

NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *in vitro* DE SEGMENTOS
NODAIS DO MARACUJAZEIRO-AZEDO 'UENF RIO DOURADO'

ROBERTA APARECIDA DE SALES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2020

NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *in vitro* DE SEGMENTOS
NODAIS DO MARACUJAZEIRO-AZEDO 'UENF RIO DOURADO'

ROBERTA APARECIDA DE SALES

“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
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S163

Sales, Roberta Aparecida de.

Nitrato de prata na conservação *in vitro* de segmentos nodais do maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' / Roberta Aparecida de Sales. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

63 f. : il.

Bibliografia: 40 - 46.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. *Passiflora edulis*. 2. Etileno. 3. Conservação de Germoplasma; Manutenção da Diversidade. 4. Cultivo Mínimo. 5. Passifloraceae. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

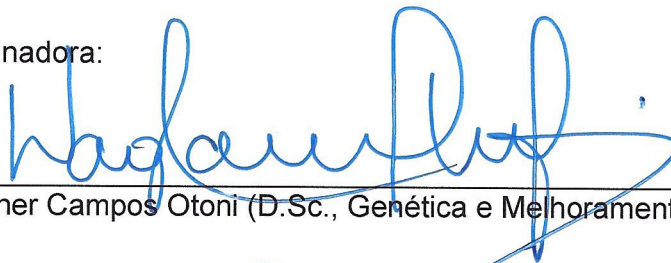
NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *in vitro* DE SEGMENTOS
NODAIS DO MARACUJAZEIRO-AZEDO 'UENF RIO DOURADO'

ROBERTA APARECIDA DE SALES

“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 12 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



Prof. Wagner Campos Otoni (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UFV



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



Prof.ª Claudete Santa-Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



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

Dedico este trabalho ao meu querido pai, Hélio, por me ensinar o valor do trabalho sério e de lutar pelo que se deseja. À minha mãe, Maria, pelo seu apoio nas horas difíceis neste trabalho, que muitas vezes me deu colo. À minha irmã, que sempre torceu por mim. Por todo amor, apoio e compreensão. Tenho muito orgulho de pertencer a esta família. Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar a formação acadêmica que me fez crescer no campo profissional.

Dizer obrigada, às vezes, não é suficiente para agradecer a tão amável e gentil pessoa que nos momentos das nossas vidas, aqueles mais difíceis, nos estende a mão amiga e nos oferece amparo.

Primeiramente a Deus, por estar sempre guiando meus passos e cuidando de mim nos momentos difíceis.

Ao meu pai, Hélio, que sempre me incentivou nessa caminhada, pelos seus conselhos e apoio de sempre

À minha mãe, Maria, que sempre me fez presente eu suas orações, pelo apoio e carinho em meus piores momentos.

À minha irmã Dani, que sempre torceu por mim e que contribuiu para que a caminhada fosse mais leve.

À minha amiga Luciana, pelos conselhos, apoio e incentivo de sempre. Por toda ajuda que me deu durante a graduação, nunca esquecerei de tudo o que fez por mim e faz.

À minha orientadora e professora Virginia Silva Carvalho, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa, por acreditar em nosso trabalho e pela orientação.

Aos meus conselheiros Alexandre Pio Viana e Telma Nair Santana Pereira, pelos conselhos e contribuições durante o mestrado.

Aos professores do PPGMP, pelos ensinamentos durante esses dois anos.

Ao querido e eficiente secretário do programa, José Daniel, por sempre ser antecioso, amigo e me incentivar a continuar na vida acadêmica;

Aos colegas do curso de PPGM, pelos dois anos de estudo que compartilhamos;

A todos os colegas do laboratório, pelo incentivo e contribuições durante esses dois anos.

Aos queridos amigos que a UENF me proporcionou Andressa, Renato, Grasiela, Geovana, Otávio, Vinicius, Larissa Jaina, Daniel, Lidiane, Larissa Resende, Fernanda Coelho, Jaqueline, Cida e Juliano, por todo incentivo e apoio.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram durante essa minha caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Retirada do tegumento, desinfestação e excisão dos embriões de *P. edulis*. (A) semente com tegumento, (B) minimorsa utilizada para retirada do tegumento, (C) semente sem tegumento, (D) desinfestação das sementes, (E) embriões sendo excisados e (F) embrião isolado. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....14
- Figura 2.** Modelo da confecção de membranas microporosas caseiras nas tampas dos frascos de cultivo *in vitro* de plantas de *P. edulis*. (A) Membranas M2 com duas camadas de fita microporosa e uma de politetrafluoretileno. (B) Vista superior da tampa com membrana caseira. (C) Vista inferior da tampa com membrana caseira. Adaptado de Saldanha et al. (2012) (A). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....15
- Figura 3.** Sequência da obtenção dos explantes para o experimento de cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado. (A) Plantas com 73 dias de idade, (B) planta sendo cortada e (C) segmentos nodais com ± 5 mm de tamanho. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....17
- Figura 4.** Escala de cores adotada durante as avaliações do experimento de cultivo mínimo *in vitro* de plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (1) verde, (2) verde-claro, (3) amarelo e (4) marrom. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....18

Figura 5. Experimento de cultivo <i>in vitro</i> de plantas de <i>P. edulis</i> (A) Tampas com membranas e (B) Tampas rígidas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	21
Figura 6. Experimento de cultivo mínimo <i>in vitro</i> de plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (A) Plantas no meio de regeneração, (B) plantas em casa de vegetação e (C) planta sendo avaliada após 30 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	24
Figura 7. Morfologia dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' durante os 180 dias de cultivo mínimo <i>in vitro</i> . Em A) 0,0 mg L ⁻¹ , B) 2,0 mg L ⁻¹ , C) 4,0 mg L ⁻¹ , D) 6,0 mg L ⁻¹ e E) 8,0 mg L ⁻¹ de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	34
Figura 8. Experimento de cultivo mínimo <i>in vitro</i> de plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (A) Plantas no meio de regeneração, (B) plantas em casa de vegetação e (C) planta sendo avaliada após 30 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	36
Figura 9. Plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> após 60 dias em meio de regeneração (A) número de folhas, (B) sobrevivência, (C) altura da planta (cm), (D) volume de raiz (cm ³) e (D) massa da matéria seca total (g). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	37
Figura 10. Plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' oriundas do cultivo mínimo <i>in vitro</i> após 30 dias na aclimatização (A) tratamento 2 (2 mg L ⁻¹), (B) tratamento 3 (4 mg L ⁻¹), (C) tratamento 4 (6 mg L ⁻¹), (D) tratamento 5 (8 mg L ⁻¹) de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do tipo de tampa (T) e concentração de nitrato de prata (N) e suas interações com as variáveis altura de planta, número de folhas, volume de raiz, massa da matéria seca total (MMST) e índice de verde (SPAD) em plantas de *P. edulis* cultivadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....20
- Tabela 2.** Altura da planta (cm), número de folhas, volume de raiz (cm³), massa da matéria seca total (g) e índice de verde (SPAD) em plantas de *P. edulis* cultivadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....21
- Tabela 3.** Altura da planta (cm), número de folhas, volume de raiz (cm³) e massa da matéria seca total (g) em plantas de *P. edulis* após 90 dias na aclimatização. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....23
- Tabela 4.** Resumo da análise de variância com os quadrados médios para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado', cultivados por 180 dias com diferentes concentrações de nitrato de prata em diferentes tempos. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....25
- Tabela 5.** Análise de desdobramento da sobrevivência, número de folhas, cor e altura de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' em função da interação entre as concentrações de nitrato de prata e o tempo após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....26

Tabela 6. Médias da porcentagem raiz de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....35

Tabela 7. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 30 dias no meio de regeneração das plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' submetidas ao cultivo mínimo, cultivadas por 180 dias com diferentes concentrações de nitrato de prata em diferentes tempos. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB - Ácido Indolbutírico

AgNO₃ - Nitrato de Prata

BAGs - Bancos Ativos de Germoplasma

CCTA - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.

