

MORFOGÊNESE *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Passiflora*
setacea DC.

LETÍCIA DA SILVA ARAÚJO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2017

MORFOGÊNESE *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Passiflora*
setacea DC.

LETÍCIA DA SILVA ARAÚJO

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCH / UENF**

060/2017

A663 Araújo, Letícia da Silva.

Morfogênese *in vitro* e criopreservação de *Passiflora setacea* DC. /
Letícia da Silva Araújo – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

xix, 87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) –
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

Bibliografia: f. 52 - 66.

1. Maracujazeiro-do-Sono. 2. Organogênese. 3. Encapsulamento-
Vitrificação. 4. Vitrificação em Gotículas. 5. Melhoramento Genético. I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.425

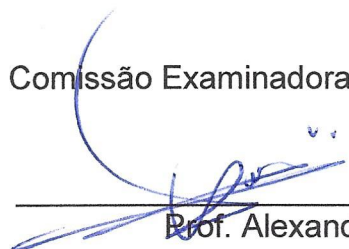
MORFOGÊNESE *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Passiflora setacea* DC.

LETÍCIA DA SILVA ARAÚJO

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 18 de abril de 2017.

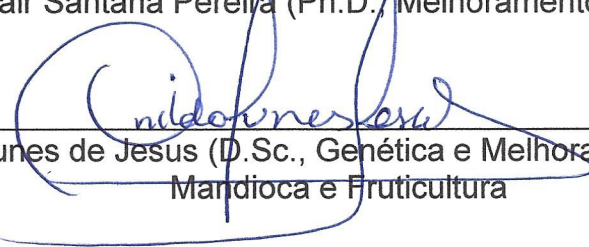
Comissão Examinadora:




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



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



Dr. Onildo Nunes de Jesus (D.Sc., Genética e Melhoramento) – Embrapa
Mandioca e Fruticultura



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

Aos meus pais Fleury Alcanfôr de Araújo (*in memoriam*) e Neci da Silva Araújo, à minha avó Maria Brito da Silva e aos meus irmãos Flávio Silva Araújo e Luiz Carlos Silva Araújo, pelo imenso amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente sempre na minha vida nos bons momentos e nos momentos de dificuldades. Pelas muitas bênçãos recebidas e por me manter firme durante essa jornada;

À minha família, minha mãe Neci da Silva Araújo, meu pai Fleury Alcanfôr de Araújo (*in memoriam*) e meus irmãos Luiz Carlos, Flávio, minha cunhada Xenise, pelo exemplo de dedicação e pelo carinho e apoio;

Ao meu querido Wallace Ribeiro, pelo carinho, paciência, amor e incentivo nos momentos difíceis;

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 mestrado;

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa;

À professora Virginia Silva Carvalho, minha orientadora, pelo incentivo, paciência e orientação na elaboração do trabalho.

Aos meus conselheiros, Alexandre Pio Viana e Henrique Duarte Vieira, pelos conselhos e contribuições no trabalho.

Aos professores do PPGMP, pelos ensinamentos durante esses dois anos, em especial à professora Telma, por todos os ensinamentos e contribuição durante esse trabalho, por sempre ser solícita e auxiliadora;

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

Ao Dr. Onildo Nunes de Jesus, pela doação do material vegetal e por aceitar participar da banca;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e aos colegas dessa instituição por toda a contribuição para esse trabalho;

Aos colegas do curso de PPGMP, pelos dois anos de estudo e dedicação;

A todos os meus colegas do laboratório LFIT 112, Andressa, Francielle, Grasiela, Kássila, Kézia, Mayara, Nayara, Rafael Rhuan, Rafael Walter, Ramon, Renato, Roberto, William;

Agradeço à Priscila por me receber em sua casa e pelo bom convívio;

Também, agradeço à Grasiela e Juliano por toda a ajuda nessa fase final do mestrado;

À Glazi e Victor Aragão, por toda a ajuda durante as análises desse trabalho;

Às minhas queridas amigas, Nayara, Jaileny, Michelle, Andreely e Carla, por todo incentivo e carinho durante todos esses anos;

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

MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tampas de polipropileno ventiladas compostas por duas camadas de fita microporosa e uma camada de fita de politetrafluoretileno entre as duas camadas de fita microporosa..... 11
- Figura 2.** Esquema de placas de Petri contendo os explantes oriundos de hipocótilo, segmento nodal e segmentos radiculares de *P. setacea* DC. utilizados na morfogênese *in vitro*..... 13
- Figura 3.** Calogênese e organogênese em hipocótilos de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese *in vitro* (barra = 1mm). A seta indica a formação de *clusters* de calos organogênicos..... 16
- Figura 4.** Calogênese e organogênese em segmentos nodais de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese (barra = 1mm). A seta indica a formação de *clusters* de calos. Formação de microbrotações por organogênese direta (*)..... 18
- Figura 5.** Calogênese e organogênese em segmentos radiculares de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese (barra = 1mm)..... 19
- Figura 6.** Média de brotações alongadas originárias de hipocótilos de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina

(BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	23
Figura 7. Média de brotações alongadas originárias de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	24
Figura 8. Média de brotações alongadas originárias de segmentos radiculares de <i>P. setacea</i> DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	25
Figura 9. Média de plantas enraizadas originárias de hipocótilos de <i>P. setacea</i> DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	25
Figura 10. Média de plantas enraizadas originárias de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> , cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	26
Figura 11. Média de plantas enraizadas originárias de segmentos radiculares de <i>P. setacea</i> DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$	26
Figura 12. Plantas aclimatizadas em casa de vegetação por 60 dias. Uma planta oriunda de hipocótilo na concentração de $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ (a), 12 plantas oriundas de segmentos nodais nas concentrações de $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ (b), duas plantas oriundas de segmento radicular, nas concentrações de $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ e $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ, respectivamente, (c) (barra = 20mm).....	27
Figura 13. Pré-cultivo de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC. em solução de MS líquido sobre mesa agitadora (100 rpm).	38
Figura 14. Encapsulamento de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC. após imersão em solução de cloreto de cálcio (a), segmentos nodais encapsulados de <i>P. setacea</i> DC. (b).....	38
Figura 15. Segmentos nodais encapsulados de <i>P. setacea</i> DC. imersos em solução de osmoproteção sobre mesa agitadora (100 rpm).....	39
Figura 16. Segmentos nodais encapsulados de <i>P. setacea</i> DC. tratados com solução de vitrificação PVS2 (a), imersão de criotubos em banho de gelo (0°C) (b), e armazenamento dos criotubos em nitrogênio líquido (c).	40
Figura 17. Descongelamento rápido de segmentos nodais encapsulados de	

<i>P. setacea</i> DC. imersos em água a 40°C (a), segmentos nodais encapsulados de <i>P. setacea</i> DC. em solução de descarregamento sobre agitação (100 rpm) (b).	41
Figura 18. Inoculação de segmentos nodais encapsulados de <i>P. setacea</i> DC. em meio de regeneração.....	41
Figura 19. Fluxograma com as etapas de vitrificação por gotículas para gemas laterais de <i>P. setacea</i> DC. Gemas cultivadas em meio MS sólido por 24 h. (a), tiras de alumínio sobre placa de gelo (b), gemas imersas em gota de PVS2 sobre tira de alumínio (c), gemas imersas em nitrogênio líquido (d), tiras de alumínio colocadas em criotubo (e), armazenamento dos criotubos em tanque de nitrogênio líquido (f).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os sais minerais do meio MS e do meio de cultura modificado (MSM) segundo o requerimento nutricional para espécies do gênero <i>Passiflora</i> spp. (Monteiro et al., 2000a adaptado).....	12
Tabela 2. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para os efeitos dos fitorreguladores 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) e sua interação (BA x TDZ) sobre a formação de calos nos três tipos de explantes de <i>P. setacea</i> DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	15
Tabela 3. Porcentagem de formação de calos nos explantes oriundos de hipocótilos de <i>P. setacea</i> DC. submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	16
Tabela 4. Porcentagem de formação de calos nos explantes oriundos de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	17
Tabela 5. Porcentagem de formação de calos em explantes oriundos de segmentos radiculares de <i>P. setacea</i> DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	19
Tabela 6. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para	

os efeitos dos fitorreguladores 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) e sua interação (BA x TDZ) sobre a formação de brotos nos três tipos de explantes de <i>P. setacea</i> DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	20
Tabela 7. Porcentagem de formação de brotações em hipocótilos de <i>P. setacea</i> DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	21
Tabela 8. Porcentagem de formação de brotações em segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes – RJ, 2017.....	22
Tabela 9. Porcentagem de formação de brotações em segmentos radiculares de <i>P. setacea</i> DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	22
Tabela 10. Descrição dos tratamentos para o uso da técnica de encapsulamento-vitrificação de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	40
Tabela 11. Descrição dos tratamentos para o uso da técnica de vitrificação em gotículas de gemas de segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	43
Tabela 12. Resumo da análise de variância com o grau de liberdade e quadrados médios sobre a porcentagem de sobrevivência, formação de calos e brotações em segmentos nodais de <i>Passiflora setacea</i> DC. submetidos a criopreservação por encapsulamento-vitrificação. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	45
Tabela 13. Porcentagem de sobrevivência, formação de calos e brotações em segmentos nodais encapsulados de <i>Passiflora setacea</i> DC. submetidos a criopreservação por encapsulamento-vitrificação após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	46
Tabela 14. Resumo da análise de variância com o grau de liberdade e quadrados médios sobre a porcentagem de sobrevivência, formação de brotações e formação de calos em gemas axilares de segmentos nodais de <i>Passiflora setacea</i> DC., submetidos a criopreservação por vitrificação em gotículas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	49

Tabela 15. Porcentagem para sobrevivência, formação de calos e brotações de segmentos nodais de <i>Passiflora setacea</i> DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4 D	2,4-Diclorofenoxiacético
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
BA	6-benziladenina
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
CV (%)	Coefficiente de Variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAO	Food And Agriculture Organization
GA₃	Ácido Giberélico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LFIT	Laboratório de Fitotecnia
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NL	Nitrogênio Líquido
pH	Potencial hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno
PVS2	Plant Vitrification Solution 2

RAS	Regras para Análise de Sementes
TDZ	Thidiazuron
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

RESUMO

ARAÚJO, Letícia da Silva; M. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2017; Morfogênese *in vitro* e criopreservação de *Passiflora setacea* DC.; Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Prof. Alexandre Pio Viana e Prof. Henrique Duarte Vieira.

A *Passiflora setacea* DC. é uma importante espécie do cerrado com potencial para uso em programas de melhoramento genético, por possuir genes de resistência a doenças que atacam a cultura do maracujá-azedo. Entretanto, essa espécie possui dificuldade de propagação, tanto por sementes como por estacas herbáceas. Diante disso, faz-se necessário o uso de estratégias de propagação e conservação de *P. setacea* DC.. Dessa forma, este trabalho objetivou i) estudar a resposta dos explantes hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular na morfogênese *in vitro* de *P. setacea*; ii) estabelecer um protocolo eficiente para morfogênese *in vitro* de *P. setacea* que promova maior multiplicação e regeneração de plantas; iii) estabelecer um protocolo de criopreservação de segmentos nodais por meio da técnica de encapsulamento - vitrificação. iv) estabelecer um protocolo de criopreservação de gemas axilares por meio da técnica de vitrificação em gotículas. Para o experimento de morfogênese foram utilizadas sementes do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para esse experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x4), em que para cada tipo de explante (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) foram testadas quatro

concentrações de 6-benziladenina (BA) (0,00; 2,22; 4,44 e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e quatro concentrações de thidiazuron (TDZ) (0,00; 2,27; 4,54 e 6,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Foi avaliada a porcentagem de formação de brotações e calos 55 dias após a indução. Em seguida, as brotações formadas foram conduzidas para as etapas de alongamento, enraizamento e aclimatização. Para o experimento de criopreservação, foram utilizados dois protocolos baseados na técnica de vitrificação (encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotículas). Para o encapsulamento-vitrificação, foram utilizados segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* e para a vitrificação em gotículas, foram utilizadas gemas axilares extraídas de plântulas germinadas *in vitro*. Os três explantes utilizados na morfogênese *in vitro* de *P. setacea* apresentaram formação de calos e brotações com maior formação de calos e brotações nos segmentos nodais e, na presença de BA. O TDZ isolado, apresentou efeito igual ou inferior ao BA na formação de calos e brotações nos três explantes utilizados. Para a regeneração de plantas a partir da morfogênese *in vitro* de *P. setacea*, recomenda-se a utilização de segmentos nodais como explantes, em meio suplementado com 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA. O protocolo de encapsulamento-vitrificação utilizado não foi eficiente para a criopreservação de segmentos nodais de *P. setacea*. No protocolo de vitrificação em gotículas, as gemas axilares de *P. setacea* apresentaram 17,50% de sobrevivência após a criopreservação.

Palavras-chave: maracujazeiro-do-sono, conservação, organogênese, encapsulamento-vitrificação, vitrificação em gotículas.

ABSTRACT

ARAÚJO, Leticia da Silva; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April 2017; *In vitro* morphogenesis and criopreservation of *Passiflora setacea* DC.; Advisor: Virginia Silva Carvalho; Committee members: Professor Alexandre Pio Viana e Professor Henrique Duarte Vieira.

Passiflora setacea DC. is an important species of Brazilian Cerrado with potential to be used in breeding improvement programs, as it has resistance genes to diseases that attack the sour passion fruit culture. However, this species has propagation difficulties, both by seeds and by herbaceous cuttings. Hence, it requires the use of propagation and conservation strategies of *P. setacea* DC. Thus, this study aimed i) to study the response to hypocotyl, nodal segment and root segment explants by *in vitro* morphogenesis of *P. setacea*; ii) to establish an efficient protocol for *in vitro* morphogenesis of *P. setacea* that may promote a better multiplication and regeneration of plants; iii) to establish a cryopreservation protocol of nodal segments by the technique of encapsulation–vitrification; iv) to establish a cryopreservation protocol of axillary buds through the technique of droplet vitrification. For the morphogenesis experiment, seeds from the germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits were used. For this experiment, a completely randomized design, in a 4x4 factorial scheme was arranged, in which for each type of explant (hypocotyl, nodal segment and root segment) were tested four concentrations of 6-benzyladenine (BA) (0,00; 2,22; 4,44 and 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and four concentrations of thidiazuron (TDZ) (0,00; 2,27; 4,54 and 6,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

The percentage of shoots and callus formation was evaluated 55 days after the induction. Then, the shoots formed were conducted to the phases of elongation, rooting and acclimatization. For the cryopreservation experiment, two protocols based on the vitrification technique (encapsulation-vitrification and droplet vitrification) were used. For the encapsulation-vitrification, nodal segments and seedlings *in vitro* were used and for the droplet vitrification, axillary buds extracted from seedlings *in vitro* were used. The three explants used in the *in vitro* morphogenesis of *P. setacea* presented callus and shoots formation, with higher formation of callus and shoots in the nodal segments and in the presence of BA. The isolated TDZ presented a similar or inferior effect to BA in the formation of callus and shoots in the three explants used. For the plant regeneration from the *in vitro* morphogenesis of *P. setacea*, it is recommended using nodal segments as explants, in the medium supplemented with 2.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BA. The encapsulation-vitrification protocol used was not efficient for the cryopreservation of nodal segments of *P. setacea*. In the protocol of droplet vitrification, the axillary buds of *P. setacea* presented 17.50% survival after the cryopreservation.

