

Estabelecimento de protocolo para propagação *in vitro* de *Passiflora caerulea*
Establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *Passiflora caerulea*
Establecimiento de protocolo para la propagación *in vitro* de *Passiflora caerulea*

Recebido: 29/07/2020 | Revisado: 06/08/2020 | Aceito: 07/08/2020 | Publicado: 14/08/2020

Glaucia Amorim Faria

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: glaucia.a.faria@unesp.br

Cíntia Patrícia Martins de Oliveira

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: cintia.patricia@unesp.br

Beatriz Garcia Lopes

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

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: biagarcialopes@gmail.com

Paula Suares Rocha

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: psr.ecotox@gmail.com

Guilherme Marcucci Peron

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0029-1659>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: guilhermeperon501@gmail.com

Karina da Silva Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8858-6429>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: karina.s.souza@unesp.br

Camila Kamblevicius Garcia

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5974-9935>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: camila.kamblevicius@gmail.com

Enes Furlani Junior

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

enes.furlani@unesp.br

José Carlos Cavichioli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4432-3648>

Polo Regional Alta Paulista, Brasil

E-mail: cavichioli@terra.com.br

Lucas Menezes Felizardo

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: lucas.felizardo@unesp.br

Resumo

A *Passiflora caerulea* L. além de apresentar importância gastronômica e medicinal vem sendo utilizada como porta-enxertos de maracujá comercial, mediante resistência a doenças fitopatogênicas. Entretanto, essa espécie apresenta suscetibilidade a patógenos virais e baixa taxa de germinação. Nesse aspecto, a cultura de tecidos torna-se uma alternativa viável por proporcionar a produção em larga escala, em curto período de tempo e livre de doenças virais, sendo assim uma ferramenta de extrema importância na preservação e propagação dessa espécie. No entanto, existem poucos estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de *P. caerulea*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* para essa espécie. Foi utilizado o meio de cultivo MS com 100% e 50% das concentrações de sais (MS 100% e MS 50%). Para execução desse experimento, inicialmente foi realizada a morfometria das sementes de *P. caerulea*, com intuito de escolher o material seminífero para posterior germinação. Em seguida, microestacas oriundas de plantas germinadas a partir dessas sementes foram inoculados em meio MS 100% e MS 50%, sem adição de fitormônios. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições, do qual foram avaliados o número de gemas, comprimento da brotação, número de folhas, coloração da folha e desenvolvimento da microestaca. A utilização do meio MS 50% se mostrou viável para o estabelecimento *in vitro* de *P. caerulea*, sem o comprometimento no desenvolvimento e da qualidade das plantas, proporcionando redução dos custos na produção do meio de cultivo.

Palavras-chave: Protocolo *in vitro*; Micropropagação *in vitro*; Conservação de germoplasma.

Abstract

Besides being of gastronomic and medicinal importance, *Passiflora caerulea* L. has been used as rootstock for commercial passion fruit, due to its resistance to phytopathogenic diseases. However, this species is susceptible to viral pathogens and presents a low germination rate. Therefore, tissue culture becomes a viable alternative for providing large-scale production, in a short period of time and free of viral diseases, being an important tool in the preservation and propagation of this species. However, there are only few studies related to the *in vitro* cultivation of *P. caerulea*. Thus, this study aimed at establishing an *in vitro* protocol for the species *P. caerulea*. using the Culture medium MS was used, with 100% and 50% concentrations of salts (MS 100% and MS 50%). To perform the experiment, the morphometry of *P. caerulea* seeds was initially carried out, in order to choose the seminiferous material for later germination. Then, microcuttings from plants germinated from those seeds were inoculated in medium MS 100% and MS 50%, with no addition of phytohormones. The experiment was conducted in a completely randomized design with 25 replications and the number of buds, sprout length, number of leaves, leaf color and micropile development were evaluated. The use of MS 50% showed to be feasible for the *in vitro* establishment of *P. caerulea*, without compromising the development and quality of the plants, providing cost reduction in the production of the culture medium.

Keywords: *In vitro* protocol; *In vitro* micropropagation; Germplasm conservation.

Resumen

La *Passiflora caerulea* L. además de presentar importancia gastronómica y medicinal viene siendo utilizada como portainjertos de maracuyá comercial, mediante resistencia a enfermedades fitopatógenicas. Sin embargo, esta especie presenta susceptibilidad a patógenos virales y baja tasa de germinación. En este sentido, el cultivo de tejidos se convierte en una alternativa viable, ya que proporciona una producción a gran escala, en poco tiempo y libre de enfermedades virales, por lo que es una herramienta muy importante para la conservación y propagación de esta especie. Sin embargo, hay pocos estudios relacionados con el cultivo *in vitro* de *P. caerulea*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo era establecer un protocolo de cultivo de establecimiento *in vitro* para esta especie. Se utilizó el medio de cultivo MS con 100% y 50% de las concentraciones de sales (MS 100% y MS 50%). Para ejecución de este experimento, inicialmente se realizó la morfometría de las semillas de *P. caerulea*, con el fin de elegir el material seminífero para posterior germinación. A continuación, microestacas procedentes de plantas germinadas a partir de estas semillas fueron inoculados en medio MS

100% y MS 50%, sin adición de fitosanidad. El experimento fue realizado en delineamiento enteramente casualizado con 25 repeticiones, de las cuales fueron evaluados el número de yemas, longitud de la brotación, número de hojas, coloración de la hoja y desarrollo de la microestaca. La utilización del medio MS 50% se mostró viable para el establecimiento *in vitro* de *P. caerulea*, sin el compromiso en el desarrollo y la calidad de las plantas, proporcionando reducción de los costos en la producción del medio de cultivo.