C.V. (%) - Coeficiente de variação

DBC - Delineamento em Blocos Casualizados

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

FV - Fonte de variação

GA₃ - Ácido Giberélico

LFIT - Laboratório de Fitotecnia

MMST - Massa da matéria seca total

MS - Sais minerais do MS (Murashige e Skoog, 1962)

MSM - Sais minerais de Monteiro et al. (2000)

NaClO - Hipoclorito de sódio

pH - Potencial hidrogeniônico

PTFE - Polietrafluoretileno

PVC - Policloreto de vinila

SPAD - Soil Plant Analysis Development

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Origem, aspectos botânicos e econômicos.....	4
3.2. A conservação de <i>Passiflora</i>	5
3.3. Bancos ativos de germoplasma de <i>Passiflora</i>	6
3.4. Conservação <i>in vitro</i> de <i>Passiflora</i>	7
3.5. O etileno e a conservação <i>in vitro</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Experimento I: Nitrato de prata e membranas de trocas gasosas no cultivo <i>in vitro</i> do maracujazeiro-azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims).....	13
4.1.1. Material vegetal.....	13
4.1.2. Desinfestação das sementes.....	14
4.1.3. Condução do Experimento I.....	14
4.2. Experimento II: Nitrato de prata no cultivo mínimo <i>in vitro</i> do maracujazeiro-azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims) 'UENF Rio Dourado'.....	16
4.2.1. Material vegetal e obtenção dos explantes para o experimento.....	16

4.2.2. Condução do experimento II.....	17
4.2.3. Regeneração dos explantes.....	18
4.2.4. Aclimatização das plantas.....	19
4.3. Análise estatística dos dados.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1. Experimento I: Nitrato de prata e membranas de trocas gasosas no cultivo <i>in vitro</i> do maracujazeiro-azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims).....	20
5.2. Experimento II: Nitrato de prata no cultivo mínimo <i>in vitro</i> do maracujazeiro-azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims) 'UENF Rio Dourado'.....	25
6. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

SALES, Roberta Aparecida de; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2020; Nitrato de prata na conservação *in vitro* de segmentos nodais do maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado. Orientadora: Prof.^a. Virginia Silva Carvalho. Conselheiros: Prof.^a. Telma Nair Santana Pereira e Prof. Alexandre Pio Viana

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) é nativo da América do Sul, sendo a espécie de maior importância econômica do gênero *Passiflora*. A conservação *in vitro* por cultivo mínimo pode ser uma estratégia para manutenção da sua variabilidade genética, mas, como é feita dentro de recipientes fechados e por períodos maiores que outras técnicas *in vitro*, alguns gases, como o etileno, tendem a se acumular dentro dos frascos. O etileno atua em vários processos de senescência, como a abscisão foliar, reduzindo o tempo de conservação *in vitro*. O presente trabalho buscou identificar a utilização de tampas com membranas e nitrato de prata (AgNO_3) para minimizar os efeitos do etileno no cultivo *in vitro*. O primeiro experimento teve como objetivo identificar qual a concentração de AgNO_3 e o tipo de tampas utilizados no cultivo *in vitro* de *Passiflora edulis*. Foi observado, entre os tipos de tampas rígidas e com membranas, que o tratamento tampas com membranas proporcionou as maiores médias para altura de plantas no cultivo *in vitro* de *P. edulis*. Além disso, o AgNO_3 não teve efeito em combinação com as tampas com membranas. O segundo experimento teve por objetivo estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* por cultivo mínimo do maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado, utilizando o AgNO_3 , visando a aumentar

o tempo de conservação *in vitro* desta cultura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial 5x6, sendo cinco concentrações de AgNO₃ (0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) e seis tempos de avaliações (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). A cada trinta dias durante o período de 180 dias, foram feitas avaliações referentes à sobrevivência, altura da planta, número de folhas e coloração das folhas. Após 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, as plantas foram transferidas para o meio de crescimento, permanecendo por 30 dias. Em seguida, foram feitas análises biométricas e fisiológicas. Nas condições experimentais, os seguintes resultados foram obtidos: para a variável sobrevivência, os tratamentos com 0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram maiores médias, 90,8%, 97,5%, 90% e 99,1%, respectivamente; para a variável número de folhas, os tratamentos com 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram maiores médias, 2,84; 3,31; 2,99 e 3,01, respectivamente; para a variável cor, os tratamentos com 2 mg L⁻¹ e 6 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram as maiores médias (1,84 e 2,01). Já os tratamentos com 4 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram as menores médias (1,53 e 1,54). Para a variável altura do explante, os tratamentos com 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram as médias 8,56; 9,59; 8,76 e 7,93. Além disso, foi observado que os explantes mantiveram sua altura durante o cultivo mínimo *in vitro*. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, indica-se a suplementação de 4 mg L⁻¹ de AgNO₃ para cultivo mínimo *in vitro* de maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado por ter proporcionado, entre os demais tratamentos, as maiores médias de sobrevivência.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*; Etileno; Conservação de Germoplasma; Cultivo Mínimo; Manutenção da Diversidade; Passifloraceae.

ABSTRACT

SALES, Roberta Aparecida de; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2020; Silver nitrate for *in vitro* conservation of nodal segments of passion fruit UENF Rio Dourado cultivar. Advisor: Virginia Silva Carvalho. Committee members: Telma Nair Santana Pereira and Alexandre Pio Viana

The passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is native to South America and is the most economically important species of the *Passiflora* L. genus. *In vitro* conservation by minimum cultivation can be a strategy to maintain its genetic variability. However, as it is carried out in closed containers and for longer periods than other *in vitro* techniques, some gases, such as ethylene, tend to accumulate inside the flasks. Ethylene acts in several senescence processes, such as leaf abscission, reducing the *in vitro* conservation time. The present work sought to identify the use of caps with membranes and silver nitrate (AgNO_3) to minimize the effects of ethylene in *in vitro* culture. The first experiment aimed to identify the concentration of AgNO_3 and the type of caps used in the *in vitro* cultivation of *Passiflora edulis*. It was observed among the types of rigid and membrane covers, the treatment with membrane covers provided the highest averages for plant height in the *in vitro* cultivation of *P. edulis*. In addition, AgNO_3 had no effect in combination with membrane caps. The second experiment aimed to establish an *in vitro* conservation protocol for the minimum cultivation of passion fruit UENF Rio Dourado cultivar using AgNO_3 , in order to increase the *in vitro* conservation time of this culture. The experiment was conducted in a completely randomized design