Keywords: 'sleep' passion fruit, conservation, organogenesis, encapsulation-vitrification, droplet vitrification.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. GERAIS.....	4
2.2. ESPECÍFICOS.....	4
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1. ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM <i>PASSIFLORA SETACEA</i> DC.....	5
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	5
3.1.2. REVISÃO.....	6
3.1.2.1. Botânica, origem e morfologia do gênero <i>Passiflora spp.</i>	6
3.1.2.2. Importância econômica da <i>P. setacea</i> DC.....	8
3.1.2.3. Morfogênese <i>in vitro</i> em <i>Passiflora spp.</i> - tipos de explantes e uso de fitorreguladores.....	8
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	10
3.1.3.1.1. Desinfestação das sementes.....	10
3.1.3.1.2. Germinação <i>in vitro</i>	10
3.1.3.2. Morfogênese <i>in vitro</i>	11
3.1.3.3. Alongamento das brotações.....	13
3.1.3.4. Enraizamento.....	14

3.1.3.5. Aclimatização	14
3.1.3.6. Análises Estatísticas	14
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1.4.1. Calogênese em explantes de <i>Passiflora setacea</i> DC.....	15
3.1.4.2. Organogênese em explantes de <i>Passiflora setacea</i> DC.	20
3.1.4.3. Alongamento das brotações.....	23
3.1.4.4. Enraizamento	25
3.1.4.5. Aclimatização	27
3.1.5. CONCLUSÃO	28
3.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>PASSIFLORA SETACEA</i> DC.....	29
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	29
3.2.2. REVISÃO.....	30
3.2.2.1. Conservação de Germoplasma	30
3.2.2.2. Bancos de Germoplasma - cenário da conservação de <i>Passiflora</i>	31
3.2.2.3. Conservação <i>in vitro</i> de germoplasma	32
3.2.2.4. Criopreservação como técnica de conservação para sementes de <i>Passiflora spp.</i>	33
3.2.2.4.1. Criopreservação de <i>Passiflora</i> pelo método de vitrificação.....	34
3.2.2.4.2. Criopreservação de <i>Passiflora</i> pelo método de encapsulamento-vitrificação.....	35
3.2.2.4.3. Criopreservação de <i>Passiflora</i> pelo método de vitrificação em gotículas.....	35
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.2.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	36
3.2.3.1.1. Desinfestação das sementes	36
3.2.3.1.2. Germinação <i>in vitro</i>	36
3.2.3.2. Encapsulamento-vitrificação.....	37
3.2.3.2.1 Pré-cultivo	37
3.2.3.2.2 Encapsulamento	38
3.2.3.2.3. Solução de osmoproteção (crioproteção)	38
3.2.3.2.4. Solução de vitrificação	39
3.2.3.2.5. Descongelamento	40
3.2.3.2.6. Inoculação em meio de regeneração	41

3.2.3.2.7. Delineamento e avaliações	41
3.2.3.3. Vitrificação em gotículas.....	42
3.2.3.3.1. Delineamento e avaliações	44
3.2.3.3.2. Análises Estatísticas	44
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.2.4.1. Encapsulamento-vitrificação em segmentos nodais de <i>P. setacea</i> DC.....	45
3.2.4.2. Vitrificação em gotículas de gemas axilares de <i>P. setacea</i> DC.....	48
3.2.5. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A contínua fragmentação do *habitat* é considerada uma ameaça significativa para a manutenção da biodiversidade em muitos ecossistemas terrestres (Young et al., 1996). O cerrado brasileiro é um *habitat* ameaçado, com a flora mais rica entre as savanas do mundo com cerca de 7000 espécies. No entanto, os esforços para conservação são modestos, de modo que apenas 2,2% de sua área está sob proteção legal (Klink e Machado, 2005).

A *Passiflora setacea* DC., conhecida como maracujazeiro-do-sono, é uma espécie silvestre, originária do cerrado e da caatinga (Costa et al., 2009), com distribuição geográfica na Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais e Rio de Janeiro, sendo bastante comum nas florestas primárias assim como em capoeiras, capoeirões e restinga litorânea (Cervi, 2006).

Essa espécie é caracterizada por possuir flores completas, autoincompatíveis, com o cálice e corola pentâmeros, com sépalas e pétalas livres de coloração branca, com filamentos da coroa com cerca de 20 mm, possuindo cinco estames livres, com filetes e anteras verdes, estigma tripartido ligado ao ovário por meio do estilete (Ribeiro, 2014). Os frutos possuem coloração verde-amarelada e são caracterizados por possuir cinco listas longitudinais da base ao ápice, com suco adocicado (Oliveira e Ruggieiro, 2005). As sementes são numerosas, obovadas de até 5 mm (Cervi, 1997).

Estudos recentes mostram que o maracujazeiro-do-sono vem despertando interesse em programas de melhoramento da cultura do

maracujazeiro-azedo, por apresentar resistência a patógenos como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Fuhrmann et al., 2014) e ao vírus do endurecimento dos frutos (CABMV) (Santos et al., 2015). Entretanto, a dificuldade na propagação por sementes e no enraizamento de estacas herbáceas podem ser fatores limitantes no uso dessa espécie em programa de melhoramento genético (Pádua et al., 2011; Braga et al., 2006a).

As sementes de *P. setacea* toleram a dessecação e o armazenamento em baixas temperaturas por um período intermediário, embora as baixas temperaturas possam induzi-las à dormência, tendo em vista que a longevidade das sementes dessa espécie é favorecida quando armazenada em temperaturas subzero (Pádua et al., 2011).

As formas mais habituais de conservação de espécies silvestres de *Passiflora* L. são em bancos de sementes e em coleções a campo. Entretanto, a renovação periódica dos bancos de sementes pode ser limitada pela redução do potencial de germinação, resultando em perda de genótipos (Pacheco et al., 2016). E as coleções vivas no campo podem expor o material a alta vulnerabilidade (ataque de pragas, doenças, furtos) (Faleiro et al., 2005).

As técnicas de cultura de tecidos podem auxiliar tanto na propagação, por meio do desenvolvimento de protocolos de micropropagação, como também na conservação *in vitro* de *P. setacea*. Para tanto, faz-se importante o estudo de requisitos específicos durante as etapas de micropropagação (escolha do explante, via organogênica, métodos de alongamento, enraizamento e aclimatização).

Nos últimos 50 anos, tais etapas vêm sendo descritas para as mais diferentes espécies do gênero *Passiflora* L. (Nakayama, 1966; Drew, 1991; Dornelas e Vieira, 1994; Lombardi et al., 2007; Pinto et al., 2010a; Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012). Esses estudos são importantes para o delineamento de estratégias de conservação *ex situ* e manutenção de germoplasma de *Passiflora* spp..

Apesar de promissora, a conservação *in vitro* ainda é pouco utilizada em espécies do gênero *Passiflora* L.. Dentre as técnicas de conservação *in vitro*, o cultivo mínimo *in vitro* visa à conservação a curto e médio prazo. E como método de conservação a longo prazo, a criopreservação visa à conservação por

períodos indefinidos mediante armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (-196 °C) ou na fase de vapor (-150 °C) (Engelmann e Takagi, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de plantas em explantes submetidos à morfogênese e à criopreservação para a conservação *ex situ* de germoplasma de *Passiflora setacea* DC.

2.2. Específicos

- Estudar a resposta dos explantes hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular na morfogênese *in vitro* de *P. setacea* DC.
- Estabelecer um protocolo eficiente para morfogênese *in vitro* que promova maior multiplicação e regeneração de plantas;
- Estabelecer um protocolo de criopreservação de segmentos nodais por meio da técnica de encapsulamento - vitrificação;
- Estabelecer um protocolo de criopreservação de gemas axilares por meio da técnica de vitrificação em gotículas.

3. CAPÍTULOS

3.1. ORGANOGÊNESE *IN VITRO* EM *Passiflora setacea* DC.

3.1.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é o maior representante da família Passifloraceae (Cervi, 2006). Encontra-se nesse gênero o maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims), de grande importância econômica por representar cerca de 90% dos pomares brasileiros de maracujá (Viana et al., 2016). Entretanto, ao longo dos anos, vários fatores colaboraram para que houvesse um decréscimo na produção de maracujá-azedo, principalmente devido à incidência de doenças que afetam a cultura, limitando o cultivo em algumas regiões, evidenciando a necessidade de obtenção de novas cultivares de maracujazeiro (Meletti, 2011).

A *P. setacea* DC. é uma espécie silvestre, conhecida como maracujazeiro-do-sono (Cervi, 1997), que possui genes de resistência a doenças que são comuns ao maracujazeiro-azedo (Fuhrmann et al., 2014). Essa espécie está sendo utilizada em programas de melhoramento genético, visando à obtenção de híbridos interespecíficos, resistentes às principais doenças da cultura do maracujazeiro (Santos et al., 2015). Apesar do seu grande potencial, esta espécie apresenta grande dificuldade em sua propagação com baixa

porcentagem de germinação de sementes e baixa capacidade de enraizamento de estacas herbáceas (Pádua et al., 2011; Chaves et al., 2004).

Dessa forma, as técnicas de cultivo *in vitro* podem auxiliar na propagação de *P. setacea* a partir do uso de protocolos eficientes de multiplicação. Para espécies do gênero *Passiflora*, alguns protocolos de multiplicação vêm sendo desenvolvidos mediante o estudo dos tipos de explantes, fitorreguladores e ambiente de cultivo (Faria e Segura, 1997b; Monteiro et al., 2000b; Becerra et al., 2004; Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Pinto et al., 2010a; Garcia et al., 2011a; Soares et al., 2012; Vieira et al., 2014).

O desenvolvimento desses protocolos *in vitro* é fundamental, pois possibilitam a multiplicação de várias espécies do gênero *Passiflora*, dando suporte para aplicação em outras técnicas biotecnológicas como a transformação genética (Trevisan et al., 2006; Monteiro-Hara et al., 2011; Viera et al., 2014), conservação de germoplasma (Faria et al., 2006; Faria et al., 2007; Soares et al., 2012), micropropagação (Santos et al., 2010) e na produção de compostos bioativos (Garcia et al., 2011a).

Em virtude do exposto, este trabalho objetiva desenvolver um protocolo eficiente de multiplicação *in vitro* e regeneração de plantas de *P. setacea* induzidas à morfogênese a partir do uso das citocininas 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) para três tipos de explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular).

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Botânica, origem e morfologia do gênero *Passiflora* spp.

No Brasil, a família Passifloraceae é representada por 152 espécies divididas em quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L.. O gênero *Passiflora* é o mais representativo dessa família, com 144 espécies descritas (Flora do Brasil, 2017). Essa família se diferencia das demais famílias pertencentes à ordem Malpighiales por possuírem filamentos na coroa (Nunes, 2009).

Acredita-se que o centro de origem desse gênero é o continente africano e sua chegada na América se deu por pontes de terras, com rápida diversificação, a partir da América Central (Muschner et al., 2012). O Brasil é considerado um dos principais centros de diversidade do gênero *Passiflora* L. (Cervi, 2006).

As plantas pertencentes a este gênero causaram grande admiração nos colonizadores durante a exploração espanhola na América, devido à beleza de suas flores e misticismo associados à tradição católica, onde a flor representa a paixão de Cristo (Cervi, 1997). Sua primeira descrição ocorreu por volta de 1587 como 'erva que dá fruto', citada no Tratado Descritivo do Brasil (Sousa et al., 1971).

As plantas desse gênero são caracterizadas por possuírem hábitos escandentes herbáceas ou lenhosas, algumas espécies são arbustivas, de crescimento vigoroso, possuindo gavinhas axilares para sustentação, com nectários no pecíolo foliar, com o caule de formato variando de cilíndrico à quadrangular, em geral estriado (Cervi, 1997; Ulmer e Macdougall, 2004).

Já as flores do gênero *Passiflora* distinguem-se principalmente por possuírem cinco estames com anteras fixadas ao filete na parte superior do androginóforo que é bem desenvolvido (Cervi, 1997). As espécies pertencentes à família Passifloraceae, em sua maioria, são alógamas (Duvick, 1967), embora haja espécies autógamas como é o caso da *P. capsularis* (Faria e Stehmann, 2010). Apesar de possuírem flores completas, a espécie *P. setacea* DC. é uma espécie alógama devido a autoincompatibilidade, que é um mecanismo que favorece a alogamia, por impossibilitar a autopolinização, resultando em um alto grau de heterozigose (Duvick, 1967). Essa espécie possui um número básico de cromossomos $n=x=9$ (Macdougall e Feuillet, 2004).

Os frutos desse gênero, em geral, são caracterizados como uma baga uniloculada, com pericarpo fino e membranoso ou espessa e carnuda, de formato ovoide à globular, com numerosas sementes, coberto por um arilo suculento comestível na maioria das espécies (Deginani, 2001).

Os frutos de *P. setacea* têm o formato redondo-ovalado, além de serem menores em relação ao maracujazeiro-azedo, com coloração verde-amarelada e apresentando cinco listras longitudinais (Vieira et al., 2008; Ribeiro, 2014). Esses frutos possuem ainda sementes numerosas, obovadas de até 5mm (Cervi, 1997). A frutificação dessa espécie, em geral, ocorre em duas épocas do ano, de janeiro

a março no sul da Bahia e de agosto a outubro no Estado de São Paulo (Ataíde, et al., 2012; Ribeiro, 2014).

3.1.2.2. Importância econômica da *P. setacea* DC.

A passicultura destaca-se por possuir um grande potencial para o mercado do consumo *in natura*, suco concentrado, ornamental, indústrias de cosméticos e medicinais como sedativos e antiespasmódicos (Braga et al., 2006b).

O cultivo de maracujazeiro concentra-se basicamente em duas espécies, são elas: o maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis*) e o maracujazeiro doce (*Passiflora alata*) (Pires et al., 2011). O maracujazeiro-azedo representa mais de 90% dos cultivos brasileiros (Viana et al., 2016).

A espécie *P. setacea* vem apresentando grande potencial entre as espécies de maracujazeiro, tanto para o desenvolvimento de novas cultivares quanto para o desenvolvimento de híbridos ornamentais. Foi a partir dessa espécie que se desenvolveu o primeiro híbrido ornamental, resultante do cruzamento entre *P. coccinea* X *P. setacea* (Faleiro et al., 2011).

A primeira cultivar de maracujazeiro silvestre registrada e protegida pelo Ministério da Agricultura, BRS Pérola do Cerrado, foi obtida a partir de seleção massal entre plantas de *P. setacea*, visando ao aumento da produtividade, tamanho de frutos e resistência a doenças (Costa et al., 2015). Os frutos desta cultivar apresentam numerosas sementes, de 170 a 200 sementes, com tamanho pequeno quando comparadas às do maracujá-azedo comercial, com massa média na faixa de 12,3 mg a 17,3 mg, dimensão longitudinal em torno de 5,3 mm e transversal de 3,3 mm, e espessura 1,29 mm (Costa et al., 2015).

3.1.2.3. Morfogênese *in vitro* em *Passiflora* spp. - tipos de explantes e uso de fitorreguladores

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica de cultivo de células, tecidos e órgãos em meio sintético, ambiente asséptico e condições controladas (Dagla, 2012). É considerada uma importante ferramenta biotecnológica no estudo da morfogênese (Diamond e Stewart, 1963) e na conservação dos recursos

genéticos (Pacheco et al., 2016), além de solucionar problemas relacionados ao melhoramento genético de plantas (Dagla, 2012).

Em geral, os protocolos para o estabelecimento *in vitro* de maracujazeiro, avaliam o tipo de explante, a composição do meio de cultura, o uso de fitorreguladores e as condições de incubação (Monteiro et al., 2000b; Trevisan e Mendes, 2005; Faria et al., 2007; Ozaroski e Thiem, 2013; Vieira et al., 2014 Pacheco et al., 2016).

No cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* spp. é mais comum o uso de explantes originários de segmentos nodais e ápices caulinares (Faria et al., 2007), embora outros trabalhos relatem o uso de explantes originários de folhas (Trevisan e Mendes, 2005), raízes (Vieira et al., 2014) e hipocótilo (Faria e Segura, 1997a).

As citocininas mais utilizadas na organogênese (formação de brotos) *in vitro* no gênero *Passiflora* são 6-benziladenina (BA) mais frequentemente e thidiazuron (TDZ) que favorecem a indução de brotações (Dornelas e Vieira, 1994; Faria e Segura, 1997b; Bacerra et al., 2004; Fernando et al., 2007; Pinto et al., 2010a; Soares, 2013; Vieira et al., 2014). Quando se deseja a formação de calos para indução de morfogênese por via embriogênica é mais empregada a auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Dornelas e Vieira 1994; Faria e Segura, 1997b; Dias et al., 2009).

Após a obtenção de brotos na etapa de morfogênese, é necessário o alongamento dos mesmos. Para esta etapa, vários trabalhos definem o ácido giberélico (GA₃) como fitorregulador, facilitando a individualização destes brotos (Nhut et al., 2007; Pinto et al., 2010a; Pinto et al., 2010b; Vieira et al., 2014). Para a indução de raízes em *Passiflora* spp, as auxinas mais utilizadas são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (Nhut et al., 2007; Komathi et al., 2011; Vieira et al., 2014).

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal foram utilizadas sementes de polinização aberta de *P. setacea* DC. (cultivar BRS Pérola do Cerrado, safra 2015/2016),

provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. 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.

3.1.3.1. Estabelecimento *in vitro*

3.1.3.1.1. Desinfestação das sementes

Para facilitar a germinação, os tegumentos das sementes foram retirados com auxílio de uma minimorsa antes da desinfestação. Em câmara de fluxo laminar as sementes sem tegumento foram mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, com 2 gotas de Tween 20 em 80 mL da solução por 15 minutos, enxaguadas três vezes em água desionizada e autoclavada.