Palabras clave: Protocolo *in vitro*; Micropropagación *in vitro*; Conservación de germoplasma.

1. Introdução

O gênero *Passiflora*, pertencente à família *Passifloraceae*, detém grande diversidade, compreendendo atualmente 534 espécies (Esashika, 2018). Por ser oriundo de regiões tropicais, o Brasil apresenta excelentes condições para seu cultivo (Pereira, Silveira, & Costa, 2017), possuindo assim, a maior concentração de passifloráceas, com aproximadamente 150 espécies (Barros et al., 2013).

As espécies comerciais de *Passiflora* possuem significativa participação no mercado nacional, possibilitando ao Brasil se destacar como o maior produtor mundial (Faleiro & Junqueira, 2016), tendo como principais finalidades a produção de suco, o consumo *in natura* dos frutos, além da utilização na indústria farmacêutica em virtude da presença de compostos bioativos valiosos (Faleiro, Junqueira & Costa, 2015).

Dentre as espécies com potencial para exploração está a *Passiflora caerulea* L. popularmente conhecida como maracujá azul devido a coloração azulada das fímbrias de sua flor, essa passiflorácea arbustiva possui um caule glabro equipado com gavinhas (Severin et al., 2011), podendo ocorrer em carvalhos, bordas de florestas e campos. Seu fruto possui cerca de 4-6 × 3,5-4 centímetros, com formato subgloboso ou ovóide e coloração alaranjada quando maduro. A polpa, de coloração avermelhada, possui um sabor adocicado (Mondin, Cervi & Moreira, 2011).

Além da importância gastronômica *P. caerulea* é utilizada na medicina popular pois apresenta atividades anti-inflamatórias, antidiarréicas, espasmolíticas (Anzoise et al., 2016), analgésicas, antienvhecimento, antiestresse e antitussígeno (Feliú-Hemmelmann, Monsalve & Rivera, 2013).

Essa espécie também vem sendo utilizada como porta-enxertos de maracujá comercial (azedo e doce) por ser resistente a doenças fitopatogênicas como a mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* (Fuhrmann et al., 2014), além de se mostrar

tolerante à podridão radicular, murcha de *Fusarium*, mancha marrom, mancha de Septoria (Grech & Rijkenberg, 1991).

Contudo, *P. caereulea* apresenta baixa germinação de sementes (Martínez, Yesid Bernal & Cáceres, 2000) e suscetibilidade a patógenos virais como os causadores do mosaico do do maracujazeiro e da podridão do colo do maracujá (Soares et al., 2012). Nesse aspecto, técnicas de cultura de tecidos como a micropropagação tornam-se uma ferramenta de extrema importância na preservação dessa espécie uma vez que permite a produção em larga escala, em um curto período de tempo e livre de fitopatógenos (Jafari, Daneshvar, & Lotfi, 2017; Hesami & Daneshvar, 2016).

A micropropagação vegetal consiste basicamente no cultivo *in vitro* de explantes em meio de cultura nutritivo sob ambiente controlado e condições assépticas no qual novas gemas são produzidas e multiplicadas (Cardoso, Oliveira & Cardoso, 2019). Podendo ser realizada por organogênese, que por sua vez pode ser indireta ou direta. A organogênese direta é um método eficaz para a micropropagação, pois apresenta resultados em pouco tempo, produz elevada quantidade de plantas sem nenhuma instabilidade genética e geneticamente estáveis e idênticas à planta mãe. Enquanto a organogênese indireta, consiste em um método de cultura de tecidos vegetais desvantajoso por criar variedades somaclonais morfologicamente anormais e ser um processo demorado (Siwach & Gill, 2011).

O meio Murashige & Skoog (MS) destaca-se dentre os meios de cultivo utilizados em micropropagação vegetal. O meio MS é composto de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas (Galdiano Júnior et al., 2013) que podem suprir as necessidades de plantas em cultivo *in vitro*. No entanto, o excesso ou deficiência no suprimento de um elemento essencial pode resultar em diferentes respostas (positivas ou negativas) para o desenvolvimento vegetal (Schwalbert et al, 2014).