(DIC) with a in 6x5 factorial scheme, with five concentrations of AgNO₃ (0, 2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹) and six evaluation times (30, 60, 90, 120, 150 and 180 days). Every thirty days during the 180 day period, evaluations were made regarding survival, plant height, number of leaves and leaf color. After 180 days of minimum *in vitro* cultivation, the plants were transferred to the growth medium, remaining for 30 days. Then biometric and physiological analyzes were performed. In the experimental conditions, the following results were obtained: for the variable 'survival', treatments with (0, 2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹) of AgNO₃ showed higher averages (90.8%; 97.5%; 90%; 99.1%), respectively, for the variable number of leaves, treatments with (2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹) of AgNO₃ presented higher averages (2.84; 3.31; 2.99; 3.01), respectively, for the color variable, treatments with 2 mg L⁻¹ and 6 mg L⁻¹ of AgNO₃ presented the highest averages (1.84 and 2.01), whereas treatments with 4 and 8 mg L⁻¹ of AgNO₃ had the lowest averages (1.53 and 1.54), for variable explant height to treatments with 2,4, 6 and 8 mg L⁻¹ of AgNO₃ had the following averages (8.56; 9.59; 8 , 76; 7.93). In addition, it was observed that the explants maintained their height during the minimum *in vitro* culture. In view of the results obtained in the present study, supplementation of 4 mg L⁻¹ of AgNO₃ is indicated for minimum *in vitro* cultivation of passion fruit-sour UENF Rio Dourado, as it provided among the other treatments the highest survival rates.

Keywords: *Passiflora edulis*; Ethylene; Germplasm Conservation; Minimum Cultivation; Maintaining Diversity; Passifloraceae.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora* spp.) faz parte da família Passifloraceae, tendo ampla diversidade de espécies, sendo *Passiflora edulis* Sims. e *Passiflora alata* Curtis. as espécies mais importantes comercialmente (Meletti et al., 2011). *Passiflora edulis* é considerada a mais importante da família, principalmente para a fabricação de sucos. O aumento na demanda de seus frutos favoreceu significativamente seu plantio no Brasil. Esse fato contribuiu para que o país se destacasse como o maior produtor mundial do fruto (Meletti et al., 2011).

O gênero *Passiflora* tem sua origem na África, contendo cerca de 530 espécies, entre essas, 153 são nativas do Brasil. Por ser o centro de origem de aproximadamente um terço das espécies, o Brasil é considerado um dos maiores centros de diversidade do gênero *Passiflora* (Cervi, 2006; Bernacci et al., 2008; Flora do Brasil, 2020).

Com toda essa diversidade de interesse ecológico e econômico, o maracujazeiro-azedo tem sua sobrevivência ameaçada, seja pela redução significativa das áreas florestais, desmatamento, urbanização e expansão agrícola, aumentando consideravelmente a preocupação com a conservação da sua biodiversidade (Bernacci et al., 2005).

Os recursos genéticos são uma reserva natural de genes, sendo importantes para manter a manutenção de alimentos, fibras e medicamentos.

Contudo, devido ao crescimento constante e desorganizado da população humana, à exploração dos ecossistemas e ao processo de evolução pelas quais as espécies passam na natureza, os recursos genéticos tendem a ser comprometidos em consequência da erosão genética (Civatti et al., 2014).

A cultura de tecidos é um conjunto dos métodos de cultivo em meio nutritivo de células, tecidos e órgãos de plantas em ambientes assépticos, sob condições controladas de intensidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, entre outros fatores. As técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas na recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, na micropropagação rápida de plantas, recuperação de híbridos interespecíficos de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica, conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, transformação genética e produção de haploides (Carvalho et al., 2011), entre outras.

Desse modo, as técnicas de cultivo *in vitro* podem auxiliar na conservação do germoplasma de *P. edulis*, além de auxiliar na utilização dessa espécie para outros propósitos, como propagação, transformação genética e produção de compostos bioativos (Faria et al., 2006; Faria et al., 2007; Soares et al., 2012).

A conservação *in vitro* pode ser feita de duas formas. A primeira é feita por meio da técnica conhecida por cultivo mínimo *in vitro* ou crescimento lento, processo pelo qual o material biológico é conservado por curto período de tempo. A segunda forma é a criopreservação, na qual o material é conservado por longos períodos de tempo em nitrogênio líquido (Engelmann, 2011; Faria, 2008).

De acordo com Biddington (1992), o cultivo *in vitro* é feito dentro de recipientes fechados, de tal maneira que gases, como, por exemplo, o etileno, que é indesejado, podem se acumular dentro dos frascos. E promove vários processos, entre os quais a abscisão foliar (Nepomuceno et al., 2007).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi reduzir os efeitos do etileno no cultivo mínimo *in vitro* de *Passiflora edulis* pela suplementação de nitrato de prata, um inibidor da ação do etileno.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar os efeitos de diferentes concentrações de nitrato de prata e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de maracujazeiro-azedo, visando ao estabelecimento de um protocolo de conservação *in vitro* do maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (*Passiflora edulis* Sims) por cultivo mínimo, utilizando o nitrato de prata, aumentando o tempo entre os subcultivos pela inibição da ação de resposta do etileno.

2.2. Específicos

Estabelecer a concentração de nitrato de prata e qual tipo de vedação (tampa rígida e tampa com membrana porosa) a ser utilizado no cultivo *in vitro* do maracujazeiro-azedo.

Estabelecer a concentração de nitrato de prata a ser utilizada no cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado'.

Prolongar o tempo de conservação *in vitro* do maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' pelo aumento do tempo entre os subcultivos.

Avaliar a resposta dos segmentos nodais oriundos do cultivo mínimo *in vitro* ao meio de crescimento.

Avaliar a viabilidade de plantas de maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado aclimatizadas, provenientes da conservação *in vitro* por cultivo mínimo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origem, aspectos botânicos e econômicos do maracujazeiro-azedo

A família Passifloraceae tem sua origem na África, seguindo posteriormente para a Europa e a Ásia, diferenciando-se com rapidez, tendo sua dispersão em regiões tropicais e subtropicais, exibindo ampla variedade morfológica, genética e adaptabilidade climática (Muschner et al., 2012; Freitas et al., 2011; Costa et al., 2016).

O maracujazeiro-azedo é um representante da família Passifloraceae, pertencente ao gênero *Passiflora* (Bernacci et al., 2015). O gênero *Passiflora* abrange aproximadamente 530 espécies, sendo muitas espécies nativas dos trópicos da América do Sul. O Brasil é considerado o centro de diversidade de *Passiflora*, tendo 153 espécies nativas e 85 endêmicas (Flora do Brasil, 2020).

O maracujazeiro-azedo é uma planta alógama, que apresenta autoincompatibilidade do tipo esporofítica (Bruckner et al., 1995). A autoincompatibilidade ocorre devido ao reconhecimento entre o pólen e as proteínas do estigma, de modo que os grãos de pólen não germinam ou produzem tubo polínico curto (Bugallo et al., 2011). O maracujazeiro-azedo apresenta grande importância econômica para o Brasil. Espécies como *P. edulis* e *P. alata* são cultivadas em razão de suas propriedades alimentícias, medicinais e ornamentais (Meletti, 2011). O fruto do maracujazeiro-azedo pode ser

consumido tanto *in natura* como na indústria de sucos, doces, geleias, entre outros produtos (Meletti et al., 2007). De acordo com Dhawan (2004), o gênero *Passiflora* apresenta importante potencial farmacológico para a produção de ansiolíticos.

Entretanto, com toda a importância econômica do maracujazeiro-azedo, ele vem apresentando queda na produtividade e na durabilidade dos pomares pela presença recorrente de doenças que provocam danos na produção e na qualidade dos frutos (Delanoë, 1991; Junqueira et al., 2006; Meletti, 2011).