3.1.3.1.2. Germinação *in vitro*

Após a desinfestação, as sementes sem o tegumento, foram colocadas em meio de cultura contendo a metade da concentração dos sais minerais do MS (Murashige e Skoog, 1962), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, acrescido de vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 7,0 g L⁻¹ ágar (Vetec®) e pH do meio ajustado para 5,7 ± 0,1. Foram distribuídos 40 mL de meio por frasco (125 mm x 60 mm) vedado com tampa rígida de polipropileno. Após a autoclavagem as tampas foram substituídas por tampas ventiladas por duas membranas.

As tampas ventiladas foram compostas por duas camadas de fita microporosa Missner® de 1,0 cm² cada (Figura 1), sendo que entre as duas camadas foi colocada uma camada de fita veda rosca de politetrafluoretileno (PTFE) Amanco® (Saldanha et al., 2012) e autoclavados por 20 minutos à 121°C e 1,1 atm de pressão.

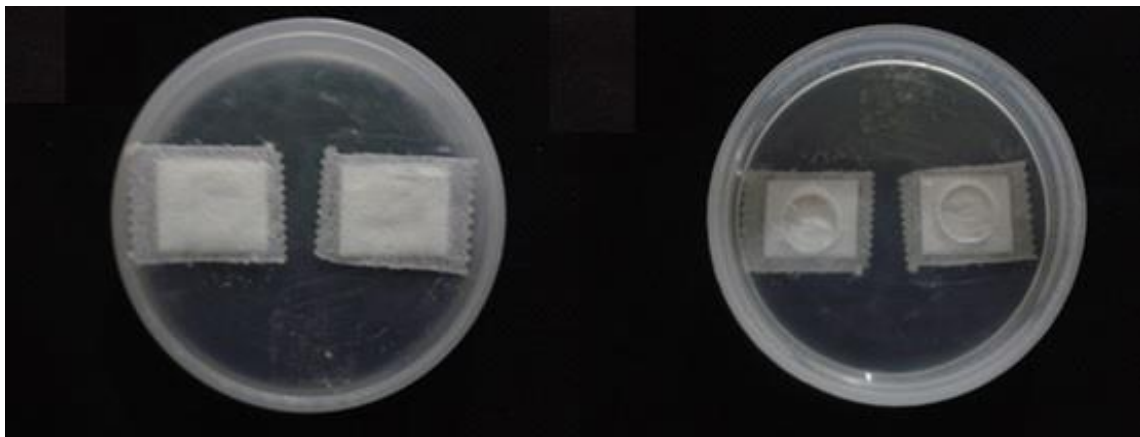


Figura 1. Tampas de polipropileno ventiladas composta por duas camadas de fita microporosa e uma camada de fita de politetrafluoretileno entre as duas camadas de fita microporosa.

Foram colocadas cinco sementes por frasco e estes foram mantidos por 15 dias no escuro em temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, então, transferidos para a luz por mais 20 dias com fotoperíodo 16:8 (luz:escuro), fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e mesma temperatura.

Após 35 dias de cultivo *in vitro*, foram consideradas germinadas as plântulas que apresentaram raiz e parte aérea expandidas. Dessas plântulas foram extraídos os explantes para a indução da morfogênese.

3.1.3.2. Morfogênese *in vitro*

Para a indução da morfogênese foram utilizados os sais minerais do meio de cultura modificado - MSM (Monteiro et al., 2000a), que é baseado no requerimento nutricional para as espécies do gênero *Passiflora* (Tabela 1), acrescido de $30,0\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $0,10\ \text{g L}^{-1}$ de mio-inositol, vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), $7,0\ \text{g L}^{-1}$ de ágar (Vetec®) e pH do meio ajustado para $5,7\pm 0,1$ e autoclavado por 20 minutos à 121°C e $1,1\ \text{atm}$ de pressão.

Tabela 1. Comparação entre os sais minerais do meio MS e do meio de cultura modificado (MSM), segundo o requerimento nutricional para espécies do gênero *Passiflora* spp. (Monteiro et al., 2000a adaptado).

Nutrientes minerais	MS (mg L ⁻¹)	MSM (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650,00	1000,00
KNO ₃	1900,00	1520,00
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-
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
Na ₂ MoO 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

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x4, onde foram testadas para cada tipo de explante (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) quatro concentrações de 6-benziladenina (BA) (0,00; 2,22; 4,44; e 8,88 µmol L⁻¹) e quatro concentrações de thidiazuron (TDZ) (0,00; 2,27; 4,54 e 6,81 µmol L⁻¹) com três repetições sendo cada uma composta por uma placa de Petri (90 mm x 15 mm) com 25 mL de meio de cultura e três explantes (Figura 2).

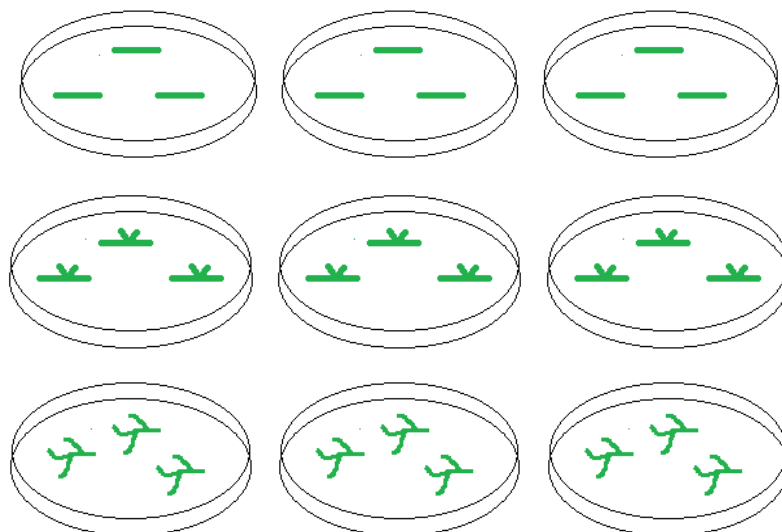


Figura 2. Esquema de placas de Petri contendo os explantes oriundos de hipocótilos, segmentos nodais e segmentos radiculares de *P. setacea* DC., utilizados na morfogênese *in vitro*.

As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ durante 55 dias.

O experimento foi avaliado após 55 dias de indução, sendo verificada a porcentagem de formação de calos e brotações nos explantes. Onde foi considerado 33,33% de formação de calos a placa que apresentava calos formados em apenas um explante, 66,66% quando dois explantes por placa formavam calos e 100% quanto todos os explantes da placa formavam calos. O mesmo foi considerado para formação de brotos. Para a análise visual foi utilizada avaliação descritiva e esta análise foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®).

3.1.3.3. Alongamento das brotações

Após a etapa morfogênica, somente os explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) que formaram brotações foram submetidos ao meio de alongamento composto pelos sais de MSM, suplementado com $2,88\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3), $30,0\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $0,10\ \text{g L}^{-1}$ de mio-inositol, vitaminas de *White* (Murashige e Skoog, 1962), $7,0\ \text{g L}^{-1}$ de ágar (Vetec®) e pH do meio ajustado para $5,7\pm 0,1$, conforme protocolo já utilizado para as espécies de *Passiflora spp.* (Pinto et al., 2010a; Vieira et al., 2014). Foram distribuídos 40 mL

de meio em frascos (125 mm x 60 mm), posteriormente vedados com tampas rígidas de polipropileno e autoclavados por 20 minutos à 121°C e 1,1 atm de pressão.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 60 dias em meio de alongamento, foi avaliado o número de brotações alongadas e, em seguida, as brotações alongadas foram transferidas para o meio de enraizamento.

3.1.3.4. Enraizamento

Para o enraizamento, as brotações alongadas foram transferidas para meio composto pelos sais de MSM, suplementado com $4,92 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB), 30g L^{-1} de sacarose, $0,10 \text{g L}^{-1}$ de mio-inositol, vitaminas de *White* (Murashige e Skoog, 1962), $7,0 \text{g L}^{-1}$ de ágar (Vetec®) e pH do meio ajustado para $5,7 \pm 0,1$, conforme protocolo já utilizado para as espécies de *Passiflora spp.* (Pinto et al., 2010a; Vieira et al., 2014). Foram distribuídos 40 mL de meio em frascos (125 mm x 60 mm), posteriormente vedados com tampas rígidas de polipropileno e autoclavados por 20 minutos à 121°C e 1,1 atm de pressão.

Os frascos com as brotações alongadas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 30 dias para que se completasse o processo de enraizamento e, em seguida, as plantas enraizadas foram levadas para casa de vegetação para a aclimatização.

3.1.3.5. Aclimatização

As plantas enraizadas foram transplantadas para copos descartáveis com substrato composto de 1:1 Basaplant® e areia, a 27°C , permanecendo em condições de casa de vegetação por um período de 60 dias.

3.1.3.6. Análises Estatísticas

As variáveis analisadas da indução de morfogênese 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 via comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (*Statistical Analysis System*, versão 5.6) (Ferreira, 2011b). Também foi utilizada estatística descritiva para as variáveis analisadas nas etapas de alongamento, enraizamento e aclimatização.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Calogênese em explantes de *Passiflora setacea* DC..

Para formação de calos nos três explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) tanto houve efeito isolado como interação ($p < 0,01$) entre os fatores analisados, exceto para o efeito isolado do TDZ em segmentos radiculares (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para os efeitos dos fitorreguladores 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) e sua interação (BA x TDZ) sobre a formação de calos nos três tipos de explantes de *P. setacea* DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

Fonte de Variação	Hipocótilo		Seg. Nodal		Seg. Radicular	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
BA	3	5,142841**	3	1,576389**	3	7,472222**
TDZ	3	2,695872**	3	3,187500**	3	0,305556 ^{ns}
Interação						
BA x TDZ	9	3,154406**	9	3,576389**	9	2,731481**
Resíduo	30	0,261111	32	0,104167	32	0,437500
CV (%)	22,18		12,60		36,92	

**Indica significância $p < 0,01$ e ^{ns} indica que não foi significativo.

A adição de fitorreguladores foi fundamental para a formação de calos em hipocótilos de *P. setacea*. Foi observada a interação positiva entre TDZ e BA em todas as combinações, exceto na ausência dos dois fitorreguladores ou quando o hipocótilo foi submetido a maior concentração de BA ($8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$), combinado com as maiores concentrações de TDZ ($4,54$ e $6,81 \mu\text{mol L}^{-1}$), onde as menores

médias foram encontradas. Para essas maiores concentrações a proliferação de calos foi muito baixa (22,33%) ou até mesmo inibida (0,00%) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de formação de calos nos explantes oriundos de hipocótilos de *P. setacea* DC. submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	0,00 bB	100,00 aA	77,66 aA	83,33 aA	63,66 b
2,27	100,00 aA	100,00 aA	89,00 aA	100,00 aA	97,33 a
4,54	77,66 aA	100,00 aA	89,00 aA	0,00 bB	63,66 b
6,81	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	22,33 bB	80,66 ab
Média	69,33 B	100,00 A	89,00 A	48,33 C	76,67
DMS:	0,5802				

Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na análise visual para calogênese foi observada a presença de *clusters* de calos organogênicos de coloração branco-leitoso (Figura 3 e, f, g, h, i, m, n, o).

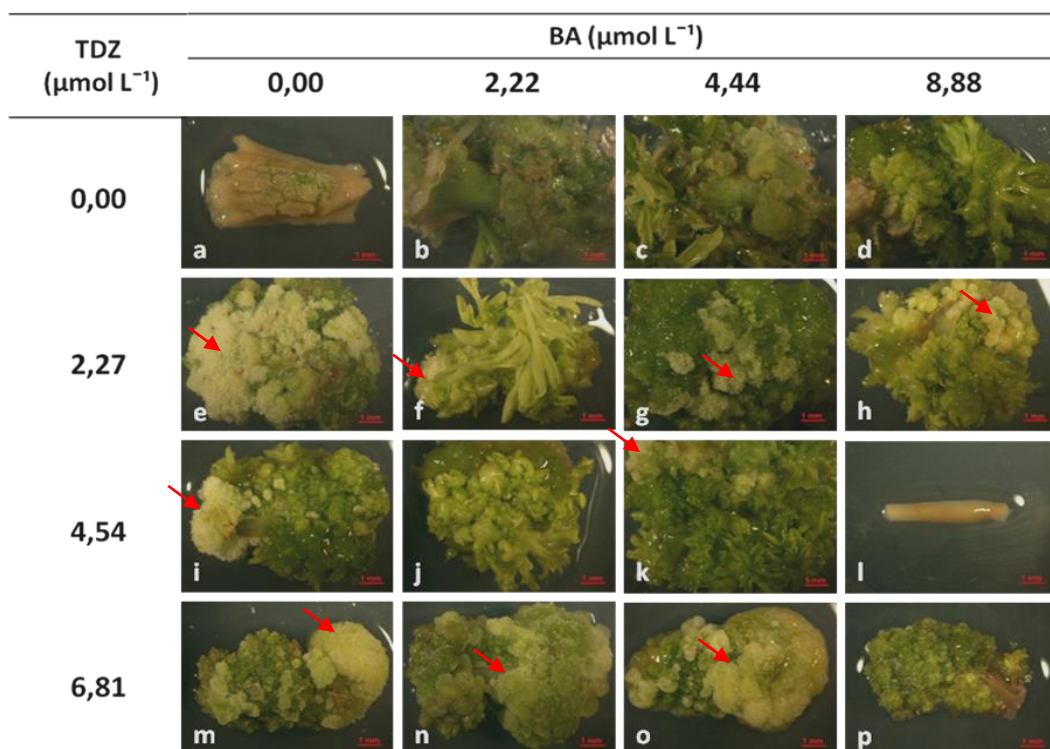


Figura 3. Calogênese e organogênese em hipocótilos de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese *in vitro* (barra = 1mm). A seta indica a formação de *clusters* de calos organogênicos.

Em segmentos nodais não foi observada a formação de calos quando foram colocados em meio de cultura sem a adição de fitorreguladores (Tabela 4), mantendo o mesmo padrão de resposta observado em hipocótilos (Tabela 3), embora divergindo dos resultados encontrados por Vieira et al., (2014), que observaram a proliferação de calos em parte aérea de *P. setacea* na ausência de fitorreguladores.

Tabela 4. Porcentagem de formação de calos nos explantes oriundos de segmentos nodais de *P. setacea* DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	0,00 bB	89,00 aA	77,66 aA	100,00 aA	66,66 b
2,27	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 a
4,54	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	0,00 bB	75,00 b
6,81	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 a
Média	75,00 B	97,33 A	94,33 A	75,00 B	85,33
DMS:			0,3571		

Médias seguidas por letras iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na interação entre TDZ e BA quando utilizado o segmento nodal, foi observado que os mesmos foram responsivos para calogênese. Houve uma boa taxa de formação de calos, embora quando submetido às combinações de 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ com 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA, foi possível observar que nessa combinação, a alta concentração de citocininas no meio inibiu a formação de calos, embora favorecendo a formação de brotações por organogênese direta (Tabela 4).

Na análise visual, foi observada a presença de calos em todos os tratamentos, exceto para a ausência dos fitorreguladores e quando da combinação de 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA com 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ, onde foi observada organogênese direta com presença de microbrotações (Figura 4 I) (Tabela 4).