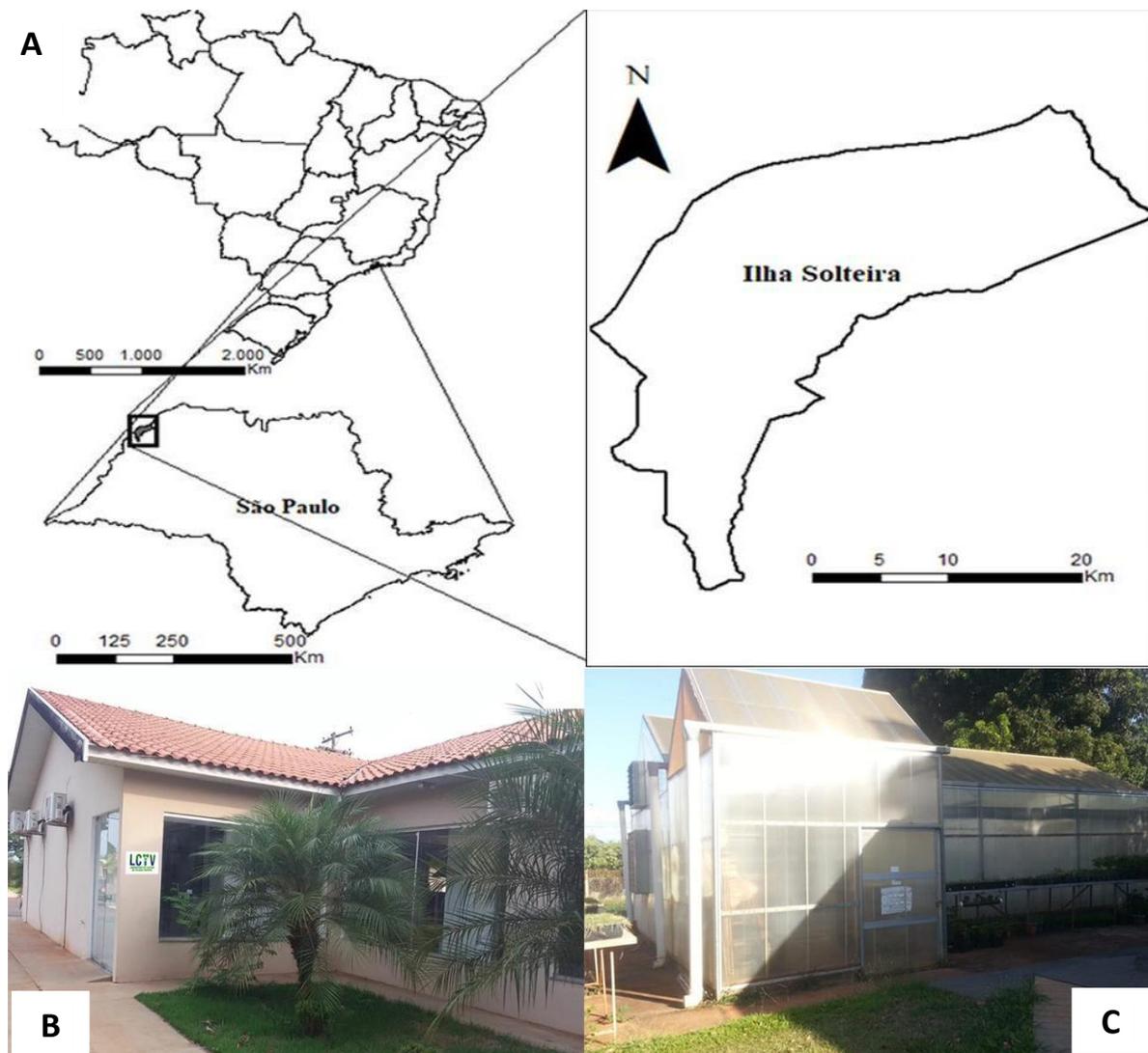
Apesar de sua grande importância econômica, atualmente existem poucos estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de *P. caerulea*. Deste modo o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* para esta espécie, utilizando o meio de cultivo MS em duas diferentes concentrações (100% e 50%).

2. Metodologia

Os dados analisados neste trabalho foram referentes a variáveis quantitativas obtidas em um ensaio de Germinação e variáveis quantitativas e qualitativas obtidas em um experimento de estabelecimento *in vitro*, ambos com *P. caerulea*. A realização destes, ocorreu no

Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) (Figura 1B) e em casa de vegetação (Figura 1C), ambos do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A faculdade está localizada no município de Ilha Solteira, localizado a 20°25'24,4" de latitude sul e 51°21'13,1" de longitude oeste, com altitude de 337 metros (Figura 1A).

Figura 1. Locais de implantação do experimento. A. Mapa da localização do município; B: Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCTV) e C: Casa de Vegetação.



Fonte: Autores.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados como material vegetal acessos de *P. caerulea* (Figura 2A) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Polo

Regional Alta Paulista - Adamantina/SP. As sementes foram retiradas de frutos maduros cortados e despoldados (Figura 2C), separadas com o auxílio de peneira de aço (1 mm) e água corrente para retirada do arilo, secas sobre papel absorvente a ± 28 °C por 48 h e armazenadas em geladeira por 2 meses (Figura 2D).

Para a escolha do material seminífero utilizado na germinação foi realizada a morfometria das sementes, seguida da análise estatística descritiva e gerados os gráficos de BoxPlot. O processo de escolha foi baseado no intervalo interquartil (IQ), por não sofrer a influência direta de dados discrepantes. Foram avaliadas as variáveis massa da semente (mg) (MS), espessura da semente (mm) (ES), largura da semente (mm) (LS) e comprimento da semente (mm) (CS).

Após o processo de escolha, as 100 sementes foram desinfetadas em etanol a 70% por 40 segundos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, sendo a lavagem tripla realizada com água deionizada autoclavada. Posteriormente foram germinadas em copos plásticos (200 mL) contendo substrato comercial Topstrato Hortaliças® autoclavado (Figura 2E). Esse substrato apresenta em sua composição casca de Pinus, vermiculita, PG Mix 14-16-18, nitrato de potássio, superfosfato simples e turfa. As plantas obtidas foram transplantadas para vasos com dimensões de 47 x 15 x 20 cm (comprimento x altura x largura) preenchidos com um composto autoclavado, formado por solo arenoso e esterco bovino (3:1), acrescido de três quilos de superfosfato simples e um quilo de cloreto de potássio para cada 1 m³ de solo (Figuras 2F e 2G). O solo utilizado é classificado como Neossolo Quartzarênico Órtico, textura arenosa, de acordo com a classificação da Embrapa (Santos et al., 2018)

