

CONSERVAÇÃO E CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE
MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

ANDRESSA LEAL GENEROSO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2018

CONSERVAÇÃO E CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE
MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

ANDRESSA LEAL GENEROSO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

064/2018

G326 Generoso, Andressa Leal.

Conservação e cultivo *in vitro* de embriões de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) / Andressa Leal Generoso. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

158 f. : il.

Bibliografia: 125 – 158.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Virginia Silva Carvalho.

1. Embriões Zigóticos. 2. Embriões Imaturos. 3. Criopreservação. 4. Maracujá – Cultivo *in vitro*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.425

CONSERVAÇÃO E CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE
MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

ANDRESSA LEAL GENEROSO

"Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas."

Aprovada em 19 de fevereiro de 2018.

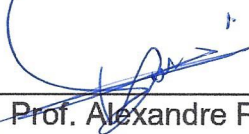
Comissão Examinadora:



Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia) - UFES



Prof.ª Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof. Alexandre Pio Viana (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof.ª Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF
(Orientadora)

À memória de minha querida avó, Maria Ivone Bittencourt
Generoso que infelizmente, de forma repentina, não pôde
acompanhar a conclusão desta tão sonhada conquista, mas
que sempre me apoiou e me incentivou com todo o amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, guiando meus caminhos e me amparando nos momentos difíceis;

Aos meus amados pais, Nilton e Sandra, que sempre me apoiam em todas as decisões da minha vida e pela educação que puderam me conceder;

À minha irmã Larissa, meu irmão Antônio, minha sobrinha Lavynia, meu padrasto Antônio e meu cunhado Luiz Paulo pelas orações, apoio e incentivo;

Ao meu querido noivo, Tertuliano pelo carinho, apoio, paciência, amor e incentivo nos momentos difíceis;

A toda a minha família, meus queridos avós, Pedro, Rita, Luiz e Ivone (*in memoriam*), meus tios, tias, primos, primas e afilhados pelos abraços carinhosos e pelas demonstrações de carinho;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de realizar o curso de doutorado;

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa;

À minha orientadora e professora, Virginia Silva Carvalho, pelos conselhos, incentivo, convívio e orientação na elaboração e execução do trabalho.

Às minhas conselheiras, Rosana Rodrigues e Telma Nair Santana Pereira, por todos os ensinamentos, conselhos e contribuições durante o doutorado.

Ao professor, Alexandre Pio Viana, pelo auxílio nas análises com empenho e boa vontade e pelo conhecimento compartilhado;

Aos professores do PPGMP, pelos ensinamentos durante esses quatro anos;

Ao secretário, José Daniel, por ser sempre solícito, amigo, atencioso e incentivador;

Ao professor, Rodrigo Sobreira Alexandre, por aceitar o convite para participar da banca;

Aos colegas do curso de PPGMP, pelos quatro anos de estudo que compartilhamos;

A todos os meus queridos amigos, colegas, incentivadores e conselheiros do laboratório LFIT 112, Clarissa, Kássila, Kezia, Kelly, Naiara, Roberta, Rafael Walter, Ramon, Renan, Renato, Roberto, Willian;

Às minhas queridas amigas que conquistei na UENF, Daniele, Francielle, Geovana, Grasiela, Letícia, Luciene e Mayara, por todo incentivo, apoio, carinho, amizade e por alegrarem a minha vida durante todos esses anos;

Aos meus queridos amigos, Rafael, Rafael Rhuan e Rodrigo, por tantos momentos felizes;

À Sandra e Glaziele, por toda a ajuda durante a execução desse trabalho;

E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo durante esse período e que contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4 D	Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético
2iP	2 isopenteniladenina
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenoacético
BA	6-Benziladenina
BAGs	Bancos ativos de germoplasma
B.O.D.	Câmara incubadora B.O.D.
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
C.V. (%)	Coeficiente de variação
DAP	Dias após a polinização
DBC	Delineamento em Blocos Casualizados
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GA₃	Ácido Giberélico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISTA	International Rules for Seed Testing
KIN	Cinetina

LFIT	Laboratório de Fitotecnia
MS	Sais minerais de Murashige e Skoog, 1962
MSM	Sais minerais de Monteiro et al., 2000
NaClO	Hipoclorito de sódio
NL	Nitrogênio líquido
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVS2	Plant Vitrification Solution 2
RAS	Regras para Análise de Sementes
TDZ	Tidiazuron
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sementes de maracujazeiro-azedo: (A) Com tegumento; (B) Sem tegumento; (C) Embrião isolado; (D) Remoção do tegumento da semente com auxílio de uma mini morsa	20
Figura 2. Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de sementes com tegumento, sementes sem tegumento e de embriões isolados de maracujazeiro-azedo.....	27
Figura 3. Germinação <i>in vitro</i> de maracujazeiro-azedo após 28 dias de cultivo: (A) Sementes com tegumento; (B) Sementes sem tegumento; (C) Embriões Isolados.....	28
Figura 4. Médias da porcentagem de germinação de (A) plântulas normais, (B) plântulas anormais e (C) embriões não germinados a partir de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo em função das concentrações de sais minerais e sacarose após 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	30
Figura 5. Médias da (A) altura da plântula, (B) comprimento das raízes, (C) massa da matéria fresca total e (D) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo oriundas de embriões zigóticos germinados <i>in vitro</i> em meios com diferentes concentrações de sais minerais, após 28 dias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	34

Figura 6. (A) Altura da plântula, (B) comprimento das raízes, (C) massa da matéria fresca total e (D) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo oriundas de embriões zigóticos maduros após 28 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	35
Figura 7. Plântulas normais de maracujazeiro-azedo oriundas da germinação de embriões zigóticos maduros em meios de cultivo com diferentes concentrações de sais minerais MS, $\frac{1}{2}$ MS, MSM e $\frac{1}{2}$ MSM em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹), após 28 dias.....	36
Figura 8. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo cultivadas <i>in vitro</i> por 45 dias em meios com diferentes concentrações de sais minerais. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	40
Figura 9. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	42
Figura 10. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume de raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea, (E) massa da matéria seca das raízes e (F) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo após 35 dias de aclimatização oriundas do cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes concentrações de sais minerais. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	45
Figura 11. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume de raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea, (E) massa da matéria seca das raízes e (F) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo após 35 dias de aclimatização oriundas do cultivo <i>in vitro</i> em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	46

Figura 12. Porcentagens de germinação de (A) plântulas normais, (B) plântulas anormais e (C) embriões não germinados de embriões zigóticos imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) isolados de maracujazeiro-azedo em função das concentrações de sacarose e fitorreguladores, após 37 dias de germinação <i>in vitro</i> . Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	50
Figura 13. Plantas oriundas do cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) de maracujazeiro-azedo após 35 dias de aclimatização. (A) 20 g L ⁻¹ de sacarose + AIA e GA ₃ ; (B) 20 g L ⁻¹ de sacarose + GA ₃ ; (C) 40 g L ⁻¹ de sacarose + AIA e GA ₃ ; (D) 40 g L ⁻¹ de sacarose + AIA e GA ₃ ; (E) 60 g L ⁻¹ de sacarose + GA ₃	52
Figura 14. Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de plântulas normais oriundas de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo em função das concentrações de sacarose e fitorreguladores, após 37 dias de germinação. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	56
Figura 15. (A) Altura da plântula, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca das raízes, na aclimatização de plântulas normais de maracujazeiro-azedo oriundas do cultivo de embriões zigóticos imaturos autotróficos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).....	58
Figura 16. (A) Fruto de maracujazeiro-azedo com 24 DAP; (B) Cultivo de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo em meio com 20 g L ⁻¹ de sacarose + GA ₃ ; (C) Cultivo de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo em meio com 20 g L ⁻¹ de sacarose; (D) Plântulas de maracujazeiro-azedo em meio de crescimento <i>in vitro</i> ; (E) Planta de maracujazeiro-azedo oriunda de embrião imaturo heterotrófico germinado <i>in vitro</i> , após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação; (F) Plantas de maracujazeiro-azedo oriundas de embriões imaturos autotróficos germinados <i>in vitro</i> , após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação.....	59
Figura 17. (A) Secador protótipo de camada delgada; (B) sementes desidratadas com 25%, 15%, 10% e 5% de teor de água inicial.....	69
Figura 18. Velocidade de germinação <i>ex vitro</i> de sementes de maracujazeiro-azedo com 5, 10, 15 e 25% de água inicial, imersas (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido (NL).....	80
Figura 19. Velocidade de germinação <i>in vitro</i> de sementes de maracujazeiro-azedo com 5, 10, 15 e 25% de água inicial, imersas (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido (NL).....	80

Figura 20. Germinação <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> de sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo. (A) Plântulas normais de sementes com 10% de teor de água criopreservadas e germinadas <i>ex vitro</i> ; (B) Protrusão da raiz primária de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas <i>ex vitro</i> ; (C) Plântulas anormais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas <i>ex vitro</i> ; (D) Embrião zigóticos maduro isolado; (E) Plântulas normais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas <i>in vitro</i> ; (F) Plântulas anormais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas <i>in vitro</i>	81
Figura 21. Cortes transversais de sementes sem tegumento de maracujazeiro-azedo com diferentes teores de água inicial, submetidas à criopreservação ou não. (A) 25% de teor de água, não criopreservada. Detalhe para os grânulos citoplasmáticos do endosperma; (B) 25% de teor de água e criopreservada; (C) 15% de teor de água, não criopreservada; (D) 15% de teor de água, criopreservada; (E) 10% de teor de água, não criopreservada; (F) 10% de teor de água, criopreservada; (G) 5% de teor de água não criopreservada; (H) 5% de teor de água, criopreservada.....	83
Figura 22. Corte transversal do eixo hipocótilo-radícula de embrião zigótico de maracujazeiro-azedo.....	84
Figura 23. Plântula de maracujazeiro-azedo com 40 dias após a germinação. Destaque para os segmentos (apical, nodal e radicular) utilizados no ensaio.....	93
Figura 24. Médias da temperatura na (A) B.O.D. e na (B) sala de cultivo durante os seis meses de cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo.....	95
Figura 25. Escala de avaliação da coloração dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . (A) 1 = verde escuro, (B) 2 = verde claro e (C) 3 = amarelo.....	95
Figura 26. Temperatura média na casa de vegetação no período de aclimatização das plantas de maracujazeiro-azedo durante os meses de agosto até novembro de 2017.....	97
Figura 27. (A) Número de brotos, (B) número de folhas, (C) altura da planta, (D) massa da matéria fresca total e (E) massa da matéria seca total de segmentos radiculares, nodais ou apicais de maracujazeiro-azedo, cultivados <i>in vitro</i> em meios com sais minerais de MS e MSM.....	99

Figura 28. (A) Altura da planta, (B) número de folhas, (C) número de brotos, (D) massa da matéria fresca total e (E) massa da matéria seca total de diferentes tipos de explantes de maracujazeiro-azedo, cultivados <i>in vitro</i> em meios com sais minerais de MS e MSM.....	100
Figura 29. Regeneração de segmentos radicular, nodal e apical cultivados em meios com sais minerais de MS e MSM. (A) Segmento radicular em meio MS; (B) Segmento nodal em meio MS; (C) Segmento apical em meio MS; (D) Segmento radicular em meio MSM; (E) Segmento nodal em meio MSM; (F) Segmento apical em meio MSM.....	102
Figura 30. Segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias de cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sais minerais, sacarose e cultivados em B.O.D. a 20 °C e em sala de cultivo a 27 °C.....	116
Figura 31. Médias da porcentagem de sobrevivência de plantas de maracujazeiro-azedo na aclimatização por 30 dias após a conservação <i>in vitro</i> por 120, 150 e 180 dias e 30 dias em meio de regeneração.....	118
Figura 32. (A) Segmentos nodais em meio de regeneração após 180 dias de cultivo mínimo em B.O.D; (B) e (C) enraizamento após 30 dias de aclimatização.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os constituintes do meio de cultura MS e do meio de cultura modificado MSM (Monteiro et al., 2000, adaptado)	21
Tabela 2. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para a germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, cultivados por 28 dias em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	29
Tabela 3. Resumo da análise de variância com os quadrados médios de dados biométricos na germinação <i>in vitro</i> de embriões maduros de maracujazeiro-azedo, após 28 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	32
Tabela 4. Análise de desdobramento da variável número de raízes, em função da interação entre as diferentes concentrações de sais minerais e sacarose, após 28 dias de germinação <i>in vitro</i> de embriões maduros de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018	33
Tabela 5. Resumo da análise de variância com os quadrados médios do crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de maracujazeiro-azedo após 45 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	38
Tabela 6. Análise de desdobramento da variável massa da matéria seca da raiz (g) em função da interação entre as diferentes concentrações de sais minerais e sacarose no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de maracujazeiro-azedo após 45 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	39

Tabela 7. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 35 dias de aclimatização de plantas de maracujazeiro-azedo oriundas do crescimento <i>in vitro</i> em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	44
Tabela 8. Dados médios de dois frutos de maracujazeiro-azedo coletados para a identificação dos estádios de desenvolvimento globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar dos embriões zigóticos imaturos. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	48
Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios na germinação <i>in vitro</i> de embriões imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) de maracujazeiro-azedo, cultivados em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores durante 37 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	49
Tabela 10. Resumo da Análise de variância com os quadrados médios na germinação <i>in vitro</i> de embriões imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo, após 37 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	53
Tabela 11. Análise de desdobramento da variável plântulas anormais em função da interação entre as diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores após 37 dias de germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	54
Tabela 12. Análise de desdobramento da variável embriões não germinados em função da interação entre as diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores após 37 dias de germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	55
Tabela 13. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 35 dias na aclimatização de maracujazeiro-azedo para os efeitos da germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos autotróficos cultivados em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	57
Tabela 14. Resumo da Análise de variância para as variáveis plântulas normais (PN), protrusão da raiz primária (PR), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), índice de velocidade de germinação (IVG), altura da plântula (AP), comprimento das raízes (CR) e massa da matéria seca (MS) em função da imersão ou não em nitrogênio líquido (A) e teores de água inicial (TA) de sementes de maracujazeiro-azedo germinadas <i>ex vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	73

Tabela 15. Resumo da análise de variância para as variáveis plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), embriões não germinados (ENG), índice de velocidade de germinação (IVG), altura da plântula (AP), comprimento de raiz (CR) e massa da matéria seca (MS) em função da imersão ou não em nitrogênio líquido (A) e teores de água inicial (TA) de sementes de maracujazeiro-azedo germinadas <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	74
Tabela 16. Análise de desdobramento das variáveis plântulas normais, protrusão da raiz primária, plântulas anormais e sementes não germinadas em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação <i>ex vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ 2018.....	75
Tabela 17 Análise de desdobramento das variáveis plântulas normais, plântulas anormais e embriões não germinados em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	76
Tabela 18. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação <i>ex vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	78
Tabela 19. Análise de desdobramento das variáveis de vigor avaliadas de índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	79
Tabela 20. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para o cultivo <i>in vitro</i> de segmentos radiculares, nodais ou apicais de maracujazeiro-azedo, cultivados em meios com diferentes composições de sais minerais (MS e MSM). Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	98
Tabela 21. Resumo da análise de variância com os quadrados médios no cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 120 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	103

Tabela 22. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 120 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	103
Tabela 23. Médias da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	104
Tabela 24. Médias do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas, Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	105
Tabela 25. Médias do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	105
Tabela 26. Resumo da análise de variância com os quadrados médios no cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 150 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	106
Tabela 27. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as diferentes temperaturas, concentrações de sais minerais e sacarose após 150 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	107
Tabela 28. Análise de desdobramento do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as diferentes temperaturas, concentrações de sais minerais e sacarose após 150 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	108
Tabela 29. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre a temperatura e as concentrações de sacarose após 150 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	109
Tabela 30. Resumo da análise de variância com os quadrados médios no cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 180 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	109

Tabela 31. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	110
Tabela 32. Médias da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	110
Tabela 33. Análise de desdobramento do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	111
Tabela 34. Médias do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	112
Tabela 35. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre a temperatura e as concentrações de sacarose após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	112
Tabela 36. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	113
Tabela 37. Coloração dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em cultivo mínimo <i>in vitro</i> sob duas temperaturas, três concentrações de sais minerais e três concentrações de sacarose, ao longo de 180 dias de conservação <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	114
Tabela 38. Médias da porcentagem de sobrevivências dos segmentos nodais cultivados por 30 dias em meio de regeneração, após serem conservados <i>in vitro</i> em duas temperaturas, três concentrações de sais minerais e três concentrações de sacarose durante 120, 150 e 180 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	117
Tabela 39. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas <i>in vitro</i> por 120 dias e regeneradas <i>in vitro</i> por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	118

Tabela 40. Médias do número de folhas de plantas aclimatizadas por 30 dias oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em diferentes temperaturas, sais minerais e sacarose por 120 dias e regeneradas <i>in vitro</i> por 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	119
Tabela 41. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas <i>in vitro</i> por 150 dias e regeneradas <i>in vitro</i> por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	120
Tabela 42. Médias da altura da planta, número de folhas e volume das raízes de plantas aclimatizadas por 30 dias, oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 150 dias em cultivo mínimo <i>in vitro</i> em diferentes temperaturas, sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	121
Tabela 43. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas <i>in vitro</i> por 180 dias e regeneradas <i>in vitro</i> por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.....	122

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
3.1. CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES MADUROS E IMATUROS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO	6
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	6
3.1.2. REVISÃO.....	7
3.1.2.1. Aspectos botânicos do gênero <i>Passiflora</i> e da espécie <i>P. edulis</i> Sims	8
3.1.2.2. Importância econômica da cultura do maracujazeiro-azedo.....	10
3.1.2.3. Melhoramento genético do maracujazeiro-azedo.....	11
3.1.2.4. A cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético do maracujazeiro	14
3.1.2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões maduros e imaturos	15
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	19
3.1.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos imaturos	24

3.1.3.3. Análises estatísticas	26
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1.4.1. Ensaio de germinação	27
3.1.4.2. Experimento de germinação de embriões zigóticos maduros	29
3.1.4.3. Experimento de crescimento <i>in vitro</i> e aclimatização <i>ex vitro</i> de plântulas oriundas do cultivo de embriões maduros	37
3.1.4.4. Experimento de germinação de embriões zigóticos imaturos	47
3.2. CULTIVO DE EMBRIÕES MADUROS APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	61
3.2.1. INTRODUÇÃO	61
3.2.2. REVISÃO	62
3.2.2.1. Conservação de recursos genéticos em <i>Passiflora</i>	62
3.2.2.2. Criopreservação em <i>Passiflora</i>	65
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	68
3.2.3.1. Material vegetal e secagem das sementes	68
3.2.3.2. Experimento de Criopreservação	69
3.2.3.3. Análises estatísticas	71
3.2.3.4. Anatomia das sementes de maracujazeiro-azedo	71
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.2.4.1. Experimento de criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo	72
3.2.4.2. Anatomia das sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo	82
3.2.5. CONCLUSÕES	86
3.3. CULTIVO MÍNIMO <i>in vitro</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (<i>P. edulis</i> Sims)	87
3.3.1. INTRODUÇÃO	87
3.3.2. REVISÃO	88
3.3.2.1. Bancos ativos de germoplasma de <i>Passiflora</i>	88
3.3.2.2. Cultivo mínimo <i>in vitro</i> em espécies do gênero <i>Passiflora</i>	90

3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS	91
3.3.3.1. Ensaio de sais minerais e tipo de explante para o cultivo mínimo <i>in vitro</i> de maracujazeiro-azedo	91
3.3.3.2. Experimento de cultivo mínimo <i>in vitro</i> de maracujazeiro-azedo	93
3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.3.4.1. Sais minerais e explante para o cultivo mínimo <i>in vitro</i> de maracujazeiro-azedo	97
3.3.4.2. Cultivo mínimo <i>in vitro</i> de maracujazeiro-azedo	102
3.3.5. CONCLUSÕES	123
4. CONCLUSÃO GERAL	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

RESUMO

GENEROSO, Andressa Leal; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro 2018; CONSERVAÇÃO E CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims); Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Conselheiras: Prof^a. Rosana Rodrigues e Prof^a. Telma Nair Santana Pereira.

No Brasil já foram descritas 145 espécies vegetais pertencentes ao gênero *Passiflora*, por isso o Brasil é considerado centro de diversidade do gênero. Porém, a erosão genética ameaça toda essa diversidade do gênero *Passiflora*. Além disso, os programas de melhoramento genético de maracujazeiro-azedo têm encontrado dificuldades na obtenção de híbridos interespecíficos devido ao aborto do embrião. Tal barreira pode ser superada com a técnica de resgate de embriões zigóticos imaturos, que ainda não foi relatada em espécies de *Passiflora*. Este trabalho objetivou estudar o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims), para posterior uso no resgate de embriões e desenvolver novas estratégias para a conservação *in vitro* de maracujazeiro-azedo, por meio da criopreservação de sementes e do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais. Para o cultivo de embriões zigóticos maduros, foram realizados experimentos de germinação e crescimento das plântulas *in vitro*, testando quatro concentrações de sais minerais (MS, ½ MS, MSM e ½ MSM) e cinco de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). Para o cultivo de embriões imaturos nos estádios heterotróficos (globular e cordiforme) e autotrófico (torpedo e cotiledonar), foram testados meios com cinco concentrações de

sacarose (20, 40, 60, 80 e 100 g L⁻¹) e quatro de fitorreguladores (sem fitorregulador; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA + 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA; 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃) (Capítulo 1). Para a conservação *in vitro* foi realizado um experimento de criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo com quatro teores de água inicial (5, 10, 15 e 25%) imersos ou não em nitrogênio líquido (NL) e colocadas para germinar *ex vitro* e *in vitro* (Capítulo 2). Para o cultivo mínimo *in vitro*, os segmentos nodais de maracujazeiro-azedo foram cultivados em meios com três concentrações de sais minerais (MSM, ½ MSM e ¼ MSM) e três de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹), em duas temperaturas (20 e 27 °C) (Capítulo 3). Para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros é indicado o uso de ½ MSM com 30 g L⁻¹ de sacarose e para o crescimento das plântulas *in vitro* é indicado o uso de MSM com 30 g L⁻¹ de sacarose. A germinação de embriões imaturos zigóticos heterotróficos é possível com o uso de 20 g L⁻¹ de sacarose e 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA + 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃ ou 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃. O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos autotróficos é possível com o uso de 20 g L⁻¹ de sacarose sem fitorreguladores. Para criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo, o teor de água de 10% e o cultivo *in vitro* de embriões maduros isolados é a combinação mais indicada, a fim de alcançar maior germinação. Para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, por até 180 dias, é indicado o uso do meio de cultivo com sais minerais ¼ de MSM, 10 g L⁻¹ de sacarose em temperatura média de 20 °C.

Palavras-chave: Embriões zigóticos; embriões imaturos; criopreservação; cultivo mínimo *in vitro*.

ABSTRACT

GENEROSO, Andressa Leal; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2018; *In vitro* CONSERVATION AND CULTURE OF EMBRYOS OF PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* Sims); Advisor: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Committee members: Prof^a. Rosana Rodrigues and Prof^a. Telma Nair Santana Pereira.

In Brazil, 145 plant species belonging to the genus *Passiflora* have been described, so Brazil is considered a center of diversity of the genus. However, genetic erosion threatens all this diversity of the genus *Passiflora*. In addition, the genetic improvement programs of passion fruit have found difficulties in obtaining interspecific hybrids due to the abortion of the embryo. Such a barrier can be overcome with the technique of rescue of immature zygotic embryos, which has not yet been reported in *Passiflora* species. This work aimed to study the *in vitro* cultivation of mature and immature zygotic embryos of passion fruit (*P. edulis* Sims), for later use in the rescue of embryos. And to develop new strategies for *in vitro* conservation of passion fruit by means of cryopreservation of seeds and minimal *in vitro* cultivation of nodal segments. For the cultivation of mature zygotic embryos, germination and growth seedling experiments *in vitro* were carried out, testing four concentrations of minerals (MS, $\frac{1}{2}$ MS, MSM and $\frac{1}{2}$ MSM) and five sucrose (0, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹). For the culture of immature embryos in the heterotrophic (globular and cordiform) and autotrophic stages (torpedo and cotyledon), five medium concentrations of sucrose (20, 40, 60, 80 and 100 g L⁻¹) and four phytohormones 0.0571 μ mol L⁻¹ of AIA + 0.0289 μ mol L⁻¹ of GA₃, 0.0571

$\mu\text{mol L}^{-1}$ of AIA, $0.0289 \mu\text{mol L}^{-1}$ of GA_3) (Chapter 1). For the *in vitro* conservation, a cryopreservation experiment was carried out with four initial water contents (5, 10, 15 and 25%) immersed or not in liquid nitrogen (NL) and placed to germinate *ex vitro* and *in vitro* (Chapter 2). For minimal *in vitro* cultivation, the nodal segments of passion fruit were grown in medium with three concentrations of minerals (MSM, $\frac{1}{2}$ MSM and $\frac{1}{4}$ MSM) and three sucrose (10, 20 and 30 g L^{-1}) at two temperatures (20°C and 27°C) (Chapter 3). For the *in vitro* germination of mature zygotic embryos the use of $\frac{1}{2}$ MSM with 30 g L^{-1} of sucrose is indicated and for the growth of the seedlings *in vitro* the use of MSM with 30 g L^{-1} of sucrose is indicated. The germination of heterotrophic zygotic immature embryos is possible with the use of 20 g L^{-1} of sucrose with and $0.0571 \mu\text{mol L}^{-1}$ of AIA + $0.0289 \mu\text{mol L}^{-1}$ of GA_3 or $0.0289 \mu\text{mol L}^{-1}$ of GA_3 . *In vitro* culture of autotrophic immature zygotic embryos is possible with the use of 20 g L^{-1} of sucrose without phytohormones. For cryopreservation of passion fruit seeds the water content of 10% and the *in vitro* culture of isolated mature embryos is the most indicated combination to achieve greater germination. For the minimum *in vitro* cultivation of nodal segments of passion fruit for up to 180 days the use of culture medium with $\frac{1}{4}$ MSM mineral salts and 10 g L^{-1} of sucrose at an average temperature of 20°C is indicated.

Keywords: Zygotic embryos; immature embryos; cryopreservation; minimum culture *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Existem evidências de que o gênero *Passiflora* L. tenha originado na África, tendo chegado até a América por pontes de terra e se diversificado rapidamente pela América do Sul (Muschner et al., 2012). Por isso, o Brasil é considerado um importante centro de diversidade do gênero *Passiflora*, com 83 espécies endêmicas de 145 espécies já descritas (Cervi, 2006; Flora do Brasil, 2017). Dentre elas, a espécie *P. edulis* Sims, conhecida como maracujazeiro-azedo é a principal espécie do gênero cultivada no País (Bernacci et al., 2008; Meletti et al., 2011), em mais de 90% dos plantios (Viana et al., 2016).

O fruto do maracujazeiro-azedo pode ser consumido tanto *in natura*, ou ser utilizado na confecção de doces, geleias, licores, sorvetes e sucos (Ferrari et al., 2004; Meletti et al., 2007). Devido a sua grande importância para a fruticultura tropical, o melhoramento genético de maracujazeiro é realizado visando o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas, com maior produtividade e resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Freitas et al., 2016).

O ataque de pragas e doenças na cultura do maracujazeiro-azedo é um sério problema e causa redução na longevidade e produtividade (Delanoë, 1991; Pires et al., 2011). As espécies silvestres de *Passiflora* são a principal fonte de genes de resistência (Faleiro et al., 2005; Meletti et al., 2005; Meletti, 2011). Os programas de melhoramento genético de maracujazeiro buscam a transferência de características de resistência a doenças das espécies silvestres para as

espécies cultivadas (Junqueira et al., 2005; Meletti et al., 2007; Santos et al., 2014 e 2015; Freitas et al., 2016).

Toda a diversidade encontrada nas espécies silvestres está ameaçada devido à expressiva redução das áreas florestais, ao desmatamento, a urbanização e a expansão agrícola, aumentando, assim, a preocupação com a conservação dos recursos genéticos do gênero *Passiflora* (Bernacci et al., 2005).

A erosão genética é um risco significativo de perda de genes em espécies de *Passiflora* (Ferreira et al., 2005). Uma maneira de reduzir os efeitos da perda de variabilidade genética das espécies cultivadas é a montagem e manutenção de bancos de germoplasma, visando a utilização e conservação dos mesmos.

No Brasil, a maior parte da manutenção de germoplasma do maracujazeiro é feita por conservação *ex situ* em bancos de sementes e no campo. No entanto, os bancos de sementes sofrem com a rápida perda de viabilidade, dormência das sementes e desuniformidade na germinação das sementes armazenadas (Alexandre et al., 2004a; Ferreira et al., 2005; Wagner Júnior et al., 2007; Ferreira et al., 2007; Oliveira Júnior et al., 2010; Zucareli et al., 2014; Aguacía et al., 2015; Santos et al., 2016). As coleções de campo exigem áreas extensas para o plantio, tornando difícil a manutenção e a proteção contra patógenos e pragas, inviabilizando este tipo de coleção em alguns casos (Ferreira et al., 2005). Assim, a conservação *in vitro* é uma alternativa para reduzir os custos de manutenção e tornar o processo de conservação das coleções mais eficiente (Lima et al., 2004).

A conservação *in vitro* pode ser realizada basicamente pela criopreservação e pelo cultivo mínimo *in vitro*. A criopreservação é uma metodologia de conservar o germoplasma por tempo indeterminado em temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido, até -196°C (Engelmann, 2004). O cultivo mínimo *in vitro* consiste em manter a cultura *in vitro* sob taxas de crescimento limitado, por curto período de tempo, com subcultivos periódicos (Withers, 1983; Morales et al., 1997). Os programas de melhoramento genético de maracujazeiros são os principais interessados em conservar, de maneira segura, o germoplasma de *Passiflora* (Cerqueira-Silva et al., 2016).

A hibridação interespecífica é o principal meio pelo qual se faz a transferência de características de resistência nos programas de melhoramento genético (Payán e Martin, 1975). Dessa forma a hibridação interespecífica é a

melhor maneira de transferir genes de resistência das espécies silvestres de *Passiflora* para a espécie cultivada.

No entanto, em alguns casos, o cruzamento entre algumas espécies apresenta barreiras pós-fertilização, como o aborto do embrião e o baixo vigor e esterelidade dos híbridos obtidos, que podem inviabilizar a utilização dos mesmos (Lima et al., 2008; Meletti et al., 2007). Assim, o resgate e cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos pode ser uma alternativa viável, quando os cruzamentos são incompatíveis e possibilitam que o embrião seja resgatado antes que seja abortado pela planta (Silva-Neto e Andrade, 2011). O cultivo *in vitro* de embriões imaturos para este gênero ainda não foi estudado, havendo assim, a necessidade do desenvolvimento de protocolos eficientes para aplicar esta técnica.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims), para posterior uso em programas de melhoramento genético e aplicação da técnica de resgate de embriões, e desenvolver novas estratégias para a conservação *in vitro* de maracujazeiro-azedo por meio da criopreservação de sementes e cultivo mínimo de segmentos nodais.

2.2. Específicos

- i. Estabelecer um meio de cultivo eficiente para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo;
- ii. Estabelecer um meio de cultivo eficiente para o crescimento *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo;
- iii. Estabelecer um meio de cultivo responsivo para a germinação de embriões zigóticos imaturos nos diferentes estádios de desenvolvimento heterotrófico (globular e cordiforme) e autotrófico (torpedo e cotiledonar);
- iv. Testar a eficiência da criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo com diferentes teores de água inicial;

- v. Testar a eficiência da germinação de sementes *ex vitro*, em rolos de papel, e do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados, após a criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo;
- vi. Estabelecer um meio de cultivo eficiente para a conservação *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, por meio do cultivo mínimo;
- vii. Testar a melhor temperatura para a conservação *in vitro*, por cultivo mínimo de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo.

3. CAPÍTULOS

3.1. CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES MADUROS E IMATUROS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO

3.1.1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims) é uma das espécies mais estudadas e a principal espécie de maracujazeiro cultivada no País (Meletti et al., 2011). Seu fruto é de grande importância para a fruticultura tropical, podendo ser consumido *in natura*, quanto industrializado (Ferrari et al., 2004; Kobori e Jorge, 2005). Embora seja uma fruteira semi-perene, em decorrência do ataque de doenças e pragas na cultura, o maracujazeiro-azedo sofre uma redução na longevidade dos seus pomares, de cinco para dois anos de vida útil (Delanoë, 1991; Pires et al., 2011). Por este motivo, o estado do Rio de Janeiro teve uma redução de 72% de sua área plantada da cultura nos últimos 10 anos (IBGE, 2013). Estes fatos confirmam a importância de programas de melhoramento genético na busca por novas cultivares resistentes a fatores bióticos e abióticos.

O melhoramento genético de maracujazeiro no Brasil visa o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a diferentes regiões do País, com maior produtividade e resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Meletti et al.,

2005; Freitas et al., 2016). A principal fonte de genes de resistência é encontrada em espécies silvestres de *Passiflora* (Faleiro et al., 2005; Meletti et al., 2005; Meletti, 2011; Santos et al., 2014 e 2015; Freitas et al., 2016), dessa forma a hibridação interespecífica é a melhor maneira de transferir genes de resistência das espécies silvestres para a espécie cultivada.

A hibridação interespecífica é uma ferramenta valiosa ao melhoramento genético do maracujazeiro, com a finalidade de aumentar a variabilidade e introduzir genes de resistência às espécies comerciais (Payán e Martin, 1975). Porém, em alguns cruzamentos interespecíficos são encontradas barreiras pós-zigóticas relacionadas ao aborto do embrião devido à degeneração do endosperma, levando a esterilidade total ou parcial dos híbridos obtidos e impossibilitando o sucesso da hibridação em alguns casos (Payán e Martin, 1975; Hu e Wang, 1986; Bridgen 1994; Brandvain e Haig, 2005; Pereira et al., 2006). Uma das formas de superar tal dificuldade é resgatar o embrião antes do aborto e cultivá-lo *in vitro*, utilizando a técnica de resgate e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos (Bridgen, 1994).

Esta técnica é conhecida por resgate de embriões *in vitro* e depende do isolamento do embrião sem lesão e cultivo do mesmo, em um meio nutritivo adequado para o crescimento embriogênico até a formação da plântula (Bridgen, 1994; Monnier, 1995). Para as espécies de *Passiflora*, ainda não foram desenvolvidos meios de cultivo e protocolos para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos. Por isso, estudos sobre a composição dos meios de cultura e fontes exógenas de carboidratos que favoreçam a germinação de *P. edulis* são importantes, tanto para aumentar a taxa de germinação quanto para obter plântulas com elevado potencial fisiológico. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho desenvolver um protocolo para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros e imaturos de maracujazeiro-azedo.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Aspectos botânicos do gênero *Passiflora* e da espécie *P. edulis* Sims

No Brasil são encontradas 153 espécies da família Passifloraceae, distribuídas nos quatro gêneros *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (Flora do Brasil, 2017). O gênero com o maior número de espécies descritas no Brasil é o *Passiflora*, colocando o País em destaque como centro de diversidade em *Passiflora*, com 83 espécies endêmicas de 145 espécies descritas (Cervi, 2006; Flora do Brasil, 2017). Existem indícios de que as plantas ancestrais do gênero *Passiflora* tenham se originado na África e tenham sido dispersadas na Europa, Ásia e chegado à América por pontes de terra, ocorrendo rápida diversificação a partir da América do Sul (Muschner et al., 2012).

As plantas do gênero *Passiflora* são caracterizadas por serem trepadeiras lenhosas ou herbáceas, com gavinhas axilares. As folhas são alternas, pecioladas, inteiras ou lobadas, algumas vezes caducas. As flores são caracterizadas por serem bissexuais, actinomorfas, solitárias ou em inflorescências, apresentam brácteas, cinco sépalas, cinco pétalas e uma ou mais séries de filamentos que formam a coroa. O gineceu possui três carpelos e o androceu é composto por cinco estames livres. Os frutos são carnosos do tipo baga indeiscentes. As sementes são comprimidas, com arilo carnoso e testa reticulada, pontuada ou alveolada (Vanderplank, 2000; Ulmer e MacDougal, 2004).

O maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims) é a principal espécie de maracujá cultivada comercialmente (Meletti, 2011). É classificado como uma planta alógama, que apresenta autoincompatibilidade do tipo esporofítica (Bruckner et al., 1995). A autoincompatibilidade ocorre devido ao não reconhecimento entre o pólen e as proteínas do estigma de maneira que os grãos de pólen não germinam ou produzem um tubo polínico curto (Bugallo et al., 2011; Madureira et al., 2014). A espécie é diploide com número básico de cromossomos igual a nove ($2n=2x=18$) (Mayeda e Vieira et al., 1995; Souza et al., 2002).

O maracujazeiro-azedo é caracterizado por possuir flores bissexuais autoincompatíveis, que abrem uma única vez por volta das 11:30, fechando-se por volta das 16:45 horas (Junqueira et al., 2001; Cobra et al., 2015). A polinização natural da planta é dependente de insetos do tipo mamangavas-de-toco, abelhas do gênero *Xylocopa*, que coevoluíram com as flores de maracujazeiro-azedo (MacDougal, 1994; Benevides et al., 2009). As

mamangavas-de-toco são de grande porte e quando visitam a flor do maracujazeiro encostam seu dorso nos estames onde estão os grãos de pólen pegajosos que são retirados e levados para o estigma de outras plantas (Benevides et al., 2009). A polinização influencia diretamente a frutificação do maracujazeiro-azedo, tendo em vista que a quantidade de sementes e o conteúdo de suco estão correlacionados com a quantidade de grãos de pólen que são depositados no estigma durante a polinização (Akamine e Girolami, 1959). Segundo Silva (2016), a polinização natural é capaz de assegurar uma boa qualidade de frutos e reduzir os custos da mão de obra, desde que, nas proximidades do plantio exista vegetação nativa conservada para a manutenção das populações de abelhas do gênero *Xylocopa*.

A propagação do maracujazeiro é realizada preferencialmente por meio de sementes, principalmente a nível comercial, por facilitar a execução (Meletti, 2002). No entanto, a desuniformidade na germinação devido à alta variabilidade genética em espécies do gênero *Passiflora* prejudica a qualidade das mudas nos plantios comerciais de maracujazeiro (Silva et al., 2005; Negreiros et al., 2006).

A propagação vegetativa pode ser realizada por meio de estaquia, enxertia ou cultivo *in vitro*, podendo facilitar a manutenção de materiais com características agrônomicas desejáveis, favorecendo a multiplicação de plantas produtivas e resistentes a pragas e doenças (Lima et al., 1999; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010; Alexandre et al., 2014).

A cultura do maracujazeiro-azedo é bastante influenciada pelas estações climáticas, apresentando melhor desenvolvimento com precipitação em torno de 800 a 1700 mm, bem distribuídas ao longo do ano. Por outro lado, chuvas intensas no período da floração dificultam a polinização em virtude dos grãos de pólen “estourarem” (Bruckner e Picanço, 2001). Os processos biológicos do maracujazeiro como, floração, fecundação, frutificação, maturação e qualidade dos frutos, são dependentes da temperatura. A faixa de temperatura entre 21 e 25 °C é considerada a mais favorável ao crescimento da planta (Borges e Lima, 2009). O florescimento depende da quantidade de horas de iluminação natural durante o dia (Cavichioli et al., 2006). As regiões, cujo comprimento do dia é acima de 11 horas de luz, apresentam as melhores condições para o florescimento (Borges e Lima, 2009).

3.1.2.2. Importância econômica da cultura do maracujazeiro-azedo

A espécie mais explorada comercialmente, no Brasil, é o maracujazeiro-azedo que é cultivado em mais de 90% dos plantios (Viana et al., 2016). Aos poucos outras espécies também estão conquistando espaço no mercado brasileiro de fruteiras. O maracujá-doce (*P. alata* Cutis) de polpa adocicada apresenta um valor de mercado mais elevado e por isso tem atraído a atenção de alguns produtores (Bernacci et al., 2008; Alves et al., 2012). Já o maracujá-do-mato (*P. cincinnata* Mast.) é comercializado na região Nordeste durante a entressafra do maracujá-azedo e tem sido considerado uma excelente opção de renda para os pequenos agricultores, por ser uma espécie adaptada às condições locais de cultivo (Oliveira Júnior et al., 2010).