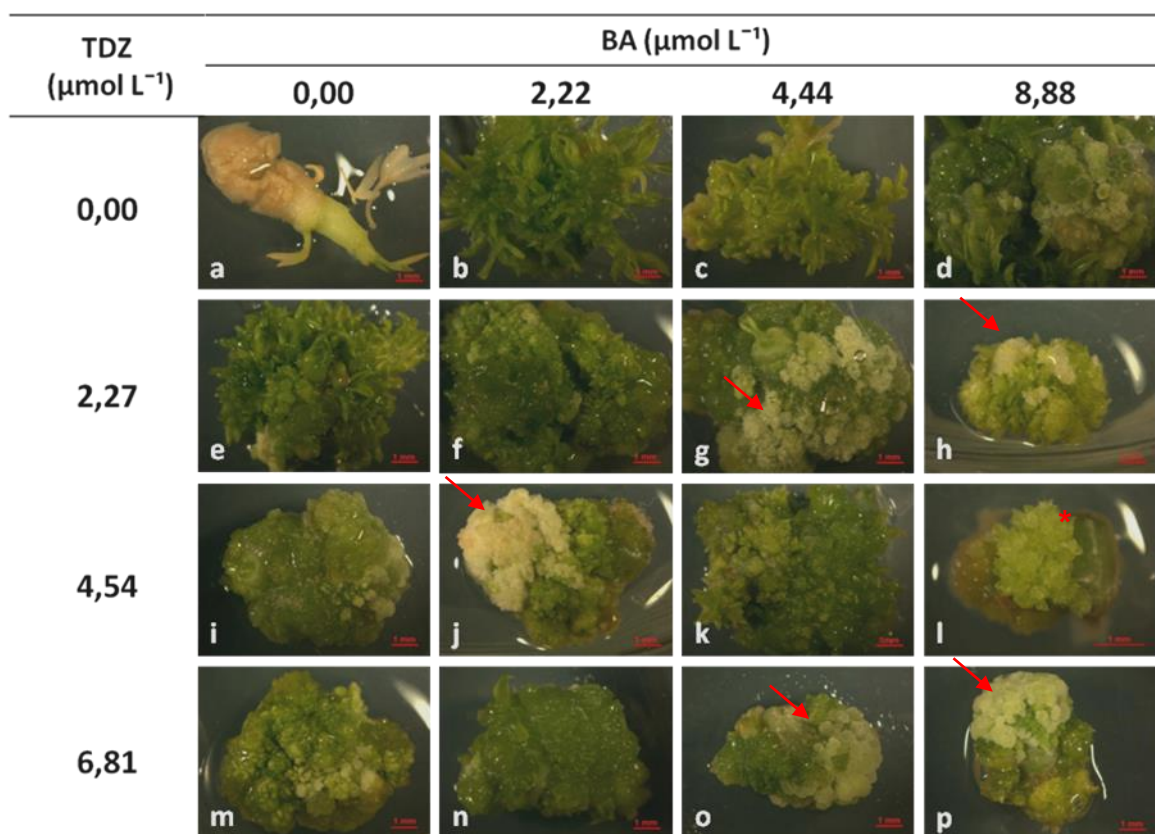


Figura 4. Calogênese e organogênese em segmentos nodais de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese (barra = 1mm). A seta indica a formação de *clusters* de calos. Formação de microbrotações por organogênese direta (*).

No presente trabalho, os segmentos radiculares na ausência dos fitorreguladores apresentaram formação de calos (Tabela 5). Dado semelhante também foi observado em *Passiflora cincinnata* Mast. (Lombardi et al., 2007) e em *P. setacea* (Vieira et al., 2014).

As citocininas são hormônios sintetizados nas raízes das plantas (Aloni et al., 2006). Dessa forma, ao excisar a raiz a atividade das citocininas pode aumentar (Van Staden e Smith, 1978), o que pode ter favorecido a formação de calos nas raízes mesmo sem a adição de citocininas ao meio (Tabela 5) (Figura 5 a).

Tabela 5. Porcentagem de formação de calos em explantes oriundos de segmentos radiculares de *P. setacea* DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	22,33 aB	77,66 aA	66,66 aAB	100,00 aA	66,66 a
2,27	66,66 aA	77,66 aA	77,66 aA	0,00 bB	55,67 a
4,54	66,66 aA	100,00 aA	77,66 aA	0,00 bB	61,00 a
6,81	66,66 aA	89,00 aA	66,66 aA	0,00 bB	55,67 a
Média	55,67 B	86,00 A	72,33 AB	25,00 C	59,67
DMS:	0,7318				

Médias seguidas por letras iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O TDZ isoladamente não afetou a formação de calos em segmentos radiculares. Porém, quando associado à maior concentração de BA houve um efeito inibidor na formação de calos (Tabela 5). Também foi constatado que a alta concentração dos fitorreguladores no meio inibiu a formação de calos em segmentos radiculares (Tabela 5) (Figura 5 h, l, p).

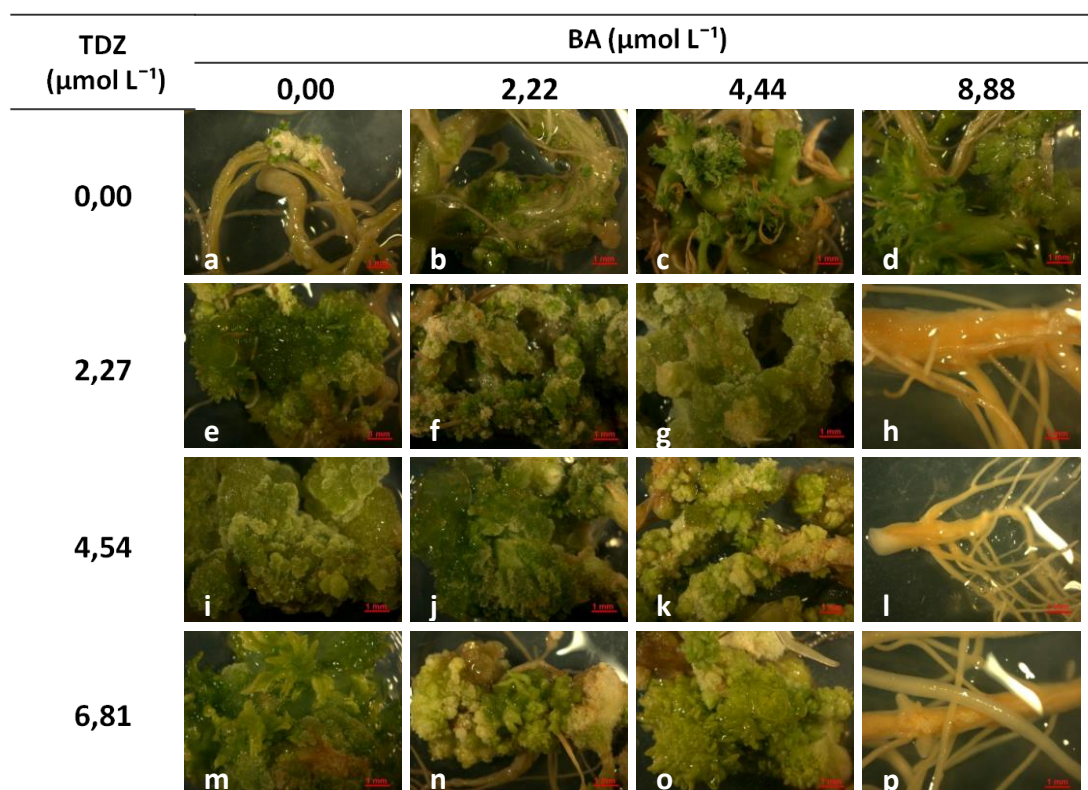


Figura 5. Calogênese e organogênese em segmentos radiculares de *P. setacea* DC. submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ), após 30 dias de indução de morfogênese (barra = 1mm).

Para calogênese nos três explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) foi observado que para os explantes oriundos da parte aérea da planta (hipocótilo e segmento nodal), quando submetidos ao meio sem fitorreguladores, formou calos, resultado semelhante ao já descrito para discos foliares de *P. edulis* (Trevisan e Mendes, 2005) e *P. setacea* (Vieira et al., 2014). No presente trabalho, foi observado formação de calos na ausência de fitorreguladores apenas em segmentos radiculares.

Para os explantes da parte aérea (hipocótilo e segmento nodal) qualquer concentração isolada de TDZ e de BA induz a formação de calos. A interação de TDZ e BA é prejudicial apenas para formação de calos quando presentes em altas concentrações para os segmentos radiculares.

3.1.4.2. Organogênese em explantes de *Passiflora setacea* DC.

Para formação de brotações nos três explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) houve efeito isolado e interação ($p \leq 0,01$) entre os fatores analisados, exceto para o efeito isolado do TDZ em segmentos radiculares (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para os efeitos dos fitorreguladores 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) e sua interação (BA x TDZ) sobre a formação de brotos nos três tipos de explantes de *P. setacea* DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

Fonte de Variação	Hipocótilo		Seg. Nodal		Seg. Radicular	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
BA	3	4,680281**	3	1,687500*	3	7,020833**
TDZ	3	3,548968**	3	1,687500*	3	0,243056 ^{ns}
Interação						
BA x TDZ	9	2,675597**	9	2,557870**	9	2,354167**
Resíduo	30	0,438889	32	0,395833	32	0,541667
CV (%)	30,78		24,55		43,61	

**Indica significância $p < 0,01$ e ^{ns} indica que não foi significativo.

Tal como na calogênese, a adição de fitorreguladores ao meio foi imprescindível para formação de brotações em hipocótilos de *P. setacea*. Houve interação positiva entre TDZ e BA em todas as concentrações, exceto na ausência dos fitorreguladores e quando submetidos às maiores concentrações de

TDZ e de BA, em que a proliferação de brotações foi muito baixa ou até mesmo inibida (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de formação de brotações em hipocótilos de *P. setacea* DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	0,00 bB	100,00 aA	77,66 aA	83,33 aA	63,66 b
2,27	100,00 aA	100,00 aA	89,00 aA	100,00 aA	97,33 a
4,54	77,66 aA	100,00 aA	55,67 aA	0,00 bB	54,67 b
6,81	77,66 aA	100,00 aA	77,66 aA	22,33 bB	69,33 b
Média	64,00 BC	100,00 A	75,00 AB	48,33 C	71,67
DMS:	0,7522				

Médias seguidas por letras iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Foi possível observar a necessidade do uso das citocininas para a indução de brotações em hipocótilos. Semelhante à calogênese, sem a adição de citocinina no meio de cultivo não foi constatado a formação de brotações. O explante intumescce, porém não produz brotações e morre após algum tempo (Figura 3 a).

Para a interação de TDZ com BA nos segmentos nodais, foi observado que todas as combinações das concentrações foram capazes de induzir a proliferação de brotações, exceto na ausência dos dois fitorreguladores, no qual os segmentos nodais não produziram brotações. Estes continuaram seu desenvolvimento como segmentos nodais, porém morreram pouco tempo depois (Figura 4 a) (Tabela 8).

Na busca de um protocolo eficiente para micropropagação de *Passiflora foetida* L. visando à conservação de germoplasma, Shehawat et al., (2015) avaliaram a morfogênese em segmentos nodais com o uso de 6-benziladenina (BA) e cinetina (Kin), em que a concentração de 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA promoveu uma eficiente taxa de formação de brotações. No presente trabalho, também foi possível observar que segmentos nodais submetidos a concentrações de até 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BA e ausência de TDZ também promoveram multiplicação de brotações (Figura 4 d) (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de formação de brotações em segmentos nodais de *P. setacea* DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes – RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	0,00 bB	100,00 aA	77,66 aA	100,00 aA	69,33 b
2,27	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 a
4,54	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	44,33 bB	86,00 ab
6,81	100,00 aA	100,00 aA	89,00 aA	83,33 abA	94,00 a
Média	75,00 B	100,00 A	91,67 AB	75,00 B	85,33
DMS:	0,6961				

Médias seguidas por letras iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na avaliação visual foi constatada a presença de *cluster* de brotações (Figura 4 b, c, d, e, k). Foi observado organogênese por via direta quando os segmentos nodais foram submetidos à combinação de 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA com 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ (Figura 4 l). Resultados semelhantes foram relatados por Garcia et al. (2011a) em estudos com segmentos nodais de *P. suberosa* L.

De forma semelhante à calogênese, a presença de TDZ no meio combinado com a maior concentração de BA inibiu a formação de brotações em segmentos radiculares (Tabela 9) (Figura 4 h, i, p).

Tabela 9. Porcentagem de formação de brotações em segmentos radiculares de *P. setacea* DC., submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ). Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				Média
	0,00	2,22	4,44	8,88	
0,00	22,33 aB	66,66 aAB	66,66 aAB	89,00 aA	61,00 a
2,27	66,66 aA	77,66 aA	55,67 aA	0,00 bB	50,00 a
4,54	66,66 aA	100,00 aA	66,66 aA	0,00 bB	58,33 a
6,81	66,66 aA	89,00 aA	66,66 aA	0,00 bB	55,67 a
Média	55,67 B	83,33 A	64,00 AB	22,33 C	56,33
DMS	0,8143				

Médias seguidas por letras iguais maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao estudarem a organogênese induzida por BA de *P. cincinnata* Aubl e *P. edulis* em segmentos radiculares, Silva et al. (2011) observaram a formação de brotações por via direta na presença de BA. No presente trabalho, também foi

observado organogênese direta em segmentos radiculares de *P. setacea*, inclusive na ausência dos fitorreguladores (Figura 5 a) e na presença de 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA sem adição de TDZ (Figura 5 c).

Para organogênese nos três explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular), tal como na calogênese, foi observado que os explantes de hipocótilo e segmento nodal foram os únicos que não apresentaram formação de brotações quando da ausência dos fitorreguladores. Tanto os hipocótilos como os segmentos nodais intumescem, porém, não exibem resposta morfogênica na ausência dos fitorreguladores (Tabelas 7 e 8) (Figura 3 a; 4 a). Porém, em segmentos radiculares foi observada a formação de brotações na ausência dos fitorreguladores (Tabela 9) (Figura 5 a).

Foi observada organogênese indireta para hipocótilos, segmentos nodais e segmentos radiculares que se desdiferenciaram e assumiram competência para formação de brotações. Vieira et al. (2014) também observaram o desenvolvimento de brotações a partir da via indireta em hipocótilos de *P. setacea*.

3.1.4.3. Alongamento das brotações

As brotações formadas a partir de cada tipo de explante foram transferidas para o meio de alongamento.

As brotações oriundas de hipocótilos mostraram uma maior taxa de alongamento quando estes explantes foram induzidos em meio suplementado com BA sem TDZ (Figura 6).

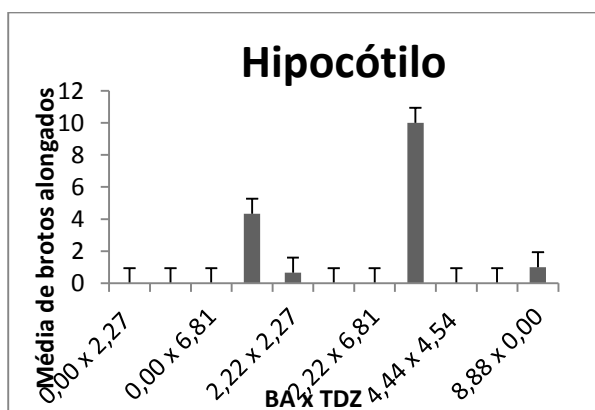


Figura 6. Média de brotações alongadas originárias de hipocótilos de *P. setacea* DC., cultivadas em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As brotações originárias de segmentos nodais foram as que melhor responderam ao meio de alongamento, com destaque para as brotações induzidas na fase de morfogênese com 2,22 e 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA na ausência de TDZ. Também foi observado alongamento de brotações originárias de segmentos nodais quando estes foram induzidos a morfogênese com suplementação de TDZ (Figura 7).

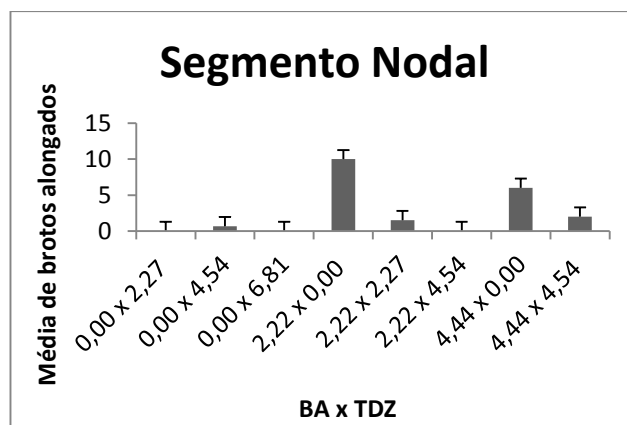


Figura 7. Média de brotações alongadas originárias de segmentos nodais de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

No estudo de Vieira et al. (2014), na etapa de alongamento, também foi observada correlação positiva entre a indução da morfogênese e o alongamento, onde os tratamentos com maior indução de morfogênese foram os que apresentaram maior número de brotações alongadas.

Para segmentos radiculares, as brotações induzidas em meio suplementado com BA nas concentrações de 4,44, e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência de TDZ, apresentaram as maiores médias de brotações alongadas (Figura 7).

Para as brotações originárias de segmentos radiculares, foi observada uma menor média de brotações alongadas em comparação com os outros dois tipos de explantes (hipocótilo e segmento nodal). Além disso, foi observado que o maior número de brotações alongadas para segmentos radiculares foram as brotações que se originaram em meio de indução suplementado com BA (Figura 8).

