DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FLORAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*

Alice Gorini Pettermann Loureiro Santos[1], Maria Alice Brandão Silva[1], Maria Annita de Aguiar Silva[2], Joana Silva Costa[3], Tamyris de Mello[3], José Carlos Lopes[1] e Rodrigo Sobreira Alexandre[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, s/nº, Guararema, Alegre - ES, 29500-000, Brasil, alicegorinip@outlook.com, alice.gestaoambiental@gmail.com, jclufes@gmail.com, rodrigosobreiraalexandre@gmail.com

[2]Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Departamento de Agronomia, Alto Universitário, s/nº Guararema, Alegre - ES, 29500-000, Brasil amariaannita@gmail.com

[3] Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, Jerônimo Monteiro - ES, 29550-000, Brasil, joanasilvacosta9@hotmail.com, tamyrisdemello@gmail.com

Resumo

O gênero *Passiflora* possui elevado valor econômico e biotecnológico, mas seu cultivo *in vitro* enfrenta desafios recorrentes relacionados à etapa de desinfestação de explantes, marcada pelo equilíbrio entre a eliminação de contaminantes e a preservação da viabilidade tecidual. Objetivou-se com esta pesquisa analisar a desinfestação de botões florais de diferentes tamanhos de espécies do gênero *Passiflora*. Botões florais de três tamanhos foram submetidos a um protocolo sequencial de desinfestação e analisados quanto às taxas de contaminação e necrose aos 30 dias de incubação. Em todas as combinações de espécie e tamanho, a soma das taxas de contaminação e necrose atingiu 100%, evidenciando que nenhum tratamento resultou em estabelecimento asséptico e viável. Contudo, dois padrões distintos de resposta foram observados, em *P. mucronata* e *P. alata*, a perda decorreu majoritariamente de fitotoxicidade e em *P. phoenicea* e *P. foetida*, a contaminação permaneceu elevada.

Palavras-chave: Maracujazeiros. Desinfestação. Necrose. Oxidação. Contaminação.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

O gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae, destaca-se pelo elevado valor socioeconômico, nutricional e farmacológico, sendo o maracujazeiro amplamente cultivado para o consumo *in natura*, processamento agroindustrial e extração de compostos fitoterápicos (Faleiro *et al*., 2019). No entanto, o cultivo convencional da cultura enfrenta desafios fitossanitários, como o desenvolvimento e a disseminação de doenças fúngicas e bacterianas, como a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, que causa alta mortalidade e comprometem a produtividade dos pomares (Teixeira *et al*., 2017; Correa *et al*., 2022). Nesse cenário, as ferramentas da biotecnologia vegetal, com ênfase na cultura de tecidos, constituem alternativas estratégicas para a multiplicação de genótipos de interesse e a obtenção de material propagativo (Oros *et al*., 2022).

A cultura de tecidos vegetais permite o cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos sob condições assépticas e ambientais controladas, viabilizando a embriogênese somática, organogênese, androgênese para a obtenção de haplóides e duplo haploide, hibridização, protoplastização e propagação vegetativa (Andrade, 2002). A eficácia dos protocolos do cultivo *in vitro*, contudo, não depende de um único fator, mas da combinação entre o método de desinfestação adotado, a seleção do explante e as condições de cultivo às quais ele será exposto (De Oliveira *et al.*, 2020). Esses mesmos fatores, no entanto, também influenciam diretamente a ocorrência de oxidação e necrose dos

tecidos. As concentrações e tempos de exposição excessivos, embora eficazes na eliminação de microrganismos, podem causar danos fitotóxicos aos explantes, decorrentes da liberação de compostos fenólicos pelos ferimentos nos tecidos (Gammoudi; Nagaz; Ferchichi, 2022; Arabzai *et al.*, 2026). A escolha adequada do sanitizante, o tempo de exposição e a concentração do agente ativo determinam o equilíbrio entre a erradicação dos contaminantes e a manutenção da viabilidade e capacidade regenerativa do tecido (Oros *et al*., 2022).