O programa de melhoramento de maracujazeiro-azedo desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro elaborou um programa de seleção recorrente intrapopulacional (população UENF MA1). Três ciclos de seleção recorrente de sementes de frutos provenientes do cruzamento de polinização aberta entre as melhores progênies selecionadas deram origem à cultivar 'UENF Rio Dourado'. A cultivar apresenta rendimento de 25 toneladas ha⁻¹, valores médios de 250 para número de frutos por planta e 175 g para peso dos frutos, o que proporciona um aumento percentual de 36% na produtividade, de 25% no número de frutos e 3% no peso dos frutos (Viana et al., 2016).

3.2. A Conservação de *Passiflora*

As espécies do gênero *Passiflora* apresentam ampla variedade morfológica, tendo relação direta com sua extensa distribuição geográfica e com aspectos evolutivos que procedem da influência mútua entre seus polinizadores, dispersores de sementes, pragas e doenças (Cerqueira-Silva et al., 2016).

Entretanto, o crescimento constante, a desorganização da população humana e a exploração sem controle dos ecossistemas e de seus recursos naturais têm colaborado para o desaparecimento desses ecossistemas naturais, com isso, muitas espécies vegetais sofrem com a erosão genética, caracterizada pela perda gradativa de sua reserva de genes (Civatti et al., 2014).

Por ser considerado uma reserva natural de genes, os recursos genéticos vegetais têm potencial de utilização para produtos sustentáveis, como, por exemplo, produção de alimentos, fibras e medicamentos, importantíssimos para a humanidade. Sob esta perspectiva, é crescente a necessidade de conservação

dos recursos genéticos vegetais, incluindo as espécies do gênero *Passiflora* (Panis e Lombardi, 2005; Civatti et al., 2014).

A conservação *in situ* é feita no espaço onde a espécie ocorre de forma natural, de maneira que os processos biológicos e físicos sejam preservados como as relações ecológicas e evolutivas. Esse tipo de conservação estabelece a manutenção e o monitoramento das populações naturais. Entretanto, somente a criação de áreas de conservação não garante a sobrevivência das espécies (Heywood e Iriondo, 2003).

A conservação *ex situ* é feita em bancos de germoplasma, responsáveis por preservar uma parte significativa das populações naturais (Heywood e Iriondo, 2003). As estratégias para a conservação *ex situ* de *Passiflora* nos programas de melhoramento genético de maracujazeiro-azedo geralmente são restritas a bancos de sementes e a coleções vivas (Cerqueira-Silva et al., 2016).

De acordo com Kavani (2011), a conservação em bancos de sementes é feita pela desidratação das sementes até os níveis iniciais mais baixos de água, sendo seu armazenamento feito em baixas temperaturas, entre -20 e 10 °C.

Nas coleções vivas, as plantas são mantidas a campo, ficando assim expostas a variações ambientais, pragas e doenças. O gênero *Passiflora* apresenta dificuldades em manter coleções vivas nos bancos de sementes pela perda gradativa da viabilidade das sementes armazenadas em baixas temperaturas, havendo dificuldade de execução destas técnicas como estratégia de conservação por longos períodos (Cerqueira-Silva et al., 2016).

Sendo assim, a conservação *in vitro* pode ser utilizada como instrumento para a conservação da variabilidade genética do maracujazeiro-azedo.

3.3. Bancos ativos de germoplasma de *Passiflora*

A diminuição dos ambientes naturais em razão da interferência humana tem proporcionado erosão genética de espécies de maracujazeiro-azedo. Em vista disto, como finalidade de conservar e de prevenção à extinção de genótipos que têm interesse para programas de melhoramento genético de maracujá, faz-se necessário construir, ampliar e fazer a manutenção dos bancos de germoplasma (Ferreira, 2005; Faleiro et al., 2011).

Em geral, a conservação *ex situ* de *Passiflora* é resumida aos bancos de sementes e coleções de campo (Ferreira, 2005; Cerqueira-Silva et al., 2016). São contabilizadas cerca de 50 coleções de *Passiflora*, dispostas em 32 países, conservando, assim, em torno de 1200 acessos de maracujazeiro-azedo (Ferreira, 2005; Faleiro et al., 2011). Aproximadamente 95% destes acessos pertencem a bancos de germoplasma distribuídos apenas em nove países: Brasil (32%), Equador (30%), Peru (14%), Colômbia (8%), França (3%), EUA (2%), Costa Rica (2%), Jamaica (2%) e Quênia (2%) (Ferreira, 2005; Cerqueira - Silva et al., 2014; Cerqueira - Silva et al., 2016).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) tem três bancos ativos de germoplasma de maracujazeiro-azedo em três unidades. Destaca-se que a Embrapa Mandioca e Fruticultura, que está localizada em Cruz das Almas, mantém um dos maiores Bancos de Germoplasma de *Passiflora* (Ferreira, 1999; Lima et al., 2004), sendo conservados 478 acessos, abrangendo 52 espécies, em campo e *in vitro*. Os outros dois bancos ativos estão localizados nas unidades da Embrapa Cerrado (Bioma Cerrado) e Embrapa Semiárido (Bioma Caatinga) (Faleiro et al., 2011).

Além da Embrapa, algumas universidades, instituições federais e estaduais, distribuídas pelo País, também têm coleções de suma importância (Cerqueira-Silva et al., 2016). A conservação do germoplasma é feita em forma de sementes, plantas a campo e explantes *in vitro* (Meletti et al., 2005; Faleiro et al., 2011).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro tem um acervo de, aproximadamente, 27 espécies e 116 acessos conservados na forma de sementes e em câmaras frias (Pereira, 2020).

3.4. A Conservação *in vitro* de *Passiflora*

A conservação dos recursos genéticos de *Passiflora* se faz necessária por deter várias características de interesse para os programas de melhoramento genético, como qualidade dos frutos, maior produtividade e resistência a problemas fitossanitários. Porém, o material genético das espécies do gênero *Passiflora* corre o risco de desaparecer em algumas regiões em razão dos impactos da ação do homem sobre a natureza. Por consequência, o

desenvolvimento de estratégias de conservação para as espécies do gênero *Passiflora* é de suma importância.

A conservação *in situ* é feita no ambiente em que a espécie ocorre de maneira natural. Porém, nesse tipo de conservação, é necessário fazer a manutenção e o monitoramento das populações, não havendo garantia da sobrevivência das espécies (Heywood e Iriondo, 2003).

A conservação *ex situ* é feita em bancos de sementes, coleções vivas (Cerqueira-Silva et al., 2016) e *in vitro* (Veiga et al., 2012). Nos bancos de sementes, as sementes são desidratadas até níveis de umidade mais baixos e armazenadas em baixas temperaturas (Kavani, 2011). Nas coleções vivas, as plantas são mantidas a campo. As dificuldades em *Passiflora* de manter as coleções vivas e a perda gradativa da viabilidade das sementes armazenadas em baixas temperaturas tendem a dificultar o emprego desta técnica como forma de conservação por longos períodos (Cerqueira-Silva et al., 2016).

A conservação *in vitro* por cultivo mínimo é uma estratégia viável para manutenção da variabilidade genética do maracujazeiro-azedo. Essa estratégia tem como vantagem a utilização de um espaço reduzido para manutenção das coleções e de um ambiente controlado, livre dos ataques de pragas e doenças (Faleiro et al., 2011).