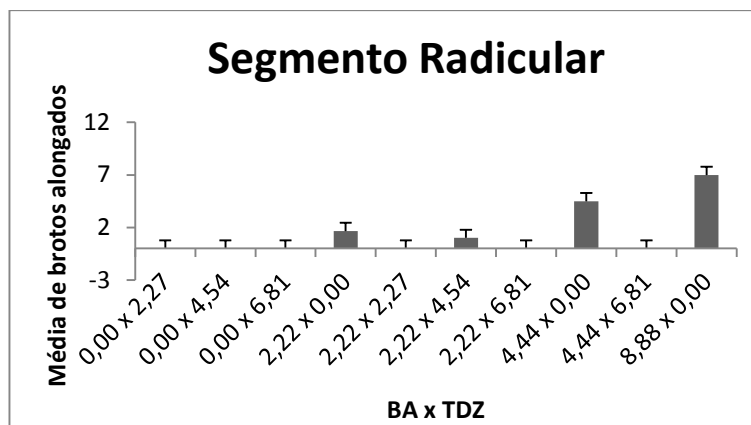


Figura 8. Média de brotações alongadas originárias de segmentos radiculares de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.1.4.4. Enraizamento

Foi observado o enraizamento de apenas uma planta oriunda de explantes de hipocótilo submetida ao tratamento de $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA sem TDZ (Figura 9).

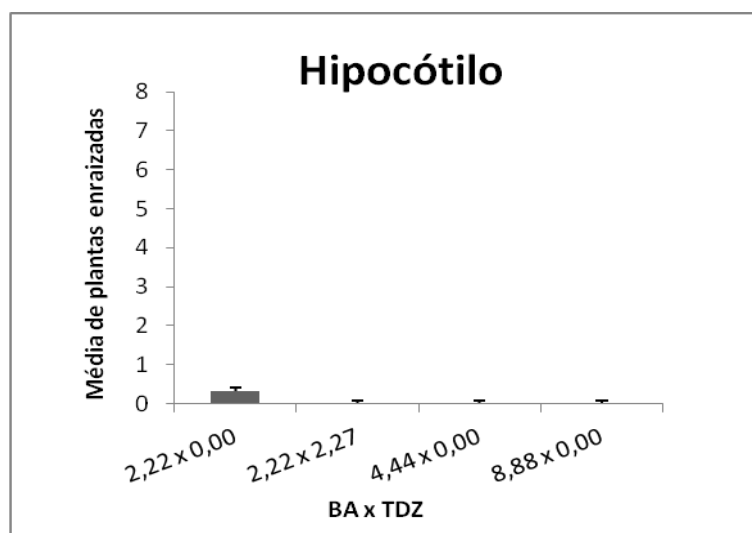


Figura 9. Média de plantas enraizadas originárias de hipocótilos de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O maior número de plantas enraizadas foi obtido a partir de brotações oriundas de segmentos nodais induzidos em meio suplementado com 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA sem TDZ (Figura 10).

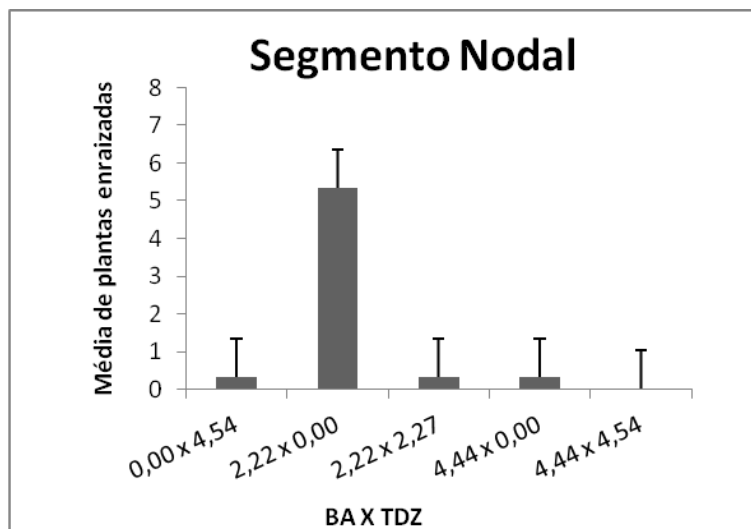


Figura 10. Média de plantas enraizadas originárias de segmentos nodais de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para as plantas originárias de segmentos radiculares foi observado o enraizamento de apenas duas plantas oriundas dos tratamentos de indução com BA nas concentrações de 4,44 e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BA sem TDZ (Figura 11).

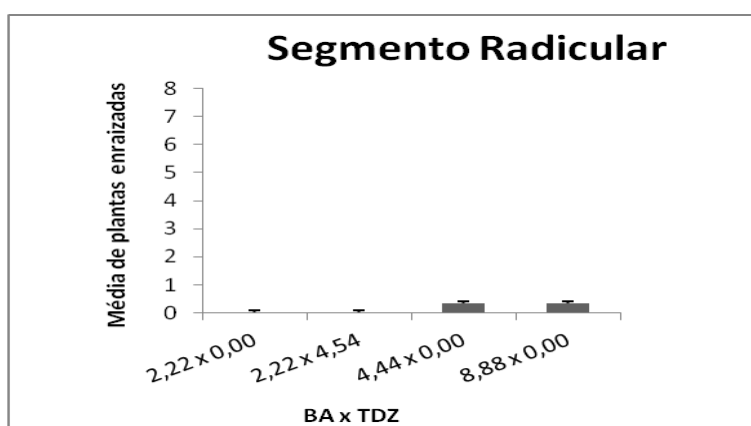


Figura 11. Média de plantas enraizadas originárias de segmentos radiculares de *P. setacea* DC., cultivados em diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.1.4.5. Aclimatização

As plantas enraizadas foram aclimatizadas por 60 dias em casa de vegetação e não apresentaram nenhuma alteração visual (Figura 12).



Figura 12. Plantas aclimatizadas em casa de vegetação por 60 dias. Uma planta oriunda de hipocótilo na concentração de $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ (a), 12 plantas oriundas de segmentos nodais nas concentrações de $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ (b), duas plantas oriundas de segmento radicular, nas concentrações de $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ e $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ BA x $0,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ, respectivamente, (c) (barra = 20mm).

3.1.5. CONCLUSÃO

Os três explantes (hipocótilo, segmento nodal e segmento radicular) utilizados na indução da morfogênese *in vitro* em *P. setacea* DC. apresentaram formação de calos e brotações.

O maior número de plantas enraizadas foi obtido a partir de segmentos nodais e na presença de BA.

O TDZ isolado apresentou efeito igual ou inferior ao BA na indução de calos e brotações nos três explantes utilizados.

Para a regeneração de plantas a partir da morfogênese *in vitro* de *P. setacea* DC., recomenda-se a utilização de segmentos nodais como explantes, em meio suplementado com $2,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA.

3.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Passiflora setacea* DC.

3.2.1. INTRODUÇÃO

A espécie *P. setacea* DC. vem recebendo destaque devido ao seu uso em programas de melhoramento genético. Quer seja em cruzamentos visando à resistência a doenças (Fuhrmann et al., 2014; Santos et al., 2015), ou como cultivar para agroindústria (Faleiro et al., 2011) e até mesmo no mercado de ornamentais (Faleiro et al., 2007).

Entretanto, apesar da importância econômica de muitas dessas espécies, várias se encontram a beira da extinção (Pilatti et al., 2011), principalmente as espécies pertencentes ao bioma cerrado que vive em constante ameaça devido a ações antropológicas (Klink e Machado, 2005). Dessa forma, faz-se importante o uso de estratégias de conservação dessas espécies. Existem duas formas de conservação de germoplasma. A conservação *in situ*, que objetiva a conservação das espécies em seus *habitats*, além da recuperação de populações viáveis no seu meio natural (CDB, 1992). E também a conservação *ex situ* que é a conservação dos componentes da biodiversidade fora de seu *habitat*, esse último pode ser dividido de três formas: banco de sementes, coleções a campo e cultivo *in vitro* (CDB, 1992).

Diferentes métodos para conservação *in vitro* são aplicados dependendo do período desejado para a conservação (Engelmann, 2011). Para curto e médio prazo, podem ser utilizadas condições limitantes do crescimento, onde as plantas são mantidas em subcultivos em série, denominado cultivo mínimo *in vitro* (Bhojwani e Razdan, 1996).

Para a conservação a longo prazo, a criopreservação é a única técnica que garante a conservação por período indeterminado por meio da redução do metabolismo e da divisão celular (Engelmann, 2004). Para tanto, o material vegetal é mantido em temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (NL) a -196°C ou em sua fase de vapor a -150°C (Sakai e Engelmann, 2007).

Para as espécies maracujazeiro, alguns protocolos visando à conservação por longos períodos por criopreservação vem sendo desenvolvido. Quer seja com a finalidade de criopreservar sementes de *Passiflora* (Ospina et al., 2000; Meletti et al., 2004; Meletti et al., 2007; Pádua et al., 2011; Veiga-Barbosa et al., 2013), ou na conservação de ápices caulinares (Soares, 2013) e segmentos nodais (Garcia et al., 2011b; Merhy et al., 2012), utilizando as técnicas baseadas na vitrificação (Sakai et al., 1990), como encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotículas.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação por meio do uso das técnicas de encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotículas para a espécie *P.setacea* DC..

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Conservação de Germoplasma

A conservação dos recursos genéticos tem por objetivo fundamental a manutenção de uma ampla diversidade genética de espécies com um valor conhecido ou potencial, a fim de assegurar a disponibilidade para a exploração pelas gerações presentes e futuras (Khanna e Singh, 1991).

A preocupação de que as variedades modernas e as práticas agrícolas estivessem eliminando a biodiversidade no campo levou, nos anos 70, a uma

corrida para criação de bancos de germoplasma para preservar o germoplasma *ex situ* (FAO, 1996).

Basicamente, há duas formas de conservação dos recursos genéticos, por conservação *in situ* e por conservação *ex situ*. A conservação *in situ* ocorre quando uma dada população é mantida dentro da comunidade da qual faz parte, no ambiente em que se desenvolveu (Frankel, 1977). Esse tipo de conservação pode ser aplicado para todas as espécies, embora os recursos genéticos permaneçam propensos às perdas por acidentes, pragas e doenças (Wang et al., 1993).

A conservação *ex situ* é realizada quando populações, indivíduos e material reprodutivo são mantidos fora do seu ambiente de crescimento original (Skroppa, 2005). Esse tipo de conservação pode ser realizado a partir de câmaras de conservação de sementes (-20° C), cultura de tecidos, criopreservação, (-196° C), conservação a campo (coleções vivas) (MMA, 2017).

3.2.2.2. Bancos de Germoplasma - cenário da conservação de *Passiflora*

Existem cerca de 7,4 milhões de acessos de recursos genéticos conservados em mais de 1750 bancos de germoplasma em todo o mundo, tanto em bancos de sementes como em coleções de campo, *in vitro* e em condições de criopreservação (Dulloo et al., 2010). As maiores coleções pertencem aos cereais como o milho e o trigo, e as frutas representam menos de 10% das coleções globais (FAO, 1996).

Para a conservação de fruteiras é mais comumente relatado a conservação a campo (93%). A conservação por bancos de sementes e a conservação *in vitro* é representada pelos outros 7% (Ferreira, 2011a).

Os recursos genéticos de *Passiflora* são conservados em quase sua totalidade sob condições de campo em coleções vivas, o que coloca esse material em alta vulnerabilidade (Faleiro et al., 2005). Dessa forma, é importante o desenvolvimento de pesquisas para assegurar a conservação desse germoplasma por métodos alternativos, como a conservação *in vitro*.

Até o ano de 2005 havia cerca de 50 coleções mundiais de *Passiflora* com 1235 acessos (Ferreira, 2005). No Brasil, até 2005, foram catalogadas oito coleções de germoplasma de *Passiflora* com um total de 500 acessos (Ferreira, 2005). Noventa acessos, essencialmente de espécies silvestres, são conservados

a campo (Oliveira, 2010). É na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que se concentra a maior quantidade de espécies e acessos, cerca de 40 espécies com 200 acessos (Faleiro, 2014).

No Brasil, a manutenção do acervo genético de maracujazeiro tem sido realizada a partir dos centros de instituições de pesquisas, conservando o germoplasma em forma de sementes, plantas a campo e explantes *in vitro* (Meletti et al., 2005; Ferreira, 2011a).

Dentre as oito coleções existentes no Brasil de *Passiflora*, a UENF dispõe de uma coleção com cerca de 27 espécies e 116 acessos. A conservação desses acessos é feita basicamente por armazenamento das sementes em câmaras frias e em plantas a campo (Pereira, 2017).

3.2.2.3. Conservação *in vitro* de germoplasma

O cultivo mínimo é uma técnica de conservação *in vitro*, onde os acessos são mantidos em crescimento lento, fornecendo opções para armazenamento a curto e médio prazo (Kaviani, 2011). No cultivo mínimo, o metabolismo vegetal é reduzido mediante alterações nos ambientes de cultivo, como a diminuição da temperatura e modificações do meio de cultivo com o uso de fitorreguladores e agentes osmóticos (Lemos et al., 2002).

Quando comparada a conservação a campo, a conservação *in vitro* se mostra vantajosa por reduzir o risco de perda por desastres climáticos e ataque de pragas e doenças (Matsumoto et al., 2010). Outro fator é a garantia da segurança do intercâmbio de germoplasma (Viera, 2000), além de armazenar um grande número de acessos de germoplasma em um espaço mínimo (Meletti et al., 2005).

Entretanto, alguns aspectos podem interferir no bom andamento de um banco de germoplasma *in vitro*. A necessidade de frequentes subcultivos; os erros de identificação do material conservado; a contaminação por microrganismos; necessidade de mão de obra especializada, além da possibilidade de aparecimento de variantes somaclonais (Santos, 2000).

O estabelecimento *in vitro* de diversas espécies de maracujazeiro é essencial quando se deseja fazer a conservação *in vitro* de germoplasma de *Passiflora* usando procedimentos biotecnológicos (Passos e Bernacci, 2005).

3.2.2.4. Criopreservação como técnica de conservação para sementes de *Passiflora spp.*

A criopreservação compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (-196°C) ou vapor (-150°C) (Santos, 2000). Esta técnica é descrita como um método eficaz para conservação a longo prazo dos recursos genéticos vegetais, por reduzir o metabolismo das células a níveis mínimos (Engelmann, 2004; González-Benito et al., 2004; Kaviani, 2011).

Na criopreservação não há a necessidade de subcultivos como acontece no cultivo mínimo, o que diminui o risco de ocorrer variação somaclonal. Além disso, o material é criopreservado em um espaço limitado e o custo com a manutenção é menor em comparação com outras técnicas de conservação (González-Benito et al., 2004).

Dos fatores que podem prejudicar o material conservado por criopreservação, podem ser citadas a lesão irreversível, causada pela formação de cristais de gelo intracelulares e a alta dessecação (Kaviani, 2011). Dessa forma, para que o processo de criopreservação seja bem-sucedido, é essencial que se evitem esses fatores que causam lesões às células (Kami, 2012).

Os primeiros trabalhos sobre criopreservação de sementes em espécies do gênero *Passiflora* ocorreram no início dos anos 2000, quando foi observada a necessidade de alternativas à conservação a campo para espécies desse gênero (Ospina et al., 2000; Meletti et al., 2004; Meletti et al., 2007; Pádua et al., 2011; Veiga-Barbosa et al., 2013).

A técnica de criopreservação em sementes de *Passiflora* consiste em conservar em nitrogênio líquido sementes com baixos teores de água intracelular a fim de que se obtenha uma boa resposta da retomada do desenvolvimento das sementes criopreservadas. No protocolo de criopreservação de sementes, o primeiro passo é a determinação do teor de água inicial nas sementes. Em geral, é utilizado o método de estufa (Brasil, 2009). Em seguida, as sementes são desidratadas até atingirem os teores iniciais de água desejáveis para criopreservação, entre 10 - 12% para espécies intermediárias (Kaviani, 2011). E então são colocadas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido. A etapa de descongelamento das sementes pode ser feita de duas formas, ou por descongelamento rápido em banho-maria (Guevara et al., 2001) ou por

descongelamento lento em temperatura ambiente, durante três horas (González-Benito et al., 2009). Em geral, para avaliar a eficácia do protocolo de criopreservação, são executados testes de germinação, viabilidade e vigor das sementes (Ospina et al., 2000; Guevara et al., 2001; Meletti et al., 2007; González-Benito et al., 2009).

No Brasil, o primeiro trabalho sobre criopreservação de sementes de *Passiflora* teve por objetivo avaliar a tolerância à dessecação das sementes de espécies silvestres e comerciais (Meletti et al., 2004). Pois, a dessecação das sementes sem prejuízo à retomada de crescimento é uma etapa fundamental para garantir o sucesso da técnica.

3.2.2.4.1. Criopreservação de *Passiflora* pelo método de vitrificação

A vitrificação é uma técnica que foi definida por Fahy et al. (1984) como o processo de solidificação de um líquido intracelular, tornando a água que antes estava em uma fase líquida para uma fase amorfa, ou vítrea, impedindo a formação de cristais de gelo no interior das células.