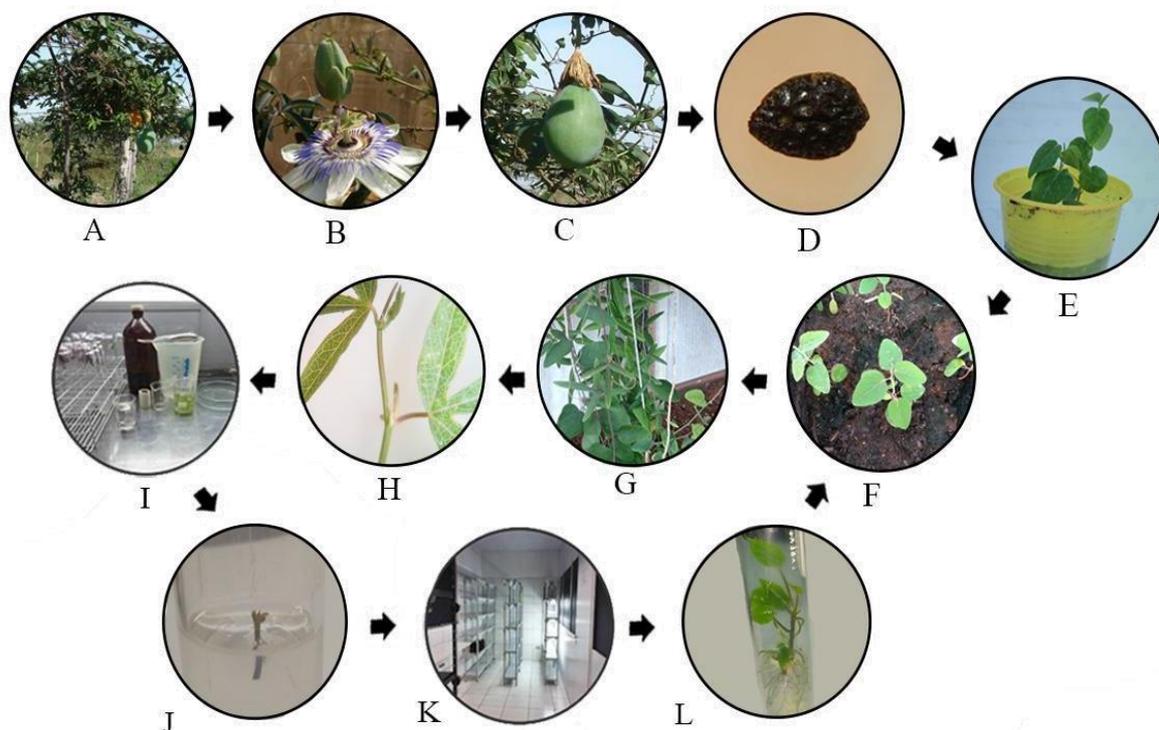
A germinação e o crescimento inicial das plantas foram realizados em casa de vegetação de acrílico do tipo 'Pad&Fan' (Figura 1C) com temperatura controlada em 28°C, umidade relativa do ar em 60% e irrigação duas vezes ao dia por 3 minutos (1800 cm³ min⁻¹).

Os segmentos nodais ou microestacas contendo gemas apicais e axilares (Figura 2H), foram desinfetadas em etanol a 70% por 40 segundos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, sendo a lavagem tripla realizada com água deionizada autoclavada (Figura 2I).

Após a desinfestação, as microestacas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculadas na posição vertical (Figura 2J) em tubos de ensaio com 20 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 100% e 50% das concentrações de macro, micronutrientes e compostos orgânicos (MS 100% e MS 50%, respectivamente) (Tabela 1). Os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2 g L⁻¹ de phytigel®, pH ajustados em 5,8 e autoclavados a 121 °C (1 kg cm⁻²) durante 20 minutos, sem adição de hormônio

vegetal. As microestacas inoculadas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2K).

Figura 2. Esquema do processo de estabelecimento *in vitro* de *Passiflora caerulea* e planta completa (folhas e raízes) de *Passiflora*. A. Planta; B. Flor; C. Fruto; D. Semente; E. Germinação em copos plásticos na casa de vegetação; F. Transferência para os vasos em casa de vegetação; G. Crescimento em casa de vegetação. H. Gema apical e 1ª Gema axilar; I. Desinfestação em câmara de fluxo laminar; J. Inoculação em câmara de fluxo laminar; K. Sala de crescimento; L. Planta completa de *Passiflora* desenvolvida *in vitro*.



Fonte: Autores.

Após 60 dias da inoculação da microestaca, as seguintes variáveis foram avaliadas: número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF), coloração da folha (COR) e desenvolvimento da microestaca (ESCDES) (Tabela 2). A variável NG foi obtida por meio de contagem direta do número de gemas viáveis e a variável CB foi medida com o auxílio de uma régua milimetrada.

Tabela 1. Composição do meio Murashige & Skoog (MS) completo (MS 100%) e com metade da concentração (MS 50%) para macronutrientes, micronutrientes e compostos orgânicos.

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

Fonte: Autores.

Tabela 2. Escalas de coloração das folhas e desenvolvimento da plântula com respectivas notas atribuídas.