A conservação *in vitro* possibilita a manutenção dos acessos em um pequeno espaço físico, facilitando a disponibilidade para o melhoramento genético de plantas, impedindo ocasionais danos aos materiais de interesse (Faria, 2006; Faria, 2008).

Existem duas estratégias fundamentais para a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal: o cultivo mínimo *in vitro*, que conserva o material biológico por determinados períodos, e a criopreservação, que conserva o material por longos períodos de tempo (Faria, 2008).

A criopreservação é um tipo de conservação de germoplasma que consiste em colocar o material de interesse em temperaturas baixíssimas em nitrogênio líquido até -196° C (Engelmann, 2004; Kavani, 2011). Nessas condições, todos os processos metabólicos e as divisões celulares são parcialmente paralisados, fazendo com que o material vegetal possa ser armazenado por longos períodos (Engelmann, 2004).

González-Benito et al. (2009) analisaram tolerância à dessecação e ao congelamento de sementes das espécies de *P. pinnatistipula*, *P. tarminiana* e *P. mollissima*. Observaram que, após 48h de dessecação, tempo máximo estudado, as sementes *P. pinnatistipula* apresentaram 45% de germinação e as sementes de *P. mollissima*, 37% germinação, já as sementes *P. tarminiana*, 23% de germinação, a menor porcentagem observada de germinação. Para sementes que não foram desseçadas, a espécie *P. pinnatistipula* apresentou 75% de germinação após imersão em nitrogênio líquido, nas outras espécies, não foi observada germinação.

Garcia et al. (2011) desenvolveram estratégias de conservação *in vitro* para *P. suberosa*, para conservação a longo prazo, tendo sido testadas duas técnicas de criopreservação - a vitrificação e a encapsulação-vitrificação. De acordo com os autores, o conjunto da técnica de encapsulamento-vitrificação, o pré-crescimento em meio suplementado com alta concentração de sacarose e a incubação pós-criopreservação na ausência de luz proporcionaram maior recuperação em comparação com os resultados obtidos com a técnica de vitrificação.

Merhy et al. (2014), com o objetivo de conservar o germoplasma de *P. pohlii*, testaram duas técnicas de criopreservação - a vitrificação e o encapsulamento-vitrificação. Os segmentos nodais cultivados em meio $\frac{1}{2}$ MSM contendo 0,7 M de sacarose foram selecionados como o tratamento ideal para o pré-crescimento, por possibilitar a diminuição no teor de umidade. A técnica de vitrificação influenciou de forma positiva a resposta dos segmentos nodais de *P. pohlii*, tendo sido observada maior recuperação utilizando essa técnica em comparação com a técnica de encapsulamento-vitrificação.

Generoso et al. (2019), em seu trabalho visando estudar a criopreservação de sementes de *P. edulis*, cultivar 'UENF Rio Dourado', com diferentes teores de água inicial (25, 15, 10 e 5%), a germinação *ex vitro* das sementes em rolos de papel e *in vitro* por meio do isolamento de embriões maduros, observaram desidratação das sementes de *P. edulis*, cultivar 'UENF Rio Dourado', sendo que o teor inicial de água de 10% e a germinação *in vitro* de embriões isolados proporcionaram 100% de germinação.

A conservação por cultivo mínimo *in vitro* vem sendo utilizada com sucesso na conservação de 30 acessos de batata-doce, pertencentes ao banco

de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, com subcultivos a cada 180 dias (Vettorazzi et al., 2017). Para o gênero *Passiflora*, existem poucos trabalhos sobre a conservação por cultivo mínimo *in vitro*.

Faria et al. (2006) testaram o meio MS com a combinação de três concentrações de agente osmótico sorbitol (10; 20 e 40 g L⁻¹) e três concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹) na conservação de *P. giberti* e observaram que a combinação de MS com adição do agente osmótico sorbitol em 10 ou 20 mg/L favoreceu a conservação das plantas por quatro meses, sem subcultivos.

Garcia et al. (2011) desenvolveram estratégias de conservação *in vitro* para *P. suberosa*. A conservação a médio prazo foi feita pela manipulação do meio de cultura e das condições de luz. Entre os tratamentos utilizados, destaca-se a conservação por 12 meses em meio ½ MSM ou ¼ MSM de forma conjunta com a redução da intensidade luminosa (23 μmol m⁻²s⁻¹), possibilitando um aumento dos intervalos entre subcultivos.

Merhy (2014), em seu trabalho de crescimento lento da espécie *P. pohlii*, testou as concentrações do meio de cultivo MSM, ½ MSM e ¼ MSM com ou sem suplementação de ABA e duas temperaturas, 25 ±2°C e 30 ± 2°C. As plantas foram mantidas por 12 meses em crescimento lento, tendo sido possível manter o crescimento lento de *P. pohlii* por seis meses sem necessidade de recultivos. Após 12 meses de crescimento, as plantas apresentaram 50% de sobrevivência com o uso de ¼ MSM e 25% com uso de ½ MSM.

Generoso (2018), utilizando segmentos nodais visando ao cultivo mínimo de *Passiflora edulis*, testou três concentrações de sais minerais de MSM (total, ½ e ¼), três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹) e duas temperaturas. Após 180 dias, a maior porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo foi encontrada com a combinação de ¼ de sais minerais de MSM com 10 g L⁻¹ de sacarose (77,7%) e 20 g L⁻¹ de sacarose (50%). Na temperatura de 27°C, a combinação de ¼ de sais minerais de MSM com 20 g L⁻¹ de sacarose apresentou plantas com coloração verde-clara, já as demais combinações apresentaram plantas com coloração amarela, indicando início de senescência, o que sugere o acúmulo de etileno no interior dos tubos de ensaio. Deste modo, são necessárias novas investigações para aprimorar a técnica de

cultivo mínimo *in vitro* de *P. edulis* com a finalidade de aumentar o tempo de conservação *in vitro*.

Essa técnica da cultura de tecidos é feita dentro de recipientes fechados, de modo que produtos gasosos tendem a se acumular dentro dos frascos, como, por exemplo, o etileno, que, neste caso, é indesejado (Biddington, 1992). Porém o etileno exerce papel importante no desenvolvimento das plantas, atuando em vários processos, como, por exemplo, na maturação, germinação, crescimento e abscisão de folhas (Schaller e Kieber, 2002). Isso ocorre mesmo em baixas concentrações, pois o etileno é fisiologicamente ativo (Nepomuceno et al., 2007).

3.5. O etileno e a conservação *in vitro*

O cultivo *in vitro* é feito em recipientes fechados, ocorrendo acúmulo de gases no seu interior, caso do etileno. O etileno é um hormônio gasoso que auxilia e atua diretamente em vários processos do desenvolvimento das plantas (Biddington, 1992), mas seu acúmulo é prejudicial ao cultivo *in vitro* por desencadear reações de oxidação, hiperidricidade e senescência da planta (Gao et al., 2016).

A biossíntese do etileno se inicia com a conversão do aminoácido metionina em S-adenosil-L-metionina (SAM) pela enzima Met Adenosiltransferase. O SAM é convertido em 1-aminociclopropano-ácido carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS). A atividade da ACS é o passo limitante na síntese de etileno. O passo final requer oxigênio e envolve a ação da enzima ACC-oxidase (ACO), anteriormente conhecida como enzima formadora de etileno (EFE) (Wang et al., 2002).

A ligação ao etileno ocorre no domínio transmembrana N terminal, no qual um cofator de cobre se liga a receptores presentes. É necessária a presença do cobre para que essa ligação ocorra (Wurgler-Murphy e Saito, 1997).