Diante disso, o estabelecimento de protocolos eficientes e padronizados de desinfestação adaptados às especificidades fisiológicas do gênero *Passiflora* torna-se imprescindível para subsidiar programas de melhoramento genético, conservação e propagação ***in vitro*** (Mohammadi *et al.*, 2023). Objetivou-se com o presente trabalho analisar a desinfestação de botões florais de diferentes tamanhos de espécies do gênero *Passiflora*.

Metodologia

O experimento foi realizado no no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM), pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no município de Jerônimo Monteiro - ES. Foram coletados botões florais de diferentes tamanhos de quatro espécies de *Passiflora* (*Passiflora mucronata* Lam., *Passiflora phoenicea* Lindl., *Passiflora foetida* L. e *Passiflora alata* Curtis) de plantas matrizes cultivadas na fazendo do Incaper, localizada em Pacotuba, no município de Cachoeiro do Itapemirim – ES.

Os botões florais foram classificados em três categorias de tamanho (Tabela 1) e submetidos, em câmara de fluxo laminar, a um protocolo de desinfestação.

Tabela 1. Categorias de separação dos tamanhos de botões florais

Espécies	Classificação	Tamanho (cm)
Passiflora mucronata	**Pequenos**	**2,5**
	Médios	**3,0-3,5**
	Grandes	**4,0-5,0**
Passiflora phoenicea	**Pequenos**	**1,5**
	Médios	**2,0-2,5**
	Grandes	**3,0**
Passiflora foetida	**Pequenos**	**1,2**
	Médios	**1,5**
	Grandes	**2,0**
Passiflora alata	**Pequenos**	**2,0**
	Médios	**2,5-3,0**
	Grandes	**3,5-4,0**

Fonte: Os autores.

A etapa inicial da desinfestação consiste na imersão em solução de álcool etílico 70% (v/v) por 1 minuto, seguidos por tripla lavagem em água destilada e autoclavada. Em seguida, os botões florais foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, por 30 minutos, com adição de Tween 20® (3 gotas por 100 mL de solução).

Após a remoção do sanitizante, os botões foram imersos em solução de amoxicilina (3 g L^{-1}) por 1 hora. Decorrido o tempo de tratamento antibiótico, o material foi enxaguado três vezes com água destilada e autoclavada e submetido ao tratamento fúngico, sendo mantido por 30 minutos em solução contendo a combinação dos fungicidas Priori® (6 mL L^{-1}) e Supera® (6 mL L^{-1}).

Os explantes foram dispostos em meio de cultura basal contendo os sais minerais de Murashige e Skoog (Sigma®) (MS, 1962), suplementado com vitaminas de Gamborg (B5, 1968), 0,01% (p/v) de mioinositol, 3% (p/v) de sacarose, 0,1% (p/v) de polivinilpirrolidona (Synth®) e 0,45% (p/v) de ágar (Kasvi®). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, com KOH (Alphatec®) e/ou HCl (Vetec®) a 1,0 N, vertido em tubos de ensaio (7 mL), vedados e submetidos à autoclavagem, realizada a 121 °C e 1,1 atm de pressão por 20 minutos. Após, os explantes, em câmara de fluxo laminar, foram adicionados ao meio de cultura e mantidas em sala de crescimento sob ausência de luz e temperatura controlada de 27 ± 2 °C, durante o período de 30 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 3 (4 espécies x 3 tamanhos de botões florais), utilizando-se 4 repetições por tratamento contendo cinco explantes. Ao final de 30 dias de incubação, foram analisadas as porcentagens de contaminação microbiana (fúngica/bacteriana) e de necrose/oxidação nos explantes de cada espécie e classe de tamanho.

Resultados

Após 30 dias de incubação em meio basal sob ausência de luz, observou-se variação nas taxas de contaminação microbiana e necrose tecidual entre as diferentes espécies do gênero *Passiflora* e classes de tamanho de botão floral (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de contaminação microbiana e necrose tecidual em explantes florais de quatro espécies do gênero *Passiflora* provenientes de botões de diferentes tamanhos após 30 dias de cultivo *in vitro*

Espécies	Tamanho do botão floral (cm)	Contaminação (%)	Necrose (%)
Passiflora mucronata	Pequeno (2,5)	0,0	100,0
	Médio (3,0-3,5)	0,0	100,0
	Grande (4,0-5,0)	12,20	87,80
Passiflora phoenicea	Pequeno (1,5)	56,30	43,70
	Médio (2,0-2,5)	24,35	75,65
	Grande (3,0)	19,42	80,58
Passiflora foetida	Pequeno (1,2)	56,85	43,15
	Médio (1,5)	41,52	58,48
	Grande (2,0)	17,70	82,30
Passiflora alata	Pequeno (2,0)	34,35	65,65
	Médio (2,5-3,0)	8,65	91,35
	Grande (3,5-4,0)	5,00	95,00

Fonte: Os autores.