No Brasil, até a década de 1960, o cultivo de maracujá se restringia apenas aos quintais das residências (José e Pires, 2011). Somente na década de 1970 que o fruto do maracujazeiro-azedo começou a apresentar potencial para ser usado na indústria (Leão et al., 2006). A partir da década de 1980 a produção de maracujá iniciou a sua expansão no território nacional marcado principalmente pelo interesse do fruto para fins industriais (Pires et al., 1994; Collato, 2010).

O maracujazeiro-azedo apresenta grande importância social e econômica para o Brasil, que se tornou o maior produtor e consumidor mundial (Faleiro et al., 2012). A produção de maracujá-azedo no Brasil, na safra 2015/2016, foi de 703.489 toneladas em uma área cultivada de 49.889 hectares, mas a produção teve uma considerável redução de 16,1%, se comparada ao ano de 2014 (IBGE, 2016). Os maiores estados brasileiros produtores da cultura nos últimos anos foram: Bahia, Ceará, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo (IBGE, 2016). Já em relação à exportação, o Brasil não está entre os maiores exportadores da fruta, pois o consumo interno é maior do que a produção (Silva, 2016).

O Estado do Rio de Janeiro vem sofrendo uma queda na produtividade de maracujá com o passar dos anos. Em 2014 o estado teve uma produtividade média de aproximadamente 19 t ha⁻¹ (IBGE, 2014), e no ano de 2016 a produtividade média caiu para 15,5 t ha⁻¹ em uma área de 384 ha. Os municípios fluminenses de Campos dos Goytacazes e São Francisco de Itabapoana possuem as maiores áreas plantadas (91 e 80 há, respectivamente) (IBGE, 2016). O cultivo de maracujazeiro-azedo é realizado principalmente pela agricultura familiar, pois há uma demanda grande de mão-de-obra (Santos et al., 2016).

O maracujazeiro possui diversas maneiras de utilização na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e como planta ornamental. A principal forma de utilização do maracujá é na alimentação. O fruto pode ser consumido *in natura* ou ser utilizado na confecção de doces, geleias, licores, sorvetes e sucos (Meletti et al., 2007).

Na indústria de medicamentos e na medicina popular podem ser usadas as folhas, flores, raízes e frutos extraídos do maracujazeiro-azedo ou de espécies silvestres, para combater verminoses, tumores gástricos e estresse (Costa e Tupinambá, 2005).

Considerando o uso ornamental, as flores de *Passiflora* possuem uma beleza exótica. Por este motivo, muitos híbridos estão sendo desenvolvidos, tanto para uso como flor de corte quanto de vaso (Vanderplank et al., 2003; Braglia et al., 2010; Santos, et al., 2012).

Os resíduos como sementes e cascas de maracujá, gerados pelas agroindústrias de polpa concentrada têm sido aproveitados como subprodutos e destinados à indústria de produtos alimentícios (68%), indústria de fármacos (18%) e indústria de produtos agrícolas (14%) (Coelho et al., 2016).

Mesmo com tanta importância econômica, a cultura vem apresentando uma queda na produtividade e na longevidade dos pomares, devido à presença constante de doenças que causam perdas na produção e na qualidade dos frutos (Delanoë, 1991; Junqueira et al., 2006; Meletti, 2011).

3.1.2.3. Melhoramento genético do maracujazeiro-azedo

A cultura do maracujazeiro-azedo é difundida nas regiões tropicais do planeta, no entanto, a pouca longevidade dos pomares devido ao ataque de pragas e doenças é um grave problema para os produtores (Delanoë, 1991). Mesmo com tal dificuldade, somente no final do ano 2000, foram lançadas no mercado as primeiras sementes de cultivares melhoradas de maracujazeiro, buscando aumentar a longevidade dos pomares (Meletti, 2011).

O melhoramento genético de maracujazeiro no Brasil visa o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a diferentes regiões do País, com maior produtividade e resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Meletti et al., 2005; Freitas et al., 2016). A resistência a doenças geralmente é encontrada em espécies silvestres de *Passiflora*, por isso faz-se necessário a introdução desses

genes de resistência de espécies silvestres em cultivares comerciais (Faleiro et al., 2005; Meletti, 2011; Santos et al., 2014 e 2015; Freitas et al., 2016).

Mesmo com os esforços dos melhoristas em lançarem cultivares resistentes, a cultura do maracujazeiro ainda sofre com o ataque de pragas e doenças, as quais chegam a limitar ou, até mesmo, inviabilizar a produção em determinadas áreas (Meletti, 2011). Por isso são necessárias tecnologias para fortalecer o desenvolvimento da cultura em diversas regiões do país com a ajuda de programas de melhoramento genético atuando em determinadas localidades. Rodrigues (2015) menciona que o desenvolvimento de tecnologias que contribuam para o avanço dos Programas de Melhoramento Genético de Maracujazeiro pode gerar novas cultivares que serão capazes de impulsionar a economia estadual e favorecer a permanência do homem no campo, nas regiões de produção agrícola do Estado do Rio de Janeiro.

Na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, o Programa de Melhoramento Genético de Maracujazeiro busca fortalecer a cultura do maracujazeiro-azedo na região Norte e Noroeste Fluminense. Desde 1998, o programa trabalha com seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro-azedo e no ano de 2016 foi lançada a primeira cultivar comercial “UENF - Rio Dourado”, que apresenta alta produtividade, tornando-se uma nova alternativa para os produtores da região (Viana et al., 2016).

Ao longo de quase 20 anos de pesquisa com maracujá, o programa de Melhoramento Genético de Maracujazeiro também contribuiu para o avanço de pesquisas em diversas áreas como: citogenética (Madureira et al., 2012; Madureira et al., 2014), caracterização e biologia reprodutiva (Benevides et al., 2009; Souza et al., 2012), caracterização morfológica e diversidade genética (Viana et al., 2006; Paiva et al., 2014; Silva et al., 2016), resistência a doenças (Santos et al., 2015; Freitas et al., 2016; Sacoman et al., 2018), armazenamento de sementes (Rodrigues, 2015), conservação de germoplasma e cultivo *in vitro* (Sacoman, 2013; Araújo, 2017).

No melhoramento do maracujazeiro, uma alternativa para a seleção de genótipos mais produtivos e resistentes a doenças é o uso da hibridação (Braga et al., 2007). Payán e Martin (1975) já visavam a hibridação como uma ferramenta valiosa ao melhoramento genético de maracujá, com a finalidade de aumentar a variabilidade e introduzir genes de resistência às espécies comerciais.

A hibridação em passifloras pode ser realizada tanto intraespecífica quanto interespecífica (Meletti et al., 2005). Em cruzamentos interespecíficos são encontradas barreiras pré-zigóticas ou pós-zigóticas que impossibilitam o sucesso da hibridação em alguns casos (Payán e Martin, 1975; Brandvain e Haig, 2005). Tais barreiras podem aparecer em três estádios: durante a fertilização da planta mãe, no desenvolvimento do fruto e na formação dos embriões (Nettancourt, 2001; Brandvain e Haig, 2005).

A não germinação do grão de pólen e a inibição ou retardamento do crescimento do tubo polínico no estigma da flor são barreiras pré-zigóticas. Já as barreiras pós-zigóticas estão relacionadas ao aborto do embrião devido à degeneração do endosperma ou ao baixo vigor e esterilidade total ou parcial dos híbridos obtidos (Payán e Martin, 1975; Hu e Wang, 1986; Bridgen, 1994; Pereira et al., 2005).

Diversos trabalhos são encontrados na literatura, visando estudar a hibridação interespecífica entre espécies silvestres de *Passiflora* e a espécie cultivada *P. edulis*. Um dos trabalhos pioneiros foi o de Payán e Martin (1975). Os autores observaram que os frutos obtidos de cruzamentos entre algumas espécies de *Passiflora* tinham uma grande quantidade de embriões abortados e, ainda, sugeriram que o aborto ocorreu em estádios precoces do desenvolvimento dos embriões. Conceição et al. (2011) observaram baixa porcentagem de germinação em sementes obtidas de cruzamentos interespecíficos entre *P. gardineri* x *P. alata* (3%), *P. gardineri* x *P. gibertii* (12%) e *P. gardineri* x *P. watsoniana* (18%). Freitas et al., (2016) relataram a baixa porcentagem de germinação em sementes híbridas oriundas do cruzamento entre *P. mucronata* x *P. edulis*, devido ao aborto dos embriões causado pela degeneração do endosperma. O'campo et al. (2016) obtiveram híbridos interespecíficos entre *P. vitifolia* x *P. caerulea* e *P. mucronata* x *P. caerulea* com um número normal de sementes, porém a capacidade de germinação foi nula porque as sementes não continham endosperma. Além disso, os autores observaram que 53,84% dos cruzamentos que produziram frutos possuíam barreiras pós-zigóticas.

A baixa porcentagem de germinação das sementes híbridas pode ser causada por um erro no desenvolvimento do endosperma e resulta no aborto precoce do embrião (Payán e Martin, 1975; Bridgen, 1994). Em uma tentativa de superação do aborto precoce de embriões oriundos de cruzamentos interespecíficos, Payán

e Martin (1975) aplicaram soluções de ácido giberélico (GA₃) e ácido indolilbutírico (AIB), porém, obtiveram pouco sucesso. Em trabalhos mais recentes, os autores sugerem o emprego de técnicas biotecnológicas mais sofisticadas como hibridações interespecíficas artificiais por fusão de protoplastos, transformação genética, cultivo *in vitro* de ovários e o resgate de embriões imaturos *in vitro*. Estas técnicas são capazes de superar as barreiras e facilitar a hibridação interespecífica entre espécies de *Passiflora* (Lima et al., 2000; Meletti et al., 2005; O'campo et al., 2016).

3.1.2.4. A cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético do maracujazeiro

A cultura de células e tecidos vegetais pode solucionar diversos problemas que o melhoramento genético clássico de plantas não é capaz, contribuindo para os avanços nesta área. São diversas técnicas que podem ser aplicadas para a conservação de germoplasma (cultivo mínimo *in vitro* e criopreservação), para aumentar a variabilidade genética para fins de seleção (hibridação *in vitro*, cultura de embriões e fusão de protoplastos), para agilizar o processo de melhoramento (cultura de anteras, germinação de sementes *in vitro*, clonagem de genótipos), para produção comercial de mudas de alta qualidade (propagação *in vitro* e limpeza clonal) e para transformação genética (regeneração *in vitro*) (Ferreira et al., 1998; Faleiro e Andrade, 2009).

Os primeiros estudos sobre cultura de tecidos em passifloras começaram com Nakayama (1966), que cultivou *in vitro* tecidos de *P. caerulea* e Moran Robles (1978), que cultivou *in vitro* gemas axilares de *P. edulis* e *P. molissima*. Desde então, tem sido crescente o número de trabalhos envolvendo diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais em diversas espécies de *Passiflora*.

Nos trabalhos envolvendo morfogênese e organogênese *in vitro* de espécies de *Passiflora*, os explantes utilizados são geralmente segmentos radiculares, segmentos de hipocótilo, segmentos nodais, segmentos apicais e tecidos foliares em combinação com diversos fitorreguladores como 2ip (2 isopenteniladenina), AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenoacético), BA (6-benziladenina), KIN (cinetina), GA₃ (ácido giberélico) e TDZ (tidiazuron) (Drew, 1991; Dornelas e Vieira, 1994; Isutsa, 2004; Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Garcia et al., 2011b; Silva et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Rocha et al., 2012;

Vieira et al., 2014; Shekhawat et al., 2015). A embriogênese somática em espécies do gênero *Passiflora* é alcançada utilizando embriões zigóticos maduros ou tecidos foliares em combinação com diferentes concentrações de BA, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) KIN e picloran (Guzzo et al., 2004; Pinto et al., 2011; Garcia et al., 2011a; Ferreira et al., 2015; Figueiredo et al., 2015; Rocha et al., 2015; Rosa et al., 2015).

Para o maracujazeiro-azedo a técnica de duplicação cromossômica *in vitro* já foi relatada com sucesso por Rêgo et al., (2011), a partir de segmentos de hipocótilos cultivados *in vitro*, em meio suplementado com 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de colchicina e obtiveram plantas com maior teor de sólidos solúveis na polpa de maracujá-azedo e o aumento no tamanho da flor. O desenvolvimento de plantas tetraploides visa melhorar algumas características agrônômicas importantes (Bennett, 2004).

A transformação genética também já foi relatada em *P. edulis* por Takahashi (2002), Monteiro (2005), Alfenas et al., (2005) e em *P. alata* Cutis por Pinto, (2010).

O cultivo *in vitro* pode representar alternativas para a multiplicação, conservação e disponibilização de germoplasma de espécies silvestres de *Passiflora*, em programas de melhoramento genético de maracujazeiro (Garcia et al., 2011b). Mesmo com o emprego de diversas técnicas de cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético de *Passiflora*, ainda não foram relatados na literatura estudos envolvendo o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, visando sua potencial utilização no resgate de embriões de cruzamentos incompatíveis.

3.1.2.5. Cultivo *in vitro* de embriões maduros e imaturos

A cultura de embriões *in vitro* consiste no isolamento e no crescimento de um embrião zigótico maduro ou imaturo, sob condições estéreis em meio nutritivo asséptico, com o objetivo de obter uma planta viável (Monnier, 1995). A técnica preconiza que a integridade genética do embrião seja mantida e que, se forem fornecidas as substâncias adequadas, o embrião tenha potencial para retomar o crescimento normalmente (Raghavan, 1980; Bridgen, 1994; Monnier, 1995).

O primeiro relato do cultivo *in vitro* de embriões foi feita por Hannig (1904), que cultivou embriões imaturos de crucíferas (*Raphanus sativus*, *R. caudatuse* e *Colchlearia danica*). Posteriormente, Knudson (1922) cultivou *in vitro* embriões de

orquídeas na ausência de fungos micorrízicos. Mas o primeiro relato de aplicação da cultura de embriões no melhoramento genético foi feito por Laibach (1925), que resgatou embriões híbridos de cruzamentos incompatíveis entre *Linum austriacum* x *L. perenne*. Desde então, pesquisas nesta área têm originado grandes contribuições para o melhor entendimento dos processos fisiológicos relacionados à germinação (Carvalho e Araújo, 2007).

Na hibridação interespecífica pode acontecer o aborto precoce do embrião em decorrência da má formação do endosperma (Hu e Wang, 1986). Nestes casos é possível superar tal dificuldade, resgatando o embrião antes do aborto e cultivá-lo *in vitro* (Bridgen, 1994). Esta técnica é conhecida por resgate de embriões *in vitro* e depende do isolamento do embrião zigótico sem lesão e seu cultivo em um meio nutritivo adequado para seu crescimento até a formação da plântula (Bridgen, 1994).

Além do resgate de embriões interespecíficos potencialmente abortivos, o cultivo de embriões pode ser útil para encurtar os ciclos de gerações acelerando o processo de germinação de sementes (Yeung et al., 1981; Hossain et al., 2003; Yoon et al., 2006), para superar a dormência de sementes e também para estudar os requisitos de crescimento de embriões zigóticos (Yeung et al., 1981).

O sucesso da técnica depende de alguns fatores como o genótipo (Kothari et al., 2010; Walter et al., 2018 no prelo), o estágio embrionário (Manzur et al., 2013; Walter et al., 2018 no prelo), a formulação do meio de cultivo (Monnier, 1995) e as condições de incubação (Razdan, 2003; Manzur et al., 2013).

A formação do embrião zigótico se inicia logo após a fecundação da oosfera, por um dos núcleos gaméticos do grão de pólen (Ferri, 1990). Assim o embrião zigótico inicia a sua diferenciação em uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e ápice radicular, posteriormente, desenvolvendo-se pelos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Ferri, 1990; Carvalho e Araújo, 2007).

Durante o desenvolvimento do embrião ele passa por duas fases: heterotrófica e autotrófica. Na fase heterotrófica, o embrião depende do endosperma e dos tecidos maternos para se desenvolver. Já na fase autotrófica, o embrião é metabolicamente capaz de sintetizar as substâncias necessárias para o seu crescimento. Esta fase se inicia a partir do estágio torpedo, quando começam a desenvolver os cotilédones (Raghavan, 1966).

A grande dificuldade do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos está diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento do embrião no momento da excisão, pois quanto mais jovem for o embrião menor a chance de sua sobrevivência *in vitro*. Devido ao seu tamanho reduzido, podem ser maiores os riscos de dano mecânico durante a excisão e o requerimento nutricional, sendo necessário o enriquecimento do meio de cultura (Hu e Ferreira, 1998). Desta forma, faz-se necessário a definição de um meio de cultura adequado para os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões.

O exato requerimento nutricional depende do estágio de desenvolvimento embrionário. Os embriões mais jovens são mais exigentes em combinações de vitaminas, aminoácidos e fitorreguladores. Os embriões na fase autotrófica já são metabolicamente capazes de sintetizar as substâncias necessárias para o seu crescimento, a partir de meios de cultura simples, contendo basicamente sais minerais e sacarose (Carvalho e Araújo, 2007).

Dentre os sais minerais constituintes dos meios de cultivo, o nitrato de amônio e o nitrato de potássio são as fontes de nitrogênio mais importantes no cultivo de embriões. O nitrato de amônio é essencial para o crescimento adequado e a diferenciação dos embriões imaturos (Umbeck e Norstog, 1979; Raghavan, 2003). A adição de aminoácidos como a glutamina, a asparagina e a caseína hidrolisada ao meio de cultura também podem estimular o crescimento do embrião (Bhojwani e Razdan, 1996). Algumas vitaminas como biotina, tiamina, ácido pantotênico, ácido nicotínico, ácido ascórbico, inositol e piridoxina também são comumente adicionadas aos meios de cultivo de embriões (Raghavan, 2003).

Em relação à osmolaridade, quanto mais jovem o embrião é excisado, maior será a osmolaridade requerida no meio de cultivo (Hu e Ferreira, 1998). Esse fato foi observado no primeiro trabalho com a cultura de embriões, em que Hannig (1904) não conseguiu germinar nenhum embrião no meio de cultivo, a menos que fosse fornecida uma concentração alta de sacarose como fonte de carbono. Assim, a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada para o cultivo de embriões, além de desempenhar um papel importante na manutenção do potencial osmótico adequado dos meios de cultivo (Bridgen, 1994; Raghavan, 2003).

As classes de fitorreguladores geralmente usadas para o cultivo *in vitro* de embriões são as citocininas, as auxinas e as giberelinas (Hu e Ferreira, 1998),

porém em baixas concentrações, principalmente quando os embriões são excisados nos estádios iniciais do desenvolvimento (Bridgen, 1994; Carvalho e Araújo, 2007). As citocininas são utilizadas apenas em combinação com alguma auxina, com a finalidade de promover o crescimento e a diferenciação dos embriões (Veen, 1963; Raghavan, 2003). Já as auxinas são mais utilizadas com a finalidade de promover o crescimento normal do embrião, a formação de raízes primárias, hipocótilos e cotilédones (Raghavan, 2003; Machakova et al., 2008; Manzur et al., 2014). E as giberelinas são capazes de promover o crescimento e germinação precoce do embrião (Raghavan, 2003; Moshkov et al., 2008).

A luz e a temperatura são fatores ambientais importantes na cultura de embriões. Geralmente os embriões crescem melhor quando mantidos no escuro, durante as primeiras semanas de cultivo e depois são transferidos para a luz para permitir a diferenciação dos proplastídios em cloroplastos e a síntese de clorofila (Taiz e Zeiger, 2009). A temperatura ideal depende da espécie, mas a faixa de temperatura mais usada fica entre 25 a 30 °C (Bridgen, 1994).

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos ainda não foi relatado em espécies do gênero *Passiflora*. Existem trabalhos utilizando os embriões zigóticos maduros apenas como explante para a indução de embriogênese somática (Pinto et al., 2011; Garcia et al., 2011a; Ferreira et al., 2015; Figueiredo et al., 2015; Rocha et al., 2015; Rosa et al., 2015) ou para a germinação de espécies silvestres que possuem dormência (Veiga-Barbosa et al., 2013).

Na literatura são encontrados diversos relatos de dificuldade de germinação em sementes de várias espécies de maracujazeiro (Alexandre et al., 2004a; Alexandre et al., 2004b; Ferreira et al., 2005; Delanoy et al., 2006; Wagner Júnior et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Wagner Júnior et al., 2007; Zucareli et al., 2009; Oliveira Júnior et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011; Zucareli et al., 2014; Aguacía et al., 2015; Santos et al., 2016). Estes relatos buscam maneiras para superar a dormência, a baixa e desuniforme germinação e melhorar o vigor das sementes de maracujazeiro.

A dormência relatada em sementes de algumas espécies de *Passiflora* se deve a inibidores químicos no endosperma e a resistência mecânica do tegumento. Desse modo, é possível que o cultivo de embriões *in vitro* seja capaz de superar este tipo de dormência (Ellis et al., 1985; Tsuboi e Nakagawa, 1992). Ao remover as influências, como inibidores de germinação presentes no

endosperma e a rigidez do tegumento, os embriões de várias espécies são capazes de germinar e crescer rapidamente fazendo até que o ciclo de reprodução seja encurtado (Bridgen, 1994).

O protocolo de germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro mais utilizado nos trabalhos revisados foi proposto por Dias et al. (2003). Os autores sugerem a retirada do tegumento das sementes com o auxílio de uma mini morsa e a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, por cinco minutos e enxague em água estéril, em seguida, as sementes sem tegumento são inoculadas no meio de cultivo.

Porém, sementes do maracujazeiro apresentam dormência até mesmo quando cultivadas *in vitro*, ocasionando germinação baixa e desuniforme, além da formação de plântulas anormais (Junghans et al., 2006). Por isso já existem alguns trabalhos que buscaram superar tais dificuldades com diversos métodos de escarificação química e mecânica, além da suplementação do meio de cultura com fitorreguladores (Carvalho et al., 2012; Rego et al., 2014; Cruz, 2016).

Tendo em vista a dificuldade de germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro, o estudo do cultivo de embriões maduros pode ser uma alternativa para alcançar o sucesso na germinação, além de ser um passo importante para estudar os requisitos nutricionais necessários para desenvolver um meio de cultivo para o resgate e cultivo *in vitro* de embriões imaturos de maracujazeiro.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros

3.1.3.1.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes comerciais de *P. edulis* da cultivar Maracujá Redondo Amarelo - Isla®, pertencente ao lote de sementes 34525-52. A pesquisa foi realizada no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, cujas

coordenadas locais de referência são 21° 45' de latitude Sul e 41° 20' de longitude Oeste e altitude média de 11 metros.

3.1.3.1.2. Ensaio de germinação

O ensaio de germinação foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos: sementes com tegumento, semente sem tegumento e embrião isolado (Figura 1), com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (96 x 21mm) contendo oito explantes.

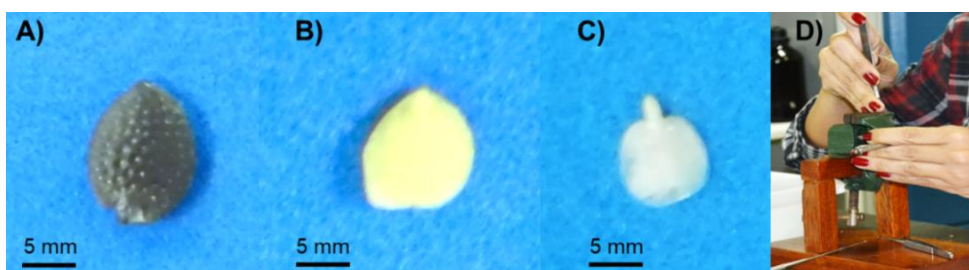


Figura 1. Sementes de maracujazeiro-azedo: (A) Com tegumento; (B) Sem tegumento; (C) Embrião isolado; (D) Remoção do tegumento da semente com auxílio de uma mini morsa.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes com e sem tegumento foram desinfestadas em álcool 70%, por trinta segundos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (NaClO) com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL, durante 15 minutos e enxaguadas por três vezes em água desionizada autoclavada. Posteriormente, os embriões foram excisados com auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio (Tecnival®). As sementes com tegumento, sem tegumento e os embriões isolados foram inoculados em meio de cultivo.

O meio de cultivo foi constituído por metade da concentração dos sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1968), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,7, e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico puro Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm e, em seguida, foram distribuídos 25 mL por placa de Petri (96 x 21mm). As placas com os explantes foram mantidas na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro,

por 15 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aos 28 dias de cultivo, as sementes foram avaliadas quanto ao número de plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas.

3.1.3.1.3. Experimento de germinação de embriões zigóticos maduros

O experimento de germinação de embriões zigóticos maduros foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 4x5, em que foram testadas quatro concentrações de sais minerais dos meios MS (Murashige e Skoog, 1962) e MSM (Monteiro et al., 2000) (Tabela 1) (MS total, $\frac{1}{2}$ MS, MSM total e $\frac{1}{2}$ MSM), em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O experimento foi constituído por quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri (96 x 21mm), contendo cinco embriões maduros.

Tabela 1. Comparação entre os constituintes do meio de cultura MS e do meio de cultura modificado MSM (Monteiro et al., 2000 adaptado).

Constituintes	MS (mg L ⁻¹)	MSM (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650,00	1000,00
KNO ₃	1900,00	1520,00
CaCl ₂ .H ₂ O	440,00	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	1300,00
KH ₂ PO ₄	170,00	272,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	616,00
H ₃ BO ₃	6,20	4,50
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	28,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	2,90
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,25
KI	0,830	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	33,60	74,84
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	55,60
Ácido nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina	0,1	0,1
Glicina	2,0	2,0
Myo inositol	100,0	100,0

O tegumento das sementes foi removido com o auxílio de uma mini morsa. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com álcool 70% por 30 segundos, NaClO a 0,5% com 2 gotas de Tween® 20 a cada 100 mL por 15 minutos e enxaguados por três vezes, em água desionizada autoclavada. Em seguida, os embriões foram excisados sob microscópio estereoscópio (Tecnival®) e colocados para germinar.

Os meios de germinação foram constituídos por quatro concentrações de sais minerais (MS total, $\frac{1}{2}$ MS, MSM total e $\frac{1}{2}$ MSM) em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹), acrescidos de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7. E, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm e, em seguida, foram distribuídos 25 mL por placa de Petri. As placas contendo os embriões foram mantidas na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro, por 15 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 28 dias de cultivo, os embriões foram avaliados quanto ao número de plântulas normais, plântulas anormais, embriões não germinados, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da raiz, massa da matéria fresca e seca total.

3.1.3.1.4. Experimento de crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas oriundas de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo

Para verificar o crescimento *in vitro* de plântulas oriundas do cultivo de embriões maduros de maracujazeiro-azedo foi conduzido um experimento em um DIC em esquema fatorial 4x5, em que foram testadas quatro concentrações de sais minerais (MS total, $\frac{1}{2}$ MS, MSM total e $\frac{1}{2}$ MSM) em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O experimento foi constituído por sete repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco de vidro (125 mm x 60 mm), contendo três plântulas.

O tegumento das sementes foi removido com o auxílio de uma mini morsa. Em câmara de fluxo laminar as sementes sem tegumento foram submetidas à desinfestação com álcool 70% por 30 segundos, NaClO a 0,5% com duas gotas

de Tween® 20 a cada 100 mL, durante 15 minutos e enxaguadas por três vezes em água desionizada autoclavada. Em seguida, os embriões foram excisados sob microscópio estereoscópio (Tecnival®) e colocados para germinar em placas de Petri, contendo 25 mL de meio de cultivo constituído por metade dos sais de MSM, vitaminas de White, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7. E, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm e, em seguida, foram distribuídos 25 mL por placa de Petri (96 x 21mm). As placas contendo os embriões foram mantidas por 28 dias na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, no escuro, por 15 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 28 dias, as plântulas germinadas foram transferidas para os meios de crescimento. Os meios de cultivo foram constituídos por diferentes concentrações de sais minerais (MS total, ½ MS, MSM total e ½ MSM) em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹) acrescidos de vitaminas de White, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7. E, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. Foram distribuídos 40 mL de meio por frasco (125 mm x 60 mm). Os frascos foram vedados com tampas com duas membranas (1,0 cm² cada) por tampa, para facilitar as trocas gasosas (Saldanha et al., 2012) e autoclavados por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm.

Os frascos com as plântulas foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro, fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹. Após 45 dias de cultivo, as plantas de quatro repetições foram avaliadas quanto ao número de folhas, altura da plântula, volume das raízes e massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total. As plantas das outras três repetições foram levadas para a aclimatização.

As plantas foram aclimatizadas seguindo os mesmos tratamentos da etapa *in vitro* em um delineamento em blocos ao acaso (DBC) com três repetições. Cada parcela foi constituída por três plantas. As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 35%. As plantas foram lavadas em água corrente para a

remoção do meio de cultivo das raízes, em seguida, foram transferidas para bandejas de plástico com capacidade de 200 mL por célula, contendo o substrato comercial Basaplant® Hortaliças e irrigadas duas vezes por dia. Após 35 dias, as mudas foram avaliadas quanto à sobrevivência, comprimento da parte aérea, número de folhas, volume de raiz, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total.

3.1.3.2. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos

3.1.3.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes imaturas de *P. edulis* Sims. oriundas do programa de seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro-azedo da UENF. No campo experimental da UENF, situado na Escola Agrícola Antônio Sarlo, foram realizados cruzamentos entre genótipos elite de maracujazeiro-azedo para a obtenção dos frutos. As coordenadas geográficas são 21° 44' 47" de latitude Sul e 41° 18' 24" de longitude Oeste e altitude de 12 metros, situado no Norte do estado do Rio de Janeiro, no município de Campos dos Goytacazes.

Os cruzamentos foram realizados a partir das onze horas, horário de abertura das flores e da curvatura dos estigmas. As flores das plantas foram protegidas com saco de papel algumas horas antes da antese. A transferência de pólen de uma planta para a outra foi realizada esfregando-se a antera sobre o estigma de outra flor protegida. As flores foram novamente protegidas e etiquetadas.

Foram coletados frutos com 12, 18, 20, 22 e 24 dias após a polinização, para identificação dos quatro estádios de desenvolvimento embrionário (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Os frutos foram destinados ao Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, cujas as coordenadas geográficas são 21° 45' de latitude Sul e 41° 20' de longitude Oeste e altitude média de 11 metros.

3.1.3.2.2. Experimento de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos

Como ainda não foram relatados na literatura estudos sobre o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos em espécies de *Passiflora*, o presente experimento teve como base os resultados obtidos com o experimento de germinação de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo e os

trabalhos com outras espécies vegetais como *Citrus sinensis* Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco Chagas et al. (2003) e *Capsicum* Manzur et al. (2013) e Walter et al. (2018 no prelo).

Para cada um dos dois estádios de desenvolvimento embrionário: heterotrófico (globular e cordiforme) e autotrófico (torpedo e cotiledonar), foi montado um experimento independente. Cada experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial 5x4, em que foram testadas cinco concentrações de sacarose (20, 40, 60, 80 e 100 g L⁻¹) em combinação com quatro concentrações de fitorreguladores (sem regulador; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA + 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA; 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃) com três repetições. Cada repetição foi composta por uma placa de Petri (40 x 11 mm), contendo quatro embriões.

Em câmara de fluxo laminar, os frutos foram submetidos à desinfestação em álcool 70% por cinco minutos e em solução de hipoclorito de sódio a 1%, com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL de solução, durante 15 minutos. Em seguida, os frutos foram abertos para a retirada das sementes imaturas e posterior excisão dos embriões. Os embriões foram excisados com auxílio de seringa com agulha e bisturi sob microscópio estereoscópio (Tecnival®) e inoculados nos meios de cultivo.

Os meios foram constituídos por metade da concentração dos sais de MSM, vitaminas de White, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, diferentes concentrações de sacarose (20, 40, 60, 80 e 100 g L⁻¹) em combinação com quatro concentrações de AIA e GA₃ (sem fitorregulador; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA + 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃; 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA; 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃), pH ajustado para 5,7 e, em seguida, foram solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico em pó Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm e, em seguida, foram distribuídos 10 mL por placa de Petri (40 x 11mm). O AIA e o GA₃ foram adicionados ao meio de cultivo após a autoclavagem.

As placas contendo os embriões foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro, por 15 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹. Após 22 dias de transferência para a luz, os embriões foram avaliados quanto à germinação de plântulas normais, plântulas anormais e embriões não germinados.

Os embriões germinados foram transferidos para o meio de crescimento onde permaneceram por 30 dias. O meio de cultivo foi constituído pelos sais minerais de MSM, vitaminas de White, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,7 e, em seguida, foram solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico em pó Vetec®. Foram distribuídos 40 mL de meio por frasco (125 mm x 60 mm). Os frascos foram vedados com tampas com duas membranas (1,0 cm² cada) por tampa para facilitar as trocas gasosas (Saldanha et al., 2012) e autoclavados por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm.

As plântulas sobreviventes foram aclimatizadas em casa de vegetação seguindo o DBC com três repetições. Cada parcela foi constituída por três plantas. As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 35%. As plantas foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultivo das raízes e transferidas para bandejas de plástico com capacidade de 200 mL por célula, contendo o substrato comercial Basaplant® Hortaliças e irrigadas duas vezes por dia. Após 35 dias, as mudas foram avaliadas quanto à sobrevivência, comprimento da parte aérea, número de folhas, volume de raiz, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total.

3.1.3.3. Análises estatísticas

As variáveis dos experimentos de germinação de embriões zigóticos maduros, crescimento e aclimatização das plântulas e do cultivo de embriões zigóticos imaturos de maracujazeiro-azedo foram submetidas a testes iniciais de homogeneidade e normalidade, utilizando os testes de Bartlett e Lilliefors, respectivamente. Em seguida, foi realizada a análise de variância e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações foram desdobradas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade com o auxílio dos programas estatísticos SAS (Statistical Analysis System) e SISVAR (Ferreira, 2011).

As variáveis analisadas da porcentagem de germinação de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas do ensaio de germinação (item 3.1.4.1.) e da aclimatização de plântulas oriunda do cultivo de embriões imaturos heterotróficos (item 3.1.4.4.) foram analisados pela estatística descritiva.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Ensaio de germinação

As sementes colocadas para germinar *in vitro* com tegumento não germinaram em quase sua totalidade (96,9%) (Figuras 2 e 3). Resultados semelhantes já haviam sido relatados na germinação *in vitro* de maracujazeiro-azedo por Dias et al. (2003), Barros et al., (2006) e Rêgo et al., (2014). Alguns estudos indicam que a explicação mais provável é que o tegumento das sementes de maracujazeiro-azedo causa uma dormência, que pode estar relacionada com o controle de entrada e saída de água das sementes ou com a ação de substâncias inibidoras do crescimento presentes no tegumento (Ellis et al., 1985; Tsuboi e Nakagawa,1992).

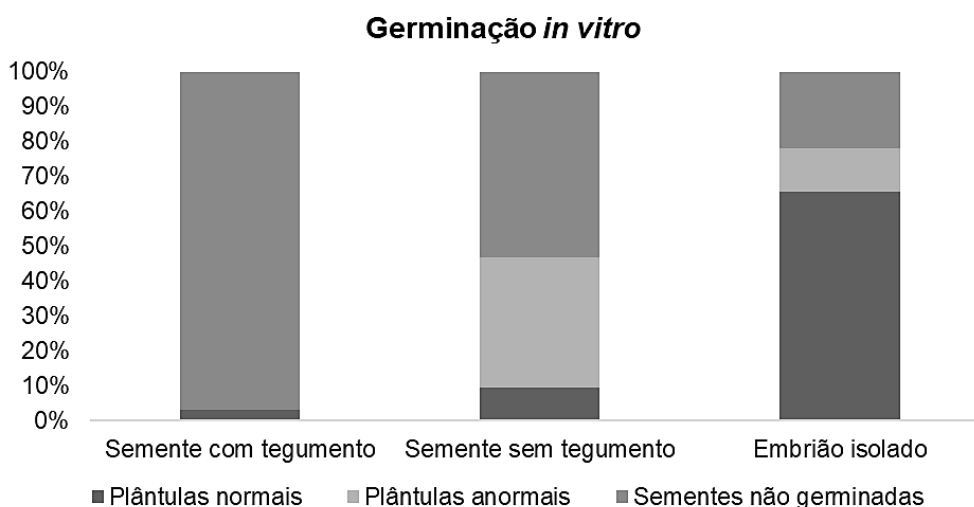


Figura 2. Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes com tegumento, sementes sem tegumento e de embriões isolados de maracujazeiro-azedo.

Se a dormência estivesse relacionada apenas com o controle da entrada e saída de água das sementes, a remoção do tegumento deveria ter solucionado o problema da dormência. No entanto, nas sementes sem tegumento houve uma alta porcentagem de germinação de plântulas anormais (37,5%) e apenas 9,4% de plântulas normais (Figuras 2 e 3). Para a germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro-azedo, Dias et al. (2003), Alexandre et al. (2009) e Rêgo et al.,

(2014) sugerem a retirada apenas do tegumento das sementes antes de serem inoculadas no meio de cultivo. Porém, os resultados obtidos neste ensaio mostram que a dormência em sementes de maracujazeiro-azedo, germinadas *in vitro*, esteve presente tanto no tegumento quanto no endosperma. A dormência em sementes depende do equilíbrio entre promotores de germinação, como auxinas, citocininas e GA₃, e inibidores de germinação como o ácido abscísico (ABA) (Takahashi et al., 1991; Taiz e Zeiger, 2009).

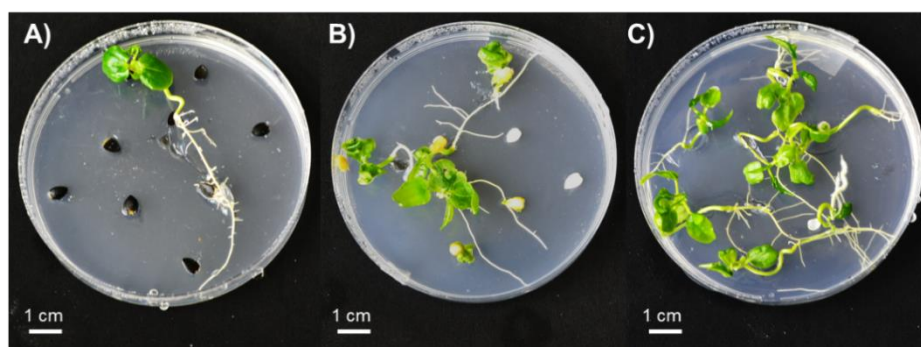


Figura 3. Germinação *in vitro* de maracujazeiro-azedo, após 28 dias de cultivo: (A) Sementes com tegumento; (B) Sementes sem tegumento; (C) Embriões isolados.

As sementes de algumas espécies do gênero *Passiflora* possuem um endosperma residual muito fino que envolve o embrião, que pode conter inibidores de germinação e crescimento capazes de atrapalhar o desenvolvimento do embrião (Morley-Bunker, 1980). Em maracujazeiro-azedo, Junghans et al., (2006) relataram que, sob condições *in vitro*, as sementes colocadas para germinar com o endosperma residual podem desencadear algum tipo de dormência, resultando em uma germinação baixa e desuniforme.

Quando o embrião foi excisado, ou seja, o tegumento e o endosperma foram removidos, a dormência foi superada, a germinação aumentou para 78,1%, com elevada formação de plântulas normais (65,6%) e baixa formação de plântulas anormais (12,5%) (Figuras 2 e 3). Desse modo, quando o embrião zigótico é isolado, a germinação de plântulas normais de maneira uniforme é garantida.