O etileno desempenha papel importante no desenvolvimento das plantas, sendo responsável por participar de vários processos como maturação, germinação, crescimento, abscisão de folhas e pétalas, senescência e resposta da planta a estresse biótico e abiótico (Schaller e Kieber, 2002).

Contudo, quando o etileno se encontra em concentrações elevadas no cultivo *in vitro*, ele pode levar a planta à morte. A concentração acumulada é

dependente da taxa de produção de etileno nos tecidos. Embora os frascos permitam a troca de etileno com o ambiente externo, sua produção ultrapassa sua perda, ocasionando acúmulo no interior dos frascos (Schaller e Kieber, 2002).

A utilização de membranas permeáveis a gases é uma alternativa para aumentar as trocas gasosas, proporcionando redução da umidade relativa do ar, aumento da taxa de transpiração, absorção de água e nutrientes pela planta. Reduz a concentração de etileno e mantém a concentração de CO₂ adequada, favorecendo a fotossíntese (Kozai e Kubota, 2001; Xiao et al., 2011).

Outra alternativa para minimizar os efeitos do etileno é a suplementação do meio de cultura com inibidores de síntese e de ação do etileno. Os inibidores de etileno são substâncias como aminoetoxivinilglicina (AVG), 1-metilciclopropeno (1-MCP) e o nitrato de prata com capacidade de inibir ou atenuar os efeitos do etileno (Bayer, 1976; Taiz e Zeiger, 2017).

No desenvolvimento e na conservação *in vitro* de *Passiflora gibertii*, Faria et al. (2017) testaram as concentrações de 0, 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de nitrato de prata no meio de cultura. Os autores indicam a suplementação de 2 mg L⁻¹ de nitrato de prata para inibir a ação do etileno.

De acordo com Bayer (1976), o íon de prata tem uma ação eficiente na inibição do etileno, sendo utilizado na forma de nitrato ou tiosulfato. Os íons de prata na forma de AgNO₃, quando adicionados ao meio de cultura, regulam de forma eficiente a atividade do etileno na maior parte dos sistemas vegetais. Isso ocorre devido ao fato de os íons de prata competirem pelos sítios de ligação do cobre em receptores de etileno localizados na membrana plasmática (Kumar et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) e em Casa de Vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.1. Experimento I: Nitrato de prata e membranas de trocas gasosas no cultivo *in vitro* do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims)

4.1.1. Material vegetal

Como material vegetal, foram utilizadas sementes de frutos comerciais de *P. edulis*. As sementes foram postas em uma peneira, lavadas em água corrente e postas para secar, por quatro dias, em temperatura ambiente, em uma bandeja forrada com papel. Posteriormente, o tegumento das sementes de *P. edulis* foi removido com o auxílio de uma minimorsa (Figura 1).

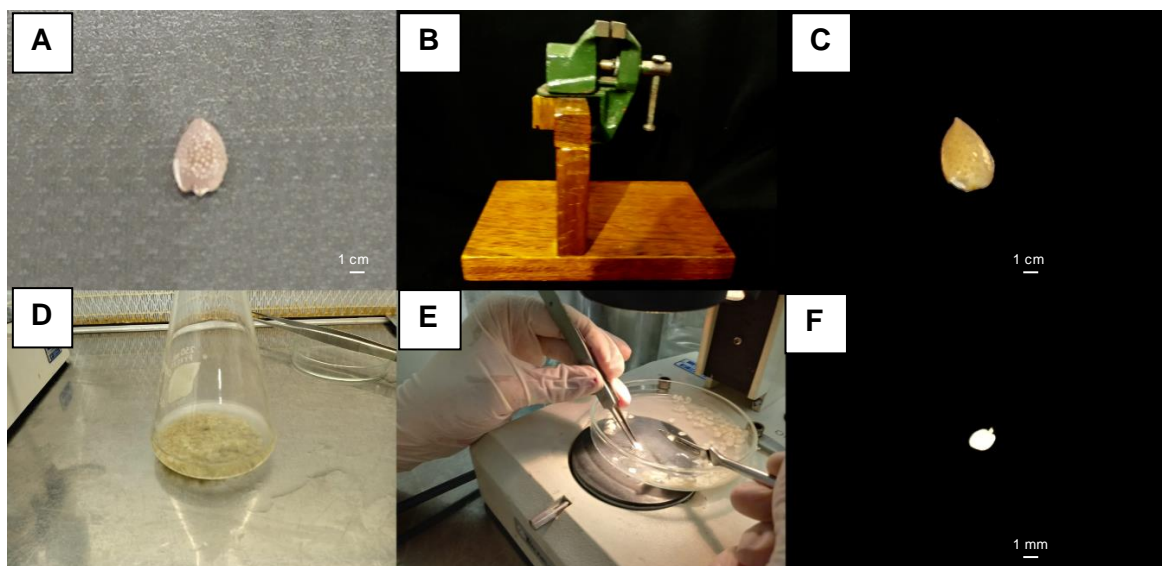


Figura 1. Retirada do tegumento, desinfestação e excisão dos embriões de *P. edulis*. (A) semente com tegumento, (B) minimorsa utilizada para retirada do tegumento, (C) semente sem tegumento, (D) desinfestação das sementes, (E) embriões sendo excisados e (F) embrião isolado. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

4.1.2. Desinfestação das sementes

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente, imersas em 100 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% com duas gotas de Tween 20[®] por 15 minutos e lavadas por três vezes em água deionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. Em seguida, os embriões foram excisados com auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio (Tecnival[®]) (Figura 1).

4.1.3. Condução do Experimento I

Os embriões foram postos para germinar em meio de cultivo constituído por ½ MSM (Monteiro et al., 2000), vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,7 e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico puro Vetec[®] e autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm.

Os frascos contendo os embriões foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, no escuro, por 15 dias, posteriormente, transferidos

para fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro, com luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia e intensidade luminosa de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 45 dias, os segmentos nodais das plântulas foram transferidos para meio constituído por sais minerais de MSM, acrescidos de vitaminas de White, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e concentrações de nitrato de prata (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; $10,0 \text{ mg L}^{-1}$). O pH foi ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L^{-1} de ágar bacteriológico Vetec®.

Foram distribuídos 50 mL de meio de cultivo em cada frasco (125 x 60 mm). Metade dos frascos foi vedada com tampa de polipropileno convencional e a outra metade, vedada com tampa de polipropileno contendo dois furos de 10 mm de diâmetro cobertos por duas camadas de fita microporosa M (Missner & Missner®) e uma de PTFE (Amanco®) de $0,05 \pm 0,01 \text{ mm}$ de espessura (Saldanha et al., 2012) e autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm (Figura 2).