Essa técnica baseia-se no tratamento de explantes com uma solução vitrificante concentrada por períodos de tempo variáveis, seguido por uma imersão direta em nitrogênio líquido, resultando tanto na vitrificação intra e extracelular (Fahy et al., 1984). A *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) é a solução mais comumente aplicada, sendo constituída por 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 mol L⁻¹ de sacarose (Sakai et al., 1990).

O uso dessa técnica é relatado para algumas espécies silvestres de maracujazeiro como a *P. suberosa* L. e a *P. pohlii* Mast. (Garcia et al., 2011b; Merhy et al., 2012; Simão et al., 2014). Esses trabalhos aplicam a vitrificação em três fases: na primeira fase, os explantes cultivados *in vitro* são excisados e pré-cultivados por 24 horas em meio sólido, suplementado com 0,7 M de sacarose a 25°C. Na segunda fase, que é a de vitrificação propriamente dita, os explantes que foram pré-cultivados são colocados em criotubos e incubados em solução de PVS2 em diferentes períodos. Na terceira fase, os criotubos são mergulhados em nitrogênio líquido e então armazenados (Garcia et al., 2011a; Merhy et al., 2012).

3.2.2.4.2. Criopreservação de *Passiflora* pelo método de encapsulamento-vitrificação

O encapsulamento-vitrificação surgiu a partir da combinação das técnicas de encapsulamento-desidratação e vitrificação. O encapsulamento-vitrificação tem apresentado boa aplicabilidade para o manuseio de explantes com tamanho reduzido, pois observou-se que os explantes encapsulados são mais fáceis de manipular, devido ao tamanho das cápsulas de alginato (Sakai e Engelmann, 2007).

Para a formação das cápsulas de alginato de cálcio, é necessário o preparo de duas soluções. A primeira é composta por um meio líquido com os sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de alginato de sódio sem adição de cálcio e sacarose. A segunda solução é descrita como meio de encapsulamento, que é composta por sais de MS, cloreto de cálcio, caseína hidrolisada e sacarose. A reação entre as duas soluções é que forma as cápsulas (Engelmann, 1997)

Existe apenas um relato do uso dessa técnica aplicada para a espécie *P. suberosa*. Para essa técnica, Garcia et al. (2011b) obtiveram 28% de regeneração de ápices caulinares, em conjunto com o pré-crescimento em meio contendo alta concentração de sacarose. Esses autores observaram ainda uma maior regeneração para os explantes incubados na ausência de luz após a criopreservação, em comparação com a técnica de vitrificação.

3.2.2.4.3. Criopreservação de *Passiflora* pelo método de vitrificação em gotículas

Esta técnica é derivada do congelamento em gotículas e da vitrificação. No protocolo de vitrificação em gotículas, os explantes são colocados em uma solução de carregamento, tratados com a solução de vitrificação PVS2 e colocados individualmente em 5-10 μ L de gota de PVS2 sobre tiras de alumínio, que são, então, imersas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, as tiras de alumínio são mergulhadas em meio líquido contendo alta concentração de sacarose e após 20 minutos de descarregamento, os explantes são retirados e colocados em meio de recuperação (Sakai e Engelmann, 2007). Apesar de ser uma técnica promissora para as espécies de *Passiflora* L. há apenas um relato

utilizando essa técnica na criopreservação de ápices caulinares e gemas laterais de *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea* (Soares, 2013).

3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal, foram utilizadas sementes de polinização aberta de *Passiflora setacea* DC., coletadas na Escola Técnica Agrícola Antonio Sarlo - Campos dos Goytacazes - RJ. 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.

3.2.3.1. Estabelecimento *in vitro*

3.2.3.1.1. Desinfestação das sementes

Para facilitar a germinação, os tegumentos das sementes foram retirados com auxílio de uma minimorsa antes da desinfestação. Em câmara de fluxo laminar, as sementes sem tegumento foram mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% com 2 gotas de *Tween* 20 em 80 mL da solução por 15 minutos, enxaguadas três vezes em água desionizada e autoclavada.

3.2.3.1.2. Germinação *in vitro*

Após a desinfestação, as sementes sem o tegumento foram colocadas em meio de cultura contendo a metade da concentração dos sais minerais do MS (Murashige e Skoog, 1962), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol acrescido de vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 7,0 g L⁻¹ ágar (Vetec®) e pH do meio ajustado para 5,7± 0,1. Foram distribuídos 40 mL de meio por frasco (125 mm x 60 mm) vedado com tampa rígida de polipropileno. Após a autoclavagem as tampas foram substituídas por tampas ventiladas por duas membranas.

Foram colocadas cinco sementes por frasco e estes foram mantidos por 10 dias no escuro em temperatura de 27±2°C e, então, transferidos para a luz por

mais 20 dias com fotoperíodo 16:8 (luz:escuro), fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 30 dias, foram consideradas germinadas as plântulas que apresentaram raiz e parte aérea expandidas. Dessas plântulas foram extraídos os segmentos nodais para o encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotículas.

3.2.3.2. Encapsulamento-vitrificação

Os segmentos nodais contendo uma gema foram seccionados com tamanho de aproximadamente 0,5 cm.

3.2.3.2.1 Pré-cultivo

Para o pré-cultivo foram utilizados 240 segmentos nodais. Foram distribuídos 120 segmentos nodais em cada *Erlenmeyer* com capacidade de 200 mL, contendo 60 mL de meio de pré-cultivo MS líquido, sob agitação contínua (100 rpm) em mesa agitadora (Nova Ética, Mod. 109), sem adição de cálcio suplementado com 2% de alginato de sódio e $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ sacarose por 24 horas (Figura 13).

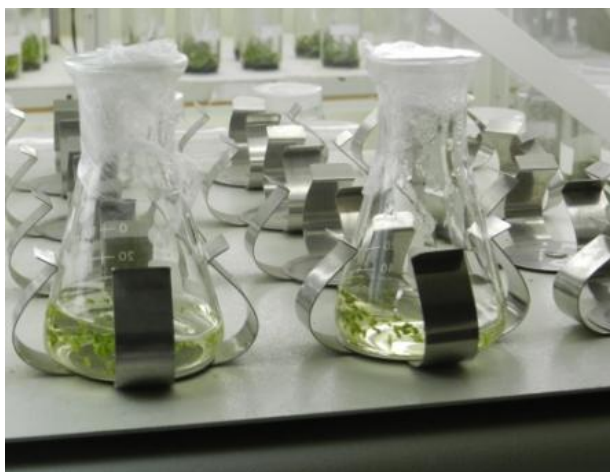


Figura 13. Pré-cultivo de segmentos nodais de *P. setacea* DC. em solução de MS líquido sobre mesa agitadora (100 rpm).

3.2.3.2.2 Encapsulamento

Após 24 horas em meio de pré-cultivo, os segmentos nodais que estavam no *Erlenmeyer* foram dispensados com auxílio de uma pipeta com ponteiros estéreis juntamente com 0,1 mL da solução de alginato de sódio, e colocados em outro frasco com a solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) para formação das cápsulas. A solução de cloreto de cálcio foi composta pelo sais de MS, contendo $0,1\text{mol L}^{-1}$ de CaCl_2 , suplementada com $0,09\text{mol L}^{-1}$ de sacarose. Os segmentos nodais permaneceram na solução de CaCl_2 por 30 minutos para formação das cápsulas (Figura 14 a, b).

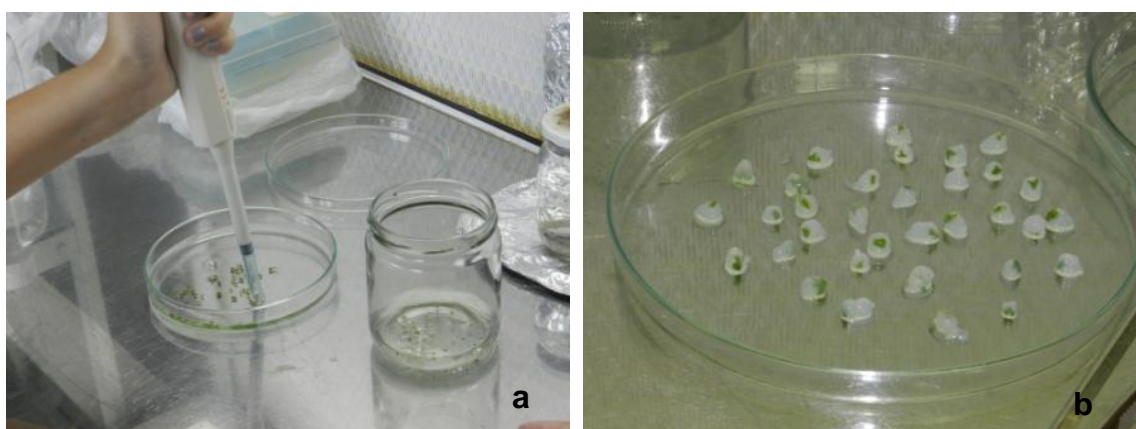


Figura 14. Encapsulamento de segmentos nodais de *P. setacea* DC. após imersão em solução de cloreto de cálcio (a), segmentos nodais encapsulados de *P. setacea* DC. (b).

3.2.3.2.3. Solução de osmoproteção (crioproteção)

Os segmentos nodais encapsulados foram colocados em *Erlenmeyers* com 40 mL de solução de osmoproteção, que é uma solução crioprotetora, composta pelos sais de MS, suplementada com 0,75 mol L⁻¹ de sacarose e 1 mol L⁻¹ de glicerol, durante 24 horas sob rotação de 100 rpm em mesa agitadora (Nova Ética, Mod. 109) a 25°C (Figura 15).

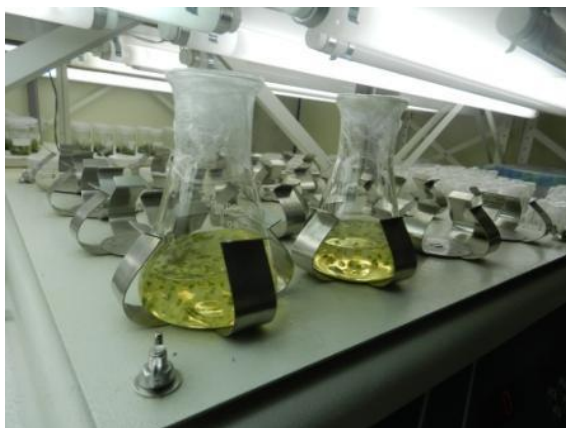


Figura 15. Segmentos nodais encapsulados de *P. setacea*, imersos em solução de osmoproteção sobre mesa agitadora (100 rpm).

3.2.3.2.4. Solução de vitrificação

Na etapa de vitrificação, os segmentos nodais encapsulados foram desidratados em solução de vitrificação PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*). Essa solução é composta por 0,4 mol L⁻¹ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO (Dimetilsufóxido), 15% de etileno glicol em meio contendo os sais de MS, com pH ajustado para 5,7, em banho de gelo a 0°C (Figura 16 a). Foi colocado 1 mL da solução de PVS2 em cada criotubo com capacidade para 2 mL e, em seguida, foram colocados quatro segmentos nodais encapsulados em cada criotubo. Os criotubos com os segmentos nodais encapsulados foram dispostos em uma caixa de isopor com gelo, para garantia de temperatura de 0°C pelo tempo de exposição a PVS2 determinado para cada tratamento (Tabela 10) (Figura 16 b). Após o tempo de exposição a PVS2 determinada para cada tratamento, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido por 24 horas. No dia seguinte, foi feito o descongelamento (Figura 16 c).



Figura 16. Segmentos nodais encapsulados de *P. setacea* DC., tratados com solução de vitrificação PVS2 (a), imersão de criotubos em banho de gelo (0°C) (b), e armazenamento dos criotubos em nitrogênio líquido (c).

Tabela 10. Descrição dos tratamentos para o uso da técnica de encapsulamento-vitrificação de segmentos nodais de *P. setacea* DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TRATAMENTOS	
T1	SNE em imersão rápida no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T2	SNE por 15 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T3	SNE por 30 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T4	SNE por 45 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T5	SNE por 60 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T6	SNE por 90 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T7	SNE por 120 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
T8	SNE por 180 min. no PVS2 (0°C), nitrogênio líquido por 24 h.
CONTROLES	
C1	SNE imersos diretamente no nitrogênio líquido por 24 h.
C2	SNE por 15 min. no PVS2 (0°C), sem nitrogênio líquido.
C3	SNE por 60 min. no PVS2 (0°C), sem nitrogênio líquido.
C4	SNE sem PVS2 e sem nitrogênio líquido.
C5	SNE por 90 min. no PVS2 (0°C), sem nitrogênio líquido.
C6	SNE por 120 min. no PVS2 (0°C), sem nitrogênio líquido.
C7	SNE por 180 min. no PVS2 (0°C), sem nitrogênio líquido.

*SNE= Segmentos nodais encapsulados.

3.2.3.2.5. Descongelamento

Depois de armazenados em nitrogênio líquido, os criotubos foram rapidamente aquecidos em água morna (40°C) por dois minutos (Figura 17 a). Em seguida, foi retirada a solução de PVS2 dos criotubos e os segmentos nodais encapsulados foram incubados em 40 mL de solução de descarregamento, composta por sais do meio MS com 1,2 mol L⁻¹ de sacarose durante 20 minutos em mesa agitadora a 100 rpm (Nova Ética, Mod. 109) (Figura 17 b).



Figura 17. Descongelamento rápido de segmentos nodais encapsulados de *P. setacea* DC., imersos em água a 40°C (a), segmentos nodais encapsulados de *P. setacea* em solução de descarregamento sobre agitação (100 rpm) (b).

3.2.3.2.6. Inoculação em meio de regeneração

Os segmentos nodais encapsulados foram transferidos para frascos de cultivo (65mm x 125 mm) com meio de regeneração composto pelos sais de MSM (Monteiro et al., 2000a), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e suplementado com 2,22 µmol L⁻¹ de BA (Figura 18).



Figura 18. Inoculação de segmentos nodais encapsulados de *P. setacea* DC., em meio de regeneração.

3.2.3.2.7. Delineamento e avaliações

O experimento de encapsulamento-vitrificação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, a parcela foi

constituída por um criotubo com quatro segmentos nodais encapsulados. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, formação de calos e formação de brotações, considerando 25% de sobrevivência para cada explante que apresentasse coloração verde após 60 dias, totalizando 100% quando todos os explantes apresentavam coloração verde ao final dos 60 dias. O mesmo foi feito para formação de calos e brotações.

3.2.3.3. Vitrificação em gotículas

Para a vitrificação em gotículas (*droplet vitrification*) as sementes foram colocadas para germinar conforme metodologia descrita no item 3.2.3.1.2. Em seguida, os segmentos nodais de 0,5 cm foram excisados das plântulas germinadas *in vitro* e colocados em meio composto pelos sais de MSM, suplementado com 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 6-benziladenina (BA), 30 g L^{-1} de sacarose, vitaminas de White, 0,1g L^{-1} de mio-inositol, durante 14 dias.

Em câmara de fluxo laminar, foram excisadas gemas axilares dos segmentos nodais cultivados *in vitro*, com aproximadamente 1,0 mm de tamanho, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Tecnival®). As gemas foram colocadas em placa de Petri com meio de pré-cultivo sólido [sais de MS e 30 g L^{-1} de sacarose], por 24 horas até a retirada de todas as gemas (Figura 19 a). Após esse período, em condições assépticas de câmara de fluxo laminar, foram dispostas tiras de alumínio (30 mm x 5 mm) em uma placa de Petri sobre bloco de gelo, garantindo uma temperatura próxima aos 0°C (Figura 19 b). Em cada tira de alumínio foram depositadas oito gotas de 4 μL da solução de vitrificação PVS2, em seguida as gemas laterais foram imersas nas gotas sendo realizada a vitrificação de acordo com cada tratamento (Tabela 11) (Figura 19 c).

Tabela 11. Tratamentos e controles para a criopreservação por vitrificação em gotículas em gemas de segmentos nodais de *P. setacea* DC. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

TRATAMENTOS	
T1	Gemas com vitrificação em gotículas de PVS2 por 60' e imersão em NL
T2	Gemas com vitrificação em gotículas de PVS2 por 45' e imersão em NL
T3	Gemas com vitrificação em gotículas de PVS2 por 30' e imersão em NL
CONTROLES	
C1	Gemas sem vitrificação em gotículas de PVS2 e sem imersão em NL
C2	Gemas sem vitrificação em gotículas de PVS2 e imersas no NL
C3	Gemas com vitrificação em gotículas de PVS2 por 60' e sem imersão em NL

Após o período de vitrificação, as tiras de alumínio e os criotubos foram imersos em um recipiente contendo NL e, em seguida, com o auxílio de uma pinça, as tiras de alumínio foram colocadas nos criotubos, posteriormente vedados e colocados em *canisters* para o armazenamento em tanque de NL (Figura 19 d).

As gemas laterais permaneceram por um período de 24 horas em NL (Figura 19 e), em seguida foram retiradas e colocadas diretamente em solução de descarregamento contendo sais de MS e $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose. Após esse período, as gemas foram cultivadas em meio de regeneração contendo sais MSM, 30 g L^{-1} de sacarose e suplementado com $2,22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA, mantidas no escuro em temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias e mais 30 dias na luz com fotoperíodo 16:8 (luz:escuro), fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de $50 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

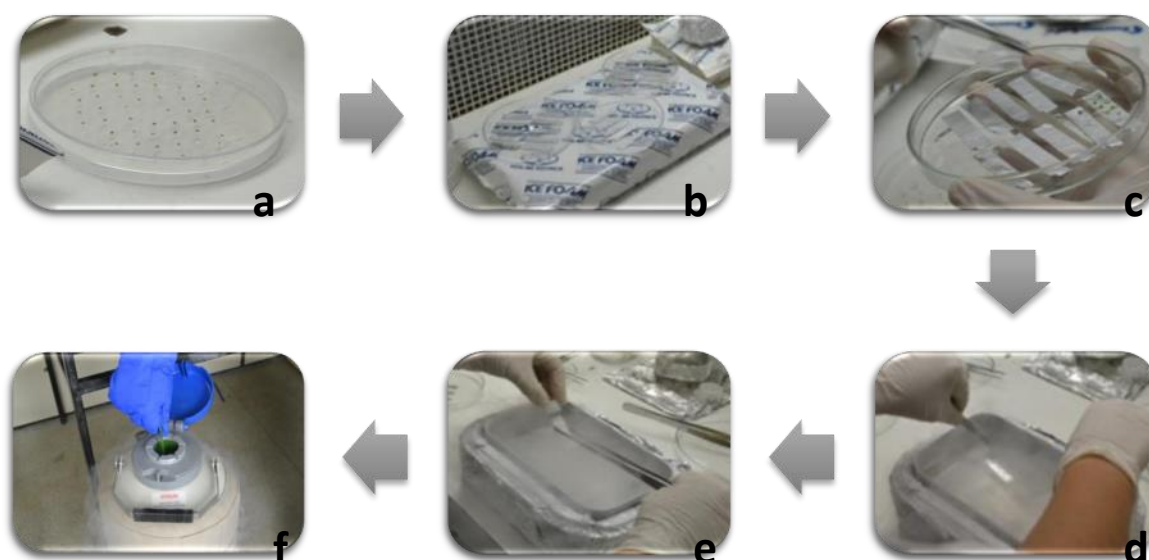


Figura 19. Fluxograma com as etapas de vitrificação por gotículas para gemas laterais de *P. setacea*. Gemas cultivadas em meio MS sólido por 24 h. (a), tiras de alumínio sobre placa de gelo (b), gemas imersas em gota de PVS2 sobre tira de alumínio (c), gemas imersas em nitrogênio líquido (d), tiras de alumínio colocadas em criotubo (e), armazenamento dos criotubos em tanque de nitrogênio líquido (f).

3.2.3.3.1. Delineamento e avaliações

O experimento de vitrificação em gotículas foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Cada repetição consistiu de um criotubo com uma tira de alumínio contendo oito gemas sob gotículas de PVS2. Foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência, formação de calos e formação de brotações após 60 dias. Foi considerada viva a gema que apresentasse coloração verde após 60 dias, cada gema equivaleu a 12,5%. O mesmo foi considerado para formação de calos e brotações.

3.2.3.3.2. Análises Estatísticas

As variáveis da criopreservação foram submetidas às pressuposições de normalidade e homogeneidade pelo teste de *Lilliefors* e *Bartlett*, respectivamente. Em seguida, as variáveis do encapsulamento-vitrificação foram transformadas em raiz quadrada de $x + 1$ antes da análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para vitrificação em

gotículas, as variáveis foram transformadas em raiz quadrada de x antes da análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (*Statistical Analysis System*, versão 5.6) (Ferreira, 2011b).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1. Encapsulamento-vitrificação em segmentos nodais de *P. setacea* DC.

Para a criopreservação por encapsulamento-vitrificação de segmentos nodais, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para as variáveis analisadas (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo da análise de variância com o grau de liberdade e quadrados médios sobre a porcentagem de sobrevivência, formação de brotações e formação de calos em segmento nodal de *Passiflora setacea* DC., submetidos à criopreservação por encapsulamento-vitrificação. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

Fonte de Variação	GL	Sobrevivência	Calos	Brotações
		QM	QM	QM
Tratamentos	14	3834,821429**	2296,130952**	1848,214286**
Resíduo	45	270,833333	243,055556	531,2500

**Indica significância $p < 0,01$.

Houve formação de calos e brotações apenas nos controles que não foram imersos em NL. Nenhum segmento nodal sobreviveu à imersão em NL (Tabela 13).

Tabela 13. Porcentagem de sobrevivência, formação de brotações e calos em segmentos nodais encapsulados de *Passiflora setacea* DC., submetidos à criopreservação por encapsulamento-vitrificação, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

	Tratamentos		Sobrevivência	Calos	Brotações
	PVS2	NL			
C1	-	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
C2	15 min.	-	37,50 b	37,50 a	37,50 a
C3	60 min.	-	75,00 a	68,75 a	37,50 a
C4	-	-	81,25 a	62,50 a	56,25 a
C5	90 min.	-	62,50 a	0,00 b	50,00 a
C6	120 min.	-	50,00 a	6,25 b	31,25 a
C7	180 min.	-	31,25 b	0,00 b	31,25 a
T1	Imersão rápida	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T2	15 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T3	30 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T4	45 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T5	60 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T6	90 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T7	120 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T8	180 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
CV(%):			40,92	66,32	81,16

Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo pelo teste Scott-Knott.

Para a variável sobrevivência foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os controles não imersos em NL. A sobrevivência dos segmentos nodais tratados com PVS2 por 60 (C3), 90 (C5) e 120 (C6) minutos não diferem do controle sem tratamento com PVS2 (C4). Os controles submetidos à vitrificação por 15 (C2) e 180 (C7) minutos apresentaram menor porcentagem de sobrevivência, 37,50 e 31,25%, respectivamente. Os segmentos nodais imersos diretamente em NL sem PVS2 (C1) não sobreviveram. Também não foi observada sobrevivência para todos os tratamentos em que os segmentos nodais foram imersos em NL (Tabela 13).

Para a formação de calos nos controles, foi observada diferença significativa. Os segmentos nodais submetidos a 15 e 60 minutos em PVS2 e o controle sem PVS2 tiveram as maiores porcentagens de formação de calos. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para formação de brotações entre os controles que não foram imersos no NL. Nos controles de 90 e 180 minutos em

PVS2 foi observada organogênese por via direta, ou seja, não houve formação de calos, apenas de brotações (Tabela 13).

Utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação não foi possível regenerar nenhuma planta após a imersão em NL a partir de segmentos nodais (Tabela 13). Em busca do desenvolvimento de um protocolo de criopreservação para segmentos nodais de *P. pohlii* utilizando as técnicas de vitrificação e encapsulamento-vitrificação, Merhy et al. (2012) obtiveram resultados superiores com a técnica de vitrificação, no entanto, ao utilizarem o encapsulamento-vitrificação esses autores observaram uma taxa de sobrevivência muito baixa para esse tipo de explante.

Já Viana et al. (2012), comparando a eficácia dos protocolos de vitrificação e encapsulamento-vitrificação na criopreservação das espécies *P. suberosa* e *P. foetida*, observaram que para essas espécies a técnica de encapsulamento-vitrificação foi mais eficaz na retomada de crescimento dos explantes em comparação com a técnica de vitrificação. Esses autores sugerem que as cápsulas de alginato de cálcio proporcionaram uma proteção adicional, reduzindo a toxicidade da solução de vitrificação.

Como exposto, as espécies do gênero *Passiflora* spp. exibem respostas distintas aos tratamentos de criopreservação. No presente trabalho, não foi observada sobrevivência dos segmentos nodais de *P. setacea*. criopreservados por meio da técnica de encapsulamento-vitrificação. A etapa da extração dos segmentos nodais pode ter corroborado com esses resultados, pois, explantes maiores que 1 mm possuem espaços intracelulares maiores que podem acumular água e, portanto, cristalizar, principalmente ao passarem pelas temperaturas de -15°C a -60°C que é a faixa crítica onde ocorre a formação de cristais de gelo nas células (Mazur, 1984). No presente trabalho foi utilizado explantes de 5 mm.

Outro ponto importante é o uso da solução de pré-, rica em sacarose, que pode auxiliar na proteção dos explantes antes da imersão em NL (Santos, 2000). No presente trabalho, a solução de pré-cultivo apresentava 0,09 M de sacarose. Garcia et al. (2011b), ao utilizarem o protocolo de encapsulamento-vitrificação para criopreservação de *P. suberosa* testaram três concentrações de sacarose para a etapa de pré-cultivo, onde os explantes expostos à solução com 0,3 M de sacarose mostraram maior porcentagem de retomada do crescimento e multiplicação de brotações. A otimização da etapa de pré-cultivo com a utilização

de uma solução concentrada de sacarose pode ser um ponto fundamental que colabore para o sucesso da técnica.

A solução vitrificante PVS2 pode ser tóxica para muitas espécies, principalmente devido à presença do DMSO (Heringer et al., 2013; Best, 2015), embora, para *Passiflora*, ainda não tenha sido relatado nenhuma reação fitotóxica (Garcia et al., 2011b; Merhy et al., 2012; Soares, 2013). No presente estudo também foi observado que o PVS2 não apresentou toxicidade em segmentos nodais de *P. setacea*. Pois foram constatadas a sobrevivência, formação de calos e brotações em segmentos nodais de *Passiflora setacea* expostos à solução contendo DMSO.

O protocolo de encapsulamento-vitrificação vem mostrando eficiência para a criopreservação de muitas espécies (Wang et al., 2004; Viana et al., 2012; Wang et al., 2014). As várias etapas são muito minuciosas e o menor erro pode comprometer todo o processo e o sucesso da técnica. O protocolo utilizado para criopreservação por meio de encapsulamento-vitrificação do presente trabalho não foi eficiente para regeneração de plantas após a criopreservação. O tamanho dos explantes excisados (excessivamente grande) e a solução de pré-cultivo que poderia ser substituída por uma solução com maiores concentrações de sacarose podem ter contribuído para o insucesso da técnica.

3.2.4.2. Vitrificação em gotículas de gemas axilares de *P. setacea* DC.

Para a criopreservação por vitrificação em gotículas de gemas axilares extraídas de segmentos nodais de *P. setacea*, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para sobrevivência, formação de calos e brotações (Tabela 14).

Tabela 14. Resumo da análise de variância com o grau de liberdade e quadrados médios sobre a porcentagem de sobrevivência, formação de calos e brotações em gemas axilares de segmentos nodais de *Passiflora setacea* DC., submetidos a criopreservação por vitrificação em gotículas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

Fonte de Variação	GL	Sobrevivência	Formação de Calos	Formação de Brotações
		QM	QM	QM
Tratamento	5	5443,981481**	4782,870370**	1645,370370**
Resíduo	21	127,976190	199,404762	157,738095

**Indica significância $P < 0,01$.

Para a variável sobrevivência foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos criopreservados ou não. A maior porcentagem de sobrevivência (85%) foi obtida quando as gemas foram submetidas à PVS2 por 60 minutos, sem imersão em NL (C3). Foi observado que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando as gemas não foram submetidas à PVS2 e NL (C1) e no tratamento em que as gemas foram submetidas à PVS2 por 30 minutos e imersas no NL (T3). Não foi observada sobrevivência e nem formação de calos e brotações para os demais tratamentos (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem de sobrevivência do explante, formação de calos e brotações em gemas de segmentos nodais de *Passiflora setacea*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

	Tratamentos		Sobrevivência do explante	Formação de Calos	Formação de Brotações
	PVS2	NL			
C1	-	-	42,50 b	42,50 a	7,50 b
C2	-	24h.	0,00 c	0,00 b	0,00 b
C3	60 min.	-	85,00 a	77,50 a	47,50 a
T1	60 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T2	45 min.	24h	0,00 c	0,00 b	0,00 b
T3	30 min.	24h	17,50 b	10,00 b	7,50 b
CV(%)			35,81	43,48	75,41

Médias seguidas por letras iguais minúscula na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Para variável formação de calos, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos (Tabela 15). As maiores porcentagens de formação de calos foram obtidas quando as gemas foram submetidas à PVS2 por 60 minutos

sem imersão no NL (C3) e, quando as gemas não foram submetidas à PVS2 e ao NL (C1). As gemas que foram submetidas à PVS2 por 30 minutos antes da imersão em NL (T3) foram as únicas que apresentaram formação de calos após criopreservação (Tabela 15).

Para a formação de brotações foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, onde as gemas que foram submetidas à PVS2 por 60 minutos sem imersão em NL obtiveram maior porcentagem de formação de brotações por explante (C3). As gemas que não foram submetidas à PVS2 e ao NL (C1) e o tratamento em que as gemas foram submetidas à PVS2 por 30 minutos antes da imersão em NL (T3) formaram brotações (7,50%), embora não diferindo estatisticamente dos tratamentos que não apresentaram nenhuma formação de brotações (Tabela 15).

É crescente o número de espécies criopreservadas com sucesso pela técnica de vitrificação em gotículas (Panis et al., 2005; Barraco et al., 2011; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2017). Embora sua aplicabilidade pareça ser promissora para as espécies de *Passiflora*, ainda são poucos os trabalhos utilizando essa técnica. Soares (2013) conseguiu regenerar até 50% de gemas apicais criopreservadas de *P. setacea*, utilizando vitrificação em gotículas. As gemas apicais possuem alto poder regenerativo, o que pode favorecer a recuperação desses explantes. Já para o presente estudo, após a criopreservação de gemas axilares, as taxas de sobrevivência, formação de calos e brotações foram de 17%, 10% e 7,5%, respectivamente.

Ao avaliar as duas técnicas aplicadas no presente trabalho, foi observado que a vitrificação em gotículas apresentou melhores perspectivas para o uso na criopreservação em detrimento do encapsulamento-vitrificação para a espécie *P. setacea*. Apesar de resultados promissores na criopreservação de muitas espécies utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação (Ming-Hua e Sen-Rong, 2010; Wang et al., 2014; Jeon et al., 2015), as especificidades do processo de cada etapa para essa técnica devem ser otimizadas para a eficiência na criopreservação de *P. setacea*. Pois, a combinação dos efeitos de cada etapa está diretamente ligada ao sucesso da criopreservação (Park e Kim, 2015).

Os efeitos resultantes de cada etapa, desde o tamanho do segmento nodal excisado, o pré-cultivo, encapsulamento, osmoproteção, vitrificação, descongelamento e regeneração não mostraram taxas de sobrevivência com o

uso da técnica de encapsulamento-vitrificação, embora tenha sido observada a sobrevivência quando usado o protocolo de vitrificação em gotículas. De acordo com esses resultados é necessário incorporar novas modificações à técnica de encapsulamento-vitrificação para obtenção de melhores respostas e garantir o sucesso da criopreservação, além de otimizar o protocolo de regeneração de gemas axiliares criopreservadas por meio da técnica de vitrificação em gotículas, a fim da garantia do sucesso da criopreservação.

3.2.5. CONCLUSÃO

O protocolo de encapsulamento-vitrificação utilizado não foi eficiente para a criopreservação de segmentos nodais de *P. setacea* DC.

No protocolo de vitrificação em gotículas, as gemas axiliares de *P. setacea* DC. apresentaram 17,50% de sobrevivência, após a criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v. 97, n.5, p. 883-893.
- Ataíde, E.M., Oliveira, J.C., Ruggiero, C. (2012). Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D. C. cultivado em Jaboticabal, SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 2, p. 377-381.
- Barraco, G. Sylvestre, I. Engelmann, F. (2011). Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. *Scientia Horticulturae*, v. 130, n. 1, p. 320-324.
- 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*. v. 79, p. 87-90.
- Best, B.P. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation research*, v.18, n.5, p. 422-436.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. (1996). Tissue culture media. *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition*. Amsterdã: Elsevier, p. 39-62.