Escala de Cores	Identificação	Escala de Desenvolvimento	Notas
	Verdes escuras	Planta completa (folhas e raízes)	5
	Verdes médias	Planta regenerada e alongada	4
	Verdes claras	Brotos com folhas expandidas	3
	Verde-amareladas	Formação de Brotos	2
	Amareladas	Gema vigorosa	1

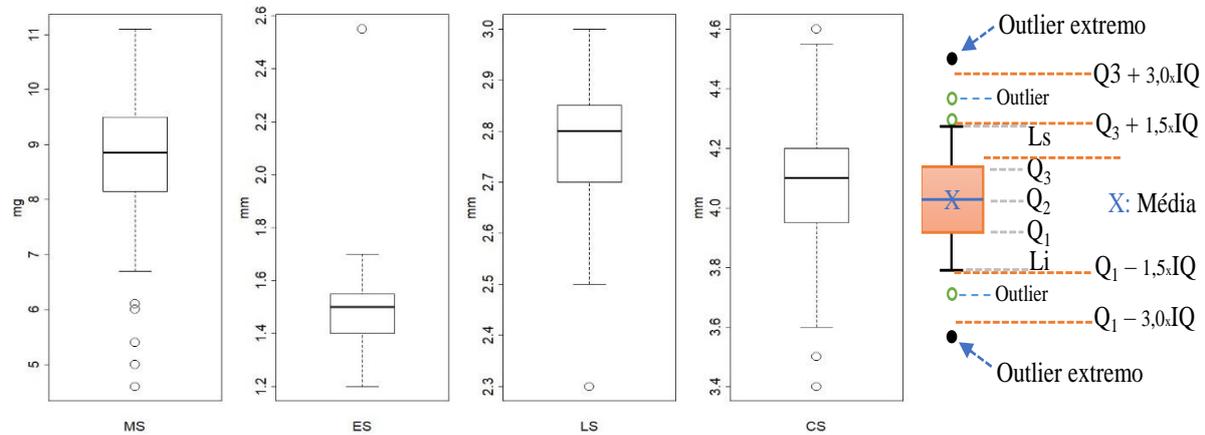
Fonte: Autores.

A hipótese da normalidade dos erros de cada variável foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez constatado a normalidade, foi realizada a análise de variância de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, utilizando o teste F a 5% para detectar a diferença entre as fontes de variações (meios) e encontrar a diferença entre as médias, utilizando o software estatístico SAS® on demand (SAS, 2018). A estatística descritiva e a confecção dos gráficos foram realizadas no software R versão 3.6.1 (R Development Core Team, 2019).

3. Resultados e Discussão

A Figura 3 mostra o gráfico de boxplot para todas as sementes antes da amostragem. Nestes gráficos são observados valores discrepantes em todas as variáveis, o que visualmente causa uma distorção na figura, afetando a média dos dados, não sendo uma medida recomendada para escolha das sementes neste experimento. Deste modo, foi escolhido o intervalo interquartilíco IQ (quartil 3 - quartil 1), que compreende 50% dos dados da distribuição, e não é diretamente influenciado pelos outliers. Sendo, portanto, retirada uma amostra de 100 sementes de todas que correspondiam a este intervalo. Para a variável MS esse intervalo foi de 1,3 (9,50 - 8,20); para ES foi de 0,15 (1,55 - 1,40); para LS foi de 0,15 (2,85 - 2,70) e para CS foi de 0,25 (4,20 - 3,95). O maior intervalo foi encontrado para variável MS que apresentou maior variabilidade dos dados em relação às outras variáveis, com coeficiente de variação (CV) de 13,86%, o que traduz a maior dispersão dos dados, seguida por ES (9,69%), CS (5,56%) e LS (3,81%) (Figura 3).

Figura 3. Gráfico de Boxplot das características biométricas de *P. caerulea*. A- MS (Massa da semente mg); B- ES (Espessura da semente mm); C- LS (Largura da semente mm); D-CS (Comprimento da semente mm) de *P. caerulea*. Ls: limite superior; Li: limite inferior; Q₁: quartil 1; Q₃: quartil 3; Q₃ ou Md: mediana; X: média aritmética; IQ: intervalo interquartil (Q₃-Q₁); Outlier superior: >Q₃+ 1,5IQ; Outlier inferior: <Q₁- 1,5IQ; Outlier extremo superior: >Q₃+ 3IQ; Outlier extremo inferior: <Q₁- 3IQ.



Fonte: Autores.

Com base no gráfico de boxplot apresentado na figura 3, observa-se que os resultados de CV para as variáveis relacionadas com a morfometria das sementes, sugerem que variabilidade encontrada no material vegetal utilizado foi baixa. Resultado divergente foi observado por Sacramento & Souza (2000), os quais consideraram que a *P. caerulea* apresenta uma variabilidade genética relativamente alta.

Apesar desse resultado, o maior valor de CV foi encontrado na variável MS (13,86%), e, esse valor de acordo com a classificação de Pimentel-Gomes (2009) pode ser considerado um valor médio de variação (10 a 20%), as demais variáveis apresentaram CV menores que 10%, considerado um valor baixo de variação. Silveira et al. (2019), ao caracterizar biometricamente sementes de *P. cristalina*, constataram valores de CV para ES (10,63%), CS (4,99%) e LS (4,92%), valores superiores ao encontrado neste trabalho, com exceção para CS. As variações nas características morfoagronômicas dentro de uma única espécie de maracujazeiro pode ocorrer em virtude da variabilidade genética existente nas populações como também pela influência do ambiente (Araújo, Silva & Queiroz, 2008).

De acordo com a estatística descritiva, as sementes de *P. caerulea* apresentaram média da massa da semente igual a 8,59 mg, enquanto a espessura, largura e comprimento tiveram médias de 1,49, 2,78, e 4,07 mm, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística descritiva da caracterização biométrica das sementes de *P. caerulea*.