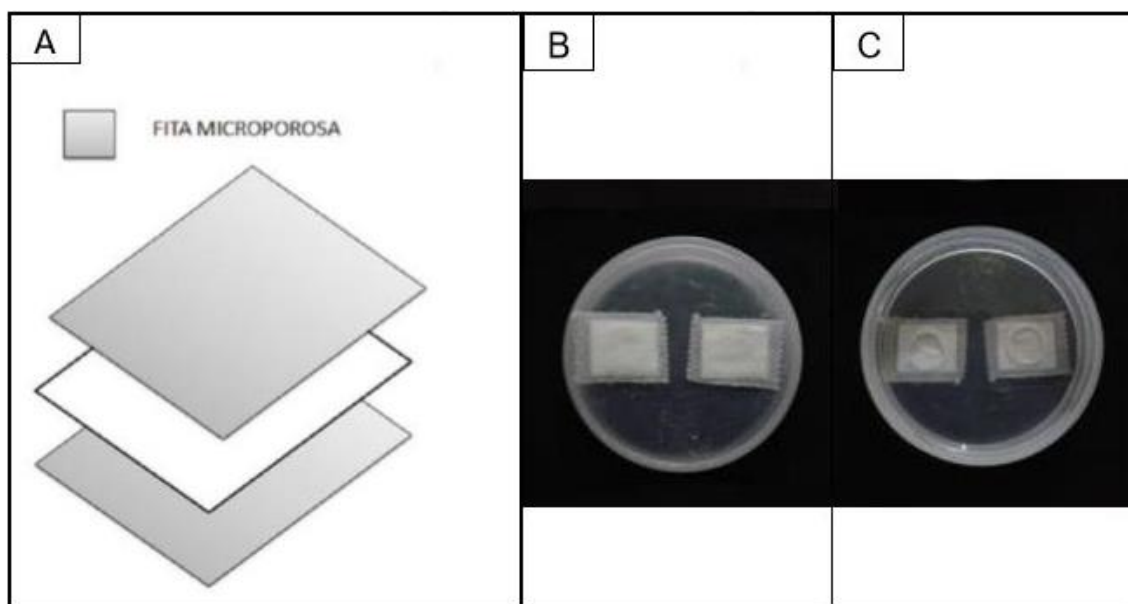


Figura 2. Modelo da confecção de membranas microporosas caseiras nas tampas dos frascos de cultivo *in vitro* de plantas de *P. edulis*. (A) Membranas M2 com duas camadas de fita microporosa e uma de politetrafluoretileno. (B) Vista superior da tampa com membrana caseira. (C) Vista inferior da tampa com membrana caseira. Adaptado de Saldanha et al. (2012) (A). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, em que foram testados cinco

concentrações de nitrato de prata (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg L⁻¹) e dois tipos de vedações (tampa convencional e tampa com membranas de trocas gasosas), composto por 6 repetições, sendo um frasco com 4 explantes por repetição.

Após 40 dias, as plantas foram avaliadas quanto à altura, número de folhas, volume de raiz, índice de verde e massa da matéria seca total. Parte das plantas foi levada para a casa de vegetação onde foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultivo das raízes. Em seguida, foram transferidas para bandejas de plástico, com capacidade de 200 mL por célula, contendo o substrato comercial Basaplant[®] Hortaliças, e irrigadas duas vezes por dia. Permaneceram aclimatizadas por 90 dias em casa de vegetação coberta com filme agrícola de 150 micra de espessura e tela de sombreamento de 35%.

4.2. Experimento II: Nitrato de prata no cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) 'UENF Rio Dourado'

4.2.1. Material vegetal e obtenção dos explantes para o experimento

Como material vegetal foram utilizadas sementes de *Passiflora edulis* Sims, cultivar 'UENF Rio Dourado', oriundas da empresa Rio Norte Sementes.

O tegumento das sementes foi removido com o auxílio de uma mini-morsa. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente imersas em 100 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% com duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. Em seguida, os embriões foram excisados com auxílio de uma pinça e de um bisturi sob microscópio estereoscópio (Tecnival[®]).

Os explantes foram inoculados em frascos (125 mm x 60 mm) contendo 40 mL de meio de cultura, contendo os sais minerais do MSM (½ força) (Monteiro et al., 2000) e as vitaminas de White (Murashige & Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,7± 0,1 antes de ser solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec[®] e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1,0 atm de pressão. Foram inoculados cinco embriões por frasco de cultivo e tampados com tampa de polipropileno..

Os frascos contendo os embriões foram incubados em sala de cultivo com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 73 dias, sendo mantidos no escuro nos primeiros 15 dias. Em seguida, foram transferidos para a luz, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro e irradiância de $54\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, promovida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia.

Para a condução do experimento de cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) 'UENF Rio Dourado', foram utilizados como explantes os segmentos nodais ($\pm 5\ \text{mm}$) de plântulas com 73 dias de idade (Figura 3).

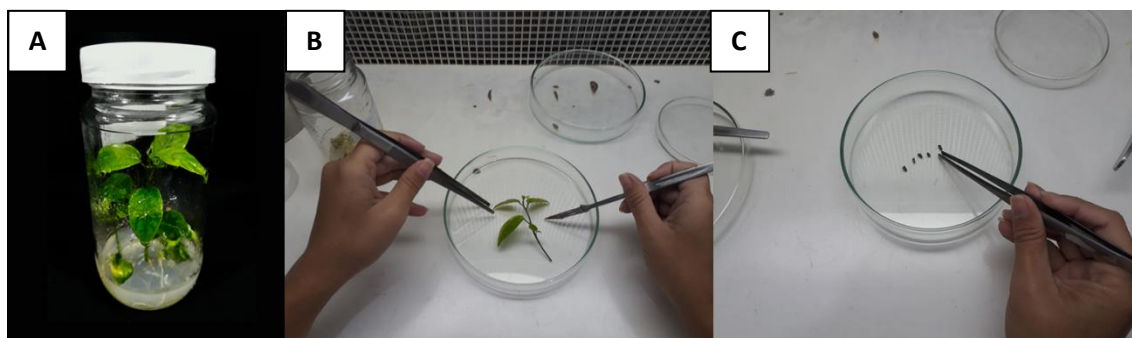


Figura 3. Sequência da obtenção dos explantes para o experimento de cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado'. (A) Plantas com 73 dias de idade, (B) planta sendo segmentada e (C) segmentos nodais com $\pm 5\ \text{mm}$ de tamanho. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

4.2.2. Condução do experimento II

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5x6, sendo cinco concentrações de nitrato de prata (0, 2, 4, 6 e $8\ \text{mg L}^{-1}$) e seis tempos de avaliações 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

O meio de cultura utilizado foi o MSM com $\frac{1}{4}$ de força, com $10\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $10\ \text{mL L}^{-1}$ de vitaminas de White e $100\ \text{mg L}^{-1}$ mio-inositol, com pH ajustado para $5,7\pm 0,1$ e $7\ \text{g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico Vetec®, autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,0 atm de pressão, conforme recomendações de Generoso (2018). O experimento foi constituído por seis repetições, sendo cada uma composta por vinte tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) com 10 mL de meio de cultura e um segmento nodal, totalizando 120 tubos por tratamento.

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, promovida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia. A cada trinta dias, durante um período de 180 dias, foram feitas avaliações referentes à sobrevivência, altura da planta, número de folhas e coloração das folhas pela escala (1) verde, (2) verde-claro, (3) amarelo e (4) marrom (Figura 4).

