidade para detectar as diferenças de todos os fatores (meios) e comparar as médias quando encontrada diferença significativa. Os dados foram analisados e os gráficos foram confeccionados utilizando o software R versão 3.6.1 (R Development Core Team, 2019).

### 3. Resultados e Discussão

Observando os limites inferiores e superiores entre as diferentes repetições para cada variável, nota-se que alguns valores estiveram acima ou abaixo desses limites, sendo considerados como outliers. Como o intervalo interquartil (IQ) não é influenciado por outliers, ele foi utilizado para analisar a dispersão dos dados, com isso nota-se que a variável

MS apresentou maior variabilidade (IQ = 1,4). Pode-se ainda concluir que as variáveis MS e CS podem ser dados assimétricos, uma vez que a linha da mediana não se encontra exatamente na metade entre os quartis 1 e 3; neste caso, a mediana deve ser preferível como medida de tendência central, pois a média é altamente influenciada por valores atípicos (Figura 2).

**Figura 2.** Boxplot para massa (MS) (mg), espessura (ES) (mm), largura (LS) (mm) e comprimento (CS) (mm) das sementes de *P. foetida*.



Fonte: Elaborado pelos autores.

As médias encontradas para as variáveis MS, ES, LS e CS foram 10,85 mg, 1,52 mm, 2,47 mm e 5,36 mm, respectivamente. As medidas de dispersão variância e desvio padrão corroboraram com o intervalo interquartílico, demonstrando maior variabilidade na variável MS, com variância igual a 2,24 e desvio padrão igual a 1,49. O maior Coeficiente de variação (CV) foi encontrado para a variável MS (13,60%), seguida de LS (6,49%), CS (6,38%) e ES (4,89%) (Tabela 4).

Para a variável MS, tem-se que o valor mínimo foi de 5,90 mg e máximo de 13,90 mg e foram encontrados valores abaixo de 5,9 mg (outliers); para a variável ES o valor mínimo foi de 1,3 mm e máximo de 1,75 mm, encontrando valores acima e abaixo dos limites (outliers); para a variável LS tem-se que o valor mínimo foi de 1,99 mm e máximo de 2,85 mm e foram encontrados valores abaixo de 1,99 mm; já para a variável CS o valor mínimo foi de 4,10 mm e máximo de 6,12 mm, com valores abaixo de 4,10 mm (outliers) (Tabela 4).

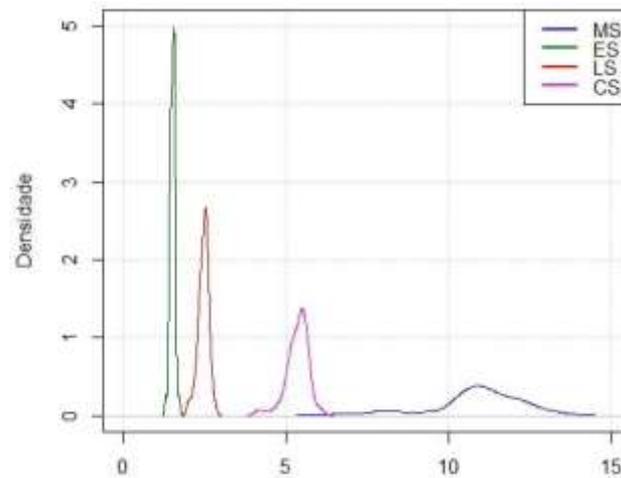
**Tabela 4.** Estatística descritiva para massa (MS) (mg), espessura (ES) (mm), largura (LS) (mm) e comprimento (CS) (mm) das sementes de *P. foetida*.

Estatística Descritiva	MS (mg)	ES (mm)	LS (mm)	CS (mm)
Mínimo	5,90	1,30	1,99	4,10
Quartil 1	10,40	1,47	2,37	5,19
Mediana	11,00	1,53	2,49	5,44
Média aritmética	10,85	1,52	2,47	5,36
Quartil 3	11,80	1,58	2,58	5,58
Máximo	13,90	1,75	2,85	6,12
Variância	2,26	0,0061	0,03	0,12
Desvio Padrão	1,50	0,07	0,16	0,35
Erro Padrão	0,15	0,007	0,02	0,03
CV (%)	13,60	4,89	649	6,38
Assimetria PEARSON	0,10	0,08	0,11	0,24
Assimetria	-0,98	-0,09	-0,59	-1,06

Fonte: Elaborado pelos autores.