3.1.4.2. Experimento de germinação de embriões zigóticos maduros

Na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, a análise de variância mostrou diferença significativa para os sais minerais e a sacarose dentro das variáveis plântulas normais e anormais (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, cultivados por 28 dias em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Plântulas normais	Plântulas anormais	Embriões não germinados
Sais minerais (M)	4	7,797*	4,846*	0,855 ^{ns}
Sacarose (S)	3	15,52*	12,85*	0,268 ^{ns}
(M) x (S)	12	0,889 ^{ns}	0,612 ^{ns}	0,296 ^{ns}
Resíduo	58	0,712	0,576	0,300
Média geral		76,4	17,4	6,2
C.V. (%)		22,0	79,25	169,7

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, os meios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ MSM foram superiores na germinação de plântulas normais aos meios com as concentrações totais (Figura 4A). Isso porque o meio de cultivo MSM foi elaborado por Monteiro et al. (2000), com a finalidade de suprir os requerimentos nutricionais de maracujazeiro-azedo *in vitro*. Já o meio MS foi desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) para o cultivo *in vitro* de tabaco. Mesmo assim, na literatura é comum o uso da metade das concentrações dos sais minerais de MS para a germinação *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora* (Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Carvalho et al., 2012; Soares et al., 2012; Vieira et al., 2014; Araújo, 2017).

Os embriões cultivados em meios com os sais minerais totais de MSM apresentaram a maior porcentagem de germinação de plântulas anormais (30%), não diferindo do $\frac{1}{2}$ MS (Figura 4B). Estes meios foram desfavoráveis na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de maracujazeiro-azedo. Para o cultivo

de embriões de algumas culturas as altas concentrações de sais minerais podem causar um desbalanço nutricional no meio, modificando a osmolaridade, e ocasionando a formação de plântulas anormais (Malavolta, 2006).

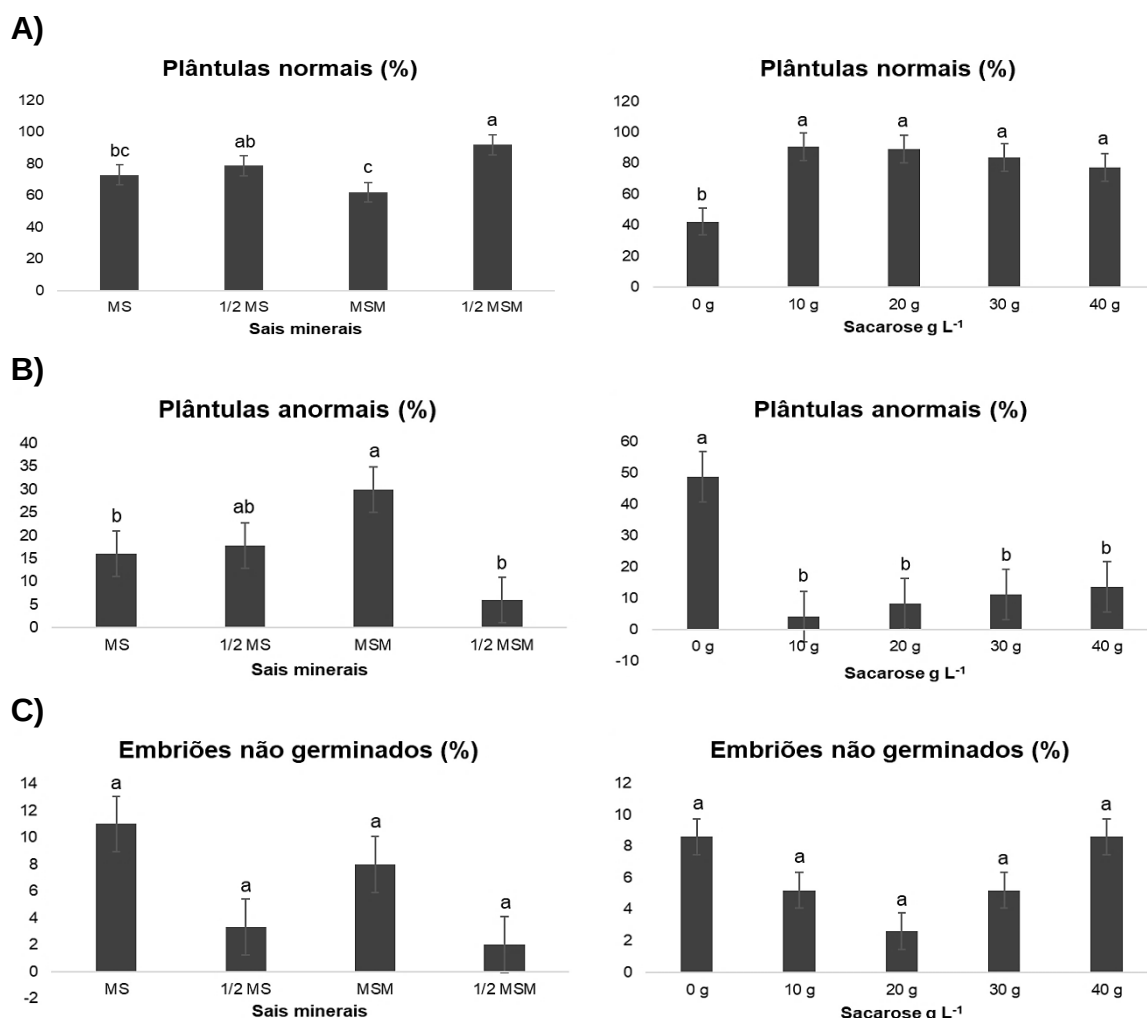


Figura 4. Médias da porcentagem de germinação de (A) plântulas normais, (B) plântulas anormais e (C) embriões não germinados a partir de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, em função das concentrações de sais minerais e sacarose, após 28 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

As concentrações de sacarose entre 10 a 40 g L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas na germinação de plântulas normais, anormais e de embriões não germinados (Figura 4A, B e C). No entanto, a ausência de sacarose nos meios de cultivo não é indicada para a germinação de embriões zigóticos

maduros de maracujazeiro-azedo, pois foi observada a menor porcentagem de germinação de plântulas normais (42,4%) e a maior porcentagem de formação de plântulas anormais (48,8%), em relação às demais concentrações de sacarose (Figura 4B e C).

Em grande parte dos protocolos, a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada para o cultivo de embriões, por desempenhar um papel importante na manutenção do potencial osmótico adequado dos meios de cultivo (Bridgen, 1994; Raghavan, 2003). Os carboidratos também são responsáveis pelo fornecimento de energia para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, oligossacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas et al., 1998). A sacarose é a forma de carbono que é transportável na maioria das plantas, sendo considerado o verdadeiro substrato para a respiração celular (Taiz e Zeiger, 2009). Além disso, alguns embriões, quando isolados e desprovidos do endosperma, são incapazes de germinar a partir das suas próprias reservas de carboidratos em meios de cultivo na ausência de sacarose (Bridgen, 1994; Raghavan, 2003). Portanto, para a germinação de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo é que a sacarose fornecida de maneira exógena é importante para o desenvolvimento e germinação dos embriões.

Para as variáveis de vigor das plântulas germinadas, a análise de variância mostrou interação significativa entre os sais minerais e a sacarose apenas para o número de raízes. As demais variáveis de altura da plântula, comprimento das raízes, massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total foram significativas apenas para as fontes de variação isoladas de sais minerais e sacarose (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância com os quadrados médios de dados biométricos na germinação *in vitro* de embriões maduros de maracujazeiro-azedo, após 28 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Altura da plântula	Número de raízes	Comprimento das raízes
Sais minerais (M)	3	456,95*	41,157*	1584,3*
Sacarose (S)	4	974,78*	42,127*	1369,8*
(M) x (S)	12	131,35 ^{ns}	8,234*	226,49 ^{ns}
Resíduo	58	134,28	2,551	120,04
Média geral		30,67	3,38	18,76
C.V. (%)		36,29	46,91	58,11

		Quadrado médio	
		Matéria fresca total	Matéria seca total
Sais minerais (M)	3	0,0052*	0,000042*
Sacarose (S)	4	0,0093*	0,000171*
(M) x (S)	12	0,0007 ^{ns}	0,000012 ^{ns}
Resíduo	58	0,0008187	0,00000498
Média geral		0,0713	0,0073
C.V. (%)		39,14	29,70

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

As maiores médias de número de raízes das plântulas foram obtidas quando os embriões foram germinados no meio de cultivo com $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose e nos meios com sais de MSM e $\frac{1}{2}$ MSM com 40 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de desdobramento da variável número de raízes, em função da interação entre as diferentes concentrações de sais minerais e sacarose, após 28 dias de germinação *in vitro* de embriões maduros de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)					Média
	0	10	20	30	40	
MS	1,0 Aa	2,31 Aa	2,73 Abc	2,38 Abc	1,7 Ab	2,02 c
½ MS	1,25 Ca	2,51 BCa	4,76 ABab	4,73 ABab	6,01 Aa	3,85 ab
MSM	1,0 Ba	1,90 Ba	1,58 Bc	1,66 Bc	6,22 Aa	2,42 bc
½ MSM	1,06 Ca	3,6 BCa	7,42 Aa	6,15 ABa	7,98 Aa	5,24 a
Média	1,07 C	2,58 BC	4,12 AB	3,73 B	5,47 A	3,38
C.V. (%)	46,91					

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Para as variáveis de vigor, altura da plântula (Figura 5A) e comprimento das raízes (Figura 5B), os sais minerais de ½ MSM apresentaram as maiores médias em relação aos demais sais minerais. Para as variáveis massa da matéria fresca e seca total (Figura 5C e D) os sais totais de MSM e ½ MSM apresentaram maiores médias em comparação aos sais de MS. De modo geral, as plântulas germinadas em meios com os sais minerais de MSM total e ½ MSM são mais vigorosas do que as plântulas germinadas em meios com os sais minerais de MS.

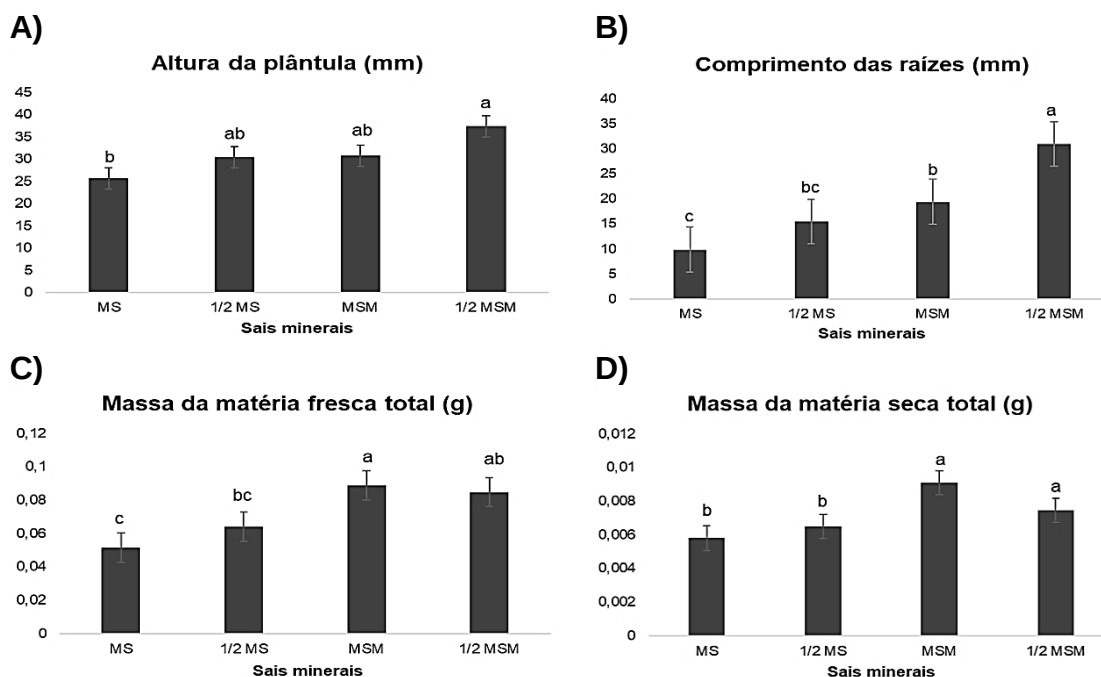


Figura 5. Médias de (A) altura da plântula, (B) comprimento das raízes, (C) massa da matéria fresca total e (D) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo oriundas de embriões zigóticos germinados *in vitro* em meios com diferentes concentrações de sais minerais, após 28 dias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

No que diz respeito às concentrações de sacarose, a ausência de sacarose também não foi satisfatória para o vigor das plântulas, de modo que apresentou as menores médias para altura das plântulas (Figura 6A), comprimento das raízes (Figura 6B), massa da matéria fresca total (Figura 6C) e massa da matéria seca total (Figura 6D). Isso porque a sacarose, no cultivo de embriões *in vitro*, é responsável por influenciar em vários processos metabólicos, possui efeito no crescimento e diferenciação dos tecidos vegetais e ainda mantém a concentração osmótica adequada para o desenvolvimento do embrião (Skrebsky et al., 2004).

A)

B)

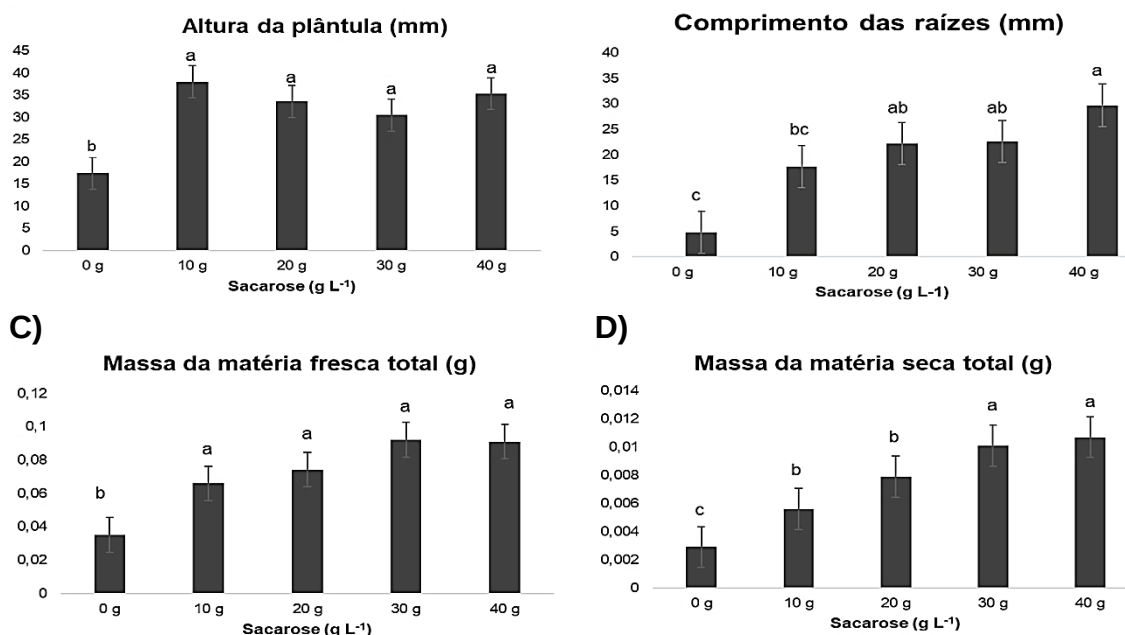


Figura 6. Médias de (A) altura da plântula, (B) comprimento das raízes, (C) massa da matéria fresca total e (D) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo, oriundas de embriões zigóticos maduros, após 28 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

A sacarose favoreceu a altura das plântulas (Figura 6A) e o acúmulo de matéria fresca total (Figura 6C). Para a variável comprimento das raízes (Figura 6B), as maiores médias foram obtidas com as concentrações de 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose. E para a variável massa da matéria seca total, as concentrações de 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose foram as que proporcionaram o maior acúmulo de matéria (Figura 6D). As concentrações entre 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose podem ser usadas para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo sem trazer prejuízos, tanto na germinação de plântulas normais quanto no vigor das plântulas (Figura 7). A determinação da melhor concentração de sacarose para o cultivo de embriões maduros vai depender da cultura (Bridgen, 1994; Raghavan, 2003). De modo que, alguns autores já relataram a necessidade da sacarose como fonte de carbono para o cultivo *in vitro* de embriões maduros de outras culturas como o murmurú (*Astrocaryum ulei*) (Pereira et al., 2006) e o pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) (Nunes et al., 2008).

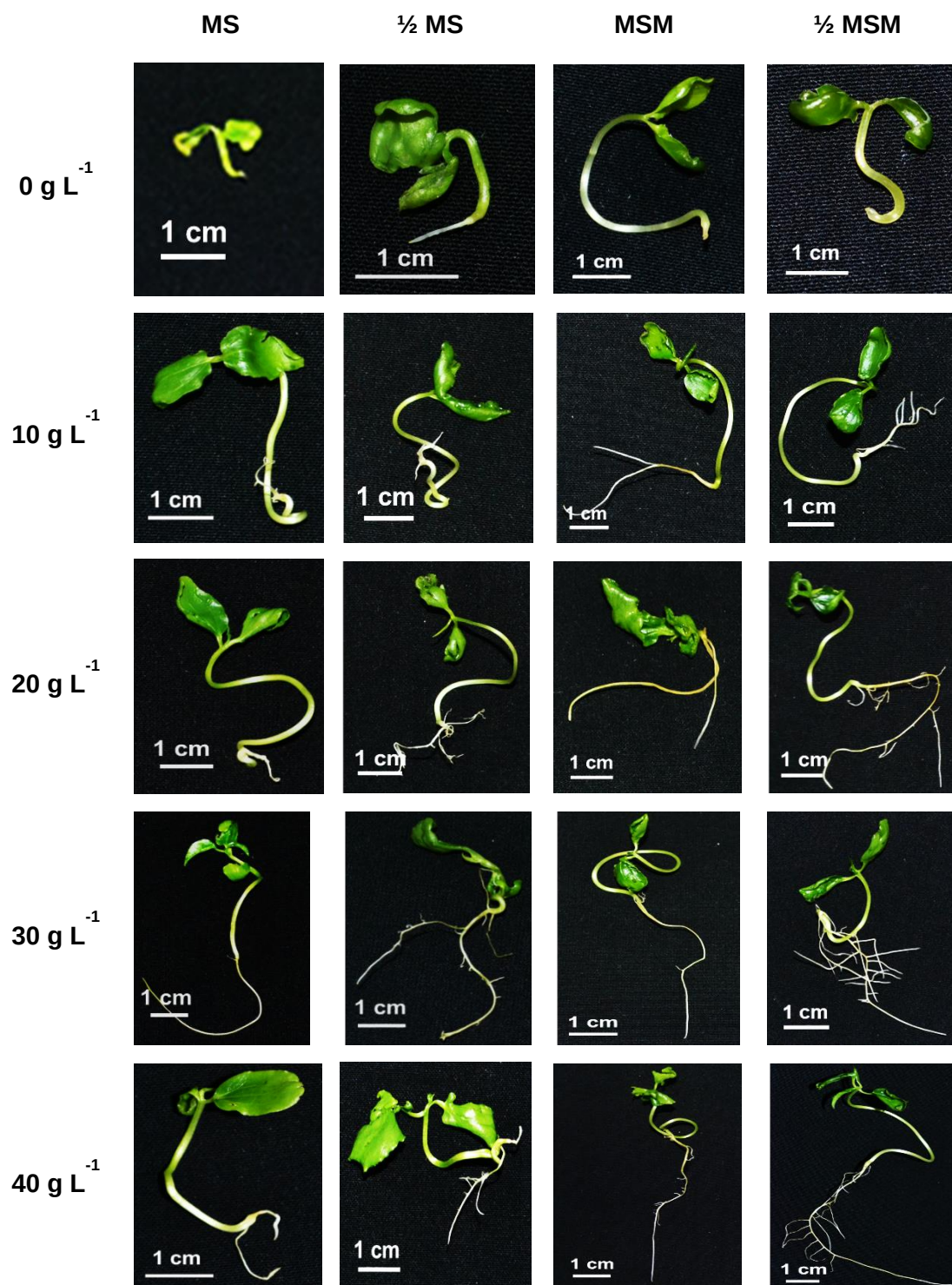


Figura 7. Plântulas normais de maracujazeiro-azedo oriundas da germinação de embriões zigóticos maduros em meios de cultivo com diferentes concentrações de sais minerais MS, $\frac{1}{2}$ MS, MSM e $\frac{1}{2}$ MSM, em combinação com cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹), após 28 dias.

Levando em consideração os resultados obtidos com as variáveis de germinação de plântulas normais e anormais (Figura 4) e das variáveis de vigor: altura da plântula, número de raízes, comprimento das raízes, massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total (Tabela 4 e Figura 5), o uso de $\frac{1}{2}$ MSM é o mais indicado para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo. Para as concentrações de sacarose, com os resultados obtidos para as variáveis de germinação de plântulas normais e anormais (Figura 4) e as variáveis de vigor: número de raízes (Tabela 4), comprimento das raízes, massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total (Figura 6), recomenda-se o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo.

3.1.4.3. Experimento de crescimento *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de plântulas oriundas do cultivo de embriões maduros

A determinação do melhor meio de cultivo para o crescimento das plântulas de maracujazeiro-azedo é importante para garantir o desenvolvimento vigoroso das plântulas obtidas a partir do cultivo de embriões maduros e, até mesmo, de embriões imaturos. Segundo Pereira et al. (2006), o meio de cultura adequado para o cultivo de embriões deve ser adaptado para cada espécie. Por isso, foi realizado o experimento de crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo.

A análise de variância do experimento de crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo, oriundas do cultivo de embriões zigóticos maduros isolados, mostrou interação significativa entre os sais minerais e a sacarose apenas para a variável massa da matéria seca da raiz. As demais variáveis de altura da planta, número de folhas, volume das raízes e massa da matéria seca da parte aérea foram significativas apenas para as fontes de variações isoladas de sais minerais e sacarose (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância com os quadrados médios do crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo após 45 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume de raiz
Sais minerais (M)	3	1283,47*	14,6587*	0,019*
Sacarose (S)	4	911,68*	1,0830 ^{ns}	0,0031 ^{ns}
(M) x (S)	12	73,59 ^{ns}	0,5848 ^{ns}	0,0016 ^{ns}
Resíduo	59	114,61	0,6570	0,0023
Média geral		68,82	6,61	0,13
C.V. (%)		15,55	12,25	34,83

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Matéria seca da parte aérea	Matéria seca da raiz	Matéria seca total
Sais minerais (M)	3	0,000327 ^{ns}	0,000257*	0,000935 ^{ns}
Sacarose (S)	4	0,004334*	0,000471*	0,007619*
(M) x (S)	12	0,0001952 ^{ns}	0,000055*	0,000414 ^{ns}
Resíduo	59	0,000152	0,000021	0,000225
Média geral		0,0724	0,0144	0,0868
C.V. (%)		17,06	32,16	17,7

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

O desdobramento da interação entre os sais minerais e a sacarose para a variável massa da matéria seca da raiz mostrou as maiores médias para as plântulas cultivadas nos meios com sais de MS, suplementados com 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose, ½ MS, suplementado com 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ e nos meios com sais ½ MSM, com 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de desdobramento da variável massa da matéria seca da raiz (g) em função da interação entre as diferentes concentrações de sais minerais e sacarose no crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo, após 45 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais	Sacarose (g L ⁻¹)					Média
	0	10	20	30	40	
MS	0,004 Ca	0,014 Ba	0,022 ABa	0,026 Aa	0,023 Aba	0,018 a
½ MS	0,006 Ba	0,017 Aa	0,019 Aab	0,019 Aa	0,018 Aab	0,015 a
MSM	0,006 Aa	0,010 Aa	0,008 Ac	0,010 Ab	0,011 Ab	0,009 b
½ MSM	0,005 Ca	0,011 BCa	0,012 BCbc	0,0189ABa	0,022 Aa	0,014 a
Média	0,005 C	0,013 B	0,0155AB	0,0185 A	0,0187 A	0,0143
C.V. (%)	32,16					

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Para a variável altura das plantas, os sais minerais de MSM, independente da concentração de sais, proporcionaram as maiores médias para altura das plântulas em relação aos sais totais de MS (Figura 8A). Os sais minerais de MSM total e ½ MSM apresentaram as maiores médias para o número de folhas, quando comparados aos sais de MS e ½ MS (Figura 8B). Para o volume das raízes, os sais minerais totais de MS e MSM foram os mais satisfatórios (Figura 8C). Já para a variável massa da matéria seca da parte aérea e total, não houve diferença entre os sais minerais estudados (Figura 8D e E).

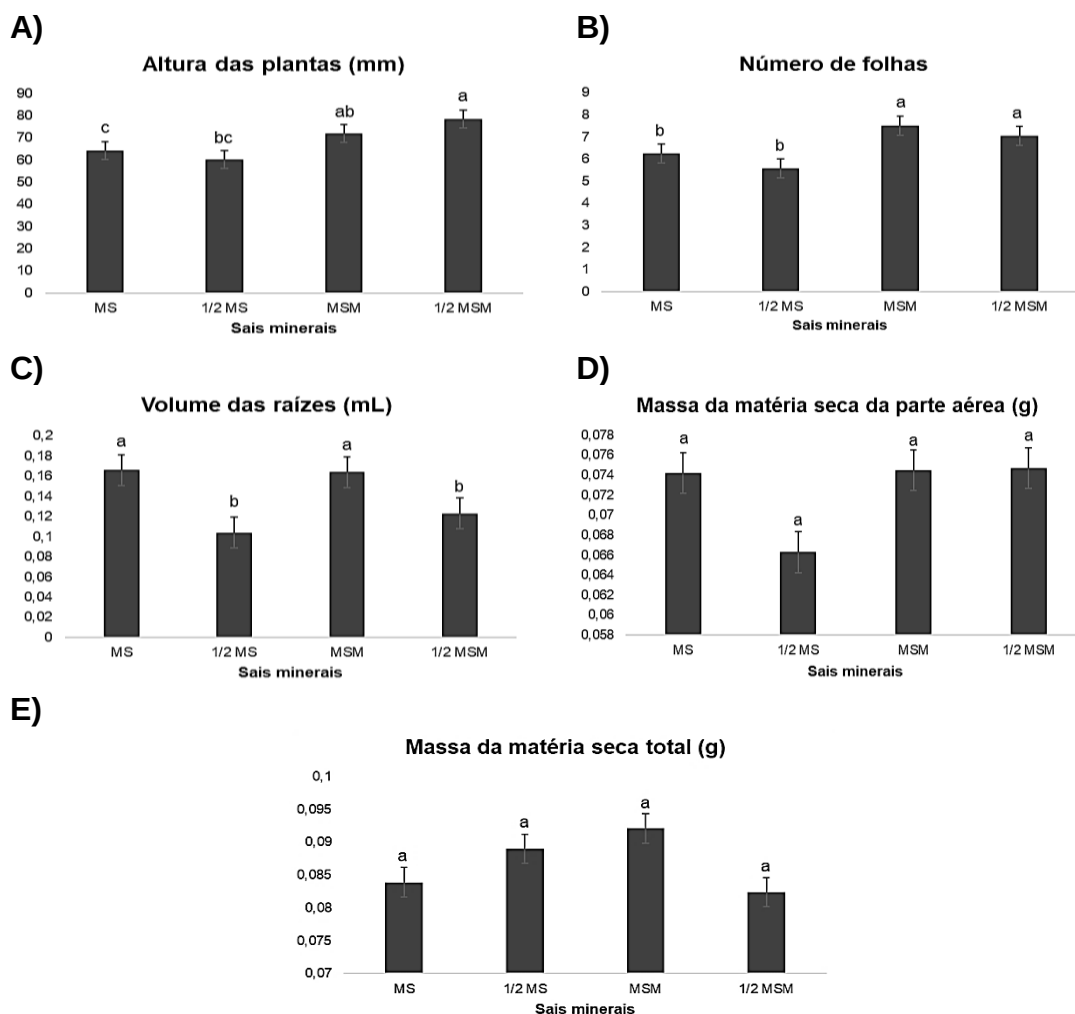


Figura 8. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca total de plântulas de maracujazeiro-azedo cultivadas *in vitro* por 45 dias em meios com diferentes concentrações de sais minerais. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

De modo geral os sais de MSM foram mais satisfatórios para o crescimento *in vitro* de plantas de maracujazeiro-azedo. O meio MS foi desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), baseado nos requerimentos nutricionais da folha do tabaco, e acabou se tornando o meio de cultivo mais utilizado na cultura de tecidos vegetais. No entanto, para o cultivo *in vitro* de maracujazeiro-azedo, alguns autores relataram sintomas de deficiência nutricional como clorose e diminuição do crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, em meios com sais de MS e 1/2 MS (Moran Robles, 1978; Kantharajah e Dodd, 1990; Dornelas e Vieira, 1994; Monteiro et al., 2000).

Tendo em vista as deficiências *in vitro* do maracujazeiro-azedo, Monteiro et al., (2000) desenvolveram o meio MSM, com a finalidade de ajustar a composição mineral do meio MS para o cultivo *in vitro* e multiplicação de maracujazeiro-azedo. As principais diferenças entre os meios MS e MSM estão na substituição do $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pelo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, retirada do KI, além de algumas diferenças nas concentrações dos demais sais de macronutrientes e micronutrientes (Tabela 1). Os resultados do presente trabalho comprovam a eficiência dos sais minerais MSM e $\frac{1}{2}$ MSM para o crescimento *in vitro* das plantas de maracujazeiro-azedo, em comparação com os sais minerais de MS (Figura 8).

No crescimento *in vitro* das plântulas, a ausência de sacarose trouxe prejuízos para a altura das plantas (Figura 9A) e para o acúmulo de matéria seca na parte aérea (Figura 9D) e no total (Figura 9E). Porém, não houve diferença significativa no número de folhas e volume das raízes, entre as concentrações estudadas (Figura 9B e C).

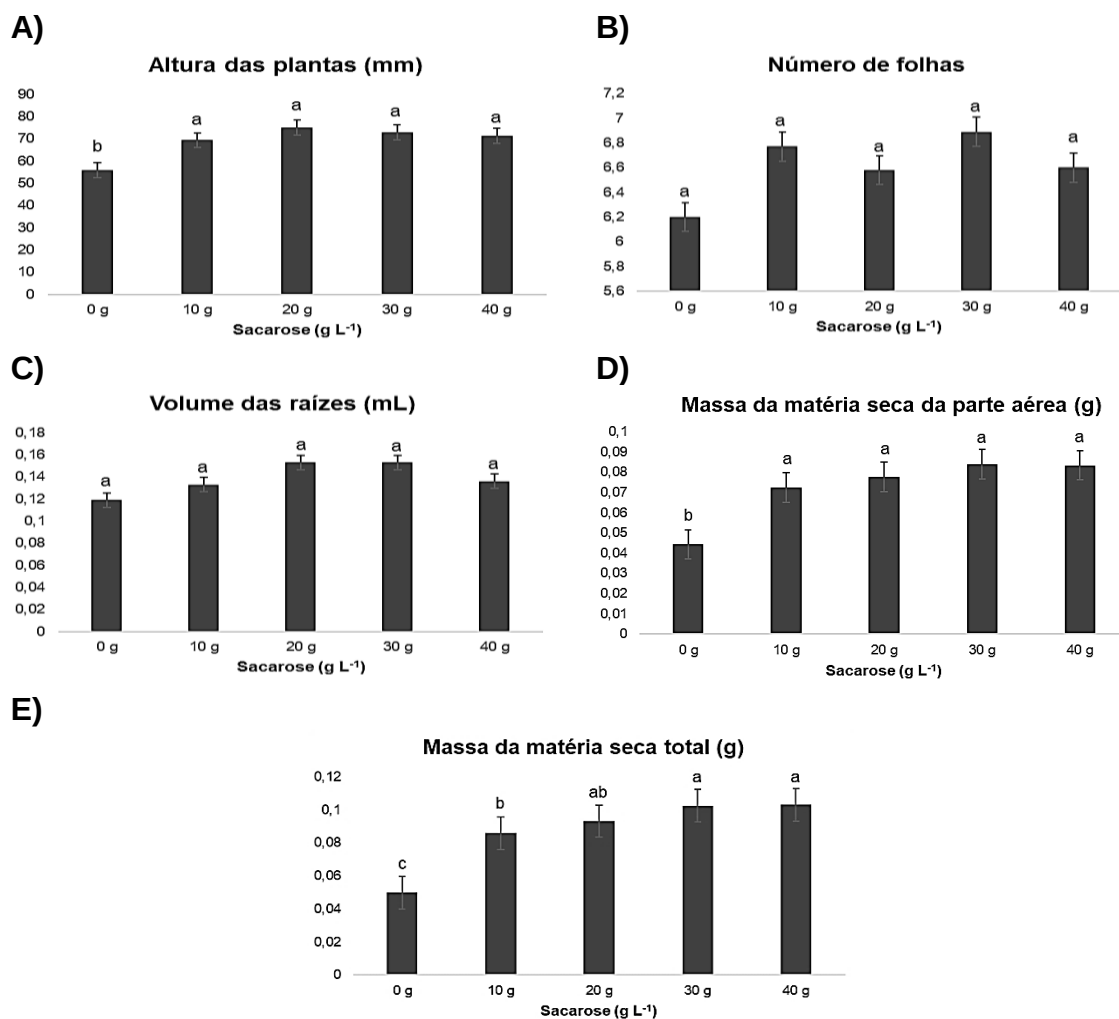


Figura 9. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo, após 45 dias de cultivo *in vitro*, em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

Na literatura é relatado que cerca de 85% da biomassa nos cultivos *in vitro* é devida à incorporação de carbono na forma de sacarose ao meio de cultura (Stancato e Tucci, 2010). Por isso, para muitas espécies, uma fonte de carbono exógena como a sacarose é essencial para garantir a sobrevivência de explantes *in vitro*, com a finalidade de substituir o carbono, que a planta, em condições naturais, retira da atmosfera por meio da fotossíntese, além de atuar como agente osmótico (George et al., 2008). Por isso, houve menor crescimento das plântulas de maracujazeiro-azedo cultivadas em meios sem sacarose. Cruz, (2016) também relatou a importância de uma fonte de carbono exógena para a altura de plântulas de *P. tenuifolia* cultivadas *in vitro*.

Mesmo sem apresentar diferença estatística para o crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo com concentrações de sacarose entre 10 e 40 g L⁻¹ (Figura 9), a concentração utilizada na grande maioria dos trabalhos *in vitro* de maracujazeiro-azedo, tanto para o meio MS quanto para o meio MSM, é 30 g L⁻¹ (Monteiro et al., 2000; Isutsa, 2004; Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Rocha et al., 2012; Shekhawat et al., 2015).

As mudas oriundas do experimento de crescimento *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e sais minerais foram aclimatizadas por um período de 35 dias e houve 100% de sobrevivência das mudas aclimatizadas. A aclimatização, após o cultivo *in vitro* de plantas de maracujazeiro-azedo, costuma ser relatada com sucesso por alguns autores, mesmo em diferentes condições de cultivo *in vitro*. Shekhawat et al., (2015) obtiveram cerca de 88% de sobrevivência de plantas aclimatizadas, após o cultivo *in vitro* em meios com sais de MS. Em outras espécies do gênero *Passiflora*, a aclimatização bem sucedida de plantas, após o cultivo *in vitro* em meios com os sais minerais MS e MSM, também já foi relatada por Becerra et al., (2004), Busilacchi et al., (2008); Garcia et al., (2011a) e Pacheco et al., (2012).

Na análise de variância das mudas aclimatizadas houve diferença significativa apenas para os sais minerais da variável altura da planta. As demais variáveis não apresentaram diferença nem interação significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 35 dias de aclimatização de plantas de maracujazeiro-azedo oriundas do crescimento *in vitro* em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume de raiz
Sais minerais (M)	3	16,973*	0,5926 ^{ns}	0,601 ^{ns}
Sacarose (S)	4	11,142 ^{ns}	1,2214 ^{ns}	0,034 ^{ns}
(M) x (S)	12	3,711 ^{ns}	0,7193 ^{ns}	0,368 ^{ns}
Resíduo	39	4,404	1,1959	0,356
Média geral		11,04	7,22	2,06
C.V. (%)		19,0	15,12	28,96

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Massa seca da parte aérea	Massa seca da raiz	Massa seca total
Sais minerais (M)	3	0,0582 ^{ns}	0,0046 ^{ns}	0,0936 ^{ns}
Sacarose (S)	4	0,0064 ^{ns}	0,0017 ^{ns}	0,0106 ^{ns}
(M) x (S)	12	0,0270 ^{ns}	0,0038 ^{ns}	0,0463 ^{ns}
Resíduo	39	0,0452	0,0032	0,0692
Média geral		0,5079	0,21	0,7179
C.V. (%)		41,88	27,18	36,6

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os sais minerais de MS total, $\frac{1}{2}$ MS e MSM total proporcionaram as maiores médias para a altura das plantas aclimatizadas (Figura 10A). As demais variáveis de número de folhas (Figura 10B), volume das raízes (Figura 10C), massa da matéria seca da parte aérea (Figura 10D), massa da matéria seca das raízes (Figura 10E) e massa da matéria seca da parte aérea (Figura 10F) não apresentaram diferença entre os sais minerais estudados, após 35 dias de aclimatização.

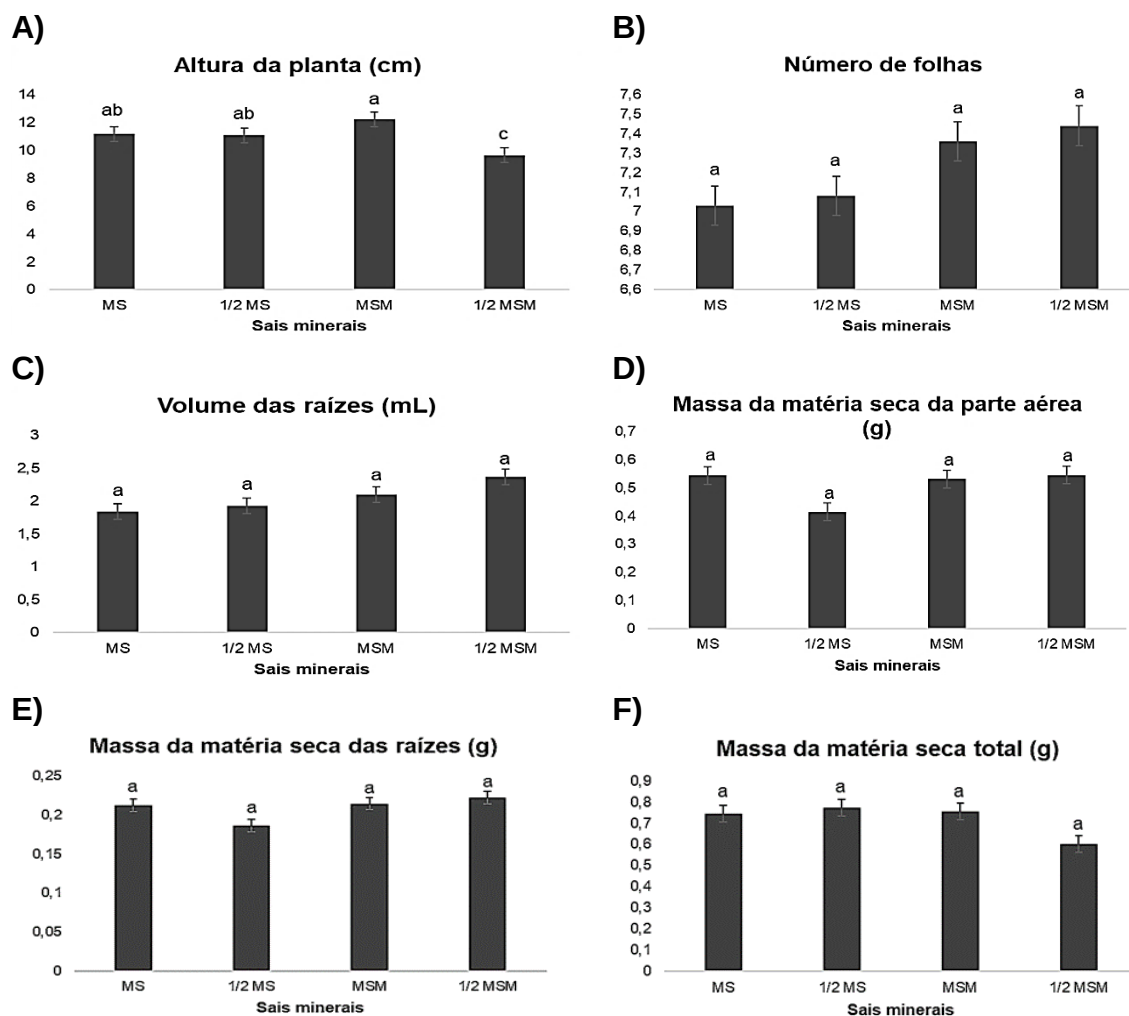


Figura 10. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume de raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea, (E) massa da matéria seca das raízes e (F) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo, após 35 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro* em meios com diferentes concentrações de sais minerais. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

Em relação às concentrações de sacarose, todas as variáveis estudadas de altura da planta (Figura 11A), número de folhas (Figura 11B), volume das raízes (Figura 11C), massa da matéria seca da parte aérea (Figura 11D), massa da matéria seca das raízes (Figura 11E) e massa da matéria seca total (Figura 11F) não apresentaram diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quando cultivadas *in vitro*, as plantas não são completamente dependentes da sua fotossíntese e, por isso, a sacarose é adicionada ao meio de cultivo. Porém, quando elas são aclimatizadas, a sacarose deixa de ser fornecida e as

plantas passam a ser capazes de produzir sua própria fonte de carbono por meio da fotossíntese (Marin e Gella, 1987). Sendo assim, após 35 dias de aclimatização, as plantas de maracujazeiro-azedo não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das concentrações de sacarose, em todas as variáveis estudadas (Figura 11).

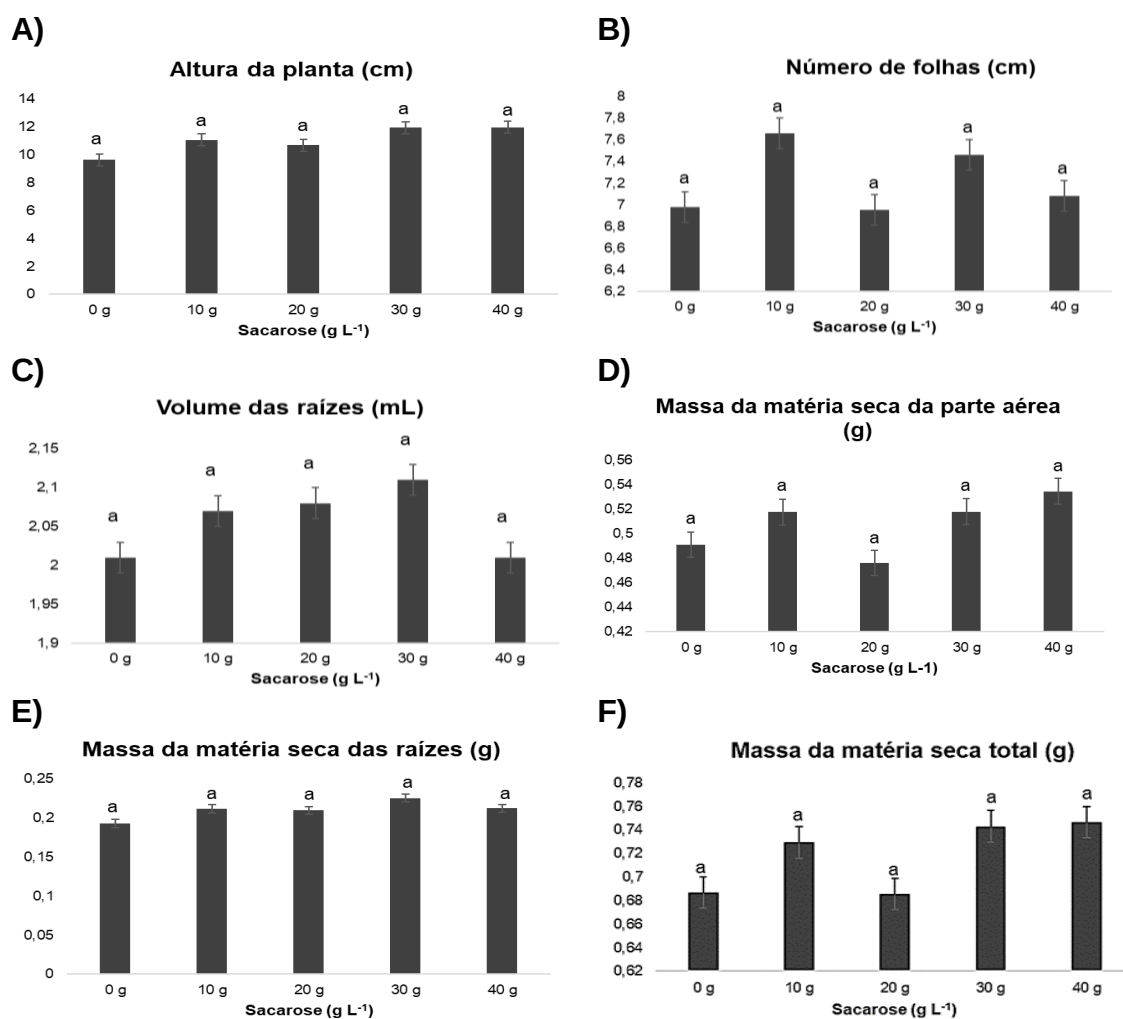


Figura 11. (A) Altura das plantas, (B) número de folhas, (C) volume de raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea, (E) massa da matéria seca das raízes e (F) massa da matéria seca total de plantas de maracujazeiro-azedo, após 35 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro* em meios com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

De modo geral, quando comparamos a eficiência dos sais minerais utilizados no crescimento *in vitro*, para as variáveis biométricas: altura das

plantas, número de folhas e volume das raízes (Figura 8) e na aclimatização para a variável altura das plantas (Figura 10), verifica-se que os sais minerais de MSM total foram mais satisfatórios. Já para as concentrações de sacarose no crescimento *in vitro*, os resultados obtidos para a massa da matéria seca total (Figura 9) indicam o uso de 30 ou 40 g L⁻¹ de sacarose para o crescimento de plântulas oriundas de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo. Como não há diferença no crescimento *in vitro* e durante a aclimatização, sugere-se o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose.

3.1.4.4. Experimento de germinação de embriões zigóticos imaturos

Como ainda não havia sido relatado na literatura, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de nenhuma espécie do gênero *Passiflora*, foi necessária a identificação dos dias em que os frutos de maracujazeiro-azedo deveriam ser coletados para que fosse possível verificar os estádios embrionários.

Em geral, o crescimento dos frutos é influenciado por fatores genéticos e ambientais, como temperatura, radiação solar e precipitação (Berilli et al., 2007). Na região de Campos dos Goytacazes-RJ, os frutos de maracujazeiro-azedo levam cerca de 100 dias, desde a antese até sua coleta com a casca totalmente amarela (Vianna-Silva et al., 2008).

Nos frutos com 12 e 18 dias após a polinização (DAP), não foram encontrados embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento, por estarem em tamanho tão reduzido que impossibilitou a observação e localização dos mesmos em microscópio estereoscópio (Tabela 8). Em uma análise morfoanatômica do desenvolvimento embriológico zigótico de maracujazeiro-azedo, Silveira (2014) observou que aos 12 DAP ocorreu a primeira divisão do zigoto, a qual foi assimétrica e deu origem a duas células distintas, uma célula apical de menor tamanho e uma célula basal maior e vacuolizada.

Nos frutos com 20 a 24 DAP, foi possível detectar todos os estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) dos embriões zigóticos imaturos de maracujazeiro-azedo (Tabela 8).

Tabela 8. Dados médios de dois frutos de maracujazeiro-azedo coletados para a identificação dos estádios de desenvolvimento globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar dos embriões zigóticos imaturos. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Dias após a polinização	Estádios	Dados dos Frutos
12	Não encontrados	Comprimento do fruto: 75,54 mm Diâmetro do fruto: 58,07 mm Coloração do fruto: verde Coloração do arilo: não observado Coloração da semente: branca Comprimento da semente: 3,98 mm
18	Não encontrados	Comprimento do fruto: 83,04 mm Diâmetro do fruto: 63,52 mm Coloração do fruto: verde Coloração do arilo: não observado Coloração da semente: branca Comprimento da semente: 5,72 mm
20	Globular Cordiforme	Comprimento do fruto: 90,03 mm Diâmetro do fruto: 74,2 mm Coloração do fruto: verde Coloração do arilo: branco Coloração da semente: branca Comprimento da semente: 8,61 mm
22	Globular Cordiforme Torpedo	Comprimento do fruto: 92,47 mm Diâmetro do fruto: 79,34 mm Coloração do fruto: verde Coloração do arilo: branco Coloração da semente: branca Comprimento da semente: 12,86 mm
24	Cordiforme Torpedo Cotiledonar	Comprimento do fruto: 93,65 mm Diâmetro do fruto: 87,01 mm Coloração do fruto: verde Coloração do arilo: amarelado Coloração da semente: branca Comprimento da semente: 17,52 mm

Observa-se uma mudança de fase de desenvolvimento embrionário muito rapidamente, com diferença de apenas um dia. Além disso, em apenas um fruto foi possível encontrar embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (Tabela 8). Os estudos, sobre o cultivo de embriões imaturos em outras culturas, também relatam a presença de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo fruto (Ribeiro et al., 1999; Manzur et al., 2013; Walter et al., 2018 no prelo). Manzur et al. (2013) observaram em espécies do gênero *Capsicum* que a velocidade da mudança de estágio é dependente do genótipo, com 16 DAP em *C. frutescens* e 27 DAP em acessos de *C. annuum*

Bola e California Wonder. Já no resgate de embriões de cruzamentos entre *Citrus sinensis* Osb. cv. Natal com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., Ribeiro et al. (1999) encontraram embriões zigóticos nos estádios globular e cordiforme em sementes com 130 a 150 DAP.

Os resultados obtidos no experimento de cultivo *in vitro* de embriões maduros de maracujazeiro-azedo foram o ponto de partida para o estabelecimento da concentração de sais minerais na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e no estabelecimento do meio para o crescimento das plântulas.

A análise de variância da germinação de embriões zigóticos imaturos heterotróficos mostrou significância ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, apenas para a sacarose para a variável plântulas normais (Tabela 9). Em virtude do baixo número de germinação de plântulas normais e anormais com muitos valores iguais a zero, o coeficiente de variação na análise de variância foi alta (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios na germinação *in vitro* de embriões imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) de maracujazeiro-azedo, após 37 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Plântulas normais	Plântulas anormais	Embriões não germinados
Sacarose (S)	4	0,9000*	0,6083 ^{ns}	1,7916 ^{ns}
Fitorreguladores (R)	3	0,1500 ^{ns}	0,2444 ^{ns}	0,4611 ^{ns}
(S) x (R)	12	0,2888 ^{ns}	0,3416 ^{ns}	0,6694 ^{ns}
Resíduo	39	0,3748	0,5446	1,3366
Média geral		5,4	7,5	87,1
C.V. (%)		259,11	227,04	25,12

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

As maiores porcentagens de germinação de embriões zigóticos imaturos heterotróficos em plântulas normais foi obtida em meios com 20, 40 e 60 g L⁻¹ de sacarose (17%, 4,5% e 6,5%, respectivamente) (Figura 12).

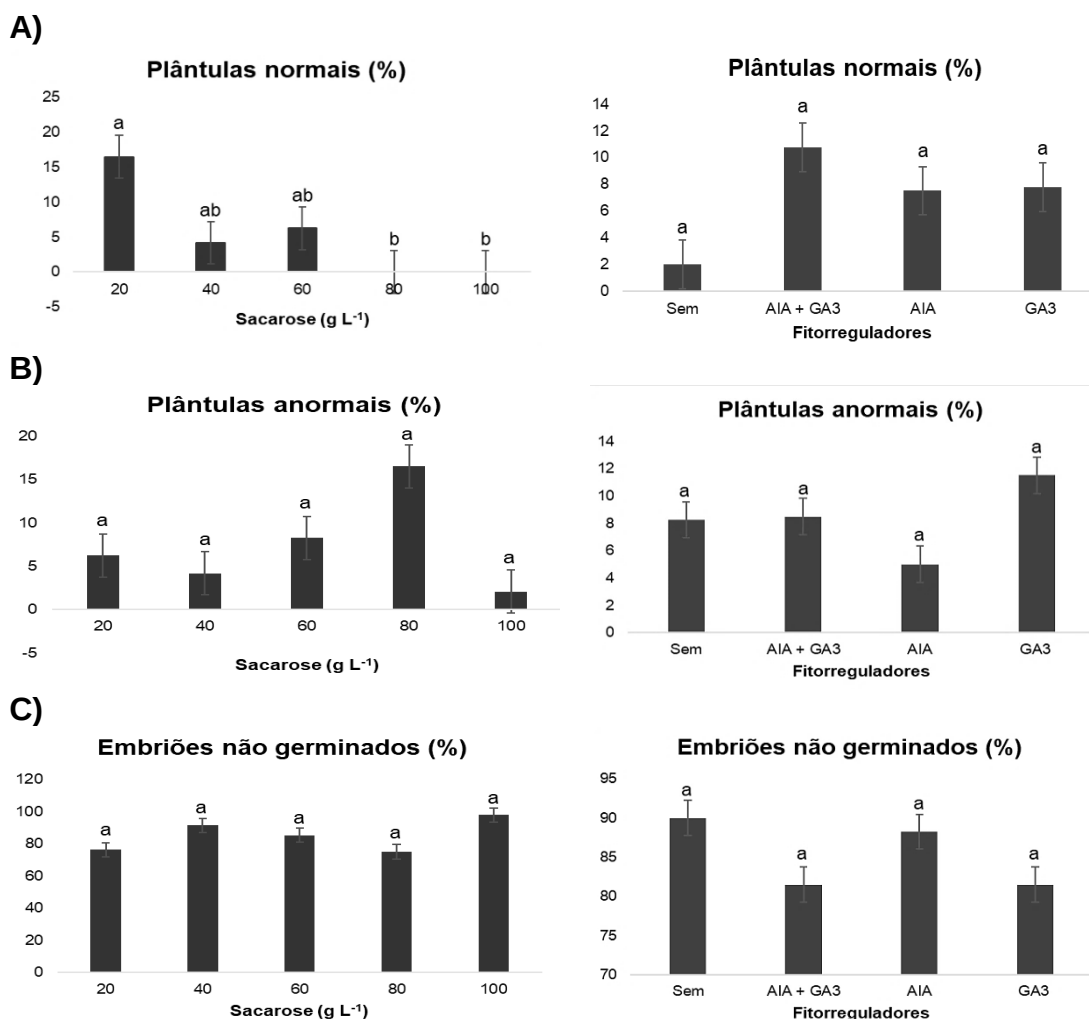


Figura 12. Porcentagens de germinação de (A) plântulas normais, (B) plântulas anormais e (C) embriões não germinados de embriões zigóticos imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) isolados de maracujazeiro-azedo em função das concentrações de sacarose e fitorreguladores, após 37 dias de germinação *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação à exigência de sacarose para a germinação *in vitro* de embriões imaturos de diversas culturas como bolsa-de-pastor (*Capsella bursa-pastoris*) (Monnier, 1984), laranja (Chagas et al., 2003) e limão (Viloria et al., 2005), os autores relatam a necessidade do uso de elevadas concentrações de sacarose, entre 80 a 120 g L⁻¹, para a germinação de embriões heterotróficos. Porém, os resultados deste trabalho demonstram o contrário, pois as maiores porcentagens de germinação de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo se deu em meios suplementados com as menores concentrações de sacarose 20, 40 e 60 g L⁻¹ (Figura 12), sendo suficiente para

que os embriões fossem capazes de germinar. Portanto, mesmo em baixas concentrações a sacarose é necessária para a germinação de embriões imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo.

A sacarose presente no meio de cultura é a principal fonte de energia para o embrião, atua na formação do esqueleto de carbono, sendo efetiva sobre o crescimento e diferenciação celular e ajudando a manter a osmolaridade do meio de cultivo (Skrebsky et al., 2004). Além disso, o papel da sacarose durante a germinação, também, está relacionado ao transporte e a transdução de auxinas e atuam como moléculas de sinalização para regular a expressão gênica (Moore et al., 2003; Wind et al., 2010; Stokes et al., 2013). Manzur et al., (2013) observaram em embriões globulares e cordiformes de *Capsicum*, maiores porcentagens de germinação em meios com 40 g L⁻¹ de sacarose.

As plântulas normais de maracujazeiro-azedo foram transferidas para o meio de crescimento onde permaneceram durante 35 dias. Em seguida as plantas sobreviventes foram aclimatizadas. Após 35 dias de aclimatização foi observado 100% de sobrevivência das plântulas levadas para a casa de vegetação. Porém, apenas cinco tipos de meios de cultivo (20 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃, 20 g L⁻¹ de sacarose + GA₃, 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃, 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃ e 60 g L⁻¹ de sacarose + GA₃) foram capazes de fornecer as condições ideais para que os embriões imaturos heterotróficos fossem capazes de crescer até a aclimatização (Figura 13).



Figura 13. Plantas oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos heterotróficos (globular e cordiforme) de maracujazeiro-azedo após 35 dias de aclimatização. (A) 20 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; (B) 20 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; (C) 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; (D) 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; (E) 60 g L⁻¹ de sacarose + GA₃.

Embora para a germinação dos embriões imaturos heterotróficos o uso ou não de AIA e GA₃ em combinação ou isolados não apresentou diferença significativa (Figura 12), apenas as plântulas oriundas de embriões cultivados em meios, contendo AIA e GA₃ em combinação ou com apenas GA₃, foram capazes de serem aclimatizadas (Figura 13).

Em relação à atuação dos fitorreguladores, as auxinas possuem uma função chave na regulação e estabelecimento do eixo embrionário para a germinação (Hamann, 2001), por isso, quando fornecido no meio de cultura em baixas concentrações favorecem o crescimento normal do embrião (Takahashi et al., 1991; Bridgen 1994; Manzur et al., 2014; Taiz e Zeiger, 2009). Além disso, as auxinas como o AIA podem promover o crescimento de raízes primárias, hipocótilos e cotilédones (Machakova et al., 2008). Já as giberelinas são produzidas pelo eixo embrionário e estimulam a produção de enzimas hidrolíticas para a degradação das reservas das sementes que vão nutrir e sustentar o desenvolvimento do eixo embrionário (Taiz e Zeiger, 2009). As giberelinas, quando fornecidas em baixas concentrações no meio de cultivo, podem promover o crescimento dos embriões (Monnier, 1995; Moshkov et al., 2008). Desse modo, os resultados obtidos neste experimento, em que somente as plântulas germinadas em meios com fitorreguladores foram capazes de serem levadas para

a aclimatização, revelam a necessidade de suplementação com $0,0571 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIA + $0,0289 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 ou de apenas $0,0289 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 , para a germinação de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo.

A análise de variância da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos autotróficos (torpedo e cotiledonar) isolados de maracujazeiro-azedo mostrou significância para a sacarose e para os fitorreguladores para a variável plântulas normais (Tabela 10). Já para as variáveis plântulas anormais e embriões não germinados, houve interação significativa entre a sacarose e os fitorreguladores pelo teste F a 5% de probabilidade (Tabela 10).

Tabela 10. Resumo da Análise de variância com os quadrados médios na germinação *in vitro* de embriões imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo, após 37 dias de cultivo em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Plântulas normais	Plântulas anormais	Embriões não germinados
Sacarose (S)	4	14,10*	1,06*	11,76*
Fitorreguladores (R)	3	2,06*	1,57*	3,88*
(S) x (R)	12	0,90 ^{ns}	2,46*	2,91*
Resíduo	40	0,53	0,63	0,4
Média geral		35,8	28,5	34,9
C.V. (%)		38,58	52,98	42,18

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

A média geral de porcentagem de germinação de plântulas normais de embriões imaturos autotróficos (torpedo e cotiledonar) (35,8%) (Tabela 10) aumentou em comparação com a germinação de embriões heterotróficos (globular e cordiforme) (5,4%) (Tabela 9). A eficiência do cultivo *in vitro* de embriões imaturos aumenta gradualmente com o desenvolvimento do embrião (Bridgen, 1994). Esse fato já foi comprovado por diversos autores e em diferentes culturas (Viloria et al., 2005; Nunes et al., 2008; Manzur et al., 2013; Manzur et al., 2014; Walter et al., 2018 no prelo). Isso ocorre porque nos estádios iniciais do desenvolvimento os embriões globulares e cordiforme são altamente dependentes

da nutrição do endosperma e dos tecidos maternos. Posteriormente, nos estádios torpedos e cotiledonares os embriões já são metabolicamente capazes de sintetizar as substâncias necessárias para o seu crescimento (Raghavan, 1966; Ramming, 1990; Bhojwani e Razdan, 1996).

Houve alta porcentagem de germinação de plântulas anormais em meios com 80 g L⁻¹ de sacarose suplementado com AIA e GA₃ ou GA₃ e em meios com 100 g L⁻¹ de sacarose sem fitorreguladores e com AIA e GA₃ (Tabela 11). Segundo Thorpe (1995) e Finch-Savage et al. (1992), durante a germinação, o eixo embrionário precisa atingir um limiar de embebição, porém a rápida ou lenta embebição pode levar à formação de plântulas anormais. Assim, as altas concentrações de sacarose em combinação com os fitorreguladores utilizados modificaram o potencial osmótico do meio de cultura, o que pode ter dificultado a embebição de água pelos embriões imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo.

Tabela 11. Análise de desdobramento da variável plântulas anormais em função da interação entre as diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores após 37 dias de germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sacarose (g L ⁻¹)	Fitorreguladores				Média
	Sem	AIA + GA ₃	AIA	GA ₃	
20	8,25 ABb	16,5 Aab	50,0 Aa	0,0 Bb	18,7 b
40	41,5 Aab	41,5 Aa	41,5 Aa	25,0 Aab	37,4 a
60	33,3 Aab	16,5 Aab	50,0 Aa	0,0 Bb	24,5 ab
80	25,0 ABab	50,0 Aa	0,0 Bb	57,5 Aa	33,1 ab
100	57,5 Aa	41,5 ABA	16,5 BCab	0,0 Cb	28,9 ab
Média	33,1 A	33,2 A	31,6 A	16,4 B	28,5
C.V. (%)	52,98				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05).

As maiores porcentagens de não germinação dos embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo foi observada nos meios de cultivo suplementados com 80 e 100 g L⁻¹ de sacarose em combinação com fitorreguladores (Tabela 12). Segundo Liu et al. (1993) e Manzur et al. (2014), o excesso de auxinas para o cultivo de embriões imaturos podem promover um

efeito inibitório. Portanto, a combinação entre as altas concentrações de sacarose e o uso de fitorreguladores inibiram a germinação dos embriões imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de desdobramento da variável embriões não germinados em função da interação entre as diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores após 37 dias de germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sacarose (g L ⁻¹)	Fitorreguladores				Média
	Sem	AIA + GA ₃	AIA	GA ₃	
20	16,5 Aab	0,0 Ab	16,5 Ac	16,5 Ac	12,4 b
40	0,0 Bb	0,0 Bb	16,5 ABc	25,0 BCc	10,4 b
60	41,5 Aa	50,0 Aa	25,0 ABb	50,0 Aab	41,6 a
80	8,25 Cb	50,0 ABa	100,0 Aa	25,0 BCc	45,8 a
100	16,5 Bab	57,5 ABa	83,3 Aab	100,0 Aa	64,3 a
Média	16,5 B	31,5 AB	48,3 A	43,3 A	34,9
C.V. (%)	42,18				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a germinação de plântulas normais de embriões imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo as melhores concentrações de sacarose foram com 20 g L⁻¹ (70,75%) e 40 g L⁻¹ (54%), além disso, observou-se um decréscimo gradual da germinação, conforme a concentração de sacarose aumentava (Figura 14). Os embriões imaturos nos estádios torpeda e cotiledonar crescem bem em concentrações mais baixas de sacarose (Monnier, 1995; Bhojwani e Razdan, 1996). Dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento dos embriões, a presença de sacarose no meio de cultura pode ser em baixas concentrações ou até mesmo dispensável em razão dos embriões serem capazes de utilizar a energia necessária a partir das próprias reservas para germinar *in vitro* (García et al., 2002).

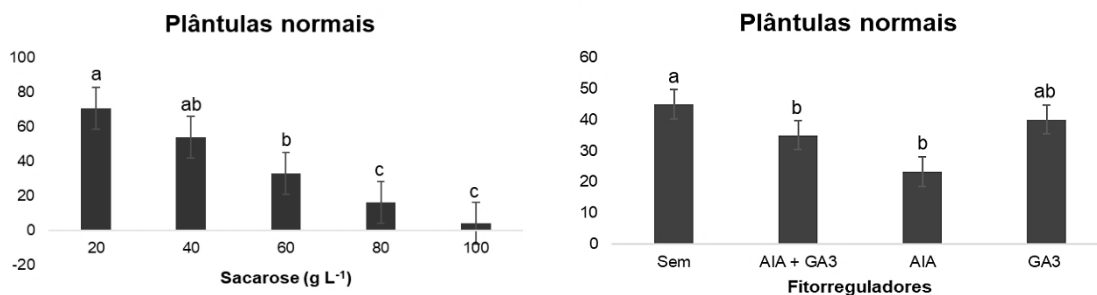


Figura 14. Porcentagem de germinação *in vitro* de plântulas normais oriundas de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo em função das concentrações de sacarose e fitorreguladores, após 37 dias de germinação. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

O aumento das concentrações de sacarose (60, 80 e 100 g L⁻¹) foi prejudicial para a germinação de plântulas normais, a partir dos embriões imaturos autotróficos (33,25, 16,5 e 4%, respectivamente) (Figura 14). A sacarose em concentrações elevadas pode prejudicar a germinação dos embriões, afetando o processo de embebição do embrião, devido ao aumento da pressão osmótica do meio de cultivo (Lippman e Lippmann, 1984).

O uso de fitorreguladores no meio de cultivo em baixas concentrações é indicado para facilitar o cultivo de embriões *in vitro*, porém, em muitos casos, os fitorreguladores fornecidos de forma exógena não são necessários (Monnier, 1996). Para embriões imaturos autotróficos (torpedo e cotiledonar) de maracujazeiro-azedo, o uso de fitorreguladores pode ser dispensável para germinação de plântulas normais, sendo os melhores resultados obtidos sem fitorreguladores (45%) ou com o uso de 0,0289 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GA₃ (40%) (Figura 14). Walter et al. (2018 no prelo) também relatam a eficiência do cultivo de embriões zigóticos imaturos nos estádios torpedo e cotiledonar de *C. baccatum* e *frutescens* sem o uso dos fitorreguladores AIA e GA₃.

As plântulas normais de maracujazeiro-azedo foram transferidas para o meio de crescimento, onde permaneceram durante 35 dias. Em seguida, as plantas sobreviventes foram aclimatizadas e dezesseis tipos de meios de cultivo foram capazes de fornecer as condições ideais para que os embriões imaturos autotróficos fossem capazes de crescer até a aclimatização.

Na aclimatização das plantas oriundas do cultivo *in vitro* de embriões imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo, houve diferença significativa

apenas para a variável número de folhas (Tabela 13). As demais variáveis altura da planta, volume das raízes, massa da matéria seca da parte aérea, raízes e total não apresentaram diferença significativas entre os tratamentos pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 13).

Tabela 13. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 35 dias na aclimatização de maracujazeiro-azedo para os efeitos da germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos autotróficos cultivados em meios com diferentes concentrações de sacarose e fitorreguladores. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume de raiz
Tratamento	15	66,03 ^{ns}	8,2867*	0,4147 ^{ns}
Resíduo	14	968,9	3,1044	0,6133
Média geral		62,79	7,91	1,26
C.V. (%)		24,66	22,26	34,18

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		Massa seca da parte aérea	Massa seca da raiz	Massa seca total
Tratamento	15	0,0212 ^{ns}	0,0032 ^{ns}	0,03955 ^{ns}
Resíduo	14	0,0548	0,0058	0,0935
Média geral		0,2506	0,0949	0,3455
C.V. (%)		55,08	50,09	53,27

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Na aclimatização das plântulas oriundas do cultivo de embriões zigóticos imaturos de maracujazeiro-azedo, o tratamento constituído pela combinação de 60 g L⁻¹ de sacarose e AIA apresentou o menor número de folhas em relação aos tratamentos com 80 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃, 80 g L⁻¹ de sacarose + GA₃ e 100 g L⁻¹ de sacarose sem fitorregulador.

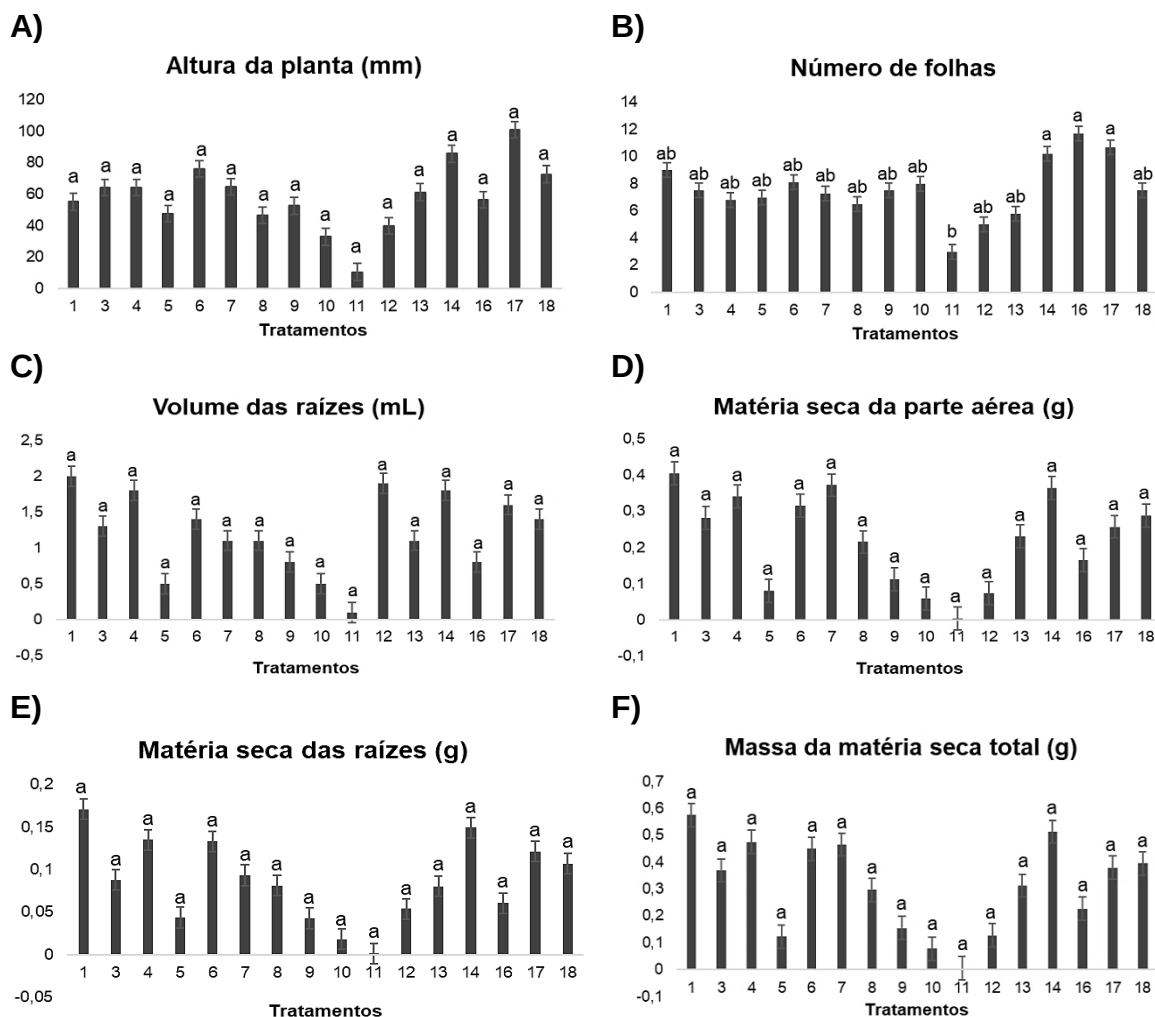


Figura 15. (A) Altura da plântula, (B) número de folhas, (C) volume das raízes, (D) massa da matéria seca da parte aérea e (E) massa da matéria seca das raízes, na aclimatização de plântulas normais de maracujazeiro-azedo oriundas do cultivo de embriões zigóticos imaturos autotróficos. Legenda dos tratamentos: 1) 20 g L⁻¹ de sacarose; 3) 20 g L⁻¹ de sacarose + AIA; 4) 20 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; 5) 40 g L⁻¹ de sacarose; 6) 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; 7) 40 g L⁻¹ de sacarose + AIA; 8) 40 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; 9) 60 g L⁻¹ de sacarose; 10) 60 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; 11) 60 g L⁻¹ de sacarose + AIA; 12) 60 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; 13) 80 g L⁻¹ de sacarose; 14) 80 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃; 16) 80 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; 17) 100 g L⁻¹ de sacarose; 18) 100 g L⁻¹ de sacarose + AIA e GA₃. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Levando em consideração os resultados obtidos na germinação de plântulas normais (Figura 12) e na aclimatização (Figura 13) do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo, é indicado o uso 20 g L⁻¹ de sacarose em combinação com os fitorreguladores AIA e GA₃ ou

de apenas GA₃. Já os resultados obtidos na germinação de plântulas normais (Figura 14) do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo, é indicado o uso de 20 g L⁻¹ de sacarose sem o uso dos fitorreguladores ou com a adição de apenas GA₃ (Figura 16). Porém, novas investigações com baixas concentrações de sacarose e de GA₃ devem ser realizadas para melhorar a eficiência do cultivo de embriões nos estádios globular e cordiforme (heterotróficos).

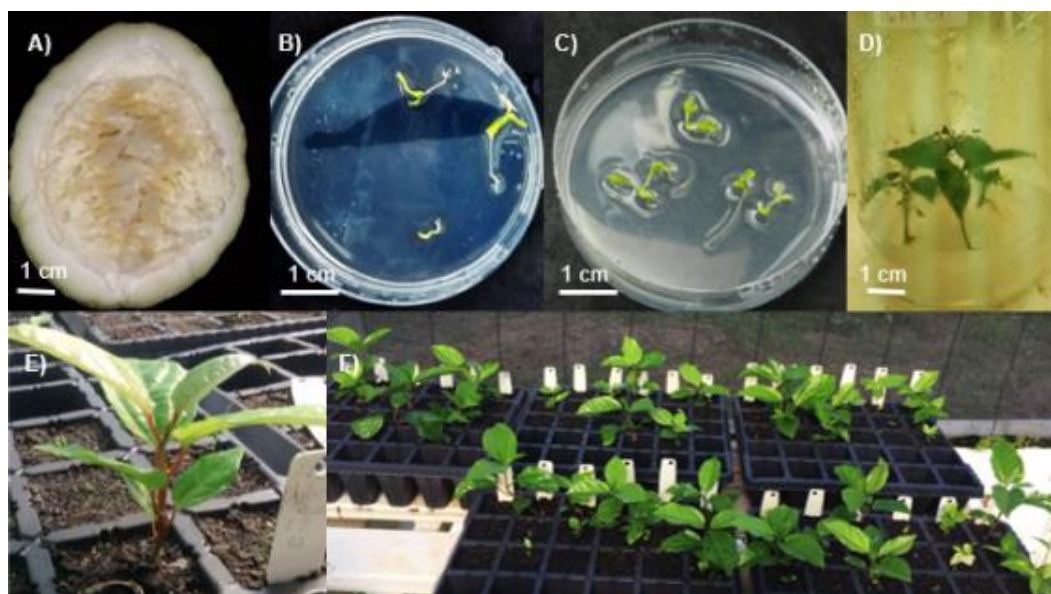


Figura 16. (A) Fruto de maracujazeiro-azedo com 24 DAP; (B) Cultivo de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo em meio com 20 g L⁻¹ de sacarose + GA₃; (C) Cultivo de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo em meio com 20 g L⁻¹ de sacarose; (D) Plântulas de maracujazeiro-azedo em meio de crescimento *in vitro*; (E) Planta de maracujazeiro-azedo oriunda de embrião imaturo heterotrófico germinado *in vitro*, após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação; (F) Plantas de maracujazeiro-azedo oriundas de embriões imaturos autotróficos germinados *in vitro*, após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação.

3.1.5. CONCLUSÕES

Para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros isolados de maracujazeiro-azedo, é indicado o uso do meio de cultivo com metade da

concentração dos sais minerais de MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose para garantir a germinação de plântulas normais e vigorosas. Para o crescimento das plântulas *in vitro* oriundas do cultivo de embriões, é indicado o uso de sais minerais de MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose.

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos heterotróficos de maracujazeiro-azedo, desde a germinação até a aclimatização, é possível com o uso de 20 g L⁻¹ de sacarose combinado com os fitorreguladores 0,0571 µmol L⁻¹ de AIA + 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃ ou apenas 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃. Já o cultivo de embriões zigóticos imaturos autotróficos de maracujazeiro-azedo, desde a germinação até a aclimatização, é possível com o uso de 20 g L⁻¹ de sacarose, sem a adição de fitorreguladores ou com a adição de 0,0289 µmol L⁻¹ de GA₃.

3.2. CULTIVO DE EMBRIÕES MADUROS APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

3.2.1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo é a espécie de maracujá mais estudada e cultivada no Brasil (Meletti et al., 2011). O Brasil é o centro de origem da espécie e ainda considerado centro de diversidade em *Passiflora* com cerca de 145 espécies descritas (Flora do Brasil, 2017; Cervi 2006). Mesmo com toda essa diversidade, os recursos genéticos de *Passiflora* são constantemente ameaçados pela erosão genética, devido às atividades humanas de redução e fragmentação das áreas florestais (Ocampo et al., 2010).

Nos programas de melhoramento genético de maracujá, as estratégias para a conservação *ex situ* de *Passiflora* ainda são incipientes, geralmente limitadas a bancos de sementes e a coleções vivas (Cerqueira-Silva et al., 2016). A conservação realizada em bancos de sementes consiste, basicamente, em sua desidratação até os menores níveis de água inicial e seu armazenamento em baixas temperaturas entre -20 e 10 °C (Kavani, 2011). Nas coleções vivas as plantas são mantidas a campo, expostas às variações ambientais, pragas e doenças. Em *Passiflora*, a perda gradativa da viabilidade das sementes armazenadas nestas temperaturas e as dificuldades em se manter as coleções vivas dificultam o emprego destas técnicas, como forma de conservação por longos períodos (Cerqueira-Silva et al., 2016).

A criopreservação é uma estratégia para a conservação *ex situ* de germoplasma por tempo indefinido em nitrogênio líquido (-196 °C). O ponto crítico é o teor de água livre no material, que pode formar cristais de gelo durante o congelamento e levar a ruptura das membranas celulares (Engelmann, 2011). Assim sendo, faz-se necessário a retirada da água livre dos tecidos por desidratação física ou osmótica, seguida pelo congelamento rápido em nitrogênio líquido (Kavani, 2011).

O teor de água inicial é um fator crítico para a criopreservação de sementes (González-Benito et al., 2009). Na literatura são encontrados alguns trabalhos avaliando o teor de água inicial na criopreservação de sementes de diversas espécies de *Passiflora* (Ospina et al., 2000; Meletti et al., 2007; Veiga-Barbosa et al., 2013). Nesses trabalhos, a avaliação da germinação após a criopreservação é realizada por testes padrões de germinação (ISTA, 2009). Apenas González-Benito et al. (2009) avaliaram o cultivo de embriões isolados *in vitro* de *P. mollissima* e *P. tarminiana*, após a criopreservação.

Ainda não foram relatados na literatura, trabalhos que utilizassem o cultivo *in vitro* de embriões isolados na avaliação da germinação de sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo. Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar a criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo, com diferentes teores de água inicial e testar a eficiência da germinação *ex vitro*, em rolos de papel e o cultivo *in vitro* de embriões maduros isolados.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Conservação de recursos genéticos em *Passiflora*

Passiflora é o maior gênero da família Passifloraceae e abrange mais de 500 espécies silvestres distribuídas, especialmente, nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Fajardo et al., 1998; Ulmer e MacDougal, 2004). Na América do Sul, a Colômbia e o Brasil são os países considerados como centros de diversidade do gênero *Passiflora* (Fajardo et al., 1998; Ulmer e MacDougal, 2004; Ocampo et al., 2010).