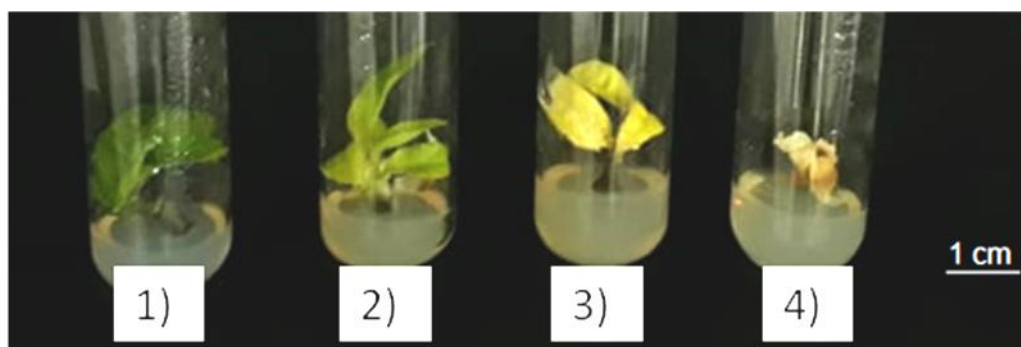


Figura 4. Escala de cores adotada durante as avaliações do experimento de cultivo mínimo *in vitro* de plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (1) verde, (2) verde-claro, (3) amarelo e (4) marrom. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

4.2.3. Crescimento dos explantes

Após 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, os segmentos nodais foram transferidos para o meio de regeneração constituído pelos sais minerais de MSM, vitaminas de White, $30\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $100\ \text{mg L}^{-1}$ de mio-inositol, e $4,92\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIB (Trevisan e Mendes, 2005), com pH ajustado para 5,7, e solidificado com $6\ \text{g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico Vetec®.

O meio de cultura foi autoclavado por 30 minutos a $121\ ^{\circ}\text{C}$ e 1,1 atm. Em câmara de fluxo laminar foi filtro-esterilizado $2,89\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 , adicionado ao meio de cultura autoclavado, agitado para fazer sua homogeneização e distribuídos 40 mL de meio por frasco de vidro (125 x 60 mm).

Foram transferidos três segmentos nodais por frasco de cultivo (125 mm x 60 mm) e mantidos no meio de regeneração por 60 dias na sala de crescimento com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro e

luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2.4. Aclimatização das plantas

As plantas sobreviventes foram levadas para casa de vegetação onde foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultivo das raízes e transferidas para bandejas de plástico, com capacidade de 200 mL por célula, contendo o substrato comercial Basaplant® Hortaliças, e irrigadas duas vezes por dia. Permaneceram aclimatizadas por 30 dias.

Após 30 dias, as mudas foram avaliadas quanto à sobrevivência, número de folhas, altura da planta, volume das raízes, massa da matéria seca da parte aérea, da raiz e total. Também foram feitas análises fisiológicas como o índice de verde (SPAD - Soil Plant Analysis Development) e o índice fotossintético (PI). A intensidade de cor verde foi avaliada pelo medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter® (Minolta, Japão), sendo feitas três leituras no segundo par de folhas fotossinteticamente ativas e, em seguida, obtida a média. A avaliação do índice fotossintético (PI) foi feita no segundo par de folhas fotossinteticamente ativas por meio do fluorímetro não modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter® (Hansatech Instruments - King's Lynn, Norfolk). Durante as medidas, foi utilizada uma pinça para a adaptação dos cloroplastos ao escuro por 20 minutos, para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” e a perda de calor fosse mínima.

4.3. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos nos experimentos I e II primeiramente foram submetidos ao teste inicial de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA), e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações foram desdobrados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I: Nitrato de prata e membranas de trocas gasosas no cultivo *in vitro* do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims)

A análise de variância do cultivo *in vitro* durante 40 dias mostra que não houve interação significativa entre o tipo de vedação e a concentração de nitrato de prata (AgNO_3) para altura da planta, número de folhas, volume de raiz, massa seca total e índice de verde (SPAD). A suplementação de nitrato de prata influenciou apenas o volume de raiz. Já para as variáveis altura da planta, número de folhas, massa seca total e índice de verde (SPAD), houve influência do tipo de vedação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do tipo de tampa (T) e concentração de nitrato de prata (N) e suas interações nas variáveis altura de planta, número de folhas, volume de raiz, massa da matéria seca total (MMST) e índice de verde (SPAD) em plantas de *P. edulis* cultivadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

FV	GL	Quadrado médio				
		Altura da planta	Número de folhas	Volume de raiz	MMST	SPAD
Tampa (T)	1	3151,26*	8,26*	0,0190 ^{ns}	51480,91*	1756,59*
Nitrato (N)	4	158,17 ^{ns}	2,17 ^{ns}	0,0071*	1555,21 ^{ns}	74,63 ^{ns}
T x N	4	108,46 ^{ns}	1,13 ^{ns}	0,010 ^{ns}	3693,02 ^{ns}	76,91 ^{ns}
Resíduo	18	8360,85	1,77	0,005	3505,7	40,62
CV (%)		28,84	16,87	50,41	40,03	19,62

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

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

Os tratamentos com as tampas com membranas de trocas gasosas apresentaram as maiores médias para altura da planta, número de folhas, massa da matéria seca total e índice de verde de plantas de *P. edulis* (Tabela 2, Figura 5).

Tabela 2. Altura da planta (cm), número de folhas, volume de raiz (cm³), massa da matéria seca total (g) e índice de verde (SPAD) em plantas de *P. edulis* cultivadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Vedação	Altura das plantas (mm)	Número de folhas	Volume radicular (cm ³)	Massa da matéria seca total (mg)	Índice de verde (SPAD)
Tampa convencional	60,9 b	7,2 b	0,124 a	67,4 b	25,0 b
Tampa com membrana de trocas gasosas	81,4 a	8,3 a	0,200 a	191,7 a	40,4 a
CV (%)	28,84	16,87	50,41	40,03	19,6

Médias na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste F ($P \leq 0,05$).

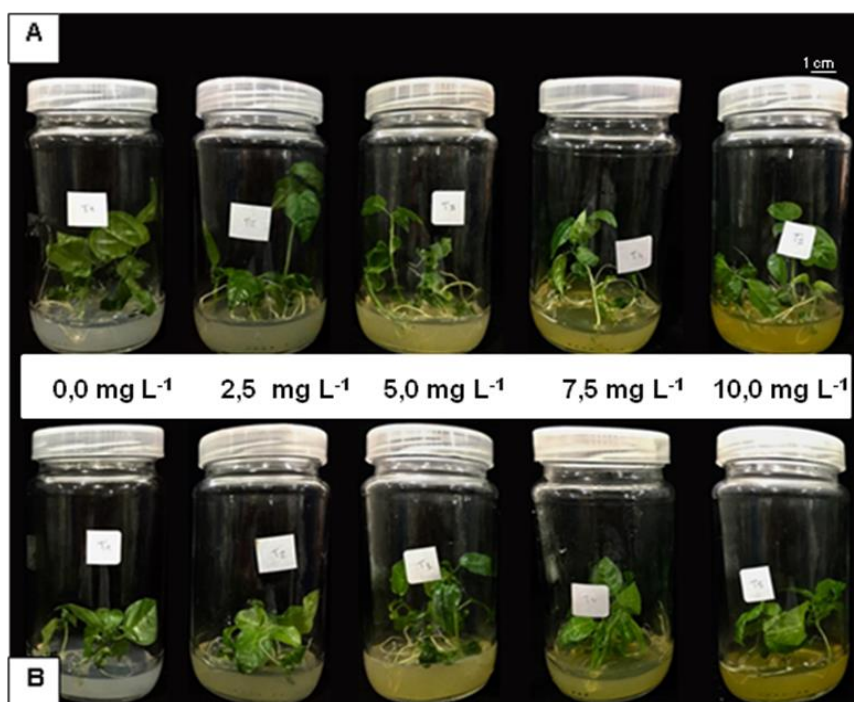


Figura 5. Experimento de cultivo *in vitