

**Tamanho ótimo de parcelas para experimentos de estabelecimento *in vitro* em espécies
do gênero *passiflora***

**Optimal size of plots for experiments with *in vitro* establishment of species of the
passiflora genus**

**Tamaño óptimo de las parcelas para experimentos aplicados al establecimiento *in vitro*
de tres especies del género *Passiflora***

Recebido: 16/10/2020 | Revisado: 19/10/2020 | Aceito: 22/10/2020 | Publicado: 24/10/2020

Glauca Amorim Faria

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

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

Ana Patricia Bastos Peixoto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0690-1144>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: anapatricia@servidor.uepb.edu.br

Augusto Ramalho de Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7695-2890>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: armorais@ufla.br

Taís Ferreira Costa

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

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil

E-mail: thayscostta@hotmail.com

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

Tiago Almeida de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4147-7721>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: tadolive@servidor.uepb.edu.br

Lucas Menezes Felizardo

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

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: lucas-one@hotmail.com

Resumo

As espécies do gênero *Passiflora* apresentam grande importância comercial, ornamental e fitoterapêutica. Contudo, são escassas as informações sobre o tamanho ideal de parcelas em experimentos visando o estabelecimento *in vitro* de *Passiflora*. Este trabalho teve por objetivo determinar o tamanho ótimo de parcelas em experimentos de estabelecimento *in vitro* das espécies de *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, *Passiflora giberti* N. E. Brown. e *Passiflora laurifolia* L. Para cada espécie foram conduzidos ensaios de uniformidade com duas concentrações de sais do meio de cultura (MS e ½ MS) e em cada ensaio realizaram-se avaliações aos 45, 75 e 105 dias após incubação dos explantes. Em cada avaliação e meio de cultura foram simulados diversos tamanhos de parcelas, variando de uma (1) unidade básica até 50 por parcela, sendo cada unidade básica constituída por uma planta. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Em experimentos de estabelecimento *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*, de 15 explantes para *P. giberti* N. E. Brown. e de 9 explantes para *P. laurifolia* L.

Palavras-chave: Precisão experimental; Coeficiente de variação; Ensaio de uniformidade.

Abstract

The genus *Passiflora* have great commercial, ornamental and phytotherapeutic importance. However, information on the ideal plot size in experiments aiming at the *in vitro* establishment of *Passiflora* is scarce. This study aimed at determining the optimal size of

plots in experiments of *in vitro* establishment of the species *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, *Passiflora giberti* N. E. Brown. and *Passiflora laurifolia* L. For each species, uniformity tests were conducted with two concentrations of salts of the culture medium (MS and ½ MS) and for each test, evaluations were performed at 45, 75 and 105 days after incubation of the explants. In each evaluation and culture medium, different sizes of plots were simulated, ranging from one (1) basic unit to 50 per plot, with each basic unit consisting of a plant. To estimate the optimum plot size, the modified maximum curvature method was used. In *in vitro* establishment experiments, the recommended optimal plot size should be 11 explants for *P. edulis* Sims f. *edulis*, of 15 explants for *P. giberti* N. E. Brown. and 9 explants for *P. laurifolia* L.

Keywords: Experimental precision; Coefficient of variation; Uniformity test.

Resumen

El género *Passiflora* tiene una gran importancia comercial, ornamental y fitoterapéutica. Sin embargo, la información sobre el tamaño de parcela ideal en los experimentos que tienen como objetivo el establecimiento *in vitro* de *Passiflora* es escasa. El objetivo de este trabajo fue determinar el tamaño óptimo de parcela en experimentos para el establecimiento *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, *Passiflora giberti* N. E. Brown. y *Passiflora laurifolia* L. Para cada especie se realizaron pruebas de uniformidad con dos concentraciones de sales del medio de cultivo (MS y ½ MS) y en cada ensayo se realizaron evaluaciones a los 45, 75 y 105 días después de la incubación de los explantes. En cada medio de evaluación y cultivo se simulaban diferentes tamaños de parcelas, que van desde una (1) unidad básica hasta 50 por parcela, siendo cada unidad básica una planta. Para estimar el tamaño óptimo de la parcela, se utilizó el método de curvatura máxima modificado. En experimentos de establecimiento *in vitro*, el tamaño de parcela óptimo recomendado debe ser de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*, de 15 explantes para *P. giberti* N. E. Brown. y 9 explantes para *P. laurifolia* L.

Palabras clave: Precisión experimental; Coeficiente de variación; Prueba de uniformidad.

1. Introdução

O gênero *Passiflora* L., pertence à família Passifloraceae, sendo considerado como o maior representante em número de espécies (Freitas, 2011). Esse gênero é originário da América Tropical e Subtropical, e, no Brasil, são encontradas cerca de 150 espécies, das quais 85 são endêmicas (Barros et al., 2013).

As principais espécies do gênero *Passiflora* cultivadas para fins de interesse comercial são as *P. edulis*. Elas são consumidas principalmente pela qualidade de seus frutos, na elaboração de sucos e concentrados que atendem principalmente o segmento de bebidas e doces (Costa; Tupinambá, 2005). As espécies *P. incarnata* e *P. alata* são utilizadas como fitoterápicos com a finalidade calmante, na forma de extratos de folhas, frutos desidratados, além de serem usadas na fabricação de cosméticos (Faleiro et al, 2017).

A espécie *Passiflora edulis Sims f. edulis*, maracujá roxo, é originário do Brasil, Paraguai e norte da Argentina, e agora cultivado comercialmente em quase todos os países tropicais e subtropicais. De acordo com Jiménez et al., (2011) os frutos possuem diâmetro entre 4 e 6 cm, com aroma intenso e sabor doce-ácido, possuindo um indicador importante de maturação que é a coloração roxa espalhadas em sua casca. De maneira geral, muito se assemelha a *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), sendo que a diferença básica se relaciona com a pigmentação da casca do fruto no estágio de maturação.

A espécie *Passiflora laurifolia* Linnaeus é originária das Índias orientais, Venezuela e leste do Brasil e seus frutos doces são comidos frescos e utilizados para preparar bebidas e sorvetes, estando na terceira ou quarta posição em importância comercial entre as espécies do gênero *Passiflora*.

A espécie *Passiflora giberti* N.E. Brown pode crescer alcançando vários metros de altura, podendo ser encontrada nas margens de estradas. É uma espécie heliófita, possui folhas trilobadas e flores com pétalas e sépalas de coloração branca, medindo entre 7 e 8 cm de diâmetro e em condições normais produz de 10 a 30 folhas por dia (Peixoto, 2020; Vanderplank, 2000). Planta muito vigorosa típica do Pantanal Matogrossense, possui frutos comestíveis de coloração alaranjada. Possui potencial para cultivo com fins ornamentais.

Algumas espécies possuem resistência a doenças causadas por patógenos do solo, a exemplo de *P. suberosa*, *P. coccinea* e *P. setacea* (Silva et al., 2012), *P. alata* e *P. giberti* (José et al., 2000; Silva et al., 2012) que são resistentes à morte prematura. Mas infelizmente não existe registro de cultivares de maracujazeiro resistentes a fusariose. Visando buscar espécies para futuros trabalhos em melhoramento Preisigke et al. (2017) avaliaram 15 espécies de maracujazeiro, sendo as espécies *P. foetida*, *P. mucronata*, *P. nitida* e *P. morifolia* dentre as avaliadas, as que apresentaram maior resistentes à fusariose. Cavichioli et al. (2011) analisando o desenvolvimento, produtividade e sobrevivência do maracujazeiro-amarelo enxertado, verificou que a sobrevivência no campo foi observada em plantas enxertadas sobre *P. gibertii*, com 91,43% seguido de *P. alata* que apresentou 60% de plantas sobreviventes, enquanto as plantas enxertadas com *P. edulis* obtiveram sobrevivência de apenas 8,6% das

plantas. Já Oliveira et al. (2013) constatou que alguns acessos de *P. edulis* comportam-se como moderadamente resistente à virose, antracnose e verrugose nos frutos e ramos.

A cultura de tecidos de plantas é uma técnica que contribui para o melhoramento genético, conservação e manutenção dos germoplasmas. O estabelecimento *in vitro*, fase inicial deste processo, consiste em introduzir os explantes no meio de cultura para desenvolvimento. Esta é a fase mais complexa, pois fatores externos influenciam diretamente, como sanidade da planta e a própria adaptação ao meio *in vitro*. Para garantir o sucesso do cultivo *in vitro*, em todas as fases, faz-se necessário conhecer o protocolo adequado para cada espécie (Peixoto, Faria, Morais, 2011). O estabelecimento *in vitro* em *Passifloraceae* tem sido citado por vários autores, como por exemplo, Carvalho et al. (2019), Silvério Junior et al. (2020), Faria et al. (2020a), com a finalidade de se cultivar em espaço reduzido e promover o controle ambiental.

Para garantir que os resultados obtidos nestes experimentos sejam confiáveis busca-se reduzir o erro experimental. A precisão experimental é essencial para qualquer experimento no campo ou em ambientes controlados. Mas para os experimentos com cultura de tecidos, a variação causada pelo erro experimental pode anular os efeitos dos tratamentos, pois embora esses experimentos sejam instalados em condições controladas, os materiais biológicos utilizados com maior frequência, como os explantes, são muito sensíveis às pequenas alterações (Izquierdo; López, 1991). Portanto, deve-se dar uma maior atenção ao planejamento do experimental, fase em que são escolhidos delineamentos, o tamanho da parcela e o número de repetições a serem utilizados. O ideal é que este planejamento consiga detectar diferenças significativas entre tratamentos e permita a obtenção de resultados com uma boa precisão.

A escolha do tamanho ideal de parcelas e o número de repetições constitui-se num método racional para melhorar as estimativas, mas esse número varia em função das condições experimentais. Em teoria, quanto maior o número de repetições, maior é a precisão, uma vez que o aumento do número dos graus de liberdade do resíduo assegura maiores estimativas dos efeitos dos tratamentos. Porém essa relação não é linear, levando inicialmente a uma diminuição do erro experimental até certo ponto, a partir do qual o ganho com precisão é muito pequeno (Peixoto, Faria, Morais, 2011). Deste modo à escolha criteriosa do tamanho ótimo de parcela visa melhorar a precisão e reduzir o erro experimental, aumentando as chances de detectar diferenças entre os experimentos, tornando-se estatisticamente mais desejáveis.

A grande maioria dos métodos empregados para estimar o tamanho da parcela utiliza ensaios de uniformidade. A partir desses ensaios são calculadas as estatísticas para os diferentes tamanhos de parcela avaliados, sendo a variância e o coeficiente de variação as mais utilizadas (Faria et al. 2020b). Os métodos mais antigos, portanto, mais conhecidos são a máxima curvatura (Lessman & Atkins, 1963) e o máxima curvatura modificada (Meier & Lessman, 1971). Mas, de acordo com Morais et al. 2018, merecem destaque: o Modelo de regressão linear segmentada com platô (Anderson & Nelson, 1971), Modelo de regressão quadrática com platô (Anderson & Nelson, 1975) e o Método de comparação de variâncias (Hatheway & Williams, 1958).

Na literatura consultada, não foram encontradas referências específicas para estabelecimento *in vitro* de *Passiflora*, apenas na fase de conservação *in vitro* (Peixoto, Faria e Morais, 2011), mas esses resultados não podem ser considerados para experimentos com estabelecimento, por possuírem maior influência de fatores não controlados, o tamanho adotado pode não ser viável. Desse modo, este estudo tem como objetivo determinar o tamanho ótimo de parcelas em experimentos de estabelecimento *in vitro* com as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. utilizando o método da máxima curvatura modificado, com a finalidade de propiciar a obtenção de resultados de pesquisa com maior confiabilidade e precisão.

2. Metodologia

Os dados utilizados para os cálculos deste trabalho foram de seis ensaios de uniformidade, com as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown e *P. laurifolia* L. do banco de Germoplasma da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, combinadas com duas concentrações de sais do meio de cultura Murashige e Skoog (1962), completo (MS) e com a metade ($\frac{1}{2}$ MS) das concentrações dos sais minerais e vitaminas.

Os explantes foram oriundos de sementes obtidas por polinização manual controlada. Foram tomados os devidos cuidados fitossanitários com a qualidade das sementes, preparo do substrato, semeadura e condução das mudas que foi formação das mudas em casa de vegetação. A germinação foi realizada em sacos de polietileno de 10 x 20 x 08 cm preenchidos com um substrato composto, formado por três partes de solo, uma de esterco de curral curtido (bovino), três quilos de superfosfato-simples e meio quilo de cloreto de potássio, em aproximadamente 1m³ de solo.

Em casa de vegetação, foram retirados os explantes e estes levados ao laboratório, onde foram desinfetados com etanol 70% por 40 segundos e solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 15 minutos, e lavados com água destilada esterilizada por quatro vezes. Microestacas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram estabelecidas em frascos com 30 mL dos meios de cultura MS e 1/2MS, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificados com 2 g L⁻¹ de phytigel®, ajustados a pH de 5,8; autoclavado a 121°C (1 kg cm⁻²), sem adição de hormônio vegetal. O fotoperíodo adotado foi de 16 horas, temperatura de 27 ± 1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 μE m⁻² s⁻¹.

Os seis ensaios de uniformidade foram conduzidos utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Cada ensaio, foi constituído por 100 unidades experimentais, que foram dispostas em 10 fileiras (linha) por 10 colunas. Cada unidade experimental foi constituída por um (1) explante. Para cada unidade foram realizadas quatro avaliações ao longo do tempo (45, 75 e 105 DAI - dias após a incubação dos explantes em meio de cultura). Em cada uma foram avaliados: comprimento das brotações em cm, número de raízes, número de folhas e coloração das folhas. Para os dados de coloração das folhas foi adotada uma escala de notas para quantificar a viabilidade dos explantes, essas notas variaram de 1 a 3, sendo que 1: folhas totalmente verdes; 2: folhas verde-claro; e 3: folhas senescentes.

Os tamanhos de parcelas foram formados por X₁ unidades básicas na linha e X₂ unidades básicas na coluna, simulados pelo agrupamento de unidades adjacentes, de modo que X₁X₂ = x correspondesse a x tamanho da parcela, em unidades básicas. Desse modo, foram simulados 31 tamanhos de parcelas em cada ensaio de uniformidade (Tabela 1), de modo que o tamanho da parcela variou de (1) uma unidade básica até 50 unidades por parcela, e, o número de parcelas variou de 100 até 2. Para cada simulação foram estimados os parâmetros: número de parcelas, média das parcelas com x unidades básicas, variância por unidade básica e coeficiente de variação. Para as parcelas simuladas de diferentes formas, mas com o mesmo tamanho, calcularam-se as médias dos coeficientes de variação (Tabela 1).

O método escolhido para calcular o tamanho ótimo de parcela foi o método da máxima curvatura modificado. Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (*CV*) e o tamanho da parcela com *X* unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que *a* e *b* são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa no qual ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X_0 = \exp\{[1/(2b+2)]\log[(ab)^2(2b+1)/(b+2)]\}$, em que *X*₀ é o valor da abscissa no ponto de

máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (Meier; Lessman, 1971).

Tabela 1. Tamanho da parcela, forma da parcela e número de parcelas totais em cada simulação para os ensaios de uniformidade de plantas de maracujazeiro roxo *in vitro*.

Simulações	Tamanho	Forma	Número de parcelas
1	1	1 × 1	100
2	2	2 × 1	50
3	2	1 × 2	50
4	3	3 × 1	30
5	3	1 × 3	30
6	3	2 + 1	25
7	3	1 + 2	25
8	4	2 × 2	25
9	5	2 × 2 + 1	15
10	6	2 × 3	15
11	6	3 × 2	15
12	7	2 × 3 + 1	10
13	7	3 × 2 + 1	9
14	8	2 × 4	10
15	8	4 × 2	10
16	10	2 × 5	10
17	10	5 × 2	10
18	12	3 × 4	6
19	12	4 × 3	6
20	15	3 × 5	6
21	15	5 × 3	6
22	16	4 × 4	4
23	18	3 × 6	3
24	18	6 × 3	3
25	20	4 × 5	4
26	20	5 × 4	4
27	25	5 × 5	4
28	30	5 × 6	2
29	30	6 × 5	2
30	50	5 × 10	2
31	50	10 × 5	2

Fonte: Autores.

3. Resultados e Discussão

Nas variáveis avaliadas, a concentração completa (meio MS) apresentou os melhores valores (Tabela 2), sinalizando melhor desenvolvimento para os genótipos estudados, com exceção para o número de raízes.

Os coeficientes de determinação (R^2) da função de curvatura e do valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (X_0), para os ensaios de uniformidade, variaram de 80% a 98% para a espécie

P. edulis, de 71% a 98% para a espécie *P. giberti* e 74% a 98% para *P. laurifolia*, em meio MS e 1/2MS, em todas as avaliações (Tabela 3).

Tabela 2. Valores médios para o comprimento das brotações, em cm, número de raízes e coloração das folhas em função dos meios de cultura e das espécies. *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L.

Meio	Espécie			Média
	<i>P. edulis</i>	<i>P. giberti</i>	<i>P. laurifolia</i>	
Comprimento das brotações				
MS	2,11	3,20	1,918	2,42
½ MS	1,79	1,65	1,36	1,62
Média	1,93	2,44	1,66	
Número de raízes				
MS	0,19	0,15	0,50	0,28
½ MS	0,24	0,17	0,12	0,18
Média	0,21	0,17	0,33	
Coloração das folhas				
MS	1,85	1,74	1,09	1,52
½ MS	1,96	2,38	1,50	1,89
Média	1,90	1,95	1,22	
Número de folhas				
MS	1,37	1,46	1,78	1,54
½ MS	0,81	0,45	0,56	0,62
Média	1,07	0,97	1,22	

Fonte: Autores.

Estes resultados mostram bom ajuste no método da máxima curvatura modificado, com valores médios de R^2 variando de 86% a 96% para a espécie *P. edulis*, de 79% a 95% para *P. giberti* e 84% a 97% *P. laurifolia*. Observa-se, que em média, os valores de R^2 são menores para a espécie *P. giberti* N. E. Brown. quando comparados com as outras espécies, o que nos mostra que o ensaio dessa espécie se apresentou mais heterogêneo que as demais.

Em média, verifica-se na espécie *P. edulis* que, com exceção do número de folhas, as demais variáveis apresentaram valores de R^2 menores no meio ½ MS e maiores no meio MS (Tabela 3). Entretanto, essas diferenciações são de pequena magnitude, indicando similaridade na qualidade de ajuste dos dados ao modelo.

Em *P. edulis*, quando utilizou o meio MS, o maior tamanho de parcela foi encontrado com 46,43 unidades básicas na variável número de raízes aos 45 dias, enquanto o menor tamanho encontrado foi 6,09 unidades básicas (ub) na variável coloração de folhas aos 75 dias. Quando utilizou o meio ½ MS tanto o maior quanto o menor tamanho de parcela foram encontrados ao 45 dias, sendo o maior 31,15 ub na variável número de raízes e o menor 4,60 ub na variável comprimento das brotações. Pela média dos tratamentos o maior tamanho de

parcela identificado foi 31,15 ub para a variável número de raízes e 6,21 ub na variável coloração de folhas, ambos aos 45 dias (Tabela 3). Nessa mesma espécie, quanto ao número de folhas o maior (17,96 ub) e o menor tamanho de parcela (12,18 ub), foram observados no meio MS aos 45 e 75 dias de avaliação, respectivamente. Já na variável coloração das folhas o maior e menor tamanho da parcela foram encontrados no meio $\frac{1}{2}$ MS, sendo o maior 7,18 ub aos 75 dias e o menor tamanho de 6,08 ub aos 45 dias de avaliação (Tabela 3).

De modo geral, na espécie *P. edulis* independente do meio de cultura e do período de avaliação, o número de raízes foi a variável que apresentou maiores tamanhos de parcelas. Contudo, no estabelecimento *in vitro* o número de raízes (NR) não é a variável com maior importância, tendo em vista que, busca-se nesta fase plantas saudáveis, isentas de vírus e com bom crescimento, portanto adotou-se neste estudo a variável comprimento da plântula (CB) como prioridade na recomendação de um tamanho de parcela ideal. Nesta variável pode-se observar que o menor tamanho de parcela encontrado foi o de 4,60 ub aos 45 dias no meio $\frac{1}{2}$ MS e o maior tamanho 10,99 ub aos 75 dias no meio MS, sendo recomendável como tamanho ótimo a utilização de 11 ub por parcela (Tabela 3).

Para a espécie *P. edulis* os diferentes tamanhos de parcelas observados entre as variáveis (8,6 ub para CB; 31,3 ub para NR) sugerem muita cautela quanto ao planejamento de experimentos desse tipo, pois dependendo da variável, um maior ou menor tamanho poderá ser adotado. Já com relação ao meio de cultura, os valores não diferiram muito um do outro em avaliações mais tardias, podendo utilizar menores tamanhos aos 105 dias, 14 ub nas duas composições do meio, aos 75 dias parcelas com 16 ub para a composição MS e 15 para $\frac{1}{2}$ MS. Aos 45 dias houve grande diferença, sendo encontrado o valor 20 ub para MS e 15 ub para $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 3).

Em experimentos de estabelecimento *in vitro*, considerando como variável de referência o comprimento das brotações, para espécie *P. edulis* Sims f. *edulis* o tamanho ótimo de parcela recomendado é 11 plantas por parcela no meio MS e 10 plantas por parcela no meio $\frac{1}{2}$ MS.

Na espécie *P. giberti* observa-se também, que em média, os valores de R^2 são maiores no meio $\frac{1}{2}$ MS quando comparado com o meio MS em todas as variáveis (Tabela 3), com exceção para número de folhas, mostrando assim que o ensaio no meio $\frac{1}{2}$ MS apresenta-se mais homogêneo que outro.

Em meio MS, a espécie *P. giberti* teve o maior tamanho de parcela, 34,53 ub, na variável número de raízes aos 75 dias e o menor tamanho, 4,39 ub, foi obtido na variável coloração de folhas aos 45 dias. Já em $\frac{1}{2}$ MS o maior tamanho de parcela verificado foi 35,36

ub na variável número de raízes aos 75 dias e o menor foi 2,34 ub na variável coloração das folhas aos 45 dias de avaliação. Pela valor médio o maior tamanho de parcela encontrado foi 34,95 ub para a variável número de raízes aos 75 dias e 3,36 ub na variável coloração de folhas aos 45 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de determinação (R^2) e estimativas dos tamanhos ótimos de parcelas (X_0) para a espécie *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. nos meios de cultura MS e ½ MS ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis: comprimento das brotações em cm (CB), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e coloração das folhas (CF).

Meio	Avaliação (dias)	CB		NR		NF		CF		Média	
		X_0	R^2								
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>											
MS	45	8,82	0,98	46,43	0,97	17,96	0,94	6,34	0,82	19,88	0,93
	75	10,99	0,97	32,57	0,97	12,18	0,97	6,09	0,90	15,46	0,95
	105	8,99	0,96	26,06	0,96	13,02	0,98	7,00	0,82	13,77	0,93
	Média	9,60	0,97	35,02	0,97	14,39	0,96	6,48	0,85	16,37	0,94
½ MS	45	4,60	0,89	31,15	0,95	15,56	0,94	6,08	0,96	14,35	0,93
	75	8,96	0,94	26,44	0,95	14,38	0,96	7,18	0,80	14,24	0,91
	105	9,28	0,91	25,17	0,93	14,89	0,96	6,31	0,85	13,91	0,91
	Média	7,61	0,91	27,59	0,95	14,94	0,95	6,52	0,87	14,17	0,92
Média Geral	45	6,71	0,94	38,79	0,96	16,76	0,94	6,21	0,89	17,12	0,93
	75	9,97	0,95	29,51	0,96	13,28	0,96	6,63	0,85	14,85	0,93
	105	9,14	0,93	25,61	0,95	13,95	0,97	6,65	0,83	13,84	0,92
	Média	8,61	0,94	31,30	0,96	14,66	0,95	6,50	0,86	15,27	0,93
<i>P. giberti</i> N. E. Brown.											
MS	45	11,85	0,85	29,24	0,96	15,93	0,94	4,39	0,78	15,35	0,88
	75	13,62	0,87	34,53	0,94	15,29	0,96	9,52	0,80	18,24	0,89
	105	14,70	0,86	25,11	0,89	19,99	0,93	7,33	0,88	16,78	0,89
	Média	13,39	0,86	29,63	0,93	17,07	0,94	7,08	0,82	16,79	0,89
½ MS	45	7,29	0,93	31,26	0,96	24,50	0,98	2,34	0,85	16,35	0,93
	75	7,47	0,93	35,36	0,95	22,08	0,94	2,43	0,71	16,83	0,88
	105	8,07	0,94	34,66	0,96	25,70	0,96	2,64	0,74	17,77	0,90
	Média	7,61	0,94	33,76	0,95	24,09	0,96	2,47	0,76	16,98	0,90
Média Geral	45	9,57	0,89	30,25	0,96	20,22	0,96	3,36	0,82	15,85	0,91
	75	10,54	0,90	34,95	0,95	18,69	0,95	5,98	0,76	17,54	0,89
	105	11,39	0,90	29,88	0,92	22,85	0,94	4,98	0,81	17,28	0,89
	Média	10,50	0,90	31,69	0,94	20,58	0,95	4,77	0,79	16,89	0,90
<i>P. laurifolia</i> L.											
MS	45	6,72	0,95	41,37	0,98	11,53	0,95	12,06	0,91	17,92	0,95
	75	8,49	0,97	21,61	0,95	11,78	0,97	8,49	0,92	12,59	0,95
	105	8,01	0,97	19,03	0,95	18,61	0,96	4,56	0,80	12,55	0,92
	Média	7,74	0,96	27,34	0,96	13,97	0,96	8,37	0,87	14,35	0,94
½ MS	45	7,62	0,94	-	-	19,30	0,90	-	-	13,46	0,92
	75	7,95	0,96	30,41	0,98	19,54	0,95	11,28	0,77	17,30	0,91

	105	8,64	0,96	31,53	0,98	20,48	0,94	6,25	0,74	16,72	0,91
	Média	8,07	0,95	30,97	0,98	19,77	0,93	8,77	0,75	15,83	0,91
Média Geral	45	7,17	0,94	41,37	0,98	15,41	0,93	12,06	0,91	19,00	0,94
	75	8,22	0,97	26,01	0,96	15,66	0,96	9,89	0,85	14,94	0,93
	105	8,32	0,97	25,28	0,97	19,55	0,95	5,40	0,77	14,64	0,91
	Média	7,90	0,96	30,89	0,97	16,87	0,95	9,11	0,84	16,19	0,93

(-) não houve dados suficientes para análise. Fonte: Autores.

Para a espécie *P. giberti*, quanto a variável número de folhas observa-se que o menor, 15,29 ub, e o maior tamanho de parcela, 25,70 ub, foram encontrados no meio MS aos 75 e ½ MS aos 105 dias de avaliação, respectivamente. Para a variável coloração das folhas o maior valor encontrado foi de 9,52 ub aos 75 dias em meio MS e o menor tamanho foi 2,34 ub aos 45 dias de avaliação em meio ½ MS (Tabela 3). Número de raízes nesta espécie também apresentou maiores tamanhos de parcelas independente da concentração de sais, e assim como as demais não foi considerado primordial para a obtenção do tamanho de parcela ideal. Na variável CB pode-se observar que o menor tamanho de parcela encontrado foi o de 7,29 ub aos 45 dias no meio ½ MS e o maior tamanho 14,70 ub aos 105 dias no meio MS.

Dessa forma, para o estabelecimento *in vitro* utilizando a espécie *P. giberti* N. E. Brown, o tamanho ótimo de parcela recomendado é de 15 plantas por parcela para experimentos com o meio MS e o de 8 plantas por parcela para experimentos no meio ½ MS.

Assim como nas anteriores, na espécie *P. laurifolia* o maior tamanho de parcela encontrado foi para variável número de raízes, sendo 41,37 ub em MS aos 45 dias e 30,41 ub aos 75 dias. O menores tamanhos de parcela foram na variável coloração de folhas, 4,56 ub em MS e 6,25 ub, ambos aos 105 dias de avaliação.

Nessa mesma espécie, quanto a variável número de folhas o menor tamanho de parcela observado foi 11,53 aos 45 dias em meio MS e o maior tamanho de parcela 20,48 aos 105 dias no meio ½ MS. Para a variável coloração das folhas o maior e menor tamanho de parcela foram encontrados no tratamento MS, sendo o maior com 12,06 ub os 45 dias e o menor tamanho de 4,56 ub aos 105 dias de avaliação (Tabela 3).

Com base o valor médio o maior tamanho de parcela encontrado foi 41,37 ub para a variável número de raízes aos 45 dias e 5,40 ub na variável coloração de folhas aos 105 dias (Tabela 3).

O número de raízes independente de espécies, concentração e avaliação apresentou maiores tamanhos de parcelas. Em estudos, que a finalidade seja o estabelecimento *in vitro* esta variável poderá ser desconsiderada para o cálculo do tamanho ideal, mas em outros estudos o mesmo não poderá acontecer, a exemplo do estudo em conservação *in vitro* de

Peixoto, Faria e Morais (2011) que encontraram 6 ub e 10 ub, pelos métodos da regressão linear segmentada com platô e método da regressão quadrática com platô, respectivamente, para experimentos de conservação *in vitro* de *P. giberti*.

Para o estabelecimento *in vitro*, em que comprimento da plântula é a variável com prioridade na recomendação de um tamanho ótimo de parcela, em que busca-se crescimento da plântula *in vitro* o tamanho mínimo recomendado será de 11 ub para *P. edulis Sims f. edulis*, de 15 ub para *P. giberti* N. E. Brown e de 9 ub para *P. laurifolia* L. unidades menores que estas poderão trazer insegurança às pesquisas, que são sujeitas a vários fatores não previsíveis e com isso ocorrer a perda de algumas informações e comprometer a qualidade de resultados.

4. Considerações Finais

Para experimentos de estabelecimento *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis Sims f. edulis*, de 15 explantes para *P. giberti* N. E. Brown e de 9 explantes para *P. laurifolia* L..

Os tamanhos ótimos da parcela encontrados neste estudo servirão como base para futuras pesquisas com micropropagação dessas espécies.

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 dos processos BOL1478/2008 e BOL0097/2019. Os autores também agradecem a Embrapa Mandioca e Fruticultura, a Universidade Federal de Lavras, ao Laboratório de Estatística Aplicada (LEA) e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) pelo apoio técnico e estrutural e a Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira.

Referências

- Anderson, R. L., Nelson, L. A. (1975). A family of models involving intersecting straight lines and concomitant experimental designs useful in evaluating response to fertilizer nutrients *Biometrics*, 303-318.
- Anderson, R. L., Nelson, L. A. (1971). Some problems in the estimation of single nutrients response function. Inst. of Statistics. *North Carolina State University, reprint*, n. (244).
- 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.
- Carvalho, P. P., de et al. (2019). *In Vitro* Organogenesis from Root Explants of *Passiflora miniata* Mast., an Amazonian Species with Ornamental Potential. *Brazilian Archives of biology and technology*, 62, e19170803.
- Cavichioli, J. C., Corrêa, L. D. S., Garcia, M. J. D. M., & Fischer, I. H. (2011). Desenvolvimento, produtividade e sobrevivência de maracujazeiro-amarelo enxertado e cultivado em área com histórico de morte prematura de plantas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(2), 567-574.
- Costa, A. M., Tupinambá, D. D. (2005) c. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. 475-506.
- Faria, G. A., Lopes, B. G., Peixoto, A. P. B., et al. (2020). Experimental plot size of passion fruit. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 42(1).
- 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.

Faleiro, F., Junqueira, N., Costa, A., Jesus, O. N., & Machado, C. D. F. (2017). Maracujá. *Embrapa Mandioca e Fruticultura-Livro técnico (INFOTECA-E)*.

Freitas, L. B. (2011) História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia molecular. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(S1).

Hatheway, W. H., Williams, E. J. (1958) Efficient estimation of the relationship between plot size and the variability of crop yields. *Biometrics*, 14, 207-222.

Izquierdo, J. A., Lopez F. Y. (1991). Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro*. Roca, W. M., Mroginski, L. A. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos e aplicaciones*. Cali: CIAT, 375-399.

Jiménez, A. M. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis Sims edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44, 1912–1918.

Junior, L. H. S., Faria, G. A., Lopes, B. G., Ferreira, A. F. A., de Oliveira, C. P. M., Felizardo, L. M., & Junior, E. F. (2020). Estabelecimento *in vitro* de *Passiflora tenuifila*.

Lessman, K. J., Atkins, R. E. (1963). Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield test. *Crop Science*, 3, 477-481.

Meier, V. D., Lessman, K. J. (1971). Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. *Crop Science*, 11, 648-650.

Meletti, L. M. M., Bruckner, C. H. (2001). Melhoramento genético. *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 345-385.

Menezes, J. M. T., Oliveira, J. C., Ruggiero, C., Banzatto, D. A. (1994). Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. *Científica*, 22(1), 95-104.

Morais, A. R., Villa, F., Gonzales, G. G. H., & de Moraes, E. C. (2018). Alguns modelos para a estimação do tamanho de parcelas em experimentos. *Revista Brasileira de Biometria*, 36(2), 258-275.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Oliveira, E. J., de et al. (2013). Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 485-492.

Peixoto, A. P. B., Faria, G. A., Moraes, A. R. de. (2011). Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimento de conservação *in vitro* de maracujazeiro. *Ciência Rural*, 41(11),1907-1913.

Peixoto, M. (2020) Plantas Brasileiras. Recuperado de <http://www.brazilplants.com/>

Preisigke, S. D. C., Silva, L. P. D., 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.

São José, A. R., Santos, A., Silva, A. C., Bonfim, M. P., Moraes, O. M., Ataíde, E. M., Barbosa, N. M. L. (2000). Fusariose no semiárido. Congresso Brasileiro De Fruticultura, 16. *Anais..* 470p.

Silva D. R., Narita. N., Rós. A. B., Takata. W. H. S., H Hirata. A. C. S, Cavichioli. J. C. (2012). Produtividade de maracujazeiros sobre diferentes porta-enxertos e com raiz dupla. *Colloquium Agrariae*.

Vanderplank, R. J. R. (2000). Passion flowers. (3a ed.) Cambridge: The MIT Press. 224 p.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Glaucia Amorim Faria – 30%

Ana Patricia Bastos Peixoto – 10%

Augusto Ramalho de Moraes – 10%

Taís Ferreira Costa - 9%

Cíntia Patrícia Martins de Oliveira - 9%

Paula Suares Rocha - 9%

Beatriz Garcia Lopes - 9%

Tiago Almeida de Oliveira - 7%

Lucas Menezes Felizardo - 7%