Fonte: Os autores.

Em *P. mucronata*, os explantes provenientes de botões pequenos e médios apresentaram ausência total de contaminação (0,0%), embora 100,0% dos tecidos tenham oxidado/necrosado ao longo do período de incubação. Nos botões grandes dessa espécie, obteve-se 12,20% de contaminação microbiana e 87,80% de necrose (Tabela 2).

Para as espécies *P. phoenicea*, *P. foetida* e *P. alata*, os maiores percentuais de contaminação foram registrados nos explantes oriundos dos botões florais pequenos, com valores de 56,30%, 56,85% e 34,35%, respectivamente. À medida que o tamanho dos botões florais aumentou, verificou-se uma redução progressiva nos índices de contaminação. Os menores valores de contaminação foram observados nas classes de botões grandes, registrando-se 19,42% em *P. phoenicea*, 17,70% em *P. foetida* e 5,00% em *P. alata*. Por outro lado, todos os explantes que não contaminaram evoluíram para a necrose tecidual até o 30º dia de cultivo (Tabela 2).

Discussão

Nenhuma espécie e tamanho de botão analisados, os explantes alcançaram o estabelecimento asséptico e viável, na qual a soma das taxas de contaminação e de necrose atingiu 100% em todos os tratamentos. Portanto, confirma que o protocolo empregado, não foi capaz de conciliar os dois requisitos fundamentais do estabelecimento *in vitro*, o controle microbiológico e a preservação da integridade fisiológica e morfológica tecidual. Esta é uma questão importante e reconhecida no cultivo *in vitro* do gênero *Passiflora*, cujos protocolos de desinfestação percorrem a linha tênue entre eficácia e fitotoxicidade (Arabzai *et al.*, 2026).

A relação entre o tamanho do botão floral e a taxa de contaminação observada em *P. phoenicea*, *P. f oetida* e *P. alata* pode estar associada à morfologia do botão. Botões menores e imaturos possuem tecidos mais sensíveis ao manuseio e à ação dos agentes desinfestantes, podendo sofrer microlesões

que favorecem a proliferação bacteriana ou fúngica persistente. Em contrapartida, botões de maior dimensão oferecem maior facilidade no isolamento asséptico dos explantes e suportam de forma mais eficiente a penetração superficial dos sanitizantes sem comprometer a barreira física.

Um segundo padrão, torna-se visível ao se comparar as médias por espécie. *P. mucronata* e *P. alata* apresentaram contaminação média baixa (4,07% e 16,0%, respectivamente) acompanhada de alta taxa de necrose (95,93% e 84,0%), um resultado que aponta a fitotoxicidade, e não necessariamente a ineficácia da desinfestação, como principal responsável pela perda de explantes nessas espécies. Em contraste, *P. phoenicea* e *P. foetida* mantiveram taxas de contaminação mais altas (33,36% e 38,69%), o que sugere, como hipótese, uma possível carga microbiana maior, seja endógena e/ou exógena nos botões florais dessas espécies. Esse comportamento diferente diante de um protocolo idêntico não constitui uma peculiaridade isolada de *Passiflora*, um padrão semelhante foi descrito entre clones de *Eucalyptus* submetidos ao mesmo protocolo de desinfestação, que também exibiram respostas marcadamente distintas de contaminação e sobrevivência (Kuppusamy *et al.*, 2019). Esses resultados reforçam que a resposta à desinfestação não depende apenas dos parâmetros do protocolo, mas também de características intrínsecas fisiológicas, anatômicas ou microbiológicas de cada espécie.