Estatística descritiva	MS (mg)	ES (mm)	LS (mm)	CS (mm)
Média Aritmética	8,591	1,490	2,784	4,072
Mínimo	4,600	1,200	2,300	3,400
Máximo	11,100	2,550	3,000	4,600
Variância	1,504	0,021	0,011	0,052
Desvio Padrão	1,226	0,145	0,107	0,228
Erro Padrão	0,123	0,015	0,011	0,023
CV%	13,858	9,698	3,808	5,557

MS(mg): Massa da semente; ES (mm): Espessura da semente; CS (mm): Comprimento da semente; LS (mm): Largura da semente. Fonte: Autores.

De acordo com os resultados obtido no presente estudo, não há uma grande semelhança na localização da largura e do comprimento das sementes, uma vez que as médias para a largura (2,78) e para o comprimento das sementes (4,07), não foram muito próximas (Tabela 3). Segundo Assis et al. (2013), quando não há semelhança na localização da largura e do comprimento, pode-se constatar que as sementes possuem um centro de gravidade na distribuição dessas variáveis.

A caracterização biométrica de sementes pode proporcionar informações importantes para a diferenciação de espécies do mesmo gênero (Silveira et al., 2019; Assis et al., 2013). Segundo Silveira et al. (2019), a biometria de frutos e sementes está relacionada a fatores genéticos e ambientais e pode fornecer informações valiosas para a exploração e conservação da espécie. Todavia, informações sobre as características biométricas de sementes de *P. caerulea* são escassas na literatura atual. Apenas a variável número de gemas obteve diferença significativa entre os tipos de meio de cultivo (MS 50% e MS 100%), pelo teste F com probabilidade a 5%. A maior média foi obtida para o meio MS 50% (3,56) indicando que este foi o mais efetivo nas sementes, para variável NG, da espécie *P. caerulea*. Nas demais variáveis pode-se concluir que não há diferença entre o uso dos meios MS 100% e MS 50%. As variáveis ESCDES, CB, NG e NF tiveram CV de 40,27%, 52,75%, 42,23% e 59,94% respectivamente, enquanto a variável COR apresentou o menor coeficiente de variação (10,32%) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância para escore de desenvolvimento (ESCDES), número de gemas (NG), comprimento da brotação (CB), número de folhas (NF) e coloração da folha (COR) no estabelecimento de genótipos de *Passiflora caerulea*. Ilha Solteira/SP, 2017.

FV	ESCDES	CB	NG	NF	COR
Valor de F					
Meios	0,004 ^{ns}	1,175 ^{ns}	7,284*	0,339 ^{ns}	0,522 ^{ns}
Média	2,391	1,826	2,694	1,850	2,043
CV	40,27	52,75	42,23	59,94	10,32
Meio		Médias			
MS 50%	2,375 a	2,153 a	3,555 a	1,600 a	2,066 a
MS 100%	2,400 a	1,500 a	1,833 b	1,933 a	2,000 a

* e ^{ns}, significativo e não-significativo a 5%, respectivamente, pelo Teste F. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste F. Fonte: Autores.

Jafari, Daneshvar & Lotfi (2017), promovendo a proliferação *in vitro* de *P. caerulea* via nó cotiledonar e explantes da ponta, relataram que nenhuma resposta de regeneração foi registrada nos explantes cultivados em meio MS básico (formulação original), sem acréscimo de regulador de crescimento. Contudo, foi possível verificar na Tabela 4, a indução de brotações em segmentos nodais de *P. caerulea* em meio MS básico sem modificação, onde o meio de cultura MS com metade da concentração de sais (MS 50%), foi estatisticamente superior para a variável número de gemas quando comparada a indução de brotações em meio MS 100% para essa variável. Neste sentido, pode-se inferir que o meio MS 50% foi o que melhor supriu as necessidades nutricionais de *P. caerulea*, proporcionando uma melhor resposta no cultivo *in vitro* de segmentos nodais para o número de gemas.

Conforme a estatística descritiva, as variáveis qualitativas apresentaram médias para a escala de desenvolvimento 2,39 em MS 50% e 2,38 em MS 100%, comprimento da brotação de 2,15 em MS 50% e 1,50 em MS 100%, número de gemas de 3,56 MS 50% e 1,83 em MS 100%, número de folhas de 1,93 em MS 50% e 1,60 em MS 100% e coloração da folha de 2,07 em MS 50% e 1,89 em MS 100%. De acordo com os resultados, o meio MS 50% apresentou maiores valores que o meio MS 100% para todas variáveis avaliadas (Tabela 5). Ainda de acordo com esta tabela podemos observar que no meio MS 50% forma encontrados menores valores de CV para a maioria das variáveis analisadas.

Tabela 5. Estatística descritiva para escala de desenvolvimento (ESCDES), comprimento da brotação (CB), número de gemas (NG), número de folhas (NF) e coloração da folha (COR), em meio de cultivo ½MS e MS, no estabelecimento de *Passiflora tenuifila*. Ilha Solteira - SP, 2017.

Estatística	ESCDES		CB		NG		NF		COR	
	MS 50%	MS 100%								
Média	2,40	2,38	2,15	1,50	3,56	1,83	1,93	1,60	2,07	1,89
Mínimo	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Máximo	4,00	4,00	4,00	2,00	6,00	4,00	5,00	3,00	3,00	2,00
Variância	0,83	1,13	1,31	0,33	1,28	1,77	1,35	0,80	0,07	0,11
Desvio Padrão	0,91	1,06	1,14	0,58	1,13	1,33	1,16	0,89	0,26	0,33
Erro Padrão	0,24	0,38	0,31	0,29	0,36	0,54	0,29	0,40	0,06	0,11
CV (%)	37,93	44,66	53,09	38,49	31,79	72,50	60,15	55,90	12,49	17,65

Fonte: Autores.

Os valores médios para a escala de desenvolvimento *in vitro* dos segmentos nodais de *P. caerulea* demonstraram que o meio MS 50% proporcionou o desenvolvimento adequado para formação de brotos, enquanto o meio MS 100% proporcionou o desenvolvimento de brotos com folhas expandidas conforme o estabelecido na escala de desenvolvimento proposto neste estudo (Tabela 5). De acordo com Aragão et al. (2016), tanto a composição do meio de cultura como os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas.

Na busca de um protocolo eficiente para micropropagação de *Passiflora caerulea* visando à conservação de germoplasma, Rathod et al., (2014) avaliaram a morfogênese em segmento foliar de *P. caerulea* em meio MS suplementado com reguladores de crescimento, e constataram que a concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP e 1 mg L⁻¹ de cinetina promoveu a regeneração direta de brotações. Já Jafari, Daneshvar e Lotfi (2017) mostraram que o número máximo de brotações em explantes de nós cotilédones e em explantes de ponta de broto foram obtidos em meio MS suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,15 mg L⁻¹ de AIB.

Contudo, neste trabalho, a organogênese por via direta foi observada em segmentos nodais de *P. caerulea* submetidos ao meio de cultura MS em sua formulação original, o qual

proporcionou a indução de brotações com número médio de gemas de 3,56 para o meio MS 50% e de 1,83 para o meio MS 100% (Tabela 5). Assim, pode-se afirmar que o uso de segmentos nodais em meio MS básico é suficiente para o estabelecimento *in vitro* da espécie silvestre *P. caerulea*.

O comprimento das brotações de *P. caerulea* atingiram médias de 2,15 cm em meio MS 50%. Resultados inferiores foram obtidos por Faria et al., (2007), que ao testarem diferentes concentração dos sais e nutrientes do meio MS para o alongamento de brotações *in vitro* de três espécies de *Passiflora*, constataram médias de 1,36 cm para *P. laurifolia* em meio MS 50%. Já para o meio MS 100 %, a média de 1,44 cm observada em *P. caerulea* para o comprimento de brotação (Tabela 5) foi inferior ao obtido por Faria et al. (2007), que apresentaram médias de 2,11 cm para *P. edulis*; 3,20 cm para *P. giberti* e 1,91 cm para *P. laurifolia* em meio MS com a concentração normal de sais.

Em relação ao número de folhas formadas ao final do processo de análise, foram observadas médias de 1,93 para o meio de cultura MS 50% e 1,60 para o meio MS 100% (Tabela 5). A formação de folhas indica que os tecidos de *P. caerulea* apresentam exigências de concentrações próximas ao meio MS 50% e respondem de maneira positiva a esse meio de cultura no estágio de desenvolvimento avaliado. Segundo Monfort et al. (2015), a indução ou a inibição dos processos morfogenéticos *in vitro* dependem do balanço e da interação entres as substâncias que compõem o meio de cultivo.

De acordo com Faria et al. (2017), a qualidade das plântulas pode ser definida tanto pelo número de folhas expandidas durante o período de cultivo, como pela coloração foliar. Nesse aspecto, os valores médios para a coloração das folhas de *P. caerulea* apresentaram valores em torno de 2,07 para o meio MS 50% e de 1,89 para o meio MS 100% (Tabela 5), demonstrando que as folhas das plântulas cultivadas nas diferentes concentrações de meio MS, apresentaram coloração verde de acordo com a escala de cores proposta neste estudo (Tabela 2).

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, o uso do meio MS 50% se torna vantajoso em relação ao uso do meio MS 100%, uma vez que a produção do meio diluído apresenta menor custo e seu uso acarreta uma menor incidência de contaminações, devido às menores concentrações de carbono e nitrogênio (Barroso & Nahas, 2008).

Dessa forma, embora os explantes da espécie *P. caerulea* tenham respondido significativamente ao meio MS 50% apenas para o número de gemas, com base nas variáveis analisadas é possível observar que a fisiologia desta espécie permite a organogênese em meio de cultura com concentração reduzida, sem afetar estatisticamente os processos morfogenéticos.

4. Considerações Finais

Os resultados morfológicos de sementes de *P. caerulea* podem ser utilizados para subsidiar pesquisas futuras em diversas áreas de interesse, mediante potencial fitossanitário desta espécie.

O protocolo de estabelecimento *in vitro* com a utilização do meio MS 50% se mostrou viável para o estabelecimento *in vitro* de *P. caerulea*, sem o comprometimento no desenvolvimento e na qualidade das plantas, por proporcionar redução dos custos na produção do meio MS.

O protocolo com meio MS 50%, por ser mais econômico, poderá servir como base para auxiliar estudos futuros em trabalhos que usem a adição de fitormônios tanto para a conservação quanto propagação vegetativa *in vitro* de *P. caerulea*.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores também agradecem a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Ilha Solteira, por disponibilizar toda estrutura necessária para realização do trabalho.

Referências

- Anzoise, M. L., Marrassini, C., Bach, H., & Gorzalczany, S. (2016). Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis. *Journal of ethnopharmacology*, 194, 137-145.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., & Santa-Catarina, C. (2016). *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 611-620.
- Araújo, F. P., Silva, N. D., & Queiroz, M. A. (2008). Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(3), 723-730.

Assis, J. P., Linhares, P. C. F., de Lima, G. K. L., Pereira, M. F. S., de Sousa, R. P., Moreira, J. C., & de Paiva, A. C. C. (2013). Análise biométrica de sementes de feijão bravo (*Capparis flexuosa*) planta medicinal em Mossoró-RN. *Agropecuária científica no semiárido*, 9(1), 94-98.

Barros, C. M. B., Müller, M. M. L., Botelho, R. V., Michalovicz, L., Vicensi, M., & do Nascimento, R. (2013). Substratos com compostos de adubos verdes e biofertilizante via foliar na formação de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 2575-2587.

Barroso, C. B., & Nahas, E. (2008). Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(4), 529-535.

Cardoso, J. C., Oliveira, M. E., & Cardoso, F. D. C. (2019). Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 124-132.

Esashika, D. A. S. (2018). *Fenologia e morfometria de flores e frutos de espécies e híbridos de Passiflora spp. visando ao melhoramento genético*. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (Doutorado em Agronomia).

Faleiro, F. G., & Junqueira, N. T. V. (2016). Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. *Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)*.

Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., & Costa, A. M. (2015). Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (*Passiflora spp.*). *Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)*.

Faria, G. A., Felizardo, L. M., Ferreira, A. F. A., Rocha, P. S., Suzuki, A. N., Souza, A.S., ... & Oliveira, T. A. (2017). Concentrations of silver nitrate in the *in vitro* development and conservation of *Passiflora gibertii* NE Brown. *American Journal of Plant Sciences*, 8, 2944-2955.

Faria, G. A., Costa, M. A. P. D. C., Ledo, C. A. D. S., Junghans, T. G., Souza, A. D. S., & Cunha, M. A. P. D. (2007). Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 66(4), 535-543.

Feliú-Hemmelmann, K., Monsalve, F., & Rivera, C. (2013). *Melissa officinalis* and *Passiflora caerulea* infusion as physiological stress decreaser. *International journal of clinical and experimental medicine*, 6(6), 444.

Fuhrmann, E., Junqueira, N. T. V., Blum, L. E. B., Braga, M. W., Bellon, G., & Junqueira, K. P. (2014). Reação de híbridos interespecíficos de *Passiflora spp.* à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Ciência Rural*, 44(8), 1404-1410.

Galdiano Júnior, R. F., Mantovani, C., Cassano, A. O., & Lemos, E. G. D. M. (2013). Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. *Acta Amazonica*, 43(2), 127-134.

Grech, N. M., & Rijkenberg, F. H. J. (1991). Laboratory and field evaluation of the performance of *Passiflora caerulea* as a rootstock tolerant to certain fungal root pathogens. *Journal of Horticultural science*, 66(6), 725-729.

Hesami M., & Daneshvar M. H. (2016) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in *Chenopodium quinoa* Willd. *Indo-American. Journal of Agricultural Veterinary Sciences*, 4, 25-32.

Jafari, M., Daneshvar, M. H., & Lotfi, A. (2017). *In vitro* shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 98(2).

Martinez, J. V., Yesid Bernal, A. H., & Cáceres, A. (2000). Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(3), 125-125.

- Mondin, C. A., Cervi, A. C., & Moreira, G. R. P. (2011). Synopsis of *Passiflora L.* (Passifloraceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(Supplement 1), 3-27.
- Monfort, L. E. F., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Rossi, Z. T. T., Lima, A. F., Silva, S. T., & Silva, G. M. D. (2015). Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. *Revista Ceres*, 62(2), 215-223.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-97.
- Pereira, R., da Silveira, M. R. S., & Costa, A. (2017). Maracujá silvestre (*Passiflora tenuifila Killip*): aspectos agronômicos e características dos frutos. *Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- Pimentel Gomes F. (2009). Curso de estatística experimental. 15. *Piracicaba: FEALQ*, 451.
- Rathod, H. P., Pohare, M. B., Bhor, S. A., Jadhav, K. P., Batule, B. S., Shahakar, S. B., ... & Kulkarni, M. R. (2014). *In vitro* micropropagation of blue passion flower (*Passiflora caerulea L.*). *Trends in Biosciences*, 7(19), 3079-3082.
- R Core team R. (2019). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Sacramento, C. K. & Souza, F. X. (2000). *Cajá (Spondias mombin L.)*. Jaboticabal: Funep, 42.
- SAS Institute Inc. (2018). Base SAS® 9.3 Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schwalbert, R., Maldaner, J., Aita, M. F., Amaral, G. A., & Tarouco, A. K. (2014). Concentrações de sais do meio MS no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 10(18), 1009.

Severin, C., Bueno, M., Santín, F., & Giubileo, M. G. (2011). Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 73-79.

Silveira, G. F. da, Rossi, A. A. B., Oliveira, U. A., Varella, T. L., Rossi, F. S., Cavallari, A. A., & Galvanin, E. D. S. (2019). Biometric analysis of fruits and seeds of *Passiflora cristalina* Vanderplank & Zappi. *Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais*, 7(2), 138-144.

Siwach, P., & Gill, A. R. (2011). Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), 271.

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.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Glaucia Amorim Faria – 15%

Cíntia Patrícia Martins de Oliveira – 15%

Beatriz Garcia Lopes – 15%

Paula Soares Rocha – 10%

Guilherme Marcucci Peron – 10%

Karina da Silva Souza – 8%

Camila Kamblevicius Garcia – 10%

Enes Furlani Junior – 5%

José Carlos Cavichioli – 5%

Lucas Menezes Felizardo – 7%