O desvio padrão, utilizado para definir o limite com maior concentração de dados em torno da média, permite avaliar a homogeneidade dos dados, uma vez que quanto menor o desvio padrão mais homogênea é a amostra, o que significa que os valores estão próximos da média. Pode-se observar que a variável MS apresentou o maior valor de desvio padrão em comparação com as outras variáveis, acarretando valores mais distantes da média, consequentemente com maior heterogeneidade (Figura 3).

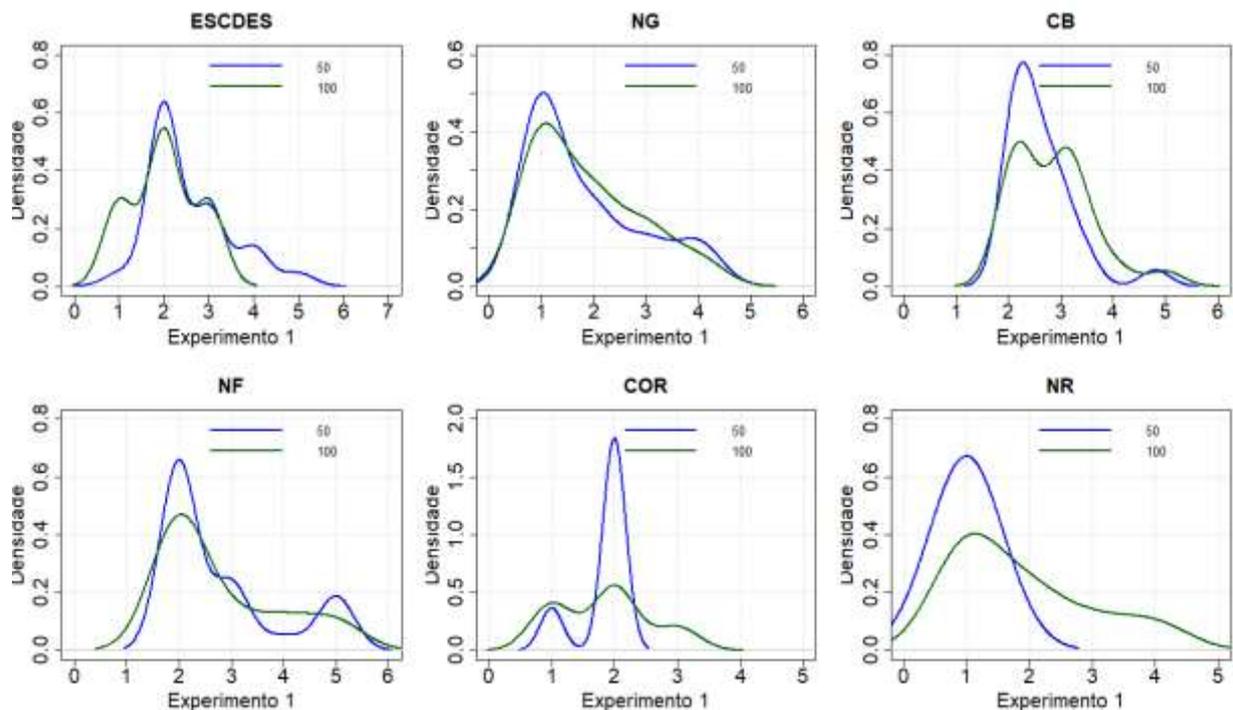
**Figura 3.** Curva de densidade para massa (MS) (mg), espessura (ES) (mm), largura (LS) (mm) e comprimento (CS) (mm) das sementes de *P. foetida*.



Fonte: Elaborado pelos autores.

No Experimento I, analisando a curva de densidade entre os tratamentos, para as variáveis ESCDES e NG tem-se que a maior concentração dos dados foi em torno de 2 (formação de brotos) e 1, respectivamente. Os tratamentos com 50% e 100% da concentração de sais pouco diferiram (Figura 4).

**Figura 4.** Curva de densidade entre tratamentos para as variáveis escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF), escore de coloração (COR) e número de raízes (NR) para o Experimento I.