A ampla variabilidade morfológica observada entre as espécies do gênero *Passiflora* está diretamente relacionada com sua vasta distribuição geográfica e com os fatores evolutivos que resultaram das interações entre seus polinizadores, dispersores de sementes, pragas e doenças (Cerqueira-Silva et al., 2016).

No entanto, as atividades humanas como o crescimento desorganizado da população humana e da exploração descontrolada dos ecossistemas e seus recursos naturais, têm contribuído com o desaparecimento de ecossistemas naturais, levando muitas espécies vegetais à erosão genética. A erosão genética é caracterizada pela perda gradual de sua reserva de genes (Civatti et al., 2014).

Este cenário não é diferente para as espécies do gênero *Passiflora*. Desse modo, tem se tornado crescente a preocupação com a conservação dos recursos genéticos de maracujás. Os recursos genéticos vegetais são considerados uma reserva natural de genes com potencial de uso para produtos sustentáveis, como alimentos, fibras e medicamentos que são essenciais para a humanidade (Panis e Lombardi, 2005; Civatti et al., 2014).

A Organização das Nações Unidas (ONU), preocupada com o impacto das atividades humanas sobre a biodiversidade, organizou em 1992, a Convenção da Diversidade Biológica (CDB) (Brasil, 1992), que determinou duas formas de conservação de recursos fitogenéticos: a conservação *in situ*, na qual as espécies são mantidas e preservadas no seu ambiente natural e a *ex situ*, em que as espécies são conservadas fora de seu hábitat, por meio de bancos de sementes, bancos de germoplasma *in vitro*, criobancos e em campo, reconhecendo que ambas as medidas desempenham um papel igualmente importante (Nick et al., 2010).

A conservação *in situ* acontece no ambiente em que a espécie ocorre naturalmente, preservando os processos físicos e biológicos como evolução e relações ecológicas. Porém, esse tipo de conservação exige a manutenção e monitoramento das populações naturais, já que a criação de áreas de conservação não garante a sobrevivência das espécies (Heywood e Iriondo, 2003).

A conservação *ex situ*, realizada por meio de bancos de germoplasma, é responsável por preservar uma amostra representativa das populações naturais (Heywood e Iriondo, 2003). A conservação de maracujazeiros em bancos de sementes no Brasil é realizada por curto e médio prazo, de maneira que as

sementes, com aproximadamente 15% de umidade, são armazenadas em câmaras frias a 10 °C. Além dessa forma, o maracujazeiro é conservado por meio de coleções a campo.

Em função da facilidade e praticidade, a utilização de suas sementes representa um importante método de propagação de maracujazeiros (Alexandre et al. 2004a; Martins et al., 2010). O armazenamento de sementes de espécies de *Passiflora* é bastante discutido na literatura e ainda não se tem uma definição da melhor metodologia para a conservação das sementes.

Para o maracujazeiro-azedo, a primeira dificuldade está na controvérsia encontrada na definição do tipo de comportamento ortodoxo ou intermediário das sementes. Alguns autores defendem o comportamento das sementes como ortodoxo (Nakagawa et al., 1991; González-Benito et al., 2009; Veiga-Barbosa et al., 2013; Posada et al., 2014). No entanto, Teng (1977), Becwar et al. (1983), Ospina et al. (2000) e Guevara et al. (2003) defendem que as sementes de maracujazeiro-azedo apresentam comportamento intermediário. O principal motivo de tal discordância entre os autores está nos relatos sobre a perda gradual da viabilidade das sementes durante o armazenamento (Piza Junior, 1991; Meletti et al., 2002; Alves et al. 2006). Além dos baixos percentuais e desuniformidade na germinação constatados em várias espécies de maracujazeiros (Vasconcelos et al., 2005; Pereira et al., 2011).

Para as coleções a campo, a manutenção de genótipos distintos no mesmo local é uma dificuldade comum aos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs). Algumas espécies de maracujazeiro devem ser replantadas periodicamente para o rejuvenescimento dos estoques (Meletti et al., 2007). Além disso, o ataque de pragas e doenças tem reduzido o tempo de exploração econômica da cultura e, até mesmo, inviabilizado o seu cultivo em determinadas regiões (Fischer et al., 2005). Por isso, a vida útil do pomar, que antes era de cinco a seis anos, passou a ser de um a dois anos (Ruggiero et al., 1996; Pinto et al., 2008). Estes fatores dificultam a conservação da cultura no campo. Desse modo, a conservação *in vitro* tem se destacado como uma alternativa viável para a conservação de germoplasma de maracujazeiro.

A conservação *in vitro* pode ser utilizada como ferramenta para a conservação da variabilidade genética do maracujazeiro, por contribuir para a redução dos custos com mão-de-obra e material de consumo, tornando os processos de

conservação mais eficientes e evitando eventuais perdas de materiais de interesse ao melhoramento genético de plantas (Faria, 2008). Segundo Meletti et al. (2007), para a maioria das espécies de *Passiflora*, ainda não foram estabelecidos protocolos de regeneração e conservação *in vitro*, o que não tem permitido o uso extensivo desta técnica de manejo de germoplasma.

O estabelecimento de coleções de germoplasma *in vitro* se mostra bem-sucedida para diversas espécies, com a vantagem de economia de espaço e da simplificação nos procedimentos de intercâmbio e quarentena de germoplasma (Meletti et al., 2007). Existem dois métodos principais para a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal, a criopreservação para a conservação por longos períodos e o cultivo mínimo *in vitro* que conserva o material biológico por curtos períodos (Faria, 2008).

3.2.2.2. Criopreservação em *Passiflora*

Basicamente, a criopreservação é uma maneira de conservar germoplasma em temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido a -196°C (Engelmann, 2004; Kaviani, 2011). Nesta temperatura todos os processos metabólicos e as divisões celulares são virtualmente paralisados, dessa forma, o material vegetal pode ser armazenado por longos períodos (Engelmann, 2004).

Durante o congelamento em nitrogênio líquido, pode ocorrer a formação de cristais de gelo dentro e fora das células, ocasionando a ruptura das membranas celulares (Engelmann, 1997). Por esse motivo, o ponto crítico da técnica é o teor de água livre nos tecidos (Engelmann, 2011). Sendo então necessária a retirada da água livre dos tecidos por desidratação física ou osmótica, seguida pelo congelamento rápido em nitrogênio líquido (Kavani, 2011). Assim exposto, a chave para o sucesso da criopreservação é transferida da tolerância ao congelamento para a tolerância à desidratação (Panis e Lambardi, 2006).

Na natureza, algumas espécies de plantas de clima temperado são capazes de sintetizar substâncias específicas (açúcares, prolina e proteínas), que reduzem o ponto de congelamento nas células e evitam a formação de cristais de gelo, durante o inverno, com temperaturas abaixo de zero. Essa estratégia permite que a planta sobreviva durante o inverno rigoroso (Panis e Lambardi, 2006).

Alguns tipos de materiais como sementes ortodoxas, embriões zigóticos e grãos de pólen, que resistem à desidratação, podem ser criopreservados sem

qualquer pré-tratamento. No entanto, materiais vegetais como sementes recalcitrantes e intermediárias, calos, brotos, gemas, entre outros tecidos, que possuem muita água livre dentro das células, são muito sensíveis ao congelamento e, dessa forma, devem ser desidratadas artificialmente (Mazur, 1984; Walters et al., 2013). Com a possibilidade de criopreservar vários tipos de tecidos, alguns pesquisadores desenvolveram diferentes métodos de desidratação para abranger um número maior de espécies e materiais vegetais.

A secagem é o método mais simples e facilmente aplicado em sementes ortodoxas, embriões zigóticos e pólenes. A secagem pode ser feita lentamente em temperatura ambiente ou com sílica gel, ou instantânea com auxílio de secadores (Berjak et al., 2000).

O congelamento lento foi o primeiro protocolo desenvolvido para desidratar tecidos vegetais. Consiste no congelamento lento com velocidade média de 0,5 a - 2 °C por minuto, na presença de uma solução crioprotetora. Quando o processo atinge a temperatura de - 40 °C, considera-se que a solução intracelular está concentrada o suficiente e, em seguida, o material vegetal pode ser imerso em nitrogênio líquido (Withers e King, 1980). Este método tem sido usado principalmente para a criopreservação de tecidos não organizados, como suspensões celulares e calos (Panis e Lambardi, 2006).

O método de encapsulamento e desidratação foi desenvolvido por Fabre e Dereuddre (1990), em que os explantes são primeiramente encapsulados em cápsulas de alginato, que podem conter também sais minerais. Em seguida as cápsulas são tratadas com altas concentrações de sacarose para a desidratação osmótica e imersos em nitrogênio líquido. Embora o procedimento possa ser considerado bastante longo e intensivo em mão-de-obra, observa-se que a presença de uma cápsula nutritiva em torno do explante favorece a regeneração após o descongelamento (Panis e Lambardi, 2006).

A vitrificação é um método de criopreservação, onde o citoplasma celular passa do estado líquido para um estado amorfo e vítreo (Fahy et al., 1984; Sakai, 2000). Isso é possível com o auxílio de substâncias crioprotetoras que evitam a formação de cristais de gelo e protege as células dos danos do congelamento (Sakai et al., 1990; Engelmann, 1997; Lambardi e Beneli, 2007). A solução mais comumente aplicada é a denominada 'PVS2' (Solução de Vitrificação de Plantas n° 2), constituída por 30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M

de sacarose (Sakai et al., 1990). Este é o método mais utilizado em tecidos muito hidratados.

Outros métodos disponíveis são a vitrificação por gotículas (Schäfer-Menuhr et al., 1997), o encapsulamento e vitrificação (Sakai, 2000), o pré-cultivo (Ramon et al., 2002) e o pré-cultivo e desidratação (Dumet et al., 1993), que podem ser usados separadamente ou em combinações.

Mesmo sendo possível criopreservar diversos tipos de tecidos vegetais, as sementes são muito utilizadas como material vegetal a ser criopreservado, como uma alternativa de preservar os recursos genéticos de espécies de interesse comercial e daquelas ameaçadas de extinção (Civatti et al., 2014).

O armazenamento de sementes ortodoxas em nitrogênio líquido pode ser considerado como uma alternativa ao armazenamento tradicional a - 20 °C (Pence, 2014). Para algumas espécies de plantas, a longevidade das sementes na temperatura de - 20 °C é de apenas alguns anos e, portanto, pode ser aumentada consideravelmente por meio do armazenamento em nitrogênio líquido. Na maioria dos casos, a secagem em temperatura ambiente pode reduzir o teor de água da semente para 5 - 10%, o que é suficiente para resistir às temperaturas ultra baixas (Panis e Lambardi, 2006).

No entanto, nos casos em que as sementes são recalcitrantes, existe a possibilidade de que os embriões ou eixos embrionários, se excisados da semente, possam ser mais tolerantes à dessecação e assim serem criopreservados (Berjak e Pammenter, 2014; Pence, 2014). É importante a avaliação da resposta das sementes após o armazenamento em nitrogênio líquido para estabelecer as condições ideais para a criopreservação (Panis e Lambardi, 2006).

Muitas espécies de maracujazeiro apresentam sementes intermediárias, que são capazes de tolerar a desidratação em níveis baixos, mas quando conservadas em temperaturas abaixo de zero, são danificadas (Ellis et al., 1990). Outras espécies são ortodoxas e podem ser facilmente criopreservadas.

Para diversas espécies de maracujá, tanto silvestres quanto comerciais, a criopreservação de sementes tem sido estudada (Ospina et al., 2000; Meletti et al., 2007; González-Benito; Veiga-Barbosa et al., 2013; Nadarajan e Pritchard, 2014; Araújo et al., 2016). Os autores relatam que o teor de água da semente é um importante aspecto a ser considerado para o estabelecimento de protocolos

de criopreservação, e cada espécie tem seu teor de água tolerável para a desidratação.

Alguns trabalhos já foram desenvolvidos, abordando a criopreservação nos demais tecidos vegetais de várias espécies de maracujá. De modo geral, são criopreservados ápices caulinares, gemas axilares e segmentos de raízes de diversas espécies de maracujazeiro por meio das técnicas de vitrificação, encapsulamento e vitrificação e vitrificação por gotículas (Garcia et al., 2011b; Merhy et al., 2012; Vianna et al., 2012; Santos, 2013; Simão et al., 2014; Araújo, 2017).

Uma vez criopreservados, os custos para manter o material vegetal armazenado em nitrogênio líquido são semelhantes aos dos bancos tradicionais de sementes (Li e Pritchard, 2009). A vantagem é o armazenamento por tempo teoricamente indefinido em pequeno espaço (Kaviani, 2011). Segundo Pence (2014), a criopreservação pode ser utilizada de maneira análoga aos bancos de sementes, para manter o germoplasma *ex situ* como um 'backup' para espécies vulneráveis na natureza.

A criopreservação tem sido bastante utilizada para o armazenamento a longo prazo, em bancos de germoplasma (Lima et al., 2008). Porém, os criobancos ainda estão em desenvolvimento no Brasil (Civatti et al., 2014). Desse modo, percebe-se a necessidade de investimento em pesquisas para as diversas espécies de maracujazeiro, visando à conservação de germoplasma comercial e silvestre.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material vegetal e secagem das sementes

A pesquisa foi realizada no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) cujas coordenadas locais de referência são 21° 45' de latitude Sul e 41° 20' de longitude Oeste e altitude média de 11 metros.

Foram utilizadas sementes de maracujá-azedo (*P. edulis* Sims) do programa de seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro-azedo da UENF. As sementes foram retiradas dos frutos e lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira de aço para a remoção do arilo.

Em uma amostra de 50 sementes foi realizada a determinação do teor de água inicial das sementes pelo método da estufa de circulação de ar a 130 °C por uma hora (Brasil, 2009). Cerca de 4000 sementes foram separadas em quatro lotes, um com o teor de água inicial de 25% e os outros lotes foram desidratados em um secador protótipo de camada delgada a 40 °C (Carlesso et al., 2008), no Laboratório de Engenharia Agrícola (LEAG) da UENF, até atingirem os teores de água desejados de 15, 10 e 5% (Figura 17).

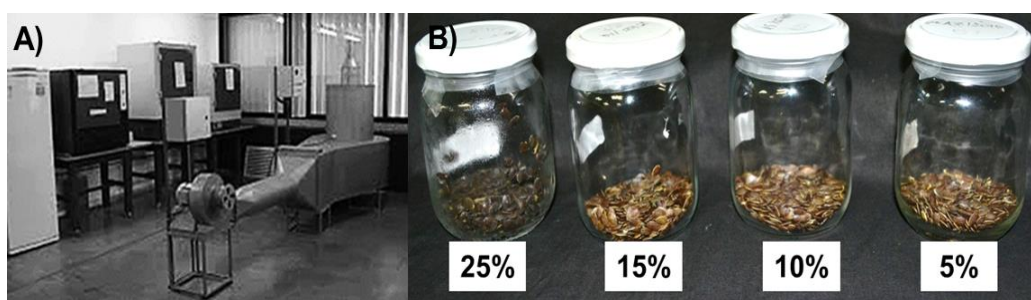


Figura 17. (A) Secador protótipo de camada delgada; (B) sementes de maracujazeiro-azedo desidratadas com 25%, 15%, 10% e 5% de teor de água inicial.

3.2.3.2. Experimento de Criopreservação

Metade das sementes com teores de água inicial de 25%, 15%, 10% e 5% foram colocadas em criotubos com capacidade de 2,0 mL e submetida à imersão rápida em nitrogênio líquido (NL) (-196 °C), onde foram mantidas por 18 horas. Os criotubos foram retirados do NL e as sementes foram descongeladas em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por 3 horas. A outra metade das sementes, considerada controle de cada um dos tratamentos, foi mantida em frascos vedados na geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, em que foi testada a imersão direta das sementes em

NL (criopreservadas e não criopreservadas), com quatro diferentes teores de água inicial (5, 10, 15 e 25%). Tanto em sementes criopreservadas como não criopreservadas procedeu-se testes para germinação *ex vitro*, em rolos de papel e *in vitro*, por cultivo de embriões maduros isolados.

Para a germinação *ex vitro* foram seguidos os padrões recomendados pelas Regras de Análises de Sementes (RAS) (Brasil, 2009) com modificações. O teste de germinação foi montado com oito repetições. Cada repetição foi constituída por 50 sementes em rolo de papel para germinação de sementes e mantidos em câmara do tipo B.O.D. com temperatura de 20°C (luz) e 30°C (escuro) e fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro. O índice de velocidade de germinação foi avaliado diariamente (Maguire, 1962), observando o número de sementes emitindo a raiz primária.

Aos 28 dias, foi realizada a contagem final da porcentagem de germinação de plântulas normais, de plântulas anormais, da protrusão da raiz primária e de sementes não germinadas. Os testes de vigor foram realizados apenas com as plântulas normais: altura da plântula, comprimento da raiz e massa da matéria seca total com o auxílio de paquímetro digital e balança de precisão. Foram consideradas plântulas normais apenas as que apresentaram parte aérea e raiz expandidas.

Para a germinação *in vitro*, o tegumento das sementes foi retirado com o auxílio de uma mini morsa. As sementes sem tegumento foram submetidas à desinfestação em câmara de fluxo laminar com imersão, por trinta segundos, em álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% com duas gotas de Tween 20 em 100 mL de solução, por 15 minutos e enxaguados por três vezes com água desionizada e autoclavada. Em seguida, os embriões das sementes foram excisados com o auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio e colocados para germinar em frascos (60 x 100 mm) contendo 40 mL de meio de cultura composto pela metade da concentração dos sais minerais de MSM (Monteiro et al., 2000), vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão. Os frascos foram vedados com tampas ventiladas com duas membranas caseiras permeáveis a gases de 1 cm de diâmetro cada (Saldanha et al., 2012).

O teste de germinação *in vitro* dos embriões isolados foi montado com cinco repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo oito embriões. Os frascos foram mantidos na sala de cultivo no escuro, com temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$ por dez dias e, em seguida, transferidos para luz (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, promovida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia). O índice de velocidade de germinação foi avaliado diariamente e, aos 28 dias, foi realizada a contagem final de germinação de plântulas normais, de plântulas anormais e de embriões não germinados. Os testes de vigor foram realizados apenas com as plântulas normais: altura da plântula, comprimento da raiz e massa da matéria seca total com o auxílio de paquímetro digital e balança de precisão. Foram consideradas plântulas normais apenas as que apresentaram parte aérea e raiz expandidas.

3.2.3.3. Análises estatísticas

Os dados de germinação *ex vitro* e *in vitro* foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade dos tratamentos pelo teste de Bartlett e Lilliefors, respectivamente. Os dados foram transformados em arco-seno ($\sqrt{x} \div 100$) e, em seguida, foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3.2.3.4. Anatomia das sementes de maracujazeiro-azedo

Para as análises anatômicas em microscópio óptico, o tegumento das sementes criopreservadas ou não foi removido com o auxílio de uma mini morsa. As sementes sem tegumento foram utilizadas como amostras. Estas foram fixadas em uma solução aquosa, contendo glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,1) e armazenadas em geladeira por no mínimo 24 horas.

Em seguida, as amostras foram imersas em uma solução de tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,1) por uma hora à temperatura ambiente e desidratadas em uma série alcoólica: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%, por uma hora em cada etapa.

Após a desidratação em série alcoólica, as amostras foram infiltradas gradativamente em historesina, usando uma série crescente de historesina em

etanol (1:3; 1:2; 1:1; 1:1; 2:1 e 3:1), por quatro horas em cada etapa. A inclusão do material foi realizada em solução de historesina pura com solução endurecedora por 48 horas. Após a infiltração e inclusão, o material foi unido com cola instantânea a um bloco de madeira pequeno que serviu como apoio no micrótomo.

Os blocos foram cortados em um micrótomo rotativo (Leica®), com auxílio de navalhas de tungstênio. Os cortes, com cerca de 5 µm de espessura, foram dispostos com auxílio de uma pinça em lâminas com uma gota de água e corados com azul de toluidina O. Antes da observação ao microscópio, a lamínula foi selada na lâmina com Entellan®. A observação foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Axioplan Zeiss®). As imagens foram capturadas por meio de câmera Cannon® Power Shot 14 MPixel (acoplada ao microscópio), com o auxílio do programa Axiovision (Zeiss®).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1. Experimento de criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo

Para a germinação *ex vitro* e vigor das sementes de maracujazeiro-azedo, todas as variáveis avaliadas de plântulas normais, protrusão da raiz primária, plântulas anormais, sementes não germinadas, índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca apresentaram interação significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as sementes criopreservadas e as não criopreservadas, nos diferentes teores de água inicial (Tabela 14).

Tabela 14. Resumo da Análise de variância para as variáveis plântulas normais (PN), protrusão da raiz primária (PR), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), índice de velocidade de germinação (IVG), altura da plântula (AP), comprimento das raízes (CR) e massa da matéria seca (MS) em função da imersão ou não em nitrogênio líquido (A) e teores de água inicial (TA) de sementes de maracujazeiro-azedo germinadas *ex vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		PN	PR	PA	SNG
Armazenamento (A)	1	6552,24*	3842,54*	195,36*	24639,75*
Teor de Água (TA)	3	1903,69*	2001,31*	85,05*	232,92*
A x TA	3	3742,60*	495,22*	154,98*	4283,28*
Resíduo	55	1646,4	44,88	3,70	38,88
Média Geral		11,9	20,6	2,51	64,9
C.V. (%)		24,65	15,0	28,33	5,51

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		IVG	AP	CR	MS
Armazenamento (A)	1	512,95*	5439,09*	1423,38*	0,00026*
Teor de Água (TA)	3	16,31*	57,00 ^{ns}	22,22 ^{ns}	0,000007 ^{ns}
A x TA	3	72,25*	596,37*	514,42*	0,000058*
Resíduo	55	0,8828	46,61	27,29	0,000003
Média Geral		3,72	15,05	9,62	0,0039
C.V. (%)		11,61	30,85	32,37	0,09

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Na germinação *in vitro* e vigor das sementes de maracujazeiro-azedo, as variáveis avaliadas de plântulas normais, plântulas anormais, embriões não germinados, índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca apresentaram interação significativa entre a criopreservação ou não e os diferentes teores de água inicial (Tabela 15).

Tabela 15. Resumo da análise de variância para as variáveis plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), embriões não germinados (ENG), índice de velocidade de germinação (IVG), altura da plântula (AP), comprimento de raiz (CR) e massa da matéria seca (MS) em função da imersão ou não em nitrogênio líquido (A) e teores de água inicial (TA) de sementes de maracujazeiro-azedo germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		PN	PA	ENG	IVG
Armazenamento (A)	1	22814,12*	361,41*	17432,61*	47,45*
Teor de Água (TA)	3	7855,28*	301,33*	8379,00*	15,32*
A x TA	3	2792,03*	228,65*	2951,03*	14,16*
Resíduo	28	2792,03	48,87	62,50	0,1554
Média Geral		73,41	4,2	20,9	3,37
C.V. (%)		12,06	17,45	14,36	11,67

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		AP	CR	MS	
Armazenamento (A)	1	8930,60*	15772,07*	0,0013*	
Teor de Água (TU)	3	1630,01*	4148,72*	0,00024*	
A x TA	3	719,45*	3916,04*	0,000035*	
Resíduo	28	51,29	429,61	0,000007	
Média Geral		33,54	61,74	0,0135	
C.V. (%)		17,07	25,69	18,16	

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

As sementes criopreservadas com elevados teores de água inicial (15 e 25%) não germinaram em rolos de papel. As maiores médias de germinação de plântulas normais e de protrusão de raiz primária das sementes submetidas à criopreservação foram obtidas em sementes com 10% de água, não diferindo do controle (sementes não criopreservadas) e diferindo de todos os demais tratamentos com sementes criopreservadas. Além disso, a baixa temperatura induziu uma dormência secundária nas sementes com 5 e 10% de teor de água inicial submetidas à criopreservação (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de desdobramento das variáveis plântulas normais, protrusão da raiz primária, plântulas anormais e sementes não germinadas em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação *ex vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Plântulas Normais (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	0,75 Bb	4,02 Aa	0,0 Bb	0,0 Bb	1,19 b
Sem Criopreservação	15,0 Ba	5,0 Ca	35,70 Aa	34,30 Aa	22,9 a
Média	7,87 B	4,51 B	17,80 A	17,15 A	11,90
C.V. (%)	24,65				
Protrusão de Raiz primária (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	18,80 Bb	31,10 Aa	0,0 Cb	0,0 Cb	12,50 b
Sem Criopreservação	37,60 Aa	33,10 ABa	20,90 Ca	23,80 BCa	28,80 a
Média	28,20 A	32,10 A	10,45 B	11,90 B	20,60
C.V. (%)	15,0				
Plântulas Anormais (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	0,25 ABb	2,25 Aa	0,0 Bb	0,0 Bb	0,62 b
Sem Criopreservação	2,01 Ba	0,75 Ba	12,90 Aa	2,0 Ba	4,41 a
Média	1,13 B	1,50 B	6,45 A	1,0 B	2,51
C.V. (%)	28,33				
Sementes Não Germinadas (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	80,20 Ba	59,60 Ca	100,0 Aa	100,0 Aa	84,90 a
Sem Criopreservação	45,40 Bb	64,10 Aa	30,40 Cb	39,80 Bb	44,90 b
Média	62,80 A	61,80 A	65,20 A	69,90 A	64,90
C.V. (%)	5,51				

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Na germinação *in vitro* dos embriões criopreservados com 25% de água inicial, não foi possível regenerar plântulas normais, mas, com este teor de água, o congelamento rápido não chegou a matar totalmente o embrião, de modo que houve a regeneração de 7,5% de plântulas anormais. Os embriões oriundos das sementes criopreservadas com 15% de água inicial também apresentaram baixa germinação (20% de plântulas normais e 5% de plântulas anormais). Com a redução do teor de água inicial das sementes para 5%, houve um maior aparecimento de plântulas anormais (25%). No entanto, as sementes criopreservadas com 10% de água inicial apresentaram 100% de germinação de

plântulas normais, de maneira que não diferiu do controle com 97% de germinação (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de desdobramento das variáveis plântulas normais, plântulas anormais e embriões não germinados em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Plântulas Normais (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	75,0 Bb	100,0 Aa	20,0 Cb	0,0 Db	48,70 b
Sem Criopreservação	95,0 Aa	97,50 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	98,10 a
Média	85,0 B	98,70 A	60,0 C	50,0 D	73,41
C.V. (%)	12,06				
Plântulas Anormais (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	25,0 Aa	0,0 Ba	5,0 Ba	7,50 Ba	9,40 a
Sem Criopreservação	5,0 Ab	2,50 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	1,90 b
Média	15,0 A	1,25 B	2,50 B	5,35 AB	4,20
C.V. (%)	17,45				
Embriões Não Germinados (%)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	0,0 Ca	0,0 Ca	75,0 Ba	92,50 Aa	41,90 a
Sem Criopreservação	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 b
Média	0,0 C	0,0 C	37,50 B	46,20 A	20,90
C.V. (%)	14,36				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A perda da viabilidade e a morte de sementes podem ocorrer durante a criopreservação, quando o conteúdo de água nos tecidos for alto (Kavani, 2011). Dessa forma, as células devem ser desidratadas a fim de evitar a formação de cristais de gelo (Mazur, 1984). A criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo com 15 e 25% de umidade causou injúrias nos tecidos, tanto das sementes germinadas *ex vitro* quanto nos embriões isolados *in vitro*, resultando em baixa ou nenhuma germinação de plântulas normais (Tabelas 16 e 17). Resultado semelhante foi relatado por Ospina et al. (2000), em que sementes de *P. edulis* e

P. ligularis também não foram capazes de suportar a imersão em nitrogênio líquido com níveis de umidade maiores do que 15%.

O teor de água inicial da semente é um fator crítico para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de criopreservação, de maneira que a janela para o congelamento seguro é estreita. O alto teor de água pode provocar a formação de cristais de gelo, enquanto que o baixo teor de água pode induzir danos de dessecação ao embrião (González-Benito et al., 2009). Assim sendo, observou-se que a redução do teor de água das sementes para 5% causou danos aos embriões, resultando no aparecimento de 25% de plântulas anormais (Tabela 17). Do mesmo modo, Ospina et al. (2000) e Veiga-Barbosa et al. (2013) observaram que a germinação de sementes de *P. edulis* diminuiu à medida que o teor de água das sementes foi reduzido.

Para as variáveis de vigor na germinação *ex vitro* de índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca, o único tratamento em que não houve diferença no vigor das plântulas, formadas a partir de sementes criopreservadas ou não, foi o de 10% de água inicial da semente (Tabela 18).

Tabela 18. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação *ex vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Índice de Velocidade de Germinação					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	0,65 Bb	2,54 Aa	0,0 Cb	0,0 Cb	0,80 b
Sem Criopreservação	6,24 Ba	3,19 Ca	11,0 Aa	6,14 Ba	6,64 a
Média	3,44 AB	2,86 B	5,50 A	3,07 B	3,72
C.V. (%)	11,61				
Altura das Plântulas (mm)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	7,38 Bb	15,65 Aa	0,0 Bb	0,0 Bb	5,75 b
Sem Criopreservação	26,05 ABa	16,80 Ba	27,23 ABa	27,66 Aa	24,19 a
Média	16,71 A	16,22 A	13,61 A	13,83 A	15,05
C.V. (%)	30,85				
Comprimento das Raízes (mm)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	7,27 Ab	12,13 Aa	0,0 Bb	0,0 Bb	4,85 b
Sem Criopreservação	12,30 ABa	7,77 Ba	16,61 Aa	21,02 Aa	14,38 a
Média	9,78 A	9,95 A	8,30 A	10,51 A	9,62
C.V. (%)	32,37				
Massa da Matéria Seca (mg)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	2,20 Bb	5,30 Aa	0,0 Bb	0,0 Bb	1,90 b
Sem Criopreservação	6,0 ABa	4,10 Ba	7,10 Aa	6,70 Aa	6,0 a
Média	4,10 A	4,70 A	3,50 A	3,30 A	3,90
C.V. (%)	0,09				

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Com relação ao vigor das plântulas normais germinadas *in vitro*, de modo geral, a criopreservação não alterou o vigor das plântulas criopreservadas com 5% e 10% de teor de água, embora para o índice de velocidade de germinação, os embriões oriundos de sementes com 5% de água inicial apresentaram os maiores valores. Entre os tratamentos de criopreservação, a maior altura das plântulas foi obtida a partir das sementes criopreservadas com 10% de água inicial. As sementes criopreservadas com 5% e 10% de água inicial apresentaram os maiores comprimentos de raízes (Tabela 19). Portanto, as sementes com 10% de teor de água mostraram resultados satisfatórios para a germinação de

plântulas normais e vigor das plântulas após a criopreservação. Corroborando com o resultado deste trabalho, Ospina et al. (2000) sugerem valores entre 9 e 11% de teor de água para a criopreservação de sementes de *P. edulis*. Do mesmo modo, Meletti et al. (2007) também observaram plântulas vigorosas de diferentes acessos de *P. edulis* após a criopreservação.

Tabela 19. Análise de desdobramento das variáveis de vigor avaliadas de índice de velocidade de germinação, altura das plântulas, comprimento das raízes e massa da matéria seca em função da interação entre a imersão ou não em nitrogênio líquido e os teores de água inicial (5%, 10%, 15% e 25%) em sementes de maracujazeiro-azedo após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Índice de Velocidade de Germinação					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	5,04 Aa	3,30 Bb	0,75 Cb	0,07 Db	2,29 b
Sem Criopreservação	4,60 Aa	4,60 Aa	3,40 Ba	5,27 Aa	4,47 a
Média	4,82 A	3,95 B	2,07 D	2,67 C	3,37
C.V. (%)	11,67				
Altura das Plântulas (mm)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	22,81 Bb	42,97 Aa	5,52 Cb	0,0 Db	17,82 b
Sem Criopreservação	35,31 Aa	53,70 Aa	57,89 Aa	50,19 Aa	49,27 a
Média	29,06 B	48,33 A	31,70 B	25,09 C	33,54
C.V. (%)	17,07				
Comprimento das Raízes (mm)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	59,31 Aa	80,27 Aa	24,35 Bb	0,0 Cb	40,98 b
Sem Criopreservação	62,07 Aa	75,43 Aa	107,1 Aa	85,02 Aa	82,40 a
Média	61,00 A	77,85 A	65,72 A	42,51 B	61,74
C.V. (%)	25,69				
Massa da Matéria Seca (mg)					
	5%	10%	15%	25%	Média
Criopreservação	12,80 Aa	14,80 Ab	3,30 Bb	0,0 Cb	7,70 b
Sem Criopreservação	16,60 Aa	21,30 Aa	21,30 Aa	18,10 Aa	19,30 a
Média	14,70 A	18,0 A	12,30 B	9,0 C	13,50
C.V. (%)	18,16				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As sementes com 10% de água, colocadas para germinar em rolos de papel, iniciaram a germinação a partir dos sete dias e aos 28 dias de avaliação, cerca de 30% destas sementes, ainda estavam emitindo a raiz primária (Figura 18).

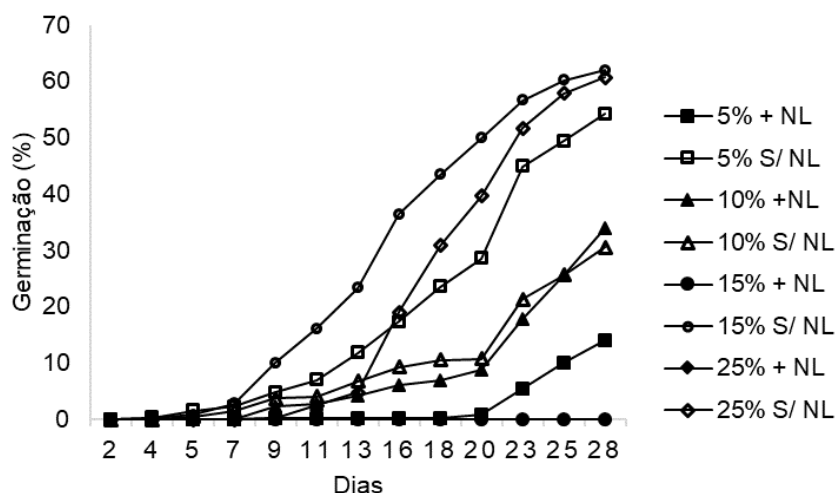


Figura 18. Velocidade de germinação *ex vitro* de sementes de maracujazeiro-azedo com 5, 10, 15 e 25% de água inicial, imersas (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido (NL).

No entanto, os embriões isolados começaram a germinar com dois dias de cultivo *in vitro* para todos os tratamentos e ao final de 12 dias, o processo de germinação já estava completo, sendo que as sementes criopreservadas com 10% de teor de água regeneraram 100% de plântulas normais (Figura 19).

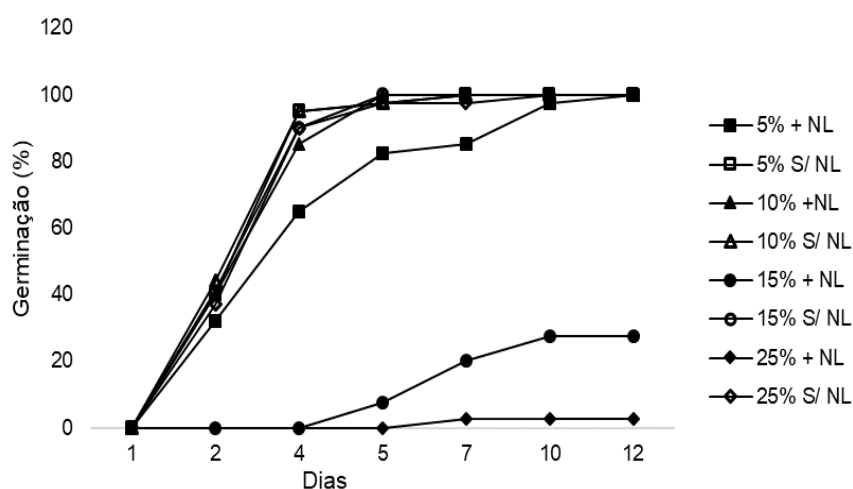


Figura 19. Velocidade de germinação *in vitro* de sementes de maracujazeiro-azedo com 5, 10, 15 e 25% de água inicial, imersas (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido (NL).

A diferença na velocidade e porcentagem de germinação entre as sementes com 5 e 10% de teor de água germinadas *ex vitro* e *in vitro* pode ser explicada como uma dormência secundária, induzida pela baixa temperatura do nitrogênio líquido, em que houve um retardo na velocidade de germinação *ex vitro*. A dormência foi facilmente superada com o cultivo *in vitro* dos embriões maduros isolados. A ocorrência de dormência secundária em sementes após a criopreservação foi também relatada por Pádua et al. (2011). Os autores trabalharam com *P. setacea* e utilizaram ácido giberélico para a superação da dormência.

Levando em consideração os resultados apresentados, fica evidente que o cultivo de embriões isolados *in vitro* é mais eficiente na germinação de sementes submetidas à criopreservação do que a germinação das sementes *ex vitro* em rolos de papel, por apresentar maior velocidade e uniformidade na germinação (Figura 20). Esta é a primeira vez que um trabalho compara a técnica de germinação de sementes em rolo de papel e o cultivo *in vitro* de embriões isolados, após a criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo.

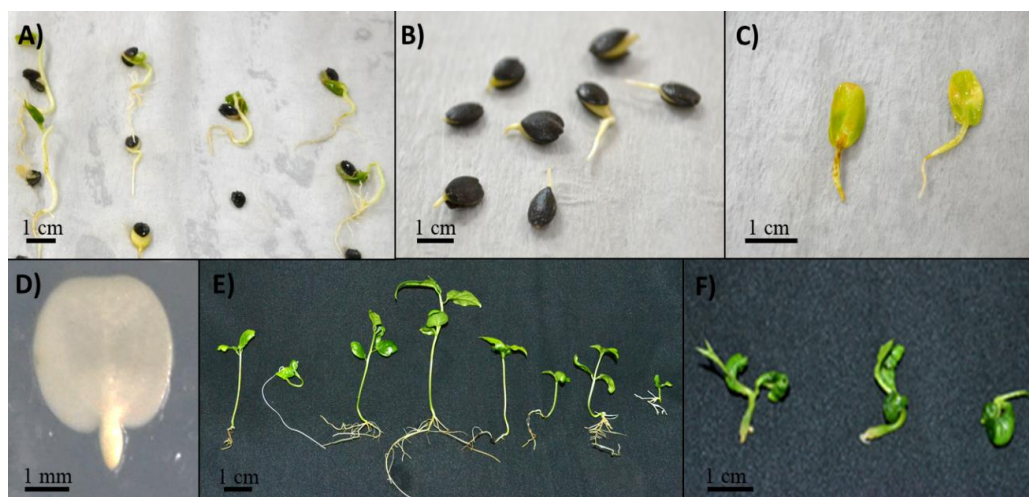


Figura 20. Germinação *ex vitro* e *in vitro* de sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo. (A) Plântulas normais de sementes com 10% de teor de água criopreservadas e germinadas *ex vitro*; (B) Protrusão da raiz primária de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas *ex vitro*; (C) Plântulas anormais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas *ex vitro*; (D) Embrião zigótico maduro isolado; (E) Plântulas normais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas *in vitro*; (F) Plântulas anormais de sementes criopreservadas com 10% de teor de água e germinadas *in vitro*.

3.2.4.2. Anatomia das sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo

As análises anatômicas de microscopia óptica mostram que as células do endosperma de maracujazeiro-azedo são grandes, de formato hexagonal ou arredondadas, desorganizadas e com a presença de muitos grânulos citoplasmáticos de reserva (Figura 21). O endosperma possui um papel importante no desenvolvimento e manutenção de um meio adequado para o crescimento do embrião, como fonte de nutrientes e de condições essenciais para o crescimento e diferenciação dos tecidos (Lester e Kang, 1998; Carvalho e Nakagawa, 2000).

Corner (1977) caracterizou as sementes de maracujazeiro-azedo como oleaginosas, devido ao seu endosperma rico em lipídios. Segundo Morton (1987), as reservas de maracujazeiro-azedo são constituídas por 11,1% de proteínas e 23% de lipídios. Portanto, a principal reserva utilizada pelo embrião de maracujazeiro-azedo são os lipídios, seguidos pelas proteínas que são degradadas, à medida que ocorre a germinação (Tozzi e Takaki, 2010; Gruski, 2015).

Os lipídios são estocados no citoplasma na forma de triglicerídeos em corpúsculos delimitados por uma única membrana e chamados geralmente de corpos lipídicos (Somerville, 2000). A degradação de lipídios e carboidratos, durante a germinação, tem por finalidade o fornecimento de energia para a síntese proteica durante o crescimento da plântula (Kornberg e Beevers, 1957). Em sementes de maracujazeiro, os lipídios são a principal fonte de energia para a germinação, o embrião consome os lipídios, utilizando-o como matéria-prima para a síntese de carboidratos (Tozzi e Takaki, 2010).

As proteínas são armazenadas em sementes dentro de organelas delimitadas por uma membrana simples, chamadas de corpos proteicos, encontrados principalmente nos cotilédones (Müntz, 1998; Müntz et al., 2001; Buckeridge et al., 2004a). As proteínas são quebradas em aminoácidos constituintes por meio de uma classe de enzimas chamadas proteases (Carvalho e Nakagawa, 2000). Os aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas são convertidos a aminoácidos (glutamina e asparagina), que são formas transportadas para o eixo embrionário em crescimento e servem como fonte de energia para o desenvolvimento de novos tecidos (Buckeridge et al., 2004b).

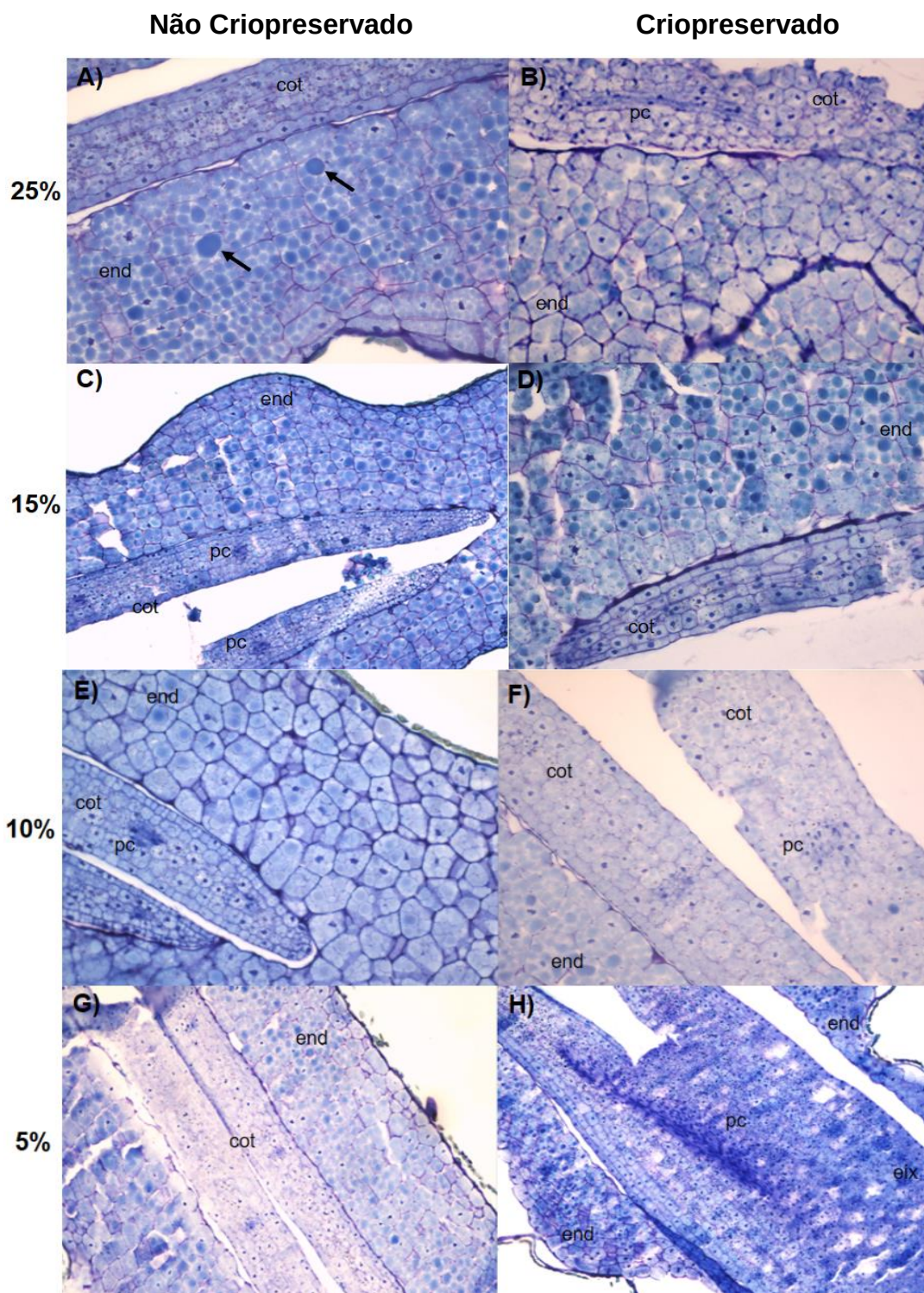


Figura 21. Cortes longitudinais de sementes sem tegumento de maracujazeiro-azedo com diferentes teores de água inicial, submetidas à criopreservação ou não. (A) 25% de teor de água, não criopreservada. Detalhe para os grânulos citoplasmáticos do endosperma (seta); (B) 25% de teor de água e criopreservada; (C) 15% de teor de água, não criopreservada; (D) 15% de teor de água, criopreservada; (E) 10% de teor de água, não criopreservada; (F) 10% de teor de água, criopreservada; (G) 5% de teor de água não criopreservada; (H) 5% de teor

de água, criopreservada. Legenda: cot = cotilédone; eix = eixo hipocótilo-raiz primária; end = endosperma; pc = procâmbio.

A observação do eixo embrionário de maracujazeiro-azedo em microscópio óptico mostra que ele é reto, com um eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones grandes. O eixo hipocótilo-radícula é formado por células pequenas e organizadas com características meristemáticas em seus polos apical e radicular, além da presença de grânulos de reserva citoplasmática (Figura 22). Os dois cotilédones são maiores com células pequenas, contendo grânulos de reserva citoplasmáticos (Figura 21). Os cotilédones também são importantes tecidos de reserva. Segundo Gruski (2015), em sementes de maracujá-azedo, a maior parte das proteínas são estocadas nos cotilédones. Tanto no eixo hipocótilo-radícula quanto nos cotilédones, é possível visualizar o procâmbio formado por células mais alongadas que as demais (Figuras 21 e 22).

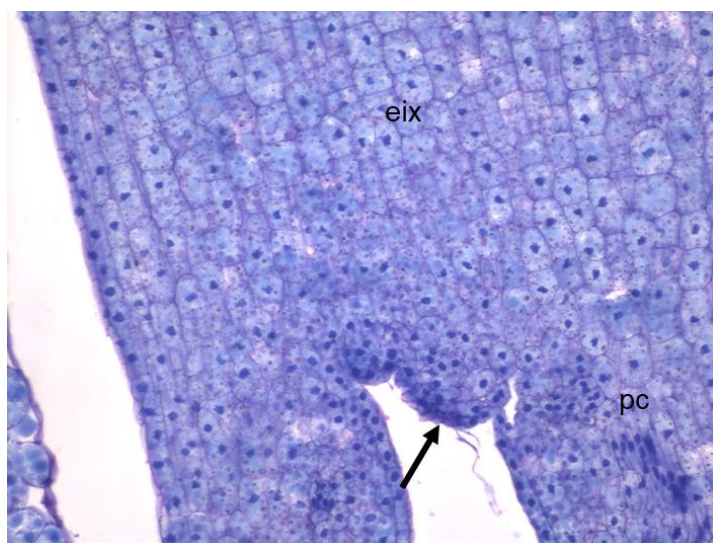


Figura 22. Corte longitudinal do eixo hipocótilo-radícula de embrião zigótico de maracujazeiro-azedo. Seta: tecido com características meristemáticas. Legenda: eix = eixo hipocótilo-radícula; pc = procâmbio.

As avaliações anatômicas das sementes de maracujá-azedo mostraram que as células do embrião sofreram uma sutil redução no formato de arredondadas para hexagonal com a redução do teor de água de 25% (Figura 21A e B) para 5% (Figura 21G e H). No entanto, essa redução não mostrou efeitos negativos na

germinação e vigor das sementes de maracujazeiro-azedo desidratadas (Tabelas 15, 16, 18 e 19).

As sementes ortodoxas são capazes de tolerar a desidratação até 2 a 5% de teor de água e o armazenamento em temperaturas abaixo de 0 °C (Roberts, 1973). Já as sementes classificadas como intermediárias são capazes de resistir a desidratação a teores de água em torno de 10 a 13%, entretanto, são sensíveis a temperaturas abaixo de 0 °C (Hong e Ellis, 1995).

Alguns autores defendem que as sementes de maracujazeiro-azedo são ortodoxas (Nakagawa et al., 1991; González-Benito et al., 2009; Veiga-Barbosa et al., 2013; Posada et al., 2014). No entanto, Teng, 1977; Becwar et al., 1983; Ospina et al., 2000 e Guevara et al., 2003 defendem que as sementes de maracujá-azedo são do tipo intermediário. Os resultados obtidos neste trabalho com a germinação, vigor e análises anatômicas das sementes de maracujazeiro-azedo demonstram que o comportamento das sementes de maracujazeiro-azedo é ortodoxo em relação à desidratação e ao armazenamento em nitrogênio líquido.

As avaliações anatômicas das sementes de maracujazeiro-azedo logo após o descongelamento não mostram diferenças entre as sementes criopreservadas ou não, com relação ao tamanho, formato das células e espaço intracelular (Figura 21).

O que se esperava era observar uma desordem celular após três horas de descongelamento das sementes de maracujazeiro-azedo em temperatura ambiente. No entanto, o resultado obtido foi a preservação das estruturas anatômicas das sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo. Outros autores também relatam a preservação dos tecidos de sementes criopreservadas. Nery (2008) não encontrou nenhum dano anatômico aparente nos tecidos de eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* após a criopreservação.

Wesley-Smith et al. (2014) e (2015) buscaram rastrear o progresso dos tecidos, após a criopreservação de eixos embrionários de *Acer saccharinum* e não conseguiram encontrar evidências anatômicas de danos celulares, após a criopreservação. Estes autores observaram um início de lise celular nas células meristemáticas apicais caulinares e radiculares dos eixos embrionários, após cerca de cinco horas do descongelamento e reidratação. Os autores ainda concluíram que a formação de pequenos cristais de gelo durante o congelamento intracelular não causou danos maciços às estruturas celulares, mas, de alguma

maneira, foram sinalizadores para a morte celular programada como a desintegração das membranas plasmáticas e a degradação das organelas celulares.

Como a coleta das amostras de sementes criopreservadas de maracujazeiro-azedo foi realizada logo após as três horas de descongelamento lento, e antes das mesmas serem reidratadas para ativar o metabolismo dos embriões, não foi possível observar os possíveis danos anatômicos que poderiam ser causados pela criopreservação.

3.2.5. CONCLUSÕES

Para a criopreservação de sementes de maracujazeiro-azedo, o teor de água de 10% e o cultivo *in vitro* de embriões maduros isolados é a combinação mais indicada a fim de alcançar germinação mais rápida e uniforme e sem danos anatômicos às células.

3.3. CULTIVO MÍNIMO *in vitro* DE SEGMENTOS NODAIS DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (*P. edulis* Sims)

3.3.1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são uma reserva natural de genes essenciais para a manutenção da produção de alimentos, fibras e medicamentos. Porém, o crescimento desordenado da população humana e a exploração dos ecossistemas, são ameaças reais a esses recursos, caso não sejam devidamente conservados (Kavani, 2011; Civatti et al., 2014).

A conservação *ex situ* é realizada principalmente por meio de banco de sementes, que é um método de custo relativamente baixo para preservar a diversidade genética de muitos indivíduos. Porém, as sementes de algumas espécies do gênero *Passiflora* sofrem com a rápida perda de viabilidade e algumas espécies possuem sementes dormentes. Estes fatores dificultam a manutenção de bancos de sementes de espécies de *Passiflora* L. (Faleiro et al., 2011).

Além dos bancos de sementes, as espécies de maracujazeiro são conservadas em coleções a campo, porém, em decorrência do ataque de pragas e doenças e de alterações climáticas como secas e geadas, dentre outras, as coleções de maracujazeiro precisam ser replantadas a cada dois anos, aumentando a mão-de-obra e o custo de manutenção a campo (Faleiro et al., 2011).

Diante desse quadro, a conservação *in vitro* por cultivo mínimo e a criopreservação apresentam-se como alternativas viáveis para a manutenção da variabilidade genética em bancos de germoplasma de maracujazeiro. Para a implementação destas metodologias, o espaço requerido é pequeno e as coleções são mantidas longe das mudanças climáticas e livres do ataque de pragas e doenças por médios e longos períodos (Pacheco et al., 2016).

O cultivo mínimo *in vitro* consiste em manter a cultura sob taxas de crescimento limitado, por meio da aplicação de compostos que provocam estresse osmótico, inibidores de crescimento no meio de cultura e redução da temperatura de incubação (Withers, 1983). A vantagem é a manutenção de muitos acessos em um pequeno espaço físico, com custos reduzidos e livres dos riscos que existem no campo (Cid, 2001; Canto et al., 2004).

Embora o cultivo mínimo *in vitro* possa ser considerado um método promissor para a conservação de germoplasma em *Passiflora*, são poucos os trabalhos encontrados na literatura, visando desenvolver protocolos para a conservação *in vitro* por meio do cultivo mínimo de espécies de maracujazeiros (Faria et al., 2006; Garcia et al., 2011b). Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims), por meio da redução das concentrações de sais minerais, de sacarose e da temperatura.

3.3.2. REVISÃO

3.3.2.1. Bancos ativos de germoplasma de *Passiflora*

O Brasil é o centro de origem e de diversidade de várias espécies do gênero *Passiflora* (Bernacci et al., 2008; Cervi 2006). Esse fato intensifica a preocupação com a conservação dos recursos genéticos do gênero em programas de melhoramento genético, já que os recursos genéticos de *Passiflora* são as fontes de novos genes de interesse (Praciak, 2008).

A erosão genética tem sido expressiva para as espécies de maracujazeiro, sendo causada, principalmente, pela interferência humana reduzindo os

ambientes naturais (Ferreira, 2005). Por isso, Faleiro et al. (2011) relatam que é crucial a criação, ampliação e manutenção dos bancos de germoplasma, a fim de prevenir a extinção e de conservar genótipos que podem ser usados em programas de melhoramento genético de maracujá.

As estratégias para a conservação *in vitro* de acessos de maracujazeiro ainda são incipientes. Na prática, a conservação *ex situ* de *Passiflora* é geralmente limitada aos bancos de sementes e coleções de campo (Ferreira, 2005; Cerqueira-Silva et al., 2016). Ao todo são estimadas aproximadamente 50 coleções de *Passiflora* distribuídas em 32 países, que conservam cerca de 1200 acessos de maracujazeiro (Ferreira, 2005; Faleiro et al., 2011). Cerca de 95% destes acessos pertencem a bancos de germoplasma em apenas nove países: Brasil (32%), Equador (30%), Peru (14%), Colômbia (8%), França (3%), EUA (2%), Costa Rica (2%), Jamaica (2%) e Quênia (2%) (Ferreira, 2005; Cerqueira-Silva et al., 2014; Cerqueira-Silva et al., 2016).

No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) possui três bancos ativos de germoplasma de maracujazeiro em três unidades: Embrapa Cerrado (Bioma Cerrado), Embrapa Mandioca e Fruticultura (Bioma Mata Atlântica) e Embrapa Semi-Árido (Bioma Caatinga). A Embrapa Mandioca e Fruticultura localizada em Cruz das Almas – BA mantém um dos maiores Bancos de Germoplasma de *Passiflora* (Ferreira, 1999; Lima et al., 2004), sendo conservados 478 acessos, de um total de 52 espécies, em campo, telados e *in vitro* (Faleiro et al., 2011).

Além da Embrapa, existem outras coleções importantes em universidades e em instituições federais e estaduais, distribuídas pelo País (Cerqueira-Silva et al., 2016), conservando o germoplasma em forma de sementes, plantas a campo e explantes *in vitro* (Meletti et al., 2005; Faleiro et al., 2011). Na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro existe um acervo de, aproximadamente, 27 espécies e 116 acessos conservados na forma de sementes, em câmaras frias e no campo (Pereira, 2017).

Apesar da importância dessas coleções, a perda de acessos durante a conservação é um problema comum. Entre os motivos da perda dos acessos estão os problemas com a manutenção *in vivo* e a dificuldade com os protocolos apropriados para assegurar a viabilidade das sementes armazenadas (Ferreira, 2005). Segundo Cerqueira-Silva et al., (2016) esses problemas podem ser

superados com a melhor compreensão da ecologia e da fisiologia das espécies silvestres, do tipo de semente (ortodoxa, recalcitrante ou intermediária), das condições adequadas para o armazenamento (temperatura e umidade ideais) e de novas estratégias para a conservação *in vitro* como o cultivo mínimo e a criopreservação.

3.3.2.2. Cultivo mínimo *in vitro* em espécies do gênero *Passiflora*

A cultura de células e tecidos vegetais exhibe várias aplicações para o maracujazeiro como: a propagação clonal, a geração de variabilidade genética, a conservação de germoplasma, a limpeza clonal, a produção de mudas de alta qualidade e a produção de metabólitos secundários *in vitro* (Faleiro et al., 2012).

A conservação de germoplasma *in vitro* pode ser realizada basicamente por duas técnicas: a criopreservação e o cultivo mínimo *in vitro*. A técnica de cultivo mínimo *in vitro* visa minimizar a divisão celular e o crescimento da planta e aumentar sua longevidade, evitando alterações genéticas e aumentando o período entre os subcultivos (Souza et al., 2007). O método consiste em manter a cultura sob taxas de crescimento limitado, por meio da aplicação de compostos que provocam estresse osmótico, inibidores de crescimento no meio de cultura e, ou redução da temperatura de incubação (Withers, 1983).

A redução do crescimento do explante é geralmente obtida pela manipulação do meio de cultura (redução da concentração de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas), diminuição da temperatura de incubação, redução ou supressão da intensidade luminosa, ou modificações da atmosfera de cultura (Withers, 1983). Assim sendo, tem sido possível conservar *in vitro* diversas culturas (Withers, 1983; Islam et al., 2003; Souza et al., 2009; Reed et al., 2011; Santos et al., 2011). A conservação por cultivo mínimo *in vitro* é utilizada com sucesso na conservação de 30 acessos de batata-doce, pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, com subcultivos a cada 180 dias (Vettorazzi et al., 2017).

Alguns agentes osmóticos tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da planta ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993).

O cultivo mínimo *in vitro* é vantajoso por permitir a manutenção de muitos acessos em um pequeno espaço físico, com custos reduzidos e livres dos riscos que existem no campo (Cid, 2001; Canto et al., 2004). Contudo, são poucos os trabalhos avaliando o cultivo mínimo *in vitro* em espécies de maracujazeiro.

Faria et al. (2006) testaram em *P. giberti* três concentrações de sacarose combinadas com três concentrações de sorbitol e concluíram que foi possível conservar por quatro meses, microestacas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose e observou que a ausência de sacarose afetou negativamente a formação da raiz.

Garcia et al. (2011b) cultivaram segmentos nodais de *P. suberosa*, por 12 meses, em meio contendo baixas concentrações de sais minerais ($\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ MSM), vitaminas e sacarose, sob intensidade de luz reduzida. Além disso, a adição de ácido abscísico (ABA) ao meio de cultura também foi avaliada e, embora não tenha afetado o desenvolvimento da planta, causou uma redução significativa nas taxas de sobrevivência.

Especificamente para o gênero *Passiflora*, muito pouco se avançou em estudos sobre a conservação *in vitro*. Assim sendo, há uma grande necessidade de estudos básicos, para o estabelecimento de protocolos adequados para a manutenção das plantas *in vitro*, com relação à composição do meio de cultura a ser empregado, ao tempo de manutenção *in vitro*, ao número de subcultivos, à capacidade de regeneração dos explantes e a possível ocorrência de variações somaclonais devido ao tempo de manutenção *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005).

3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3.1. Ensaio de sais minerais e tipo de explante para o cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo

3.3.3.1.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes da cultivar Maracujá Redondo Amarelo - Isla® do lote 34525-52. A pesquisa foi realizada no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), cujas coordenadas locais de referência são 21° 45' de latitude Sul e 41° 20' de longitude Oeste e altitude média de 11 metros.

O tegumento das sementes foi removido com o auxílio de uma mini morsa e levado para a câmara de fluxo laminar. As sementes sem tegumento foram submetidas à desinfestação em álcool 70% durante 30 segundos, solução de NaClO a 0,5% com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL durante um período de 15 minutos e três enxagues em água desionizada autoclavada.

Em seguida, o embrião foi removido com o auxílio de uma pinça, bisturi e sob um microscópio estereoscópio (Tecnival®). Os embriões foram colocados para germinar em frascos de vidro (125 mm x 60 mm) contendo 40 mL de meio de cultivo constituído por metade dos sais minerais de MSM (Monteiro et al., 2000), vitaminas de White, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7 e, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos à 121 °C e 1,1 atm. Os embriões foram mantidos por 40 dias em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C no escuro por 15 dias e depois transferidos para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹. As plântulas foram as fontes de explantes para o ensaio.

3.3.3.1.2. Ensaio de sais minerais e tipo de explante

O ensaio foi conduzido em um DIC, em esquema fatorial 2x3, onde foram testadas duas composições de sais minerais (MS e MSM) e três tipos de explantes (segmento radicular, nodal e apical) com cinco repetições. Cada repetição foi constituída por quatro tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo um explante.

As plântulas foram seccionadas em três partes (segmento radicular, nodal e apical) (Figura 23) e, em seguida, foram colocadas em meios de cultivo contendo os sais minerais de MS (Murashige e Skoog, 1962) e MSM (Monteiro et al., 2000), vitaminas de White, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7 e, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. Foram distribuídos 10 mL de meio de cultura em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) e autoclavados por 15 minutos à 121 °C e 1,1 atm.

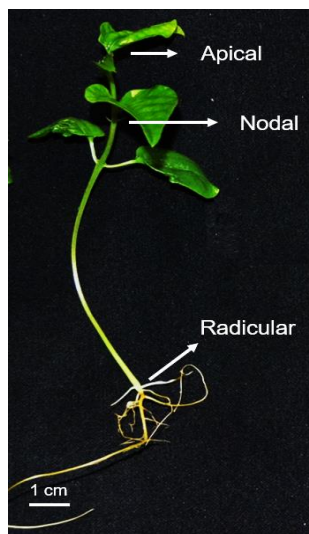


Figura 23. Plântula de maracujazeiro-azedo 40 dias após a germinação. Destaque para os segmentos: apical, nodal e radicular utilizados no ensaio.

Os segmentos foram mantidos por 60 dias em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas foram avaliadas após 60 dias de cultivo quanto a sobrevivência, enraizamento, número de folhas, número de brotos, altura da planta, massa da matéria fresca e seca total.

3.3.3.2. Experimento de cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo

3.3.3.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims) do programa de seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro-azedo da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As sementes foram retiradas dos frutos e lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira de aço para a remoção do arilo e desidratadas a temperatura ambiente (± 25 °C), durante quatro dias. Os procedimentos para a desinfestação das sementes e germinação das plântulas foram os mesmos citados no item (3.3.3.1.1.). As plantas de maracujazeiro-azedo com 60 dias após a germinação foram usadas como fonte dos segmentos nodais para o cultivo mínimo *in vitro*.

3.3.3.2.2. Cultivo mínimo *in vitro*

O experimento foi conduzido em um DIC, em esquema fatorial 2x3x3, onde foram testadas duas temperaturas (20 ± 2 °C e 27 ± 2 °C), três concentrações de sais minerais MSM (MSM total, $\frac{1}{2}$ MSM e $\frac{1}{4}$ MSM) e três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹). O experimento foi avaliado aos 120, 150 e 180 dias de cultivo mínimo. Cada avaliação foi realizada com três repetições de cada tratamento. Cada repetição foi constituída por três tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura e um explante.

Os segmentos nodais foram transferidos para os tubos de ensaio contendo os meios de cultura. A composição dos meios de cultura, de acordo com os tratamentos, foi: três concentrações de sais minerais de MSM (Total, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$), vitaminas de White, três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7 e, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. Foram distribuídos 10 mL de meio de cultura por tubo de ensaio (25 mm x 150 mm) e estes foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e 1,1 atm.

Os segmentos nodais foram mantidos por 120, 150 e 180 dias em B.O.D com temperatura de 20 ± 2 °C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 24A) e na sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 24B). As plantas foram avaliadas após 120, 150 e 180 dias quanto à sobrevivência, número de folhas e número de raízes. Além disso, foi realizada a avaliação da coloração da planta, que seguiu uma escala de cores (1: verde escuro, 2: verde claro e 3: amarelo) (Figura 25) aos 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

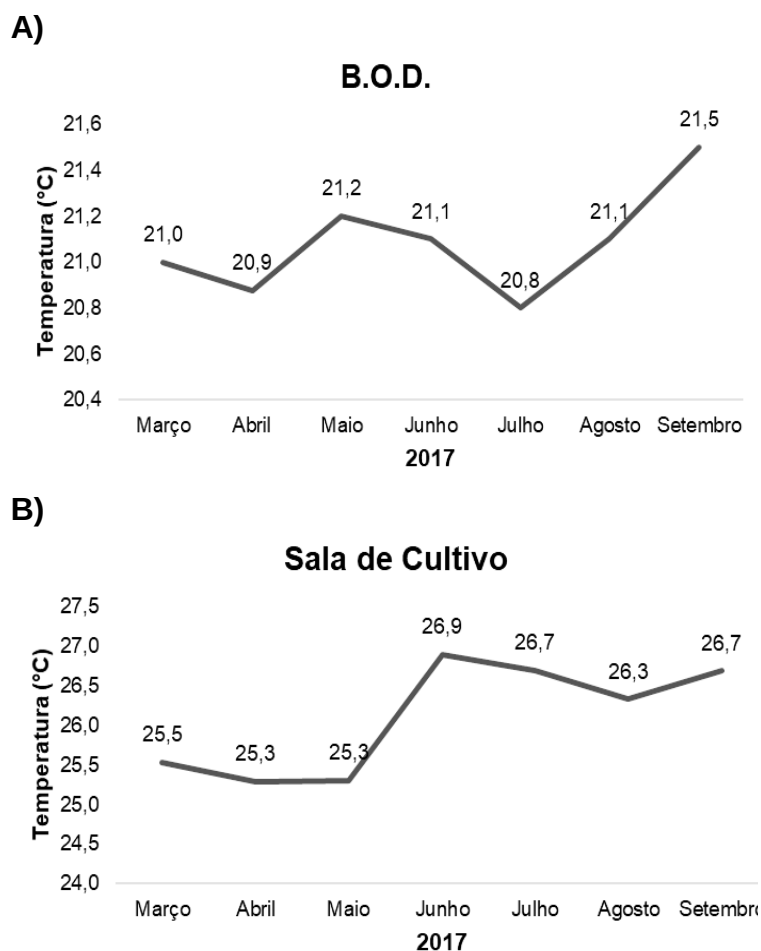


Figura 24. Médias da temperatura na (A) B.O.D. e na (B) sala de cultivo durante os seis meses de cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo.

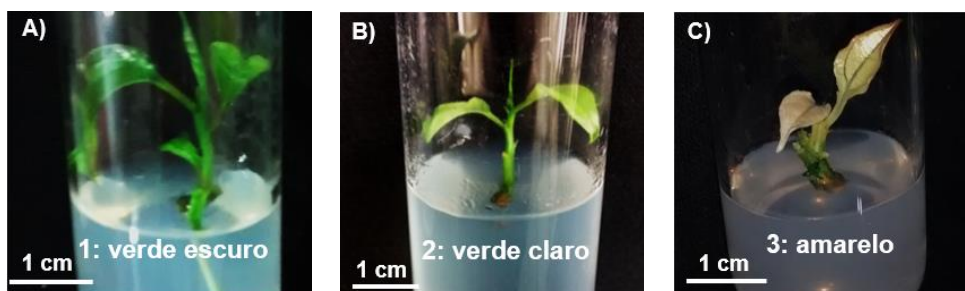


Figura 25. Escala de avaliação da coloração dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em cultivo mínimo *in vitro*. A) 1 = verde escuro, B) 2 = verde claro e C) 3 = amarelo.

Ao fim de cada avaliação, aos 120, 150 e 180 dias, os segmentos nodais foram transferidos para o meio de regeneração constituído pelos sais minerais de MSM, vitaminas de White, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 2,89 µmol L⁻¹ de GA₃ e 4,92 µmol L⁻¹ de AIB (Trevisan e Mendes, 2005), pH ajustado para 5,7 e, em seguida, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec®. Foram distribuídos 40 mL de meio de cultura por frasco de vidro (125 mm x 60 mm) e os frascos foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm.

Foram transferidos três segmentos nodais por frasco de cultivo (125 mm x 60 mm) e mantidos no meio de regeneração por 30 dias em B.O.D com temperatura média de 20±2 °C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹) ou na sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C (fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹).

As plantas sobreviventes foram aclimatizadas em casa de vegetação seguindo o DBC com três repetições. Cada parcela foi constituída por três plantas. As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 35%. As plantas foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultivo das raízes e transferidas para bandejas de plástico, com capacidade de 200 mL por célula, contendo o substrato comercial Basaplant® Hortaliças e irrigadas duas vezes por dia (Figura 26). Após 30 dias, as mudas foram avaliadas quanto à sobrevivência, número de folhas, altura da planta, volume das raízes, massa da matéria seca da parte aérea, da raiz e total.

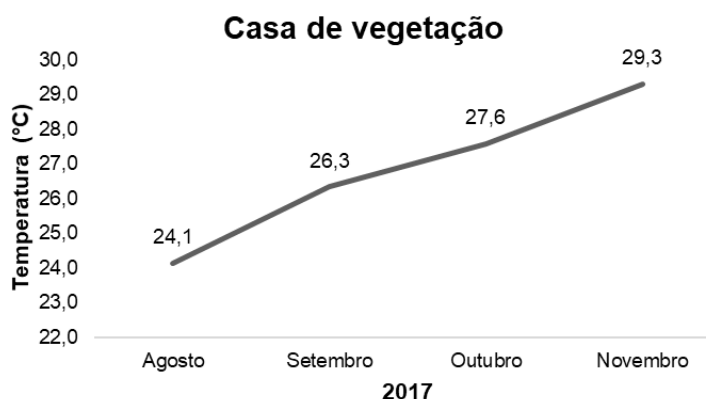


Figura 26. Temperatura média na casa de vegetação no período de aclimatização das plantas de maracujazeiro-azedo durante os meses de agosto até novembro de 2017.

3.3.3.3. Análises estatísticas

As variáveis de sobrevivência, número de folhas, número de raízes, altura da planta, volume das raízes, massa da matéria seca da parte aérea, raízes e total de maracujazeiro-azedo foram submetidas a testes iniciais de homogeneidade e normalidade, utilizando os testes de Bartlett e Lilliefors, respectivamente. Os dados foram transformados por raiz quadrada ($y = \sqrt{x}$). Em seguida, foi realizada a análise de variância e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações foram desdobradas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). As variáveis de sobrevivência no meio de regeneração e durante a aclimatização das plantas foram avaliadas pela estatística descritiva.

3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.4.1. Sais minerais e explante para o cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo

Segundo Faria et al. (2007), para o planejamento de experimentos que visem à conservação *in vitro* de germoplasma de maracujazeiros, é necessário saber a via de regeneração (organogênese ou embriogênese somática), o

explante que responde ao estímulo e a presença ou ausência de calo. Por isso o presente ensaio buscou identificar o melhor meio de cultivo e o tipo de explante para o cultivo *in vitro*, de maracujazeiro-azedo.

A análise de variância mostrou-se significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F para a composição dos sais minerais apenas para a variável massa da matéria seca total (Tabela 20). As variáveis número de brotos e altura da planta apresentaram diferença significativa entre os explantes (Tabela 20).

Tabela 20. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para o cultivo *in vitro* de segmentos radiculares, nodais ou apicais de maracujazeiro-azedo, cultivados em meios com diferentes composições de sais minerais (MS e MSM). Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Número de brotos	Número de folhas	Altura da planta
Sais minerais (M)	1	0,00037 ^{ns}	5,8815 ^{ns}	3,2334 ^{ns}
Explante (E)	2	2,3640*	0,5733 ^{ns}	79,2946*
(M) x (E)	2	0,4998 ^{ns}	0,6162 ^{ns}	6,5209 ^{ns}
Resíduo	24	0,2357	1,4693	20,2321
Média geral		1,28	1,33	24,11
C.V. (%)		37,8	57,88	18,65
Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Matéria fresca total	Matéria seca total	
Sais minerais (M)	1	0,0333 ^{ns}	0,0012*	
Explante (E)	2	0,0334 ^{ns}	0,0006 ^{ns}	
(M) x (E)	2	0,0029 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	
Resíduo	24	0,01408	0,0002	
Média geral		0,448	0,0779	
C.V. (%)		26,50	21,19	

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os sais minerais de MSM apresentaram a maior média para a massa da matéria seca total, sendo estatisticamente diferente dos sais de MS (Figura 27E). Já para as demais variáveis de número de brotos, número de folhas, altura da planta e massa da matéria fresca total, o uso dos sais minerais de MS e MSM não foram estatisticamente diferentes (Figura 27).

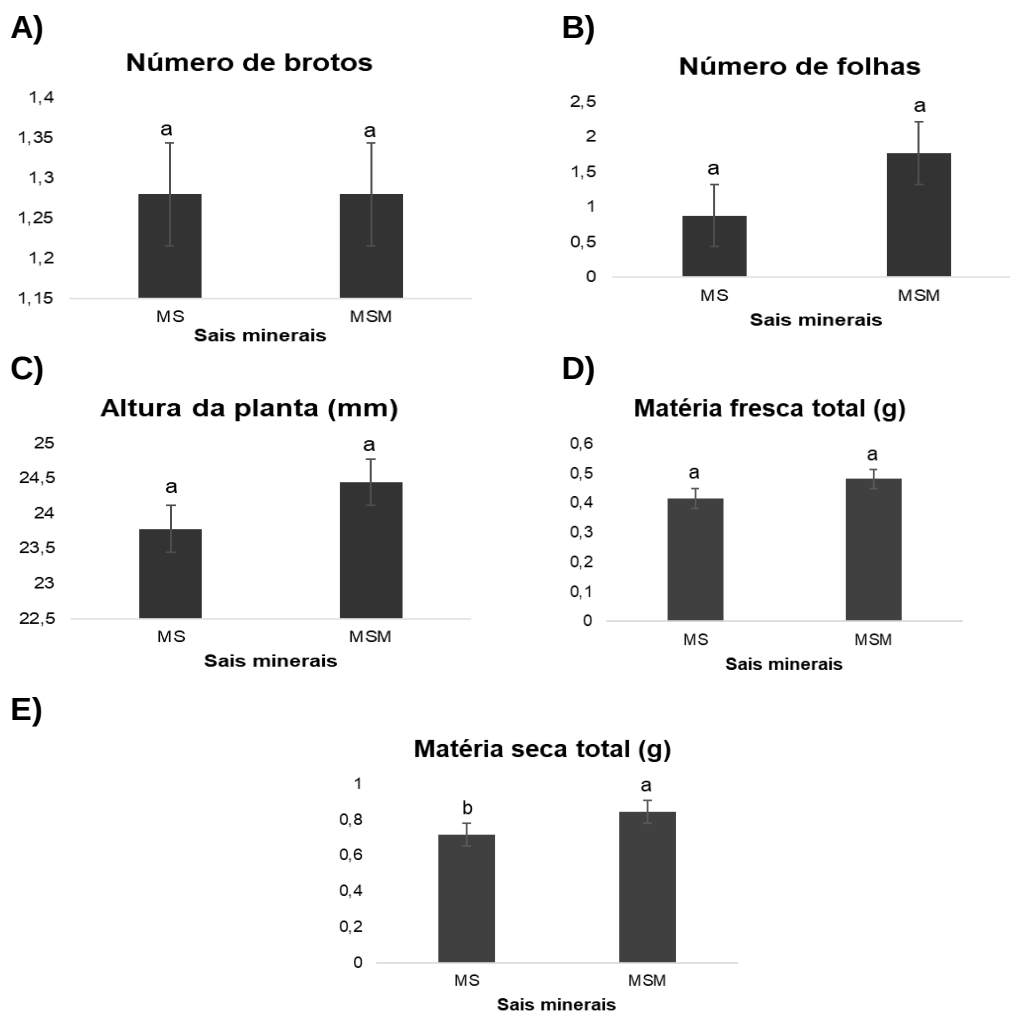


Figura 27. (A) Número de brotos, (B) número de folhas, (C) altura da planta, (D) massa da matéria fresca total e (E) massa da matéria seca total de segmentos radiculares, nodais ou apicais de maracujazeiro-azedo, cultivados *in vitro* em meios com sais minerais de MS e MSM.

Os sais de MSM foram elaborados para suprir as necessidades nutricionais *in vitro* de maracujazeiro-azedo (Monteiro et al., 2000), já o meio de cultivo MS foi desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), com base no requerimentos nutricionais para o cultivo *in vitro* de tabaco. Dessa forma, o melhor desempenho dos sais minerais de MSM em relação aos sais de MS já era esperado. Em trabalhos com espécies de *Passiflora* que comparam o desempenho do cultivo *in vitro* entre os sais MS e MSM, os sais de MSM se mostraram mais satisfatórios para a micropropagação *P. edulis* Sims (Monteiro et al., 2000) e de *P. suberosa* L. (Garcia et al., 2011a)

Em relação ao tipo de explante, o segmento radicular apresentou o pior desempenho para a média de número de brotos e altura da planta em comparação com os segmentos nodais e apicais (Figura 28A e C). Araújo, (2017) também observou menores média para a formação e alongamento de brotos em segmentos radiculares de *P. setacea*, em meio de cultivo MSM desprovido de fitorreguladores. Segundo Araújo (2017), para a formação e alongamento de brotos oriundos de segmentos radiculares é necessária a adição de BA ao meio de cultivo.

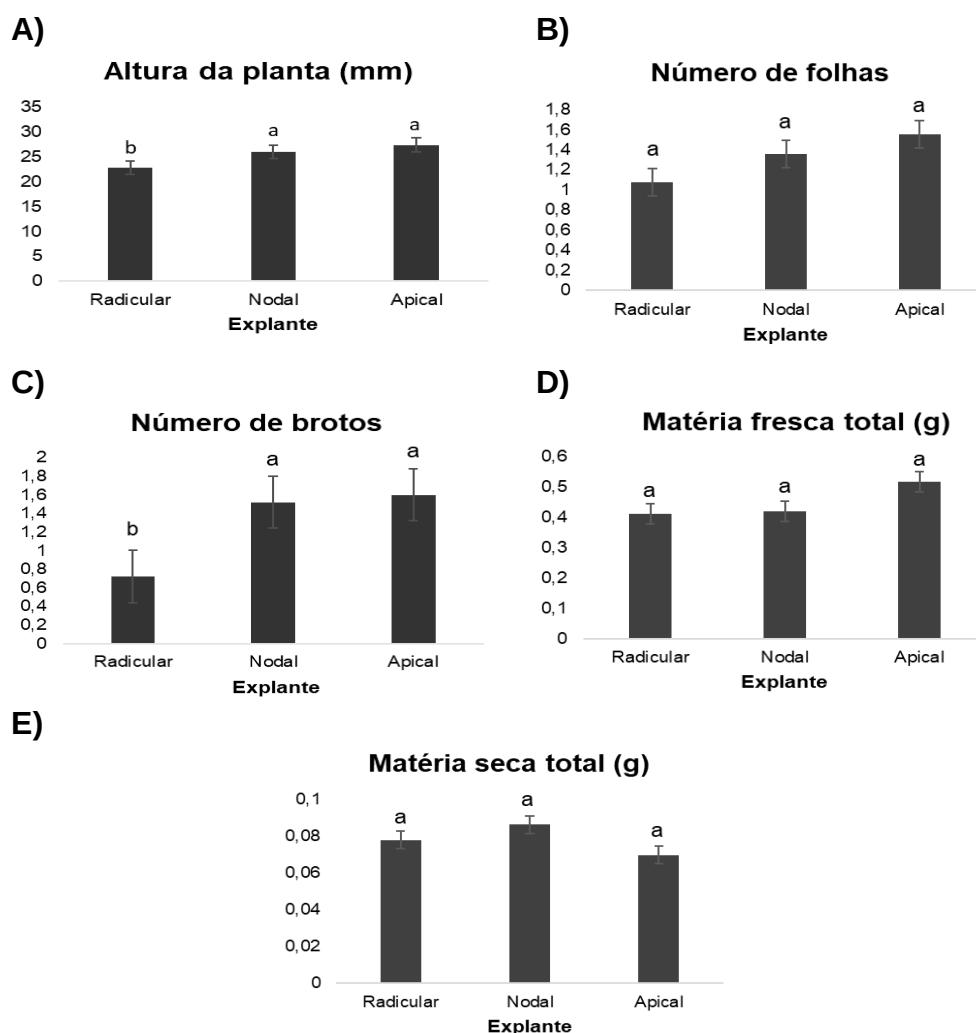


Figura 28. (A) Altura da planta, (B) número de folhas, (C) número de brotos, (D) massa da matéria fresca total e (E) massa da matéria seca total de diferentes tipos de explantes de maracujazeiro-azedo, cultivados *in vitro* em meios com sais minerais de MS e MSM.

As demais variáveis: número de folhas, massa da matéria fresca, seca e total não apresentaram diferença significativa (Figura 28B, D e E). Para o cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* é comum o uso de segmentos nodais, ápices caulinares, folhas, raízes e hipocótilo como explantes (Faria et al., 2006; Faria et al., 2007; Garcia et al., 2011a; Garcia et al., 2011b; Pacheco et al., 2012; Shekhawat et al., 2015, Araújo, 2017).

Os segmentos nodais e apicais apresentaram as maiores médias para número de brotos (Figura 28A) e altura das plantas (Figura 28C), sendo ambos explantes indicados para o cultivo *in vitro* de maracujazeiro-azedo. No entanto, Faria et al. (2007) relata o melhor desempenho no cultivo *in vitro* do explante segmento nodal em relação aos segmentos apicais em *P. giberti* N. E. Brown, *P. edulis* Sims e *P. laurifolia* L.

O cultivo *in vitro* de maracujazeiros enfrenta diversos problemas como clorose nas folhas e alta produção de etileno, que podem levar a variações morfológicas e necrose (Kantharajah e Dodd, 1990). Esses problemas justificam a importância das investigações acerca da melhoria de protocolos para a regeneração *in vitro* de espécies de *Passiflora* (Garcia et al., 2011a). Dessa forma, os estudos em relação ao tipo de explante e concentração dos sais minerais do meio de cultivo são necessários para auxiliar no desenvolvimento de protocolos de estabelecimento e conservação *in vitro* de germoplasma de maracujazeiro (Faria et al., 2007). Os sais minerais de MSM são indicados para a regeneração *in vitro* de segmentos nodais ou apicais de maracujazeiro-azedo (Figura 29).

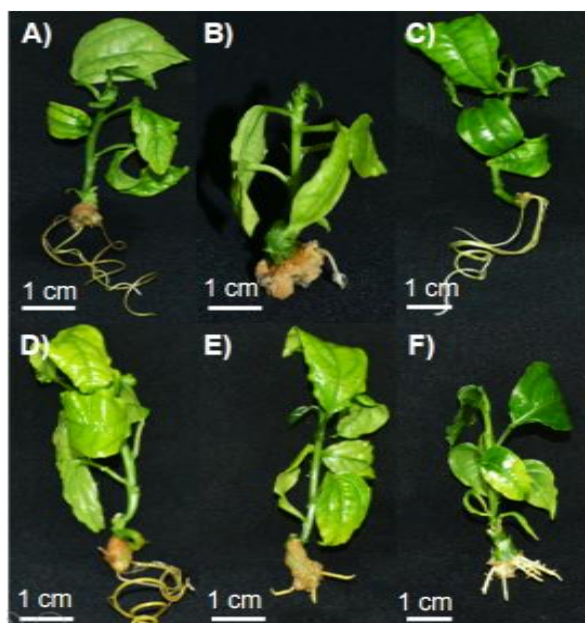


Figura 29. Regeneração de segmentos radicular, nodal e apical cultivados em meios com sais minerais de MS e MSM. (A) Segmento radicular em meio MS; (B) Segmento nodal em meio MS; (C) Segmento apical em meio MS; (D) Segmento radicular em meio MSM; (E) Segmento nodal em meio MSM; (F) Segmento apical em meio MSM.

3.3.4.2. Cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo

A análise de variância do cultivo mínimo *in vitro* durante 120 dias mostra a interação significativa entre os sais minerais e a sacarose para a sobrevivência dos segmentos nodais. Houve diferença significativa na temperatura para o número de folhas e para os sais minerais, na variável número de raízes de maracujazeiro-azedo (Tabela 21).

Tabela 21. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 120 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Sobrevivência	Número de folhas	Número de raízes
Temperatura (T)	1	0,526756*	24,897124*	0,002058 ^{ns}
Sais minerais (M)	2	0,582308*	1,952672 ^{ns}	0,969130*
Sacarose (S)	2	0,199591 ^{ns}	5,434136 ^{ns}	0,006173 ^{ns}
T x M	2	0,014403 ^{ns}	2,434147 ^{ns}	0,137861 ^{ns}
T x S	2	0,026748 ^{ns}	1,903286 ^{ns}	0,100822 ^{ns}
M x S	4	0,338479*	3,483536 ^{ns}	0,160493 ^{ns}
T x M x S	4	0,060700 ^{ns}	1,181069 ^{ns}	0,255143 ^{ns}
Resíduo	36	0,084362	3,516461	0,135803
Média		56,8	2,24	0,3148
C.V. (%)		43,69	57,62	103,52

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

No desdobramento da interação entre os sais minerais e a sacarose observa-se que a combinação entre os sais minerais de MSM com todas as concentrações de sacarose desfavoreceu a sobrevivência das plantas em comparação com os demais tratamentos, após 120 dias de cultivo mínimo *in vitro* (Tabela 22).

Tabela 22. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 120 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
MSM	33,3 Ab	22,2 Ab	55,5 Aa	37,0 b
½ MSM	94,4 Aa	55,5 ABab	33,3 Ba	61,1 a
¼ MSM	77,7 Aa	83,3 Aa	55,5 Aa	72,2 a
Média	68,5 A	53,7 A	48,1 A	56,8

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

As maiores médias para a sobrevivência foram observadas quando houve a redução para $\frac{1}{2}$ MSM em combinação com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose e com a redução dos sais para $\frac{1}{4}$ de MSM em combinação com todas as concentrações de sacarose (Tabela 22). A sacarose adicionada ao meio de cultivo afeta significativamente o crescimento das plantas *in vitro*, atuando tanto como fonte de energia quanto como regulador osmótico (Skrebsky et al., 2004; George et al., 2008). Portanto, dependendo da concentração, a sacarose pode atuar removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993; Shibli et al., 2006). Assim, a redução das concentrações de sais minerais em combinação com a redução da sacarose favorece as maiores médias para a sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo.

Aos 120 dias, a sobrevivência dos segmentos nodais foi maior quando cultivados a 20 °C (66,6%) (Tabela 23). A redução da temperatura de cultivo é uma estratégia eficiente para o cultivo mínimo *in vitro* para diversas espécies como sempre-viva (18 °C) (Lima- Brito et al., 2011), cana-de-açúcar (20 °C) (Lemos et al., 2002) e mandioca (22° C) (Souza et al., 2009).

Tabela 23. Médias da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Médias
20 °C	66,6 a
27 °C	46,9 b
C.V. (%)	43,69

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F (P≤0,05).

Em relação ao número de folhas, após 120 dias de cultivo mínimo, observa-se que as plantas cultivadas na temperatura de 20 °C tinham mais folhas (Tabela 24).

Tabela 24. Médias do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas, Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Média
20 °C	2,92 a
27 °C	1,57 b
C.V. (%)	57,62

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Já para a variável número de raízes, de modo geral, foi observado um baixo número de formação de raízes *in vitro*, sendo os sais minerais $\frac{1}{2}$ MSM e $\frac{1}{4}$ MSM, os que favoreceram as maiores médias de formação de raízes (Tabela 25).

Tabela 25. Médias do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 120 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais Minerais	Média
MSM	0,092 b
$\frac{1}{2}$ MSM	0,292 ab
$\frac{1}{4}$ MSM	0,555 a
C.V. (%)	103,52

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Após 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, observa-se interação tripla entre a temperatura, os sais minerais e a sacarose na sobrevivência e no número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo. Já para o número de raízes, a interação foi significativa entre a temperatura e os sais minerais (Tabela 26).

Tabela 26. Resumo da análise de variância com os quadrados médios no cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 150 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Sobrevivência	Número de folhas	Número de raízes
Temperatura (T)	1	0,462967*	3,804520 ^{ns}	0,131685 ^{ns}
Sais minerais (M)	2	0,427908*	16,866248*	2,674889*
Sacarose (S)	2	0,681068*	7,431439*	0,304529 ^{ns}
T x M	2	0,172839*	16,8629*	1,489708*
T x S	2	0,018519 ^{ns}	3,4315 ^{ns}	0,304526 ^{ns}
M x S	4	0,196504*	8,406382*	0,242799 ^{ns}
T x M x S	4	0,182100*	6,708852*	0,199588 ^{ns}
Resíduo	36	0,049383	1,644032	0,158437
Média		47,5	2,25	0,4197
C.V. (%)		38,48	41,33	79,01

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Aos 150 dias de cultivo mínimo a sobrevivência dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo foi maior quando, tanto os sais minerais quanto a sacarose foram reduzidos às menores concentrações, isso foi observado nas duas temperaturas testadas (100 e 89%) (Tabela 27).

Aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, observou-se que a combinação da maior temperatura (27 °C), MSM total e ½ MSM, juntamente com a maior concentração de sacarose (30 g L⁻¹), causou a morte dos segmentos nodais (Tabela 27).

Tabela 27. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as diferentes temperaturas, concentrações de sais minerais e sacarose após 150 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)	Temperatura	
		20 °C	27 °C
MSM	10	33,3 Abb	44,4 Aab
	20	33,3 Aba	22,2 Aabb
	30	77,7 Aaa	0,0 Bbb
½ MSM	10	89,0 Aaa	44,4 Bba
	20	66,6 Aaa	33,3 Aabab
	30	22,2 Abb	0,0 Abb
¼ MSM	10	100,0 Aaa	89,0 Aaa
	20	66,6 Aaa	66,6 Aaba
	30	22,2 Abb	44,4 Aba
Médias		56,7 A	38,2 B
C.V. (%)		38,48	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (para temperatura), minúscula na coluna (para sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (para sais minerais), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a variável número de folhas, as maiores médias foram observadas em meios com sais de MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose cultivados a 20 °C, em sais minerais com ¼ de MSM suplementados com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose e cultivados nas duas temperaturas (Tabela 28).

Tabela 28. Análise de desdobramento do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as diferentes temperaturas, concentrações de sais minerais e sacarose após 150 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)	Temperatura	
		20 °C	27 °C
MSM	10	0,77 Abb	2,22 Aab
	20	1,66 Aba	0,55 Aab
	30	5,11 Aaa	0,0 Ba
½ MSM	10	3,33 Aaab	1,33 Aab
	20	3,11 Aaa	1,11 Aab
	30	1,11 Aab	0,0 Aaa
¼ MSM	10	3,99 Aaa	5,44 Aaa
	20	2,88 Aaba	4,66 Aaba
	30	0,66 Abb	2,55 Aab
Médias		2,51 A	1,98 A
C.V. (%)		24,33	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (para temperatura), minúscula na coluna (para sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (para sais minerais), não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para o uso de sais ½ e ¼ de MSM nas duas temperaturas, observa-se que, conforme a concentração de sacarose aumenta, o número de folhas diminui (Tabela 28). Há uma importante relação entre a concentração de sais minerais e de sacarose no cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo. No entanto, aos 120 dias de cultivo, essa relação não foi observada (Tabela 24).

Para a variável número de raízes, após 150 dias de cultivo mínimo, a maior formação de raízes se deu em meios com 30 g L⁻¹ de sacarose cultivados a 27 °C (Tabela 29). Resultado este diferente do observado aos 120 dias, em que a sacarose não teve diferença significativa para o número de raízes entre os tratamentos (Tabela 25).

Tabela 29. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre a temperatura e as concentrações de sacarose após 150 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
20 °C	0,148 Aa	0,481 Aa	0,481 Ab	0,370 a
27 °C	0,074 Ba	0,111 Ba	1,22 Aa	0,469 a
Média	0,111 B	0,296 B	0,851 A	0,4197
C.V. (%)	79,01			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Com 180 dias de cultivo mínimo, a análise de variância mostrou interação significativa entre os sais minerais e a sacarose na sobrevivência, no número de folhas e número de raízes (Tabela 30). Para o número de raízes, ainda houve interação significativa entre a temperatura e a sacarose (Tabela 30).

Tabela 30. Resumo da análise de variância com os quadrados médios no cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, cultivados por 180 dias em duas temperaturas e em meios com diferentes concentrações de sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		Sobrevivência	Número de folhas	Número de raízes
Temperatura (T)	1	0,823046*	19,360054*	0,403291 ^{ns}
Sais minerais (M)	2	0,372428*	2,162551 ^{ns}	2,779841*
Sacarose (S)	2	0,310698*	6,452670*	0,742802 ^{ns}
T x M	2	0,039094 ^{ns}	0,878602 ^{ns}	0,569954 ^{ns}
T x S	2	0,026750 ^{ns}	0,748971 ^{ns}	1,137855*
M x S	4	0,248975*	6,465016*	0,681072*
T x M x S	4	0,057614 ^{ns}	2,267493 ^{ns}	0,248970 ^{ns}
Resíduo	36	0,049383	1,312759	0,236625
Média		32,0	1,21	0,34
C.V. (%)		60,59	74,01	111,73

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Em relação aos sais minerais e a sacarose na sobrevivência dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, após 180 dias, a maior porcentagem foi encontrada com a combinação de $\frac{1}{4}$ de sais minerais de MSM com 10 g L⁻¹ de sacarose (77,7%) e 20 g L⁻¹ de sacarose (50%) (Tabela 31). O mesmo resultado foi observado aos 120 e 150 dias de cultivo mínimo, quando a concentração de sais minerais totais foi reduzida para $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de MSM, a exigência de sacarose pelo explante também foi reduzida de 30 g L⁻¹ para 10 e 20 g L⁻¹ (Tabelas 22, 27 e 31).

Tabela 31. Análise de desdobramento da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
MSM	16,6 Ab	11,1 Ab	33,3 Aa	20,3 b
$\frac{1}{2}$ MSM	44,4 Ab	27,7 ABab	11,1 Ba	27,7 b
$\frac{1}{4}$ MSM	77,7 Aa	50,0 Aa	16,6 Ba	48,1 a
Média	46,3 A	29,6 AB	20,3 B	32,0
C.V. (%)	60,59			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As médias de sobrevivência dos segmentos nodais cultivados por 180 dias em cultivo mínimo novamente mostram um efeito positivo da temperatura de 20 °C (44,4%), em relação aos segmentos cultivados a 27 °C (19,7%) (Tabela 32).

Tabela 32. Médias da sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Médias
20 °C	44,4 a
27 °C	19,7 b
C.V. (%)	60,59

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

De modo geral, diante dos resultados obtidos na sobrevivência dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, aos 120, 150 e 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, observam-se as maiores sobrevivências em meios com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de MSM (Tabelas 22, 27 e 31). Resultado semelhante foi relatado por Garcia et al. (2011b), que também reduziram as concentrações dos sais minerais de MSM em *P. suberosa* e obtiveram 100% de sobrevivência de segmentos nodais cultivados em meios com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de MSM, durante os primeiros seis meses de cultivo mínimo. Já aos 12 meses, os autores obtiveram até 83% de segmentos sobreviventes.

Para a variável número de folhas, as maiores médias foram obtidas em meios com os sais minerais de $\frac{1}{2}$ MSM e $\frac{1}{4}$ de MSM em combinação com 10 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 33). Os resultados obtidos aos 180 dias não diferem dos observados aos 150 dias (Tabelas 28 e 33).

Tabela 33. Análise de desdobramento do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
MSM	0,5 Ab	0,6 Aa	1,7 Aa	0,96 a
$\frac{1}{2}$ MSM	1,9 Aab	0,9 Aa	0,38 Aa	1,07 a
$\frac{1}{4}$ MSM	3,3 Aa	1,1 Ba	0,5 Ba	1,61 a
Média	1,9 A	0,87 B	0,87 B	1,21
C.V. (%)	74,01			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Para o número de folhas após 180 dias de cultivo mínimo de maracujazeiro-azedo, a maior média foi obtida quando os segmentos nodais foram cultivados em temperatura média de 20 °C (Tabela 34).

Tabela 34. Médias do número de folhas de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Médias
20 °C	1,81 a
27 °C	0,61 b
C.V. (%)	74,01

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

Para a variável número de raízes, aos 180 dias, diferentemente do observado aos 150 dias, a maior média de formação de raízes foi obtida em meios cultivados a 27 °C suplementados com 10 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 35).

Tabela 35. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre a temperatura e as concentrações de sacarose após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
20 °C	0,22 Ab	0,22Aa	0,037 Aa	0,15 a
27 °C	0,92 Aab	0,33 Ba	0,33 Ba	0,52 a
Média	0,57 A	0,27 A	0,18 A	0,34
C.V. (%)	111,73			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

O maior número de raízes foi observado em segmentos nodais de maracujazeiro-azedo cultivados com ¼ de MSM suplementado com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 36).

Tabela 36. Análise de desdobramento do número de raízes de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em função da interação entre as concentrações de sais minerais e sacarose após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)			Média
	10	20	30	
MSM	0,0 Ab	0,0 Ab	0,22 Aa	0,073 b
½ MSM	0,33 Ab	0,11 Aab	0,05 Aa	0,16 b
¼ MSM	1,38 Aa	0,72 ABa	0,27 Ba	0,79 a
Média	0,57 A	0,27 B	0,18 B	0,34
C.V. (%)	111,73			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

A variável coloração dos segmentos nodais foi avaliada desde os 60 dias até 180 dias de cultivo mínimo *in vitro* e nota-se que os explantes ou os segmentos nodais, em meio suplementado com os sais minerais de MSM com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose, já apresentavam coloração amarelada desde a primeira avaliação aos 60 dias (Tabela 37). A partir dos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, observa-se a morte dos explantes cultivados nos meios com sais de MSM suplementado com 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose e ½ MSM com 30 g L⁻¹, ambos cultivados sob a temperatura de 27 °C (Tabela 37).

Tabela 37. Coloração dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em cultivo mínimo *in vitro* sob duas temperaturas, três concentrações de sais minerais e três concentrações de sacarose, ao longo de 180 dias de conservação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)	Coloração				
			60 Dias	90 Dias	120 Dias	150 Dias	180 Dias
20 °C	MSM	10	verde claro	verde claro	verde claro	verde claro	amarelo
		20	verde claro	verde claro	verde claro	verde claro	amarelo
		30	verde escuro	verde claro	verde claro	amarelo	amarelo
	½ MSM	10	verde escuro	verde escuro	verde escuro	verde claro	verde claro
		20	verde escuro	verde escuro	verde claro	verde claro	amarelo
		30	verde escuro	verde claro	verde claro	verde claro	amarelo
	¼ MSM	10	verde escuro	verde escuro	verde escuro	verde escuro	verde escuro
		20	verde escuro	verde escuro	verde claro	verde claro	verde claro
		30	verde escuro	verde claro	verde claro	verde claro	amarelo
	MSM	10	amarelo	amarelo	amarelo	amarelo	amarelo
		20	amarelo	amarelo	amarelo	-	-
		30	verde escuro	amarelo	amarelo	-	-
27 °C	½ MSM	10	verde escuro	verde claro	verde claro	amarelo	amarelo
		20	verde claro	verde claro	verde claro	verde claro	amarelo
		30	verde escuro	verde claro	amarelo	-	-
	¼ MSM	10	verde escuro	verde escuro	verde claro	verde claro	amarelo
		20	verde claro	verde claro	verde claro	Verde claro	verde claro
		30	verde claro	verde claro	verde claro	Verde claro	amarelo

Na literatura, são escassos os trabalhos sobre a conservação *in vitro* por cultivo mínimo de espécies do gênero *Passiflora* e nenhum com a espécie *P. edulis*. Faria et al. (2006) cultivaram a espécie *P. giberti* e testaram o meio MS suplementado com três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹), em combinação com três concentrações de sorbitol (10, 20 e 40 g L⁻¹) por até 120 dias. Já Garcia et al. (2011b) trabalharam com segmentos nodais de *P. suberosa* e obtiveram sucesso no cultivo mínimo por 12 meses em meios de cultivo com ½ MSM ou ¼ MSM suplementado com 3,78 µM de ABA. Desse modo, os resultados obtidos com o cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo comprovam o efeito positivo da redução para ½ e ¼ dos sais minerais de MSM, da sacarose para 10 e 20 g L⁻¹ e da importância de novas investigações acerca do efeito da redução da temperatura de cultivo.

Não foram relatados trabalhos testando diferentes temperaturas no cultivo mínimo *in vitro* de espécies de *Passiflora*. Porém, os resultados aqui demonstrados comprovam que a temperatura apresentou um efeito significativo sobre todas as variáveis analisadas *in vitro*. O cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, sob a temperatura de 20 °C, é capaz de promover a sobrevivência dos mesmos por até 180 dias, enquanto o cultivo mínimo em temperatura de 27 °C apresentou as menores médias de sobrevivência desde a primeira avaliação aos 120 dias (Figura 30).

Em relação ao uso dos sais minerais de MSM, Garcia et al. (2011b) já haviam relatado o sucesso do cultivo mínimo *in vitro* de *P. giberti* nas concentrações de ½ e ¼ MSM. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho. No entanto, o sucesso dos sais minerais de ½ e ¼ MSM está diretamente relacionado com as concentrações de 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose, proporcionando o cultivo mínimo com alta sobrevivência em *P. edulis* (Figura 30).

Em relação às concentrações de sacarose, houve um efeito negativo na sobrevivência dos segmentos nodais cultivados em sais minerais ½ e ¼ MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. Possivelmente, para os segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, o excesso de sacarose pode ter modificado a osmolaridade do meio de cultivo, o que interferiu na absorção dos sais minerais e vitaminas disponíveis para a planta.

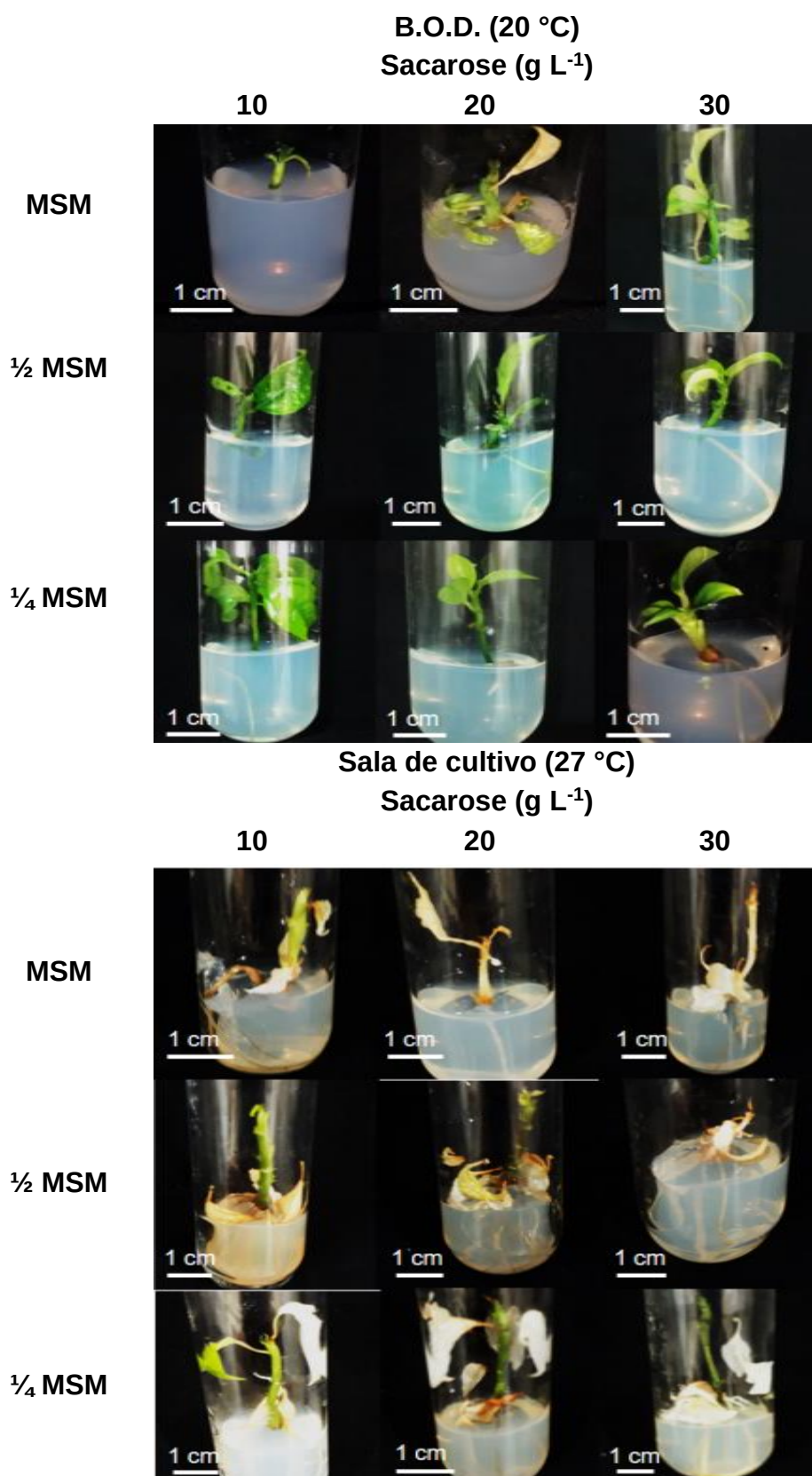


Figura 30. Segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 180 dias de cultivo mínimo *in vitro* em diferentes concentrações de sais minerais, sacarose e cultivados em B.O.D. a 20 °C e em sala de cultivo a 27 °C.

Após o cultivo mínimo *in vitro* os segmentos nodais de maracujazeiro-azedo foram transferidos para o meio de regeneração, onde permaneceram por mais 30 dias (Tabela 38).

Tabela 38. Médias da porcentagem de sobrevivências dos segmentos nodais cultivados por 30 dias em meio de regeneração, após serem conservados *in vitro* em duas temperaturas, três concentrações de sais minerais e três concentrações de sacarose durante 120, 150 e 180 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sais minerais	Sacarose (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)		
			120 Dias	150 Dias	180 Dias
20 °C	MSM	10	44,4	33,3	22,2
		20	22,2	22,2	22,2
		30	66,7	55,6	66,7
	½ MSM	10	77,8	100,0	77,8
		20	77,8	66,7	22,2
		30	44,4	33,3	22,2
	¼ MSM	10	88,9	100,0	88,9
		20	100,0	55,6	55,6
		30	44,4	33,3	22,2
	MSM	10	11,1	44,4	11,1
		20	22,2	0,0	0,0
		30	44,4	0,0	0,0
27 °C	½ MSM	10	100,0	22,2	33,3
		20	33,3	33,3	11,1
		30	22,2	0,0	0,0
	¼ MSM	10	55,6	83,3	55,6
		20	44,4	66,7	33,3
		30	33,3	33,3	11,1

A aclimatização é um dos processos mais delicados para o sucesso do cultivo *in vitro* de plantas. Para alguns genótipos de maracujazeiro-azedo a aclimatização é geralmente bem sucedida (Isutsa, 2004; Shekhawat et al., 2015). No entanto, a diferença de temperatura entre o cultivo *in vitro* na B.O.D e na sala de cultivo (Figura 24) para a casa de vegetação (Figura 25) fez com que alguns segmentos nodais não fossem capazes de sobreviver à aclimatização, reduzindo a porcentagem de sobrevivência ao longo das avaliações (Figura 31).

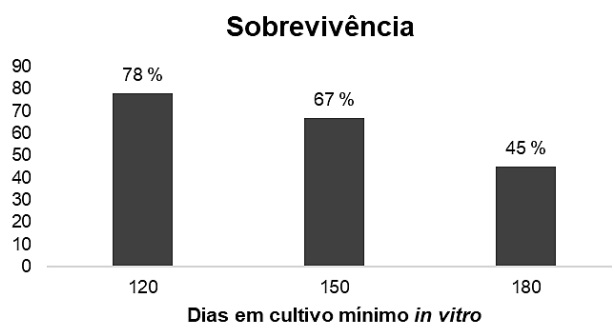


Figura 31. Médias da porcentagem de sobrevivência de plantas de maracujazeiro-azedo na aclimatização por 30 dias após a conservação *in vitro* por 120, 150 e 180 dias e 30 dias em meio de regeneração.

A análise de variância, após a aclimatização por 30 dias das plantas oriundas do cultivo mínimo por 120 dias, mostra diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F apenas para a variável número de folhas (Tabela 39). As demais variáveis altura da planta, volume das raízes, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total não foram estatisticamente diferentes (Tabela 39).

Tabela 39. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas *in vitro* por 120 dias e regeneradas *in vitro* por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume das raízes
Tratamento	13	416,58 ^{ns}	6,8794*	0,5213 ^{ns}
Resíduo	11	674,33	3,1127	1,0238
Média		36,11	7,4	0,8
C.V. (%)		36,04	13,57	66,6

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Matéria seca da parte aérea	Matéria seca da raiz	Matéria seca total
Tratamento	13	0,1101 ^{ns}	0,0036 ^{ns}	0,0272 ^{ns}
Resíduo	11	0,0192	0,0063	0,0476
Média		0,0986	0,0610	0,1775
C.V. (%)		65,6	76,3	68,08

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para a variável número de folhas o tratamento constituído por $\frac{1}{2}$ MSM, 30 g L⁻¹ de sacarose cultivados sob 27 °C se destacou em relação aos tratamentos cultivados a 20° C em meios MSM suplementado com 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose, $\frac{1}{2}$ MSM e $\frac{1}{4}$ MSM com 30 g L⁻¹ de sacarose e a 27° C em meio de cultivo com 20 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 40).

Tabela 40. Médias do número de folhas de plantas aclimatizadas por 30 dias oriundas do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo em diferentes temperaturas, sais minerais e sacarose por 120 dias e regeneradas *in vitro* por 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sais	Sacarose (g L ⁻¹)	Número de folhas
20 ° C	MSM	10	6,0 b
		30	6,0 b
		10	8,0 ab
	MSM	20	7,0 ab
		30	4,0 b
		10	7,3 ab
	$\frac{1}{4}$ MSM	20	8,1 ab
		30	5,5 b
		10	7,5 ab
27 ° C	$\frac{1}{2}$ MSM	20	6,0 b
		30	15,0 a
		10	8,0 ab
	$\frac{1}{4}$ MSN	20	8,0 ab
		30	7,0 ab
		10	7,0 ab

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

A análise de variância das plantas de maracujazeiro-azedo, aclimatizadas por 30 dias, oriundas do cultivo mínimo *in vitro* por 150 dias, mostraram diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis número de folhas e volume de raízes (Tabela 41). As demais variáveis altura da planta, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total não apresentaram diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 41. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas *in vitro* por 150 dias e regeneradas *in vitro* por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume das raízes
Tratamento	11	917,66 ^{ns}	6,6515*	0,4552*
Resíduo	10	855,10	1,2599	0,1398
Média		58,9	6,4	0,7
C.V. (%)		22,4	10,19	27,7

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Matéria seca da parte aérea	Matéria seca da raiz	Matéria seca total
Tratamento	11	0,0160 ^{ns}	0,0033 ^{ns}	0,024708 ^{ns}
Resíduo	10	0,0129	0,0020	0,0306
Média		0,1391	0,0545	0,1864
C.V. (%)		44,6	44,32	51,18

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

A maior média para o número de folhas foi observada no tratamento com sais $\frac{1}{4}$ MSM, 20 g L⁻¹ de sacarose cultivados a 27 °C, sendo estatisticamente diferente dos tratamentos cultivados a 20 °C em sais de MSM com 10 g L⁻¹ de sacarose, $\frac{1}{2}$ MSM com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose, $\frac{1}{4}$ de MSM com 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose e cultivados a 27 °C em meios com $\frac{1}{2}$ MSM com 10 g L⁻¹ de sacarose e $\frac{1}{4}$ MSM com 10 e 30 g L⁻¹ (Tabela 42).

Já para o volume das raízes, o tratamento com sais minerais de $\frac{1}{2}$ MSM, 30 g L⁻¹ de sacarose cultivado a 20 °C foi melhor em relação ao tratamento cultivado a 27 °C em meio com sais de $\frac{1}{2}$ MSM suplementado com 10 g L⁻¹ (Tabela 42).

Tabela 42. Médias da altura da planta, número de folhas e volume das raízes de plantas oriundas do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo após 150 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes temperaturas, sais minerais e sacarose. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Temperatura	Sais	Sacarose (g L ⁻¹)	Número de folhas	Volume das raízes (mL)
20 ° C	MSM	10	4,0 b	0,5 ab
		30	8,0 ab	0,65 ab
	½ MSM	10	6,3 b	0,45 ab
		20	6,6 b	0,53 ab
		30	8,0 ab	2,0 a
	¼ MSM	10	6,6 b	0,46 ab
		20	7,3 ab	0,43 ab
		30	5,0 b	0,5 ab
	½ MSM	10	4,0 b	0,1 b
27 ° C	¼ MSN	10	6,0 b	1,75 ab
		20	12,0 a	0,5 ab
		30	4,0 b	0,6 ab

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

A análise de variância das plantas de maracujazeiro-azedo aclimatizadas por 30 dias, após o cultivo mínimo *in vitro* por 180 dias e regeneração *in vitro* por mais 30 dias, não mostrou diferença significativa para nenhuma das variáveis avaliadas de altura da planta, número de folhas, volume da raiz, massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total (Tabelas 43).

Na última avaliação da aclimatização das plantas oriundas do cultivo mínimo de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo por até 180 dias e 30 dias em meio de regeneração *in vitro*, apenas oito tratamentos foram capazes de ser levados para a aclimatização. Os tratamentos sobreviventes foram os cultivados em temperatura de 20 °C em meios constituídos pelos sais de MSM com 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose, ½ MSM com 10, 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose e ¼ MSM suplementado com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose e apenas o tratamento cultivado em 27 °C em meio com ¼ de MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose.

Tabela 43. Resumo da análise de variância com os quadrados médios da aclimatização por 30 dias de plantas oriundas do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, conservadas *in vitro* por 180 dias e regeneradas *in vitro* por mais 30 dias. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Altura da planta	Número de folhas	Volume das raízes
Tratamento	7	2,4015 ^{ns}	5,9481 ^{ns}	0,7082 ^{ns}
Resíduo	7	886,84	10,6788	0,9617
Média		48,75	6,3	0,57
C.V. (%)		29,04	26,27	54,29

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Matéria seca da parte aérea	Matéria seca da raiz	Matéria seca total
Tratamento	7	0,0248 ^{ns}	0,0081 ^{ns}	0,0865 ^{ns}
Resíduo	7	0,0378	0,0107	0,0566
Média		0,0937	0,0446	0,1699
C.V. (%)		74,32	71,89	56,78

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Considerando os tratamentos que foram conservados *in vitro* por 180 dias, apenas um tratamento conservado na temperatura de 27 °C ($\frac{1}{4}$ de MSM com 30 g L⁻¹ de sacarose) e sete tratamentos conservados na temperatura de 20 °C (MSM com 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose, $\frac{1}{2}$ MSM com 10, 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose e $\frac{1}{4}$ MSM com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose) foram capazes de chegar até a aclimatização (Figura 32). Assim, a temperatura em que os segmentos nodais foram conservados é o principal fator para garantir o sucesso do cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo.

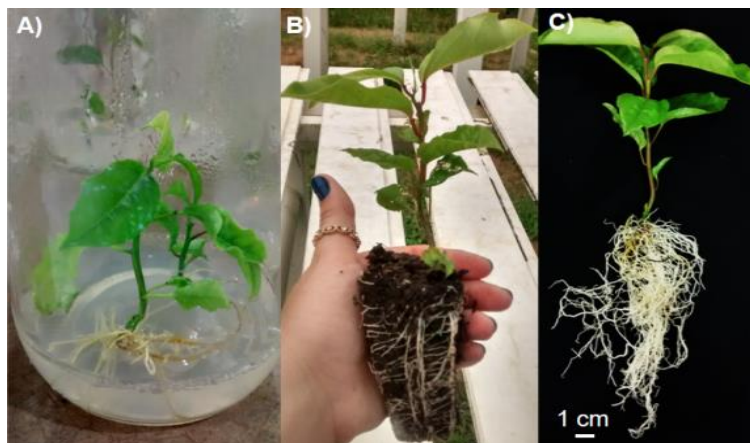


Figura 32. (A) segmentos nodais em meio de regeneração após 180 dias de cultivo mínimo em B.O.D; (B) e (C) enraizamento após 30 dias de aclimatização.

Diante dos resultados obtidos na sobrevivência ao cultivo mínimo *in vitro* durante 120, 150 e 180 dias, na regeneração por 30 dias e da aclimatização por mais 30 dias, a sobrevivência é garantida para a conservação *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo, com a redução da temperatura de cultivo para 20 °C, com a redução dos sais minerais de MSM para $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da concentração e a redução da concentração de sacarose para 10 ou 20 g L⁻¹ de sacarose.

3.3.5. CONCLUSÕES

O cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo é possível em meio com sais minerais $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de MSM, 10 ou 20 g L⁻¹ de sacarose, em temperatura média de 20 °C durante 180 dias.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho oferecem soluções eficientes para contornar algumas dificuldades frequentemente encontradas em programas de melhoramento genético de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims), como a possibilidade de resgate e cultivo *in vitro* de embriões imaturos oriundos de cruzamentos interespecíficos, proporcionando a obtenção de novas cultivares resistentes a doenças. Além disso, é proposto a conservação *in vitro* de germoplasma de maracujazeiro-azedo de maneira segura e eficiente por meio da criopreservação de sementes e do cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguacía, L. M., Miranda, D., Carranza, C. (2015) Effect of fruit maturity stage and fermentation period on the germination of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and sweet granadilla seeds (*Passiflora ligularis* Juss.). *Agronomía Colombiana*, 33(3): 305-314.
- Akamine, E. K., Girolami, G. (1959) Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. Honolulu. University of Hawaii, 44p.
- Alexandre, R. S., Wagner, A., Negreiros, J. R. D. S., Parizzotto, A., Bruckner, C. H. (2004) Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1239–1245.
- Alexandre, R. S., Couto, F. A. A., Dias, J. M. M., Otoni, W. C., Cecon, P. R., Gomes, S. B. S. (2009) Factors affecting *in vitro* germination of passion fruit seeds. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 1: 27-35.
- Alexandre, R. S., Costa, P. R., Chagas, K., Mayrinck, L. G., Detoni, J. L., Schimdt, E. R., (2014) Enraizamento adventício de estacas do maracujazeiro silvestre *Passiflora mucronata* Lam.: forma de veiculação e concentrações do ácido indol-3-butírico. *Revista Ceres*, 61(4): 567-571.

- Alfenas, P. F., Braz, A. S. K., Torres, L. B., Santana, E. N., Nascimento, A. V. S., Carvalho, M. G., Otoni, W. C., Zerbini, F. M. (2005) Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 33-38.
- Alves, C. Z., Sá, M. E., Corrêa, L. S., Binotti, F. F. S. (2006) Efeito da temperatura de armazenamento e de fitorreguladores na germinação de sementes de maracujá doce e desenvolvimento inicial de mudas. *Acta Scientiarum Agronomica*, 28(3): 441-448.
- Alves, R. R., Salomão, L. C. C., Siqueira, D. L., Cecon, P. R., Silva, D. F. P. (2012) Desenvolvimento do maracujá doce em Viçosa, Minas Gerais. *Revista Ceres*, 59(6): 127-133.
- Araújo, D. S., Luz, P. B., Neves, L. G., Sobrinho, S. D. P. (2016) Seed cryopreservation of *Passiflora species*. *Journal of Seed Science*, 38: 248–253.
- Araújo, L. S. (2017) Morfogênese *in vitro* e criopreservação de *Passiflora setacea* DC. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 66p.
- Barros, F. L. D. S., Zucoloto, M., Torres, F. J. B., Schmildt, E. R. (2006) Germinação *in vitro* de maracujá amarelo em diferentes concentrações de sacarose e ao tratamento físico no tegumento. In: *X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica - Universidade do Vale do Paraíba*, p. 1–4.
- Becerra, D. C., Forero, A. P., Góngora, G. A. (2004) Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 79: 87–90.
- Becwar, M. R., Stanwood, P. C., Leonhardt, K. W. (1983) Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant

- and desiccation-sensitive seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108(4): 613-618.
- Benevides, C. R., Gaglianone, M. C., Hoffmann, M. (2009) Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na Região Norte Fluminense, RJ. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(3): 415-421.
- Bennett, M. D. (2004) Perspectives on polyploidy in plants-ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 411–423.
- Berilli, S. S., Oliveira, J. G., Marinho, A. B., Lyra, G. B., Sousa, E. F., Viana, A. P., Bernardo, S., Pereira, M. G. (2007) Avaliação da taxa de crescimento de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) em função das épocas do ano e graus-dias acumulados. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(1): 011-014.
- Berjak, P., Pammenter, N. W. (2014) Cryostorage of Germplasm of Tropical Recalcitrant-Seeded Species: Approaches and Problems. *International Journal of Plant Sciences*, 175: 29–39.
- Berjak, P., Walker, M., Mycock, D. J., Wesley-Smith, J., Watt, P., Pammenter, N. W. (2000) Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, p. 140-155.
- Bernacci, L. C., Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Passos, I. R. S., Junqueira, N. T. V. (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Brasília: Embrapa Cerrados, p. 559-586.
- Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Passos, I. R. S., Meletti, L. M. M. (2008) Review of *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way

- to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 566–576.
- Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. (1996) *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Amsterdam: Elsevier, 502p.
- Borges, A. L., Lima, A. A. (2009) Maracujazeiro In: Crisóstomo, L. A., Naumov, A.(eds.). *Aduando para a alta produtividade e qualidade: Fruteiras Tropicais do Brasil*, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 166-181.
- Braga, M. F., Batista, A. D., Junqueira, N. T. V., Junqueira, K. P., Vaz, C. F., Santos, E. C., Santos, F. C. (2007) Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Pinto, A. C. Q., Sousa, E. S., IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 86-90.
- Braglia, L., Benedetti, L., Giovannini, A., Nicoletti, F., Bianchini, C., Pipino, L., Mercuri, A. (2010) *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. *Acta Horticulture*, 855: 47-52.
- Brandvain, Y., Haig, D. (2005) Divergent mating systems and parental conflict as a barrier to hybridization in flowering plants. *The American Naturalist*, 166(3): 330–338.
- Brasil (1992) Convenção sobre diversidade biológica. Ministério do Meio Ambiente. Brasília - DF. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf>. Acesso em: 3 de janeiro de 2018.
- Brasil (2009) Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Mapa/ACS, 399p.

- Bridgen, M. P. (1994) A review of plant embryo culture. *HortScience* 29: 1243–1246.
- Bruckner, C. H., Picanço, M. C. (2001) *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 472p.
- Bruckner C. H., Casali V. W. D., Moraes C. F., Regazzi A. J., Silva E. A. M. (1995) Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulture*, 370: 45–57.
- Buckeridge, M. S., Santos, H. P., Tiné, M. A. S., Aidar, M. P. M. (2004a) Mobilização de reservas. In: Ferreira, A. G., Borghetti, F. (eds.). *Germinação: Do Básico ao Aplicado*, Porto Alegre: Artmed, p. 163-188.
- Buckeridge, M. S., Tiné, M. A. S., Santos, H. P., Lima, D. U. (2004b) Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 137-162.
- Bugallo, V., Cardone, S., Julia, M., Gabriela, P. (2011) Breeding advances in *Passiflora* spp. (Passionflower) native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 5(1): 23–34.
- Busilacchi, H., Severin, C., Gattuso, M., Aguirre, A., Di Sapio, O., Gattuso, S. (2008) Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Medicinales y Aromática*, 7: 257–263.
- Caldas, L. S., Haridasan, P. Ferreira, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas vol. 1*. Brasília: Embrapa, p. 87-132.
- Canto, A. M. M., Souza, F. V. D., Costa, M. A. C., Souza, A. S., Ledo, C. A. S., Cabral, J. R. S., (2004) Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi

- tratado com paclobutrazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(7): 717-720.
- Carlesso, V. O., Berbert, P. A., Silva, R. F., Detmann, E. (2008) Secagem e armazenamento de sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Revista Brasileira de Sementes*, 30(2): 65-74.
- Carvalho, J. M. F. C., Araújo, S. D. S. (2007) *Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 35p.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000) *Sementes: Ciência, tecnologia e produção*. Funep, 4.ed., 590p.
- Carvalho, M. A. D. F., Paiva, R., Vargas, D. P., Porto, J. M. P., Herrera, R. C., Stein, V. C. (2012) Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. *Semina: Ciências Agrárias*, 33: 1027–1032.
- Cavichioli, J. C., Ruggiero, C., Volpe, C. A., Paulo, E. M., Fagundes, J. L., Kasai, F. S. (2006) Florescimento e frutificação do maracujazeiro-amarelo submetido à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 92-96.
- Cerqueira-Silva, C. B. M., Faleiro, F. G., Jesus, O. N., Santos, E. S. L., Souza, A. P. (2016) The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). In: Ahuja, M. R., Jain, S. M. (eds.) *Genetic diversity and erosion in plants*. New York: Springer International Publishing, p. 215-231.
- Cerqueira-Silva, C. B. M., Jesus, O. N., Santos, E. S. L., Corrêa, R. X., Souza, A. P. (2014) Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:14122–14152.
- Cervi, A. C. (2006). O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies

descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem*, 16: 1-5.

Chagas, E. A., Pasqual, M., Ramos, J. D., Cardoso, P., Cazetta, J. O., Figueiredo, M. A. (2003) Development of globular embryos from the hybridization between “Pêra Rio” Sweet Orange and “Poncã” Mandarin. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 483–488.

Cid, L. P. B. (2001) A propagação *in vitro* de plantas: O que é isso?. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 19(1): 16-21.

Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Torres-Silva, G., Assis, J. G. A., Bellintani, M. C. (2014) Cryoconservation of plant germplasm native to Brazil. *African Journal Biotechnology*, 13: 3847–3859.

Cobra, S. S. O., Silva, C. A., Krause, W., Dias, D. C., Karsburg, I. V., Miranda, A. F. (2015) Características florais e polinizadores na qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro-azedo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(1): 54-62.

Coelho, E. M., Azêvedo, L. C., Umsza-Guez, M. A. (2016) Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. *Cadernos de Prospecção*, 9(3): 347-361.

Colatto, U. L. D. (2010) Reação de progênies de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*). Dissertação (Mestrado em Agronomia), Brasília – DF, Universidade de Brasília., 97p.

Conceição, L. D. H. C. S., Souza, M. M., Belo, G. O., Santos, S. F., Freitas, J. C. O. (2011) Hybridization among wild passionflower species. *Revista Brasileira de Botânica*, 34(2): 237-240.

- Corner, E. J. H. (1977) *The seeds of dicotyledons*, Cambridge University Press, Cambridge, 320p.
- Costa, A. M., Tupinambá, D. D. (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. *In*: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 475-508.
- Cruz, D.C. (2016) Germinação de sementes de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC. e cultura *in vitro* de *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Florianópolis-SC, Universidade Federal de Santa Catarina, 110p.
- Delanoe, E. (1991) Étude de la résistance de passiflores de Guyane française vis-a-vis de fusarium pathogènes de la culture des fruits de la passion (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fruits*, 46(5) :593-600.
- Delanoy, M., Van Damme, P., Scheldeman, X., Beltran, J. (2006) Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora nov* sp. seeds. *Scientia Horticulturae*, 110: 198–203.
- Dias, J. M. M., Couceiro, M. A., Ventura, G. M., Siqueira, D. L., Lima, J. C. (2003) Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes do maracujazeiro. *Revista Ceres*, 50: 549–564.
- Dornelas, M. C., Vieira, M. L. C. (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*, 36: 211–217.
- Drew, R. A. (1991) *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora species*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 26: 23–27.
- Dumet D. (1993) Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-letters*, 14: 243- 250.

- Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duvall Y. (1993) Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports*, 12: 352-355.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1985). *Handbook for Seed Technology for Genebanks, Volume 2: Compendium of Specific Germination, Information and Test Recommendations*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources-IBPGR, 456p.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1990) An intermediate category of seed storage behavior. *Journal of Experimental Botany*, 41: 1167-1174.
- Engelmann, F. (1997) Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetative propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletters*, 112: 9-18.
- Engelmann, F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospect. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40: 427-433.
- Engelmann, F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 47(1): 5-16.
- Fabre, J., Dereuddre, J. (1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11: 413-126.
- Fahy, G. M., Macfarlane, D. R., Angell, C. A., Meryman, H. T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.
- Fajardo, D., Angel, F., Grum, M., Tohme, J., Lobo, M., Roca, W. M., Sanchez, I. (1998), Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica*, 101 :341-347.
- Faleiro, F. G., Andrade, S. R. M. (2009) Biotecnologia e transgênicos. *In*: Faleiro, F. G., Andrade, S. R. M., Reis Junior, F. B. (eds.). *Biotecnologia, transgênicos*

e biossegurança. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p.15-29.

Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. *In*: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p.187-210.

Faleiro, F. G., Oliveira, E. J., Andrade, S. R. M., Costa, A. M., Junqueira, N. T. V. (2012) Biotecnologia na cultura do maracujazeiro. *In*: Cançado, G. M. A., Londe, L. N., (eds) *Biotecnologia Aplicada à Agropecuária*. Caldas-MG: Epamig, p. 401-440.

Faleiro, F. G., Tadeu, N., Junqueira, V., Braga, M. F., Oliveira, E. J., Peixoto, J. R., Costa, A. M. (2011) *Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro: histórico e perspectivas*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 36p.

Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Junghans, T. G., Ledo, C. A. S., Souza, A. S. (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 267–270.

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

Faria, G. A., (2008) Tamanho ótimo de parcelas experimentais para experimentos *in vitro* com maracujazeiro. Tese (Doutorado em Agronomia), Ilha Solteira-SP, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, 101p.

Fernando, J. A., Vieira, M. L. C., Machado, S. R., Appezzato-Da-Glória, B. (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: The case of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91: 37–44.

Ferrari, R. A., Colussi, F., Ayub, R. A. (2004) Caracterização de subprodutos da

- industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1): 101-102.
- Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 5(6): 1039-1042.
- Ferreira, F. (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa, p. 41–52.
- Ferreira, M. E., Caldas, L. S., Resende, R. O. (1998) Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A., (eds.). *Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa, p.21-43.
- Ferreira, D. A. T., Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2015) Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for *in vitro* propagation without plant growth regulators. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*, 122: 629–638.
- Ferreira, G., Costa, P. N., Ferrari, T. B., Rodrigues, D. J., Braga, J. F., Jesus, F. A. (2007) Emergência e desenvolvimento de plântulas de maracujazeiro azedo oriundas de sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 595–599.
- Ferri, M. G. (1990) *Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)*. 9.ed. São Paulo: Nobel, 114p.
- Figueiredo, M. A. C., Paiva, R., Herrera, R. C., Alves, E., Castro, E. M., Paiva, P. D. O., Vargas, D. P. (2015) Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. *Revista Ceres*, 62: 340–346.
- Finch-Savage, W. E., Clay, H. A., Blake, P. S., Browning, G., (1992) Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: water status and endogenous abscisic acid levels. *Journal of Experimental Botany*, 43: 671–679.

- Fischer, I. H., Rezende, J. A. M., Filho, N. N., Silva, J. R. (2005) Ocorrência de *Nectria haematococca* em maracujazais no Estado do Rio de Janeiro e resistência de *Passiflora mucronata* ao patógeno. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 6.
- Flora do Brasil (2017) *Passiflora* in flora do Brasil 2020 (under construction). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, In: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12506> em 22/01/18.
- Freitas, J. C. O., Viana, A. P., Santos, E. A., Paiva, C. L., Silva, F. H. L., Amaral Jr., A. T., Souza, M. M., Dias, V. M. (2016) Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. *Euphytica*, 208: 493–50.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151–158.
- García, J. L., Troncoso, J., Sarmiento, R., Troncoso, A. (2002) Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 95–100.
- Garcia, R., Pacheco, G., Falcão, E., Borges, G., Mansur, E. (2011a) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue Organ and Culture*, 106: 47–54.
- Garcia, R. O., Pacheco, G., Vianna, M. G., Mansur, E. (2011b) *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. *CryoLetters*, 32: 377–388.
- George, E. F., Hall, M. A., Klert, G. D. (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture*.

3rd Edition, Dordrecht: Springer, 501p.

- González-Benito, M. E., Aguilar, N., Ávila, T. (2009) Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. *CryoLetters*, 30: 142–147.
- Gurski, C. (2015) Anatomia de frutos e sementes de espécies de *Passiflora* L. – subgêneros *Decaloba* (DC.) RCHB. e *Passiflora* L. (Passifloraceae). Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 82p.
- Guevara, C., J. Ospina, L., Caicedo, V., Barney, G., D’eeckenbrugge, C. (2003) Seed cryopreservation in three *Passiflora* species. Disponível em: <ftp://ciat.cgiar.org/ipgri/Templates%20Bioversity/crioPasiflora.doc>. em 22/10/17.
- Gutiérrez, M. I., Miranda, D., Cárdenas, J. F. (2011) Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.) Effect of pre-germination treatments on the germination of seed. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5: 209–219.
- Guzzo, F., Ceoldo, S., Andreetta, F., Levi, M. (2004) *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola*, 61: 108–113.
- Hamann, T. (2001) The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 292-299.
- Hannig, E. (1904) Zur physiologie pflanzlicher embryonen Ueber die cultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosack. *Botanische Zeitung*, 62: 45-80.
- Heywood, V. H., Iriondo, J. M. (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113(3): 321–335.

- Hong, T. D., Ellis, R. H. (1995) *A protocol to determine seed storage behaviour*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI, 55p.
- Hossain, M. A., Minami, M., Nemoto, K. (2003) Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. *Japan Journal of Tropical Agriculture*, 47: 9-16.
- Hu, C.Y., Ferreira, A. G. (1998) Cultura de embriões. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, 2: 371-393.
- Hu, C., Wang, P., (1986) Embryo culture: techniques and applications. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. (eds.). *Handbook of plant cell culture, techniques and applications*. New York: Macmillan Publishers, p. 43–96.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2013) *Anuário estatístico do Brasil*, 72:458p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2014) *Produção Agrícola Mundial*, v. 41.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016) Produção Agrícola Municipal - PAM. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados> em 12/03/2018.
- International Rules for Seed Testing [ISTA]. (2009) The International Seed Testing Association.
- Islam, M. T., Leunufna, S., Dembele, D. P., Keller, E. R. J. (2003). *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. *Plant Tissue Culture*, 13(1): 37-46.

- Isutsa, D. K. (2004) Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Science Horticulture*, 99: 395–400.
- José, A. R. S., Pires, M. M. (2011) Aspectos gerais da cultura do maracujá no Brasil. *In: Pires, M. M., José, A. R. S., Conceição, A. O. (eds.). Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade*. Ilhéus: Editus, p. 13-19.
- Junghans, T. G., Viana, A. J. C., Junghans, D. T. (2006) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá gibertii com e sem tegumento parcialmente removido. *In: Congresso Brasileiro de Fruticultura - Cabo Frio. Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, p. 191.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Bernacci, L. C. (2005) Potencial de espécie silvestre de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa p. 81-106.
- Junqueira, N. T. V., Lage, D. A. C., Braga, M. D., Peixoto, J. R., Borges, T. A., Andrade, S. R. M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *passiflora* silvestre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 97-100.
- Junqueira, N. T. V., Veras, M. C. M., Nascimento, A. C., Chaves, R. C., Matos, A. P., Junqueira, K. P. (2001) *A importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 18.
- Kantharajah, A. S., Dodd, W. A. (1990) *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passion fruit). *Annals of Botany*, 63: 337-339.
- Kaviani, B. (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal Crop Science*, 5: 778–800.

- Knudson, L. (1922) Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73: 1-25.
- Kobori, C.N., Jorge, N. (2005). Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciência Agrotécnica*, 29(5): 1008-1014.
- Kornberg, H. L., Beevers, H. (1957) The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrates in castor bean. *Biochimica et Biophysica Acta*, 26(3): 531-537.
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N. (2010) Chilli peppers - a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1): 35-48.
- Laibach, F. (1925) Das Taubwerden von Bastardsamen und künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Botanische Zeitung*, 17: 417–459.
- Lambardi, M., Benelli, C. (2007) La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. *Fruticoltura*, 6: 34-39.
- Leão, R. M. K., Peixoto, J. R., Junqueira, N. T. V., Resende, R. O., Mattos, J. K. A., Melo, B. (2006) Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* - CABMV) em casa de vegetação. *Bioscience Journal*, 22(2): 87-92.
- Lemos, E. E. P., Ferreira, M. S., Alencar, L. M. C., Ramalho Neto, C. E., Albuquerque, M. M. (2002) Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(10): 1359-1364.
- Lester, R. N., Kang, J. H. (1998) Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany*, 82: 445-453.
- Li, D. Z., Pritchard, H. W. (2009) The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14: 614-621.

- Lima-Brito, A., Albuquerque, M. M. S., Alvim, B. F. M., Resende, S. V., Bellintani, M. C., Santana, J. R. F. (2011) Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural*, 41: 1354–1361.
- Lima, A. A., Caldas, R. C., Cunha, M. A. P., Santos Filho, H. P. (1999) Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujazeiro-amarelo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 21(3): 318-321.
- Lima, A. A., Cunha, M. A. P. (2004) Práticas culturais. In: Lima, A. A., Cunha, M. A. P. *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.169-178.
- Lima, D. M., Golombieski, E. R., Ayub, R. A. (2000) Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. *Ciência Rural*, 30(2): 359-363.
- Lima, V. V. F., Vieira, D. L. M., Sevilha, A. C., Salomão, N. A. (2008) Germination of tropical dry forest tree species of Paranã river basin, Goiás state, after three types of storage and up to 15 months. *Biotechnology Neotropical*, 8: 89-97.
- Lippmann, B., Lippman, G. (1984) Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Reports*, 3: 215–218.
- Liu, C. M., Xu, Z. H., Chua, N. H. (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 621-630.
- MacDougal, J. M. (1994) Revision of *Passiflora* Subgenus *Decaloba*, section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). *Systematic Botany Monographic* 41: 1-46.
- Machakova, I., Zazimalova, E., George, E. F. (2008) Plant growth regulators. Introduction: auxins, their analogues and inhibitors In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J., (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. 3ed.,

Dordrecht: Springer, p. 175-204.

- Madureira, H. C., Pereira, T. N. S., Cunha, M., Klein, D. E. (2012) Histological analysis of pollen-pistil interactions in sour passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims). *Biocell*, 36(2): 83-90.
- Madureira, H. C., Pereira, T. N. S., Cunha, M., Klein, D. E., Oliveira, M. V. V., Mattos, L., Filho, G. A. S. (2014) Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations. *Biologia*, 69(5): 574-584.
- Maguire, J. D. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2): 176-177.
- Malavolta, E. (2006) Manual de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Potafos, 638p.
- Manzur, J. P., Calvache-asensio, M. D. N., Rodríguez-Burruezo, A. (2014) Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers. *Scientia Agricola*, 71: 488–493.
- Manzur, J. P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo, A. (2013) Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulture*, 161: 181–187.
- Marín, J. A., Gella, R. (1987) Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock 'Masto de Montañana' (*Prunus cerasus* L.). *Acta Horticulturae*, 212: 603-606.
- Martins, C. M., Vasconcellos, M. A. S., Rossetto, C. A. V., Carvalho, M. G. (2010) Prospecção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. *Ciência Rural*, 40(9): 1934-1940.
- Mayeda, L. Y., Vieira, M. L. C. (1995) Estudo cariotípico de três espécies do

- gênero *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 18: 426.
- Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanism and applications. *American Journal of Physiology*, 274: 125-142.
- Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume especial, p. 83–91.
- Meletti, L. M. M., Barbosa, W., Veiga, R. F. A., Pio, R. (2007) Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agraria Paranaensis*, 6: 13-20.
- Meletti, L. M. M., Furlani, P. R., Álvares, V., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Filho, J. A. A. (2002) Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. *O Agrônomo*, 54: 30-33.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Passos, I. R. S. (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78.
- Merhy, T. S. M., Vianna, M. G., Garcia, R. O., Pacheco, G., Mansur, E. (2012) Cryopreservation of *Passiflora pohlii* – Vitrification and encapsulation-vitrification. *Cryobiology*, 65: 362-363.
- Monnier, M. (1995) Culture of zygotic embryos. In: Thorpe, T. A. (ed.), *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 117–153.
- Monteiro, M. (2005) Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*. Tese (Doutorado em Genética) – Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 134 p.
- Monteiro, A. C. B. A., Higashi, E. N., Gonçalves, A. N., Rodriguez, A. P. M. (2000)

- A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 36:527–531.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300: 332-336.
- Morales, E. A. V., Valois, A. C., Nass, L. L. (1997) Recursos genéticos vegetales. Brasília: Embrapa – SPI, 178 p.
- Moran Robles, M. J. (1978) Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. molissima* Bailey. *Fruits*, 33: 693-699.
- Morley-Bunker, M. J. S. (1980) Seed coat dormancy in *Passiflora* species. *Annual Journal Royal New Zealand Institute of Horticulture*, 8: 72-84.
- Morton, J. F. (1987) Passionfruit. In: Morton, J. F. (ed.). *Fruits of Warm Climates*. Miami: Creative Resource Systems. p. 320-328.
- Moshkov, I. E., Novikova, G. V., Hall, M. A., George, E. F., (2008) Plant growth regulators: Gibberellic acid, Abscissic acid, their analogues and inhibitors, miscellaneous compounds. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, Geert.-Jan. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd edition*. Dordrecht: Springer, p. 227–231.
- Müntz, K. (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*, 38: 77-99.
- Müntz, K., Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Schlereth, A., Tiedemann, J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1741-1752.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 437-497.
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35: 1036–1043.
- Nadarajan, J., Pritchard, H. W. (2014) Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: An innovation in plant cell preservation. *PLoS One*, 9: 1–11.
- Nakagawa, J., Cavariani, C., Amaral, W. A. N. (1991) Armazenamento de sementes de maracujá amarelo. *Revista Brasileira de Sementes*, 13(1): 77-80.
- Nakayama, F. (1966) Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata*, 42: 63–74.
- Negreiros, J. R. S., Wagner Júnior, A., Álvares, V. S., Silva, J. O. C. Nunes, E. S., Alexandre, R. S., Pimentel, L. D., Bruckner, C. H. (2006) Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós-colheita na germinação e desenvolvimento inicial do maracujazeiro amarelo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 21-24.
- Nery, F. C. (2008) Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico vermelho (*Anadenanthera columbria* Vell. Brenan). Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 217p.
- Nettancourt, D. D. (2001) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin: Springer, 325p.
- Nick, C., Silva, D. J. H., Mattedi, A. P., Pedrosa, D. A. (2010) Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. In: Pereira, T. N. S. *Germoplasma: Conservação*,

- manejo e uso no Melhoramento de plantas* (ed.). Viçosa-MG: Arca, p. 59-88.
- Nunes, C. F., Pasqual, M., Santos, D. N., Custódio, T. N., Araujo, A. G. (2008) Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*, 43(1): 9-14.
- Ocampo, J., Arias, J. C., Urrea, R. (2016) Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. *Euphytica*, 209(2): 395-408.
- O'Campo, J., D'Eeckenbrugge, J. C., Jarvis, A. (2010) Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the coffee growing zone. *Diversity*, 2:1158–1180.
- Oliveira Júnior, M. X., José, A. R. S., Rebouças, T. N. H., Moraes, O. M., Dourado, F. W. N. (2010) Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32: 584–590.
- Ospina, J. A., Guevara, C. L., Caicedo, L. E., Barney, V. (2000) Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: Engelmann, F., Takagi, H. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*, Rome, p. 1-7.
- Pacheco, G., Garcia, R., Lugato, D., Vianna, M., Mansur, E. (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae*, 144: 42–47.
- 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.
- Pádua, J. G., Schwingel, L. C., Mundim, R. C., Salomão, A. N., Roverijosé, S. C. B. (2011) Germination of *Passiflora setacea* seeds and storage induced dormancy. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(1): 80-85.

- Paiva, C. L., Viana, A. P., Santos, E. A., Silva, R. N. O., Oliveira, E. J., (2014) Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(2): 381-390.
- Panis, B., Lambardi, M. (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *Role Biotechnology*, 5: 43–54.
- Passos, I. R. S., Bernacci, L. C. (2005) Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: Faleiro, F., Junqueira, N. T. V., Braga, M. (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético 1ª ed.* Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p.361-383.
- Payán, F. R., Martin, F. W. (1975) Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. *Euphytica*, 24: 709-716.
- Pence, V. C. (2014) Tissue cryopreservation for plant conservation: potential and challenges. *International Journal Plant Science*, 175: 40–45.
- Pereira, J. E. S., Maciel, T. M. S., Costa, F. H. D. S., Pereira, M. A. A. (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). *Ciência e Agrotecnologia*, 30: 251–256.
- Pereira, T. N. S. (2017). Comunicação pessoal de Telma Nair Santana Pereira, em 10 de março de 2017, realizada in loco. Email para correspondência: telmasp@uenf.br.
- Pereira, W. V. S., Vieira, L. M., Ribeiro, L. M., Mercadante-Simões, M. O., Oliveira, T. G. S. (2011) Armazenamento de sementes de maracujazeiros. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41: 273–278.
- Pinto, A. P. C. (2010) Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para resistência ao Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba-SP, Universidade de São

Paulo – USP, 64p.

- Pinto, D. L. P., Almeida, A. M. R., Rêgo, M. M., Silva, M. L., Oliveira, E.J., Otoni, W. C. (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue Organ and Culture* ,107: 521–530.
- Pinto, P. H. T., Peixoto, J. R., Junqueira, N. T. V., Resende, R. O., Mattos, J. K. A., Melo, B. (2008) Reação de genótipo de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV). *Bioscience Journal*, 24(2): 19-26.
- Pires, M. M., Gomes, A. D. A. S., Midlej, M. M. B. C., São José, A. R., Rosado, P. L., Passos, H. D. B. (2011). Caracterização do mercado de maracujá. In: Pires, M. M., São José, A. R., Conceição, A. O. (eds.). *Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade*. Ilhéus: Editus, p. 21– 67.
- Pires, M. M., São José, A. R. (1994) Custo de produção e rentabilidade da cultura do maracujazeiro. In: São José, A. R. (ed.). *Maracujá: produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB, p. 223-233.
- Piza Júnior, C. T. (1991) A cultura do maracujá. Campinas: SAA, CATI, 71p.
- Posada, P., Ocampo, J., Santos, L. G. (2014) Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae) como una contribución para la conservación *ex situ*. *Revista Colombiana de ciencias hortícolas* 8: 9–19.
- Praciak, A. (2008) Seed storage of plant genetic resources. *Seed Science Research*, 6(2): 71-75.
- Raghavan, V. (1966) Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biological Reviews*, 41:1–58.

- Raghavan, V. (1980) Embryo culture *In: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York: Academic, p. 209–240.
- Raghavan, V. (2003) One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39: 437–442.
- Ramming, D. W. (1990) The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience*, 25(4): 393-398.
- Ramon, M., Geuns, J., Swennen, R., Panis, B. (2002) Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. *CryoLetters*, 23: 345-352.
- Razdan, M.K. (2003) Plant Tissue Culture. 2ed. Enfield, USA: Science Publishers, 376p.
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., Pence, V. C. (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47:1–4.
- Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Bruckner, C. H., Finger, F. L., Otoni, W. C. (2011) *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 451–459.
- Rego, M. M., Rego, E. R., Nattrodt, L. P. A., Finger, F. L., Otoni, W. C. (2014) Evaluation of different methods to overcome *in vitro* seed dormancy from yellow passion fruit. *African Journal Biotechnology*, 13: 3657–3665.
- Ribeiro, V. G., Pasqual, M., Ramos, J. D., Bearzoti, E., Neto, S. D. A. (1999) Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1327–1333.
- Roberts, E. H. (1973) Predicting the storage life of seed. *Seed Science and Technology*, 1(3): 499-513.

- Rocha, D. I., Monte-Bello, C. C., Dornelas, M. C. (2015) Alternative induction of *de novo* shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120: 1087–1098.
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Tanaka, F. A. O., Silva, L. C., Otoni, W. C. (2012) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111: 69–78.
- Rodrigues, D. L. (2015) Qualidade de sementes e variabilidade genética de progênes c03 de maracujazeiro-azedo em função da adubação e do armazenamento. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 99p.
- Rosa, Y. B. C. J., Bello, C. C. M., Dornelas, M. C. (2015) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120: 69–77.
- Ruggiero, C., São José, A. R., Volpe, C. A., Oliveira, J. C., Durigan, J. F., Baungartner, J. G., Silva, J. R., Nakamura, K., Ferreira, M. E., Kavati, R., Pereira, V. P. (1996). *Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção*. Brasília-DF: Embrapa, 64p.
- Sacoman, N. N. (2013) Conservação de germoplasma *in vitro* e identificação de genótipos de *Passiflora setacea* resistentes ao Cowpea aphid-borne mosaic virus. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 75p.
- Sacoman, N. N., Santos, E. A., Carvalho, V. S., Viana, A. P. (2018) Resistência ao Cowpea aphid-borne mosaic virus em genótipos de *Passiflora setacea* germinadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40:1-10.

- Sakai, A. (2000) Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, p. 1-7.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990) Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9: 30-33.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Azevedo, J. L. F., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M.; Otoni, W. C. (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 110: 413–422.
- Santos, E. A., (2013) Melhoramento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) visando à resistência ao *Cowpea aphid-borne* mosaic virus. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 178p.
- Santos, E. A., Viana, A. P., Freitas, J. C. O., Souza, M. M., Paiva, C. L. (2014) Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. *Genetics Molecular Research*, 13(4): 9828–9845.
- Santos, E. A., Viana, A. P., Freitas, J. C. O., Rodrigues, D. L., Tavares, R. F., Paiva, C. L., Souza, M. M. (2015) Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp. crossing. *Euphytica*, 204(1): 1-11.
- Santos, C. H. B., Neto, A. J. C., Junghans, T. G., Jesus, O. N., Girardi, E. A. (2016) Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora* spp. *Revista Ciência Agronômica*, 47: 481–490.
- Santos, M. C., Lédo, A. S., Lédo, C. A. S, Souza, F. V. D., Junior, J. F. S. (2011)

Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*, 42(3): 735-741.

Santos, T. M., Flores, P. S., Oliveira, S. P., Silva, D. F. P., Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes de maracujá de restinga. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 6(1): 26-31.

SAS Institute Inc. (2002) Statistical Analysis System user's guide. Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute.

Schäfer-Menuhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G. (1997) Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks. *Acta Horticulture*, 447: 477-482.

Shekhawat, M. S., Manokari, M., Ravindran, C. P. (2015) An improved micropropagation protocol by *ex vitro* rooting of *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. through nodal segment culture. *Scientifica*, 2015: 578–676.

Shibli, R. D., Shatnawi, M. A., Subaih, W. S., Ajlouni, M. M. (2006) *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2: 372-382.

Silva, C. V., Oliveira, L. S., Loriato, V. A. P., Silva, L. C., Campos, J. M. S., Viccini, L. F., Oliveira, E. J., Otoni, W. C. (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 407–416.

Silva, F. H. L., Muñoz, P. R., Vincent, C. I., Viana, A. P. (2016) Generating relevant information for breeding *Passiflora edulis*: genetic parameters and population structure. *Euphytica*, 208: 609-619.

Silva, R. M. (2016) Enxertia de cultivares de maracujazeiro azedo sobre *Passiflora*

foetida L.: desempenho agrônomo das cultivares, caracterização morfoagronômica, variabilidade genética do portaenxerto e resistência a fusariose. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Mossoró – RN, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 112p.

Silva, F. M., Corrêa, L. S., Boliani, A. C., Santos, P. C. (2005) Enxertia de mesa em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27: 98–101.

Silva-Neto, S. P., Andrade, S. R. M. (2011) Cultura de tecidos vegetais: Princípios e aplicações. In: Faleiro, F. G., Andrade, S. R. M., Reis Júnior, F. B. (eds.). *Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, p. 409–434.

Silveira, S. R. (2014) Desenvolvimento embrionário e do arilo em maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e maracujá doce (*Passiflora alata* L.). Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba-SP, Universidade de São Paulo, 60p.

Simão, M., Vianna, M., Garcia, R., Engelmann, F., Mansur, E., Pacheco, G. (2014) Criopreservação de raízes *in vitro* de *Passiflora pohlii* Mast. utilizando a técnica de vitrificação em crioplaquetas. In: *III Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos*. Santos, p. 11.

Skrebsky, E. C., Nicoloso, F. T., Ferrão, G. D. E. (2004) Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural*, 34(5): 1471–1477.

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 Medicinais*, 14: 138–142.

- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B. (2000) Lipids. *In*: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and molecular biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 456-527.
- Sousa, L. B., Melo, L. F., Freitas, R. C. A., Setubal, J. W., Rezende, D. F. (2010) Germinação e emergência de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 5: 190-194.
- Souza, A. S., Souza, F. V. D., Santos-Serejo, J. A., Junghans, T. G., Paz, O. P., Montarroyos, A. V. V., Santos, V. S., Morais, L. S. (2009) Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca. *Circular Técnica* 90, Cruz das Almas – BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 24p.
- Souza, M. M. (2002) Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 162p.
- Souza, A. S., Junghans, T. G. (2007) Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas-BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 152p.
- Souza, S. A. M., Martins, K. C., Azevedo, A. S., Pereira, T. N. S. (2012) Fenologia reprodutiva do maracujazeiro-azedo no município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Ciência Rural*, 42(10): 1774-1780.
- Stancato, G. C., Tucci, M. L. S. (2010) Monitoring the end of the *in vitro* phase of *Anthurium andreaeanum* Lindl. plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(1): 61–68.
- Stokes, M. E., Chattopadhyay, A., Wilkins, O., Nambara, E., Campbell, M. M. (2013) Interplay between sucrose and folate modulates auxin signalling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 162: 1552–1565.

- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Takahashi, E. K. (2002) Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) por biobalística. Tese (Doutorado em Genética), Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, 137p.
- Takahashi, N., Phinney, B. O., Macmillan, J. (1991) Gibberellins. New York: Springer – Verlag, 426p.
- Teng, Y. T. (1977) Storage of passion fruit (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*) seeds. *The Malaysian Agricultural Journal*, 51: 118-123.
- Thorpe, T. A. (1995) *In vitro* embryogenesis in plants. In: Thorpe, T. A. (ed.), *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 181–183.
- Tozzi, H. H., Takaki, M. (2010) Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. *Brazilian Journal of Biology*, 7: 701–708.
- Trevisan, F., Mendes, B. M. J. (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola*, 62: 346–350.
- Tsuboi, H., Nakagawa, J. (1992) Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Científica*, 20: 63-72.
- Ulmer, T., MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora*: passionflowers of the world. 276p.
- Umbeck, P. F., Norstog, K. (1979) Effects of abscisic acid and ammonium ion on morphogenesis of cultured barley embryos. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 106: 110–116.

- Vanderplank, J. (2000). *Passion flowers*. The MIT Press, 224p.
- Vanderplank, J., Blanco, E. G., Feuillet, C., Frank, A., King, L., Kugler, E., Laurens, C., MacDougal, J., Skimina, T. (2003) The International *Passiflora* Register. *Passiflora Society International*, 1: 1-36.
- Vasconcelos, M. A., Silva, A. C., Silva, A. C., Reis, F. O. (2005) Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Brasília-DF: Embrapa Cerrados, p. 293-314.
- Veen, H. (1963) The effect of various growth-regulators on embryos of *Capsella bursapastoris* growing *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica*, 12: 129–171.
- Veiga-Barbosa, L., Mira, S., González-Benito, M. E., Souza, M. M., Meletti, L. M. M., Pérez-García, F. (2013) Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. *Seed Science and Technology*, 41: 89-97.
- Vettorazzi, R. G., Carvalho, V. S., Sudré, C. P., Rodrigues, R. (2017) Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. *Acta Scientiarum Agronomy*, 39(3): 359-367.
- Viana, A. P., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., Júnior, A. T. A., Souza, M. M., Maldonado, J. F. M. (2006) Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro-amarelo. *Revista Ceres*, 51(297): 545-555.
- Viana, A. P., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., Souza, M. M., Maldonado, J. F. M., Júnior, A. T. A., (2006) Genetic diversity in yellow passion fruit populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6: 87-94.
- Vianna, M. G., Ferreira, A. L., Garcia, R. O., Falcão, E., Pacheco, G., Mansur, E. (2012) Comparison of vitrification-based techniques in the efficacy of cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. and *P. foetida* L. shoot tips. *Cryobiology*, 65: 346.

- Vianna-Silva, T., Resende, E. D., Viana, A. P., Rosa, R. C. C., Pereira, S. M. F., Carlos, L. A.; Vitorazi, L. (2008) Influência dos estádios de maturação sobre as características físicas dos frutos de maracujá-amarelo. *Bragantia*, 67(2): 521-525.
- Vieira, L. M., Rocha, D.I., Taquetti, M. F., da Silva, L. C., Campos, J. M. S., Viccini, L. F., Otoni, W. C. (2014) *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant*, 50: 738–745.
- Viloria, Z., Grosser, J. W., Bracho, B. (2005) Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82: 159–167.
- Wagner Júnior, A., Alexandre, R. S., Negreiros, J. R. D. S., Pimentel, L. D., Silva, J. O. D. C. E., Bruckner, C. H. (2006) Influência do substrato na germinação e desenvolvimento inicial de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). *Ciência e Agrotecnologia*, 30: 643–647.
- Wagner Júnior, A., Negreiros, J. R. S., Alexandre, R. S., Pimentel, L. D., Bruckner, C. H. (2007) Efeito do pH da água de embebição e do trincamento das sementes de maracujazeiro amarelo na germinação e desenvolvimento inicial. *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 1014–1019.
- Walter, R., Carvalho, V. S., Generoso, A. L., Rodrigues, R., Gravina, G. D. A. (2018) Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescuing. *Acta Scientiarum Agronomy*, no prelo.
- Walters, C. P., Berjak, N., Pammenter, K., Kennedy, P. R. (2013) Preservation of recalcitrant seeds. *Science*, 339: 915–916.
- Wesley-Smith, J., Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P. (2015) Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of

programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Annals of Botany*, 115: 991–1000.

Wesley-Smith J, Berjak P, Pammenter NW, Walters C. (2014) Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of *Acer saccharinum*: an ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. *Annals of Botany*, 113: 695–709.

Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J. (2010). Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71: 1610–1614.

Withers L. A., King P. J. (1980) A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters*, 1: 213-220.

Withers, L. A. (1983) Germplasm storage in plant biotechnology. In: Mantell, S. H., Smith, H. (eds), *Plant biotechnology*, p. 187-218.

Yeung, E. C., Thorp, T. A., Jensen C. J. (1981) *In vitro* fertilization and embryo culture. In: Thorpe T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. New York: Academic, p. 253–271.

Yoon, J. B., Yang, D. C., Do, J. W., Park, H. G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56(1): 31–38.

Zucareli, V., Ferreira, G., Amaro, A. C. E., Araújo, F. P. (2009) Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista Brasileira de Sementes*, 31: 106–114.

Zucareli, V., Ono, E. O., Ferreira, G., Krohn, N. G. (2014) Germinação de sementes de maracujazeiros: água, luz, temperatura e reguladores vegetais. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 3: 98–113.