Por fim, os resultados ilustram uma problemática já descrito na literatura para o cultivo *in vitro* de *Passiflora*. Intensificar um protocolo de desinfestação para conter a contaminação tende a ampliar, na mesma proporção, os danos fitotóxicos aos tecidos (Gammoudi; Nagaz; Ferchichi, 2022; Arabzal *et al.*, 2026).

Conclusão

O protocolo de desinfestação testado não foi capaz de estabelecer explantes florais assépticos e viáveis em nenhuma das quatro espécies de *Passiflora* avaliadas, resultando em taxa líquida de sobrevivência de 0% em todas as combinações de espécie e tamanho de botão. As perdas, no entanto, seguiram padrões distintos entre espécies: em *P. mucronata* e *P. alata*, predominou a fitotoxicidade do protocolo. Em *P. phoenicea* e *P. foetida*, predominou a contaminação microbiana. Esse resultado indica que um protocolo único não é adequado para todo o gênero, sendo necessário calibrar a concentração dos agentes e o tempo de exposição de acordo com a espécie e, possivelmente, o tamanho do explante.

Referências

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.

ARABZAI, M. G.; WU, T.; MOHAMMADI, N. K.; INQILABI, N. M.; OLUNUGA, O. A.; QIN, Y.; WANG, L. Micropropagation, somatic embryogenesis, and haploid induction in *Passiflora*: advances, biological constraints, and breeding prospects. **Horticulturae**, v. 12, n. 4, artigo 497, 2026.

CORREIA, A. de O.; ALEXANDRE, R. S.; PFENNING, L. H.; CABANEZ, P. A.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. da S.; LIMA, P. A. M. de; MELLO, T. de; OTONI, W. C.; LOPES, J. C. *Passiflora mucronata*, a passion fruit wild species resistant to fusariosis and a potential rootstock for commercial varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 302, 111174, 2022.

DE OLIVEIRA, L. F.; DOS SANTOS, A. L. W.; FLOH, E. L. S. Polyamine and amino acid profiles in immature *Araucaria angustifolia* seeds and their association with embryogenic culture establishment. **Trees**, v. 34, n. 3, p. 845-854, 2020.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GAMMOUDI, N.; NAGAZ, K.; FERCHICHI, A. Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi-objective genetic algorithm. **BMC Plant Biology**, v. 22, 324, 2022.

KUPPUSAMY, S.; RAMANATHAN, S.; SENGODAGOUNDER, S.; SENNIAPPAN, C.; SHANMUGANATHAN, R.; BRINDHADEVI, K.; KALIANNAN, T. Optimizing the sterilization methods for initiation of the five different clones of the *Eucalyptus* hybrid species. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 101361, 2019.

MOHAMMADI, M. A.; WAI, M. H.; RIZWAN, H. M.; QARLUQ, A. Q.; XU, M.; WANG, L.; CHENG, Y.; ASLAM, M.; ZHENG, P.; WANG, X.; ZHANG, W.; QIN, Y. Advances in micropropagation, somatic embryogenesis, somatic hybridizations, genetic transformation and cryopreservation for *Passiflora* improvement. **Plant Methods**, v. 19, 55, 2023.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

BOBOC OROS, P.; CANTOR, M.; CORDEA, M. I.; CĂTANĂ, C. Plant regeneration protocol for recalcitrant passionflower (*Passiflora quadrangularis* L.). **Horticulturae**, v. 8, n. 4, 337, 2022.

TEIXEIRA, L. M.; COELHO, L.; TEBALDI, N. D. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e resistência de genótipos de maracujazeiro à fusariose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 3, p.1-11, 2017.

TRINH, D. C.; MELOGNO, I.; MARTIN, M.; TREHIN, C.; SMITH, R. S.; HAMANT, O. *Arabidopsis* floral buds are locked through stress-induced sepal tip curving. **Nature Plants**, v. 10, n. 8, p. 1258-1266, 2024.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo pelo fornecimento de instalações e equipamentos disponibilizados à pesquisa; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) - EDITAL FAPES/SEAG - Inovagro N 03/2024 - Pesquisa Aplicada às Políticas Públicas Estaduais da Agropecuária, Aquicultura e Pesca no Estado do Espírito Santo, pelo suporte financeiro e bolsas.