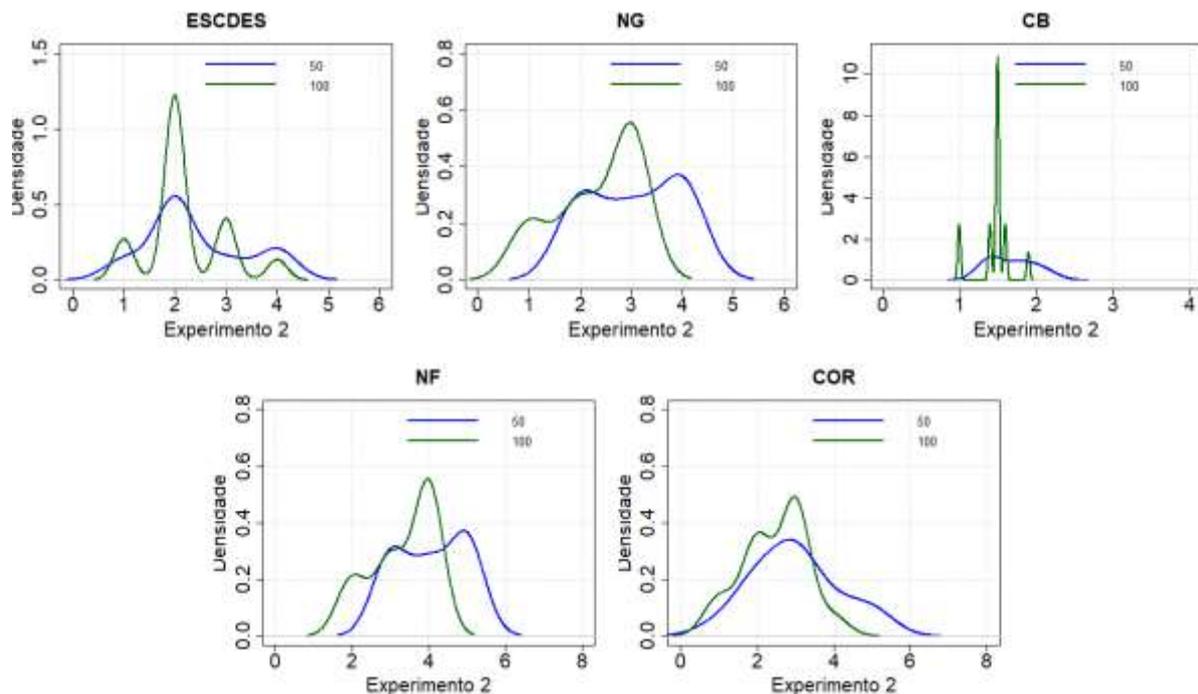


Fonte: Elaborado pelos autores.

Para as variáveis CB, NF, COR e NR tem-se uma diferença mais acentuada entre os tratamentos. A concentração dos dados está entre 2 e 3 para CB (MS 50 %) e 2 e 4 (MS 100 %), em torno de 2 para as variáveis NF e COR (verde-amareladas) e em torno de 1 para NR. Note que, o tratamento com 100% para as variáveis COR e NR tem maior variabilidade quando comparado ao tratamento com 50%, onde a variável COR apresentou a maior diferença entre os tratamentos (Figura 4).

No Experimento II, nas variáveis ESCDES, NG, CB e NF tem-se que a diferença entre os tratamentos é mais acentuada, a concentração dos dados está em torno de 2 para ESCDES (formação de brotos) para o meio 50% e diferentes picos de concentração no meio 100%, em torno de 3 para NG para o meio 50% e entre 2 e 4 para o meio 100%, entre 1 e 2 para CB no meio 50% e com picos de concentração diferentes no meio 100%, e em torno de 4 para a variável NF no meio 50% e entre 3 e 5 para o meio 100%. Note que na variável CB, os valores obtidos para o tratamento com 100% foram superiores ao tratamento com 50% (Figura 5).

**Figura 5.** Curva de densidade entre tratamentos para as variáveis escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF), escore de coloração (COR) e número de raízes (NR) no Experimento II.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Contudo, para a variável COR tem-se que a maior concentração dos dados está em torno de 3 (verdes claras), no tratamento com 50% da concentração de sais, não muito diferente do que ocorre no tratamento com 100% (Figura 5).

Para os dois experimentos realizados, observou-se durante o período de avaliação que as gemas dos segmentos nodais se converteram em plântulas, independente das concentrações dos meios. Após os 60 dias, algumas microplantas apresentaram sinais de oxidação, mudando sua tonalidade de amarelo para marrom.

No Experimento I as variáveis ESCDES, NG, CB, NF, COR e NR tiveram média geral de 2,56; 1,85; 2,72; 2,78; 1,82 e 1,44; respectivamente. O maior coeficiente de variação (CV) foi encontrado para a variável NG (56,91%), seguido de NR (55,39%), NF (40,69%), ESCDES (36,49%), COR (31,17%) e CB (25,42%). De acordo com os resultados obtidos neste experimento, foi verificada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste F, entre os meios de cultura, apenas nas variáveis ESCDES e NR, em que o tratamento com 50% da concentração dos sais obteve a maior média para ESCDES e o tratamento com 100% obteve a maior média para NR, para as demais variáveis (NG, CB, NF, COR) não ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise de variância para escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF), escore de coloração (COR) e número de raízes (NR) no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de gemas apicais de *P. foetida* (Experimento I).

Fontes de Variação	ESCDES	NG	CB (cm)	NF	COR	NR
	p – valor					
Meios	0,02*	0,91 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	0,98 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>	0,04*
Média Geral	2,29	1,85	2,73	2,79	1,83	1,44
CV (%)	36,49	56,91	25,42	40,69	31,17	55,39
Meio MS	Médias					
50%	2,56 a	1,83 a	2,61 a	2,79 a	1,83 a	1,00 b
100%	2,00 b	1,87 a	2,86 a	2,78 a	1,82 a	1,88 a

\* e \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F; ns não significativo pelo Teste F. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade.  
 Fonte: Elaborado pelos autores.

Uma vez que devemos levar em consideração no processo de estabelecimento o fornecimento de explantes viáveis para o processo posterior (multiplicação *in vitro*). Podemos considerar que as variáveis CB, NG, NF e COR devem ser escolhidas na escolha do melhor tratamento. Vale lembrar que NR interfere diretamente na ESCDES (Tabela 5).

No Experimento II as médias gerais foram: 2,30 para ESCDES, 2,70 para NG, 1,57 para CB, 3,70 para NF, 2,73 para COR, neste experimento não ocorreu a formação de raízes (NR). O maior valor de coeficiente de variação (CV) foi encontrado para variável ESCDES (38,54), seguido por COR (36,41%), NG (31,51%), NF (22,99%) e CB (16,74%) (Tabela 6), em sua maioria esses valores foram menores do que os encontrados no Experimento I (Tabela 5), podendo denotar maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Pode-se verificar comportamento distinto em relação a resposta dos tratamentos nas variáveis entre os dois experimentos, com exceção para a variável COR (Tabelas 5 e 6). Este resultado pode ter sofrido influência do tipo de explante utilizado nos dois experimentos.

Apenas para as variáveis ESCDES e COR não foi encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Para NG, CB e NF foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações de sais, pelo teste F (Tabela 6). Em todas as variáveis, o tratamento com 50% da concentração de sais obteve as maiores médias.

**Tabela 6.** Análise de variância para escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação em cm (CB), número de folhas (NF), escore de coloração (COR) e número de raízes (NR) no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de gemas axilares de *P. foetida*.

Fontes de Variação	ESCDES	NG	CB	NF	COR
Meios	0,54 <sup>ns</sup>	0,03*	0,03*	0,03*	0,15 <sup>ns</sup>
Média Geral	2,30	2,70	1,57	3,70	2,73
CV (%)	38,54	31,51	16,74	22,99	36,41
Meio MS	Médias				
50%	2,40 a	3,07 a	1,67 a	4,07 a	3,00 a
100%	2,20 a	2,33 b	1,46 b	3,33 b	2,47 a

\* e \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F; ns não significativo pelo Teste F. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo Teste F a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelos autores.

O desenvolvimento por organogênese das gemas axilares (Experimento II) apresentou valores médios mais elevados na concentração de 50% dos sais. Já para as gemas apicais os resultados obtidos não seguiram o mesmo padrão (Experimento I). Apesar do comportamento das fontes de variação nas variáveis respostas não ter sido o mesmo nos dois experimentos, pode-se concluir que nas duas situações o meio MS com 50% seria recomendado.

Em *P. Foetida* não foram relatados encontrados trabalhos em meio MS com metade da concentração de sais. Ragavendran et al (2012) e Shekhawat et al (2015), utilizaram segmentos nodais e apicais em meio MS com 100 % da concentração de sais, sem e com doses distintas de fitormônios. Entretanto, Ragavendran et al. (2012) conseguiu resposta organogênica apenas com uso de fitormônios, independente do explante utilizado. Já sem adição de fitormônios não foi obtida, mesmo nas gemas apicais, que apresentam maior nível de auxina endógena. Resultado distinto do encontrado neste trabalho e em Shekhawat et al (2015). De acordo com os autores não existe diferença entre os tipos de explantes utilizados na ausência de fitormônios, em presença de fitormônios os resultados foram distintos, apresentando diferença entre o tipo de explante utilizado para 3/5 das concentrações, sugerindo que no caso de adicionar fitormônios no meio de cultura deve-se ter cuidado com os explantes utilizados, pois os mesmos poderão interferir nos resultados.

A utilização do meio MS 50% se mostrou viável para o estabelecimento *in vitro* de *P. caerulea* (Faria et al., 2020) e *P. tenuifila* (Silvério Junior et al., 2020). Na micropropagação de segmentos nodais de marmeleiro Grimaldi et al. (2016), o número de gemas e o comprimento da brotação apresentaram maiores valores quando comparado ao meio MS com 100% dos sais, com o tratamento com apenas 50%, ao contrário do observado com os segmentos de *P. foetida* onde essa redução foi favorável para o incremento dessas variáveis.

A concentração salina é um importante fator nos protocolos de micropropagação (Santos et al., 2017). Avaliar doses reduzidas do meio de cultivo é necessário, pois além de reduzir o custo de produção, com essa diminuição pode-se evitar a vitrificação ou hiperidricidade dos explantes (Grimaldi et al., 2016), que é a manifestação fisiológica que pode ser ocasionada devido ao excesso de absorção de água em cultura de tecidos. Sendo assim, a concentração dos macro e micronutrientes deve ser pesquisada tendo em vista que uma nutrição inadequada pode causar dificuldades no desenvolvimento das mudas *in vitro* (Sridhar & Aswath, 2014).

Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos apresentam organogênese não direta e, com a utilização de fitormônios, pode ocorrer variações somaclonais, fazendo com que as gemas oriundas dos explantes, não possuam o mesmo genótipo da matriz (Oliveira et al., 2013).

De modo geral, a atividade organogênica *in vitro*, no primeiro experimento, apresentou valores similares para ambas as concentrações de meio MS sendo o meio ½ MS com resultados maiores. No segundo experimento, o meio MS com 50% dos nutrientes apresentou melhores resultados para todos os parâmetros avaliados, denotando que a espécie possivelmente sofre influência das condições *in vitro*, reforçando os estudos de Taiz et al., (2017) que mostraram que o desenvolvimento em ambientes carentes de nutrientes está diretamente relacionado à própria fisiologia da planta, podendo ser variável entre as espécies quanto às respostas fisiológicas.

Os resultados obtidos, corroboram com Amasifuen et al., (2020), que encontraram resultados satisfatórios na utilização do meio MS com metade da concentração de sais no estabelecimento *in vitro* de gemas axilares da espécie *P. foetida* para número de gemas e folhas.

Uma vez que neste trabalho foram montados dois experimentos em períodos distintos não foi possível avaliar se o tipo de explante interfere neste resultado. Faria et al. (2007), encontraram resultados distintos avaliando o tipo e posição dos explantes (gema apical, primeira, segunda, terceira e quarta gema lateral) no estabelecimento de *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. De acordo com os autores explantes mais

distantes dos locais de produção de auxina, fitormônio vegetal sintetizado nas extremidades dos tecidos vegetais, são menos influenciados por esta.

Esta informação foi corroborada em Almeida et al. (2015), em jenipapeiro, sendo verificada resposta morfogênica distinta para explantes provenientes de posições diferentes da mesma planta influencia, sinalizando que as variações nas respostas mediante o tipo e posição de explante utilizado podem estar relacionadas aos níveis hormonais endógenos da espécie.

Os resultados encontrados nos experimentos mostraram que o estabelecimento *in vitro* da espécie, pode ser realizado sem a utilização de reguladores de crescimento, pois com os dois tipos de explantes utilizados foi obtida com 50% das concentrações de sais minerais resposta organogênica satisfatória ou superior no meio de cultura, mostrando que esta concentração poderá ser recomendada no estabelecimento de gemas apicais e laterais, principalmente visando a economia, fator crucial para experimentos com cultura de tecidos.

#### **4. Considerações Finais**

A organogênese foi satisfatória para os dois tipos de explantes utilizados, sendo possível estabelecer um processo morfogênico *in vitro* em *P. foetida* sem adição de fitormônios.

De modo geral foram encontrados valores estatisticamente similares em ambas as concentrações. Mas resultados mais promissores para o processo de multiplicação foram encontrados no meio com metade da concentração de sais.

Visando fatores econômicos recomenda-se a utilização do meio contendo metade das concentrações de nutrientes, por ser mais viável e proporcionar redução dos custos na produção do meio de cultivo.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Código de Financiamento 001, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do processo nº 2015 / 18225-4, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB pelo financiamento do processo BOL0097/2019, ao Laboratório de Estatística Aplicada (LEA) e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) pelo apoio técnico e

estrutural, a Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira e a Dr<sup>a</sup> Yaliana Tafurt-Cardona pela revisão do resumo (versão em espanhol).

## Referências

Almeida, C. S., da Silva, A. V. C., de Araújo, A. G., & da Silva Léo, A. (2015). Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. *Revista Caatinga*, 28(1), 58-64.

Amasifuen, A. D. H., Curaca, A. A., Lazaro, A. A. C., & Pillasca, H. B. D. (2019). *In vitro* establishment of wild passion fruit (*Passiflora foetida* L.) from axillary buds. *Big Bang Faustiniense*, 8(9), 13-16.

Cavichioli, J. C., Corrêa, L. D. S.; Boliani, A. C. & Santos, P. C. D. (2011). Desenvolvimento e produtividade do maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(2), 567-574.

Costa, A. de F. S. da, Abreu, E. F. M., Schmildt, E. R., Costa, A. N. da & Schmildt, O. (2019). Advances observed in papaya tree propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(5).

Crochemore, M. L., Molinari, H. B. & Stenzel, N. M. C. (2003). Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(1), 5–10.

Faria, G. A., de Carvalho Costa, M. A. P., da Silva Ledo, C. A., Junghans, T. G., da Silva Souza, A., & Da Cunha, M. A. P. (2007). Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 535-543.

Faria, G. A., Oliveira, C. P. M., Lopes, B. G., Rocha, P. S., Peron, G. M., Souza, K. S., ... & Felizardo, L. M. (2020). Estabelecimento de protocolo para propagação *in vitro* de *Passiflora caerulea*. *Research, Society and Development*, 9(9), e157997158-e157997158.

Ferreira, A. F. A., da Silva, M. S. A. C., Monteiro, L. N. H., Faria, G. A.; Boliari, A. C., Rodrigues, M. G. F. & Pereira, F. D. (2019). Nodal segments and zygotic embryos in culture media for the *in vitro* propagation of tamarind. *Comunicata Scientiae*, 10 (4), 438-447.

Gutiérrez, I. E. M. de, Nepomuceno, C. F., Ledo, C. A. da S. & Santana, J. R. F. de. (2011). Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. *Ciência Rural*, 41(2), 260–265.

Lemes, C. S. R., Sorgato, J. C., Soares, J. S. & Rosa, Y. B. C. J. (2016). Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. *Ciência Rural*, 46(3), 499-505.

Melo Filho, A. A., Kamezaki, A. K., Ribeiro, P. R. E., Melo, A. C. G. R. de, Fernández, I. M., Santos, R. C., Chagas, E. A. & Chagas, P. C. (2018). Chemical composition, antioxidant and biological activity of leaves *Passiflora foetida*. *Chemical Engineering Transactions*, 64(1), 241–246.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

Oliveira, L. S., Dias, P. C. & Brondani, G. E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(76), 439-453.

Pacheco, G., Simão, M. J., Vianna, M. G., Garcia, R. O., Vieira, M. L. C. & Mansur, E. (2016). *In vitro* conservation of *Passiflora* — A review. *Scientia Horticulturae*, 211, 305–311.

Preisigke, S. da C., Silva, L. P. da, Serafim, M. E., Bruckner, C. H., Araújo, K. L. & Neves, L. G. (2017). Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. *Summa Phytopathologica*, 43(4), 321–325.

R Core team R. (2019). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Ragavendran, C.; Kamalanathan, D.; Reena G. & Natarajan D. (2012). *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L., an exotic medicinal plant. *Asian Journal Plant Science Research*, 2(6), 707–711.

Raja, H. D.; Ramkumar, K.; Srinivasan, P. & Tamilvanan, R. (2018). Studies on *in vitro* and ex vitro seed germination of *Passiflora foetida* using various seed germination enhancing substances. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 1790-1796.

Rodrigues, D. B.; Nadal, M. C.; Camargo, S. S.; de Assis, A. M.; Schuch, M. W.; Peil, R. M. N. & Faria, R. T. (2016). Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. micropropagation. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), 2901-2910.

Santos Filho, H. P.; Laranjeira, F. F.; Haddad, F. (2017). *Capítulo 11: Doenças do maracujazeiro causadas por fungos, oomicetos e bactérias*. In: Junghans, T. G.; Jesus, O. N. de. *Maracujá: do cultivo a comercialização*. Brasília: Embrapa.

Santos, E. de O.; Rodrigues, A. A. de J. & de Carvalho, A. C. P. P. (2017). Concentrações do meio MS e auxinas no enraizamento *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*). *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 13(1), 7-14.

Shekhawat, M. S.; Kannan, N.; Manokari, M. & Ravindran, C. P. (2015). *In vitro* regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 209–214.

Silva, E. M.; de Melo, N. F.; Mendes, A. M. S.; de Araújo, F. P.; Maia, L. C. & Yano-Melo, A. M. (2015). Response of *Passiflora setacea* to mycorrhization and phosphate fertilization in a Semiarid Region of Brazil. *Journal of Plant Nutrition*, 38(3), 431-442.

Silva, R. M. da; Ambrósio, M. M. de Q.; Aguiar, A. V. M. de; Faleiro, F. G.; Cardoso, A. M. S. & Mendonça, V. (2017). Reação de cultivares de maracujazeiro em áreas com fusariose. *Summa Phytopathologica*, 43(2), 98–102.

Silvério Junior, L. H., Faria, G. A., Lopes, B. G., Ferreira, A. F. A., Oliveira, C. P. M. de, Garcia, C. K., Felizardo, L. M., Rocha, P. S., Ribeiro, B. C., Cavichioli, J. C., & Furlani Junior, E. (2020). Estabelecimento *in vitro* de maracujá *Passiflora tenuifila*. In Impacto, Excelência e Produtividade das Ciências Agrárias no Brasil 4 (pp. 120–135). Atena Editora. <https://doi.org/10.22533/at.ed.53720210511>

Soares, W. S.; Rêgo, M. M.; Rêgo, E. R.; Barroso, P. A.; Nascimento, K. S. & Ferreira, K. T. (2012). Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(spe), 138–142.

Sridhar, T. M.; Aswath, C. R. A. (2014). Comprehensive study on role of natural organic extracts in tissue culture medium. *American Journal of Plant Sciences*, 5(20), 3073-3088.

Taiz, L. et al. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 858p.

Viana, F. M. P.; Freire, F. das C. O.; Cardoso, J. E. & Vidal, J. C. (2003). *Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 12p. (Comunicado Técnico, 86).

Zucareli, V.; Ono, E. O.; Boaro, C. S. F. & Brambilla, W. P. (2014). Desenvolvimento inicial de maracujazeiros (*Passiflora edulis f. flavicarpa*, *P. edulis f. edulis* e *P. alata*) enxertados sobre *Passiflora cincinnata*. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(5), 2325-2339.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Glaucia Amorim Faria - 15%

Luiz Henrique Silvério Junior - 15%

Beatriz Garcia Lopes - 10%

Antônio Flavio Arruda Ferreira - 10%

Cíntia Patrícia Martins de Oliveira - 10%

Paula Suares Rocha - 10%

Taís Ferreira Costa - 10%

Enes Furlani Junior - 10%

Lucas Menezes Felizardo - 10%