- Braga, M.F., Santos, E.D., Junqueira, N.T. V., Sousa, A.A. T.C., Faleiro, F.G., Rezende, L.N., Junqueira, K.P. (2006a). Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n.2, p. 284-288.
- Braga, M.F., Silva, J.R., Ruggiero, C., Barros, A.M., Vasconcelos, M.A.S., Batista, A.D., Dutra, G.A., Peixoto, M. (2006b). Demandas para as pesquisas visando à exploração diversificada. *In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (eds) Maracujá: demandas para a pesquisa*. Embrapa Cerrados, 54p.
- Brasil. (2009). Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. *Mapa/ACS*.
- CDB - Convenção de Diversidade Biológica (1992). Rio de Janeiro - RJ. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica>> Acesso em: 04 de novembro de 2015.
- Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 101, 349-358.
- Cervi, A.C. (1997). *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueira*, v. 45, p. 1- 92.
- Cervi, A.C. (2006). O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem*, v. 39, p. 43-129.
- Chaves, R.C., Junqueira, N.T.V., Manica, I., Peixoto, J.R., Pereira, A.V., Fialho, J.F. (2004). Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 1, p. 120-123.
- Costa, A.M., Lima, H.C., Cardoso, E.R., Silva, J.R., Padua, J.G., Faleiro, F.G., Pereira, R.C.A., Campos, G.A. (2015). Produção de Mudas de Maracujazeiro Silvestre (*Passiflora setacea*). *Embrapa Cerrados*. 1ªed, 6p.
- Costa, A.M., Vicentini, G.C., Brandao, L.S., Silva, K.N., Santos, A.L.B., Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V. (2009). Descritores morfológicos quantitativos da *Passiflora setacea* variedade BRS Pérola do Cerrado obtidos na safra

chuvosa e seca. In: *5 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*, Guarapari, ES.

- Dagla, H.R. (2012). Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. *Resonance*, p.759-767.
- Deginani, N.B. (2001). Las especies argentinas del género *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Darwiniana*, v. 39, n. 1-2, p. 43-129.
- Diamond, H., Stewart, D.C., (1963). Extend your research capabilities. In: Lipetz, J. Plant Tissue Culture, *Science*, v. 141, n.3576, p. 190-195.
- Dias, L.L.C., Santa-Catarina, C., Ribeiro, D.M., Barros, R.S., Floh, E.I.S., Otoni, W.C. (2009). Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 99, p. 199-208.
- Dornelas, M.C., Vieira, M.L.C. (1994). Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.36, p.211-217.
- Drew, R.A. (1991). In vitro culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 26,n.1, p. 23-27.
- Dulloo, M.E., Hunter, D., Borelli, T. (2010). *Ex situ* and *in situ* conservation of agricultural biodiversity: major advances and research needs. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 38, n. 2, p. 123-135.
- Duvick, D.N. (1967). Influence of morphology and sterility on breeding methodology. In: Frey, K. J. *Plant breeding*, Iowa States University Press. Iowa, p. 85-138.
- Engelmann, F. (1997). Importance of desiccation for cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated apices. *Plant Genetic Resources Newsletter*, v. 112, p.9–18.
- Engelmann, F. (2004). Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, v. 40, p. 427- 433.

- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 47, n.1, p. 5-16.
- Engelmann, F., Takagi, H. (2000). Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application. Proceedings of an international workshop, Tsukuba, Japan, October, 1998. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application. Proceedings of an international workshop*, Tsukuba, Japan, October, 1998.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v. 21, p. 407- 426.
- Faleiro, F.G. (2014). *MARACUJÁ - germoplasma e melhoramento genético*. Disponível em: < <http://www.cpac.embrapa.br> > Acesso em 04 de novembro de 2015.
- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.B., 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 (Documentos, 307)*, p.36.
- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. Peixoto, J.R. (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. *Embrapa Cerrados*, 670 p.
- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Junqueira, K.P., Braga, M.F., Soares-Scott, M.D., Souza, L.S., Castiglioni, G.L. (2007). BRS Rubiflora: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 13, p. 337-339.
- Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F.; Oliveira, E.J. de; Peixoto, J.R.; Costa, A. M. (2011) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*, 36p.

- FAO (1996) Biodiversity Preserved: in situ and ex situ; CGIAR. Disponível em: < <http://www.fao.org/FOCUS/E/96/06/04-e.htm> > acesso em: 08 de março de 2017.
- Faria J.L.C., Segura J. (1997b) Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. *HortScience*, v. 32, p. 1276–1277.
- Faria, F.S., Stehmann, J. R. (2010) Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). *Acta Botanica Brasílica*, São Paulo , v. 24, n. 1, p. 262-269.
- 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*, v. 28, n. 2, p. 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*, v. 66, n. 4, p. 535-543.
- Faria, J.L.C., Segura, L. (1997a). *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 33, p. 209-212.
- 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*, v. 91, p. 37-44.
- Ferreira, D.F. (2011b). Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042.
- Ferreira, F. R. (2005). Recursos genéticos de *Passiflora*. *In: In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa – Cerrados*. p. 41-51.
- Ferreira, F.R. (2011a). Germoplasma de fruteiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. especial 1, p. 1-6.

- Flora do Brasil. (2017). *Passifloraceae*: Flora do Brasil 2020 em construção. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 21 Fev. 2017.
- Frankel, O.H. (1977). Natural variation and its conservation. In: Genetic diversity in plants. *Springer US*, p. 21-44.
- Fuhrmann, E., Junqueira, N.T.V., Blum, L.E.B., Braga, M.W., Bellon, G., Junqueira, K. P. (2014). Reaction of interspecific hybrids of *Passiflora* spp. to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Ciência Rural*, v. 44, n.8, 1404-1410.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v. 50, n. 1, p. 151–158.
- 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 and Organ Culture (PCTOC)*, v. 106,n.1, 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*, v. 32, n. 5, p. 377-388.
- González-Benito, M.E., Aguilar, N., Ávila, T. (2009). Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. *Cryoletters* v. 30, n. 2, p. 142-147.
- González-Benito, M.E., Clavero-Ramírez, I., López-Aranda, J.M. (2004). Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetative by propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 2, n. 3, p. 341-351.
- Guevara, C.J., Ospina, L., Caicedo, V., Barney, G., Coppens D'eeckenbrugge. S.F. (2001). Seed cryopreservation in three *Passiflora* species. Disponível em

< <ftp://ciat.cgiar.org/ipgri/Templates%20Bioiversity/crioPasiflora.doc> > Acesso em: 18 de novembro de 2015.

Heringer, A.S., Steinmacher, D.A., Fraga, H.P., Vieira, L.N., Ree, J.F., Guerra, M.P. (2013). Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 114, n.3, p. 365-372.

Jeon, S.M., Arun, M., Lee, S.Y., Kim, C.K. (2015). Application of encapsulation-vitrification in combination with air dehydration enhances cryotolerance of *Chrysanthemum morifolium* shoots tips. *Scientia Horticulturae*, v. 194, p. 91-99.

Kami, D. (2012). Cryopreservation of Plant Genetic Resources, Current Frontiers in Cryobiology, Katkov, I. (Ed.). *University Campus Step*, p. 439-456. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/cryopreservation-of-plant-genetic-resources> > acesso em: 03 de novembro de 2015.

Kaviani, B. (2011). Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n.6. p. 778-800.

Khanna, P.P., Singh, N. (1991). Conservation of plant genetic resources. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF9213931> > acesso em: 03 de fevereiro de 2017.

Klink, C.A., Machado, R.B. (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*. v.19, n.3, p.707-713.

Komathi, S., Rajalakshmi, G., Savetha, S., Ayyappadas, M.P., 2011. In vitro regeneration of *Passiflora foetida* L. J. Res. Biol. 8, 653-659.

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*, v. 37, n. 10. p. 1359-1364.

- Lombardi, S.P., Passos, I.R.S., Nogueira, M.C.S., Appezzato-da-Gloria, B. (2007). *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian archives biology and technology*, v.50, n.2, p.239-247.
- Macdougall, J.M., Feillet, C. (2004). Systematics. In: Ulmer, T., Macdougall, J. M. (eds) *Passiflora: Passionflowers of the World*. Timber Press. 430 p.
- Matsumoto, K., Cardoso, L.D., Santos, I.R.I.S. (2010). Manual de curadores de germoplasma - Vegetal: Caracterização *in vitro*. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 11p.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and applications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 247, n. 3, p. 125-142.
- Meletti, L.M.M. (2011). Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n.spe1, p.83-91.
- Meletti, L.M.M., Barbosa, W., Veiga, R.F.A. (2004). Criopreservação de sementes de três espécies de maracujazeiro. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 18. Florianópolis.
- Meletti, L.M.M., Barbosa, W., Veiga, R.F.A., Pio, R. (2007). Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.6, p.13-20.
- 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. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. *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*, v. 65. n.3, p. 362-363.
- Ming-Hua, Y., Sen-Rong, H. (2010). A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 101, 349-358.

- Ministério do Meio Ambiente - MMA. (2017). Conservação *in situ*, *ex situ* e on farm. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>> acesso em: 25 de março de 2017.
- Monteiro, A.C.B.A., Higashi, E.N., Gonçalves, A.N., Rodriguez, A.P.M. (2000a). 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 Developmental Biology - Plant*, v. 36, p. 527–531.
- Monteiro, A.C.B.A., Nakazawa, G.T., Mendes, B.M.J., Rodriguez, A.P.M. (2000b). Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agricola*, v. 57, n.3, p. 571-573.
- Monteiro-Hara, A.C.B.A., Jadão, A.S., Mendes, B.M.J., Rezende, J.A.M., Trevisan, F., Mello, A.P.O.A., Vieira, M.L.C., Meletti, L.M.M., Piedade, S.M.S. (2011). Genetic transformation of passionflower and evaluation of R1 and R2 generations for resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. *Plant Disease*, v. 95, p. 1021-1025.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497.
- 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*. vol. 35, n. 4, suppl. 1, p. 1036-1043.
- Nakayama, F. (1966). Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v.41, 63-74.
- Nhut, D.T., Khiet, B.L.T., Thi, N.N., Thuy, D.T.T., Duy, N., Hai, N.T., Huyen, P.X., (2007). High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) technology. *In: Jain SM and Häggman H (eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer*, p. 417-426.

- Nunes, T. (2009). Neotropical Passifloraceae. In: Milliken, W., Klitgård, B., Barakat, A. (2009), *Neotropikey - recursos interativos da chave e da informação para plantas flowering do Neotropics*. Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Passifloraceae.htm>. Acesso em 21 de Fevereiro de 2017.
- Oliveira, E.J. (2010). Avanços Tecnológicos na Cultura do Maracujazeiro: Oportunidades para o Nordeste. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/902518/avancos-tecnologicos-na-cultura-do-maracujazeiro-oportunidades-para-o-nordeste> > Acesso em: 04 de novembro de 2015.
- Oliveira, J. C. de; Ruggiero, C. (2005). Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.143–158.
- 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. *Genetic Resources Unit - CIAT*, p. 378-381.
- Ozarowski, M., Thiem, B. (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 23, n. 6, p. 937-947.
- 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*, v.144, p. 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*, v.211, p.305-311.
- Pádua, J.G., Schwingel, L.C., Mudim, R.C., Salomão, A.N., Roverijosé, S.C.B. (2011). Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n.1, p. 080-085.

- Panis, B., Piette, B., Swennen, R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*, v.168, n.1, 45-55.
- Park, S.U., Kim, H.H. (2015). Cryopreservation of sweet potato tips using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, v.36, n.5, p. 344-352.
- 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. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. *Embrapa - Cerrados*. p. 360-383.
- 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.
- Pilatti, F.K., Aguiar, T., Simões, T., Benson, E.E., Viana, A.M. (2011). In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 47, n.1, p. 82-98.
- Pinto, A.P.C., Monteiro-Hara, A.C.A., Stipp, L.C.L., Mendes, B.M.J., (2010a.). *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. v. 46, p. 28-33.
- Pinto, P.D.L., Barros, B.A., Viccini, L.F., Campos, J.M.S., Silva, M.L., Otoni, W.C., (2010b.). Ploidy stability of somatic embryogenesis derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. v. 103, p. 71-79.
- 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.
- Ribeiro, D.P. (2014). Biologia reprodutiva e compostos bioativos dos frutos de *Passiflora setacea* D. C. *Tese (Mestrado em Agronomia)* - Vitória da Conquista - BA, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, 69 p.

- Sakai, A., Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. *Cryoletters*, v.28, p.151-172.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, v. 9, p. 30-33.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Azevedo, J.L.F., Dias, 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*, v. 110, p. 413-422.
- Santos, E.A., Viana, A.P., Freitas, J.C.O., Silva, F.H.L., Rodrigues, R., Eiras, M. (2015). Resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 143, p. 85-98.
- Santos, F. C., Ramos, J. D., Pasqual, M., Rezende, J. C., Santos, F. C., Villa, F. (2010). Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. *Revista Ceres*, v. 57, n.1, p. 112-117.
- Santos, I.R.I. (2000). Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 70-84.
- Shehawat, M.S., Kannan, N., Manokari, M., Ravindran, C. P. (2015). *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v.13, p. 209–214.
- Silva, C.V., Oliveira, L.S. Lorigato 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* v. 107 p.407–416.
- 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 crioplasmas < http://www.cbrg.net.br/cd/Resumos/ResumoCBRG_185.pdf > Acesso em 06 de novembro de 2015.

- Skrøppa, T. (2005). *Ex situ* conservation methods. Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe. *Arbora, Zvolen, Slovakia*, p. 567-583.
- Soares, A.L.C. (2013). Multiplicação, enraizamento e conservação *in vitro* de maracujazeiro nativo. *Dissertação (Mestrado em Agronomia)* – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 86 p.
- Soares, W.S., Rêgo, M.M., Rêgo, E.R., Barroso, P.A., Nascimento, K.S., Ferreira, K.T. (2012). Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.Especial, p. 138-142.
- Sousa, G.S., Varnhagen, F.A., Porto Seguro, V. (1971). Tratado descritivo do Brasil em 1587. *Companhia Editora Nacional*, 389 p.
- Trevisan, F., Maciel, S.C., Mendes B.M.J., Vieira, M.L.C., Rezende, J.A.M., Meletti, L.M.M. (2006). Resistance to passionfruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. *Plant Disease*, 90, 1026-1030.
- Trevisan, F., Mendes B.M.J. (2005). Optimization of *in vitro* organogenesis in passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola*. v. 62, n. 4.
- Ulmer, T., Macdougall, J.M. (2004). *Passiflora: Passionflowers of the World*. 276p.
- Van Staden, J., Smith, A. R. (1978). The synthesis of cytokinins in excised roots of maize and tomato under aseptic conditions. *Annals of Botany*, v. 42, n.179, 751-753.
- 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*. v. 41, p. 89-97.

- Viana, A.P., Gonçalves, G.M., Silva, M.G. D. M., Ferreira, R. T., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T., Carvalho, G.F.D. (2016). UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 16, n.3, p. 250-253.
- Vianna, M. G., Ferreira, A. L., Garcia, R. O., Falcão, E., Pacheco, G., Mansur, E. (2012). 23. Comparison of vitrification-based techniques in the efficacy of cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. and *P. foetida* L. shoot tips. *Cryobiology*, v.65, n.3, 346.
- Vieira, L.M., Pereira, W.V.S., Oliveira, T.G.S., Aquino, F.F., Ribeiro, L.M., Mercadante-Simões, M.O. (2008). Análise Biométrica de Frutos e Sementes de *Passiflora setacea*. In: *IX Simpósio Nacional do Cerrado: Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*, 9, Brasília, DF, 3 p.
- Vieira, L.M., Rocha, D.I., Taquetti, M.F., 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 and Developmental Biology - Plant*, v. 50, p. 738–745.
- Vieira, M.L.C. (2000). Conservação de Germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, n.14, p. 18-20.
- Wang, B. S., Charest, P. J., Downie, B. (1993). *Ex situ storage of seeds, pollen and vitro cultures of perennial woody plant species*. Etude FAO: *Forets FAO*, n. 113.
- Wang, B., Li, J. W., Zhang, Z. B., Wang, R. R., Ma, Y. L., Blystad, D. R., Keller, E.R.J, Wang, Q. C. (2014). Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. *Journal of biotechnology*, v.184, p. 47-55.
- Wang, L.Y., Li, Y.D., Sun, H.Y., Liu, H.G., Tang, X.D., Wang, Q.C., Zhang, Z.D. (2017). An efficient droplet-vitrification cryopreservation for valuable blueberry germplasm. *Scientia Horticulturae*, v. 219 p. 60–69
- .

- Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C. T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E., Perl, A. (2004). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation–vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 77, n.3, p. 267-275.
- Young, A., Boyle, T., Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 11, n.10, p. 413-418.
- Zhang, J. M., Huang, B., Zhang, X. N., Volk, G. M., Zhou, Y. C., & Chen, X. L. (2015). Identification of a highly successful cryopreservation method (droplet-vitrification) for petunia. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 51, n.4, p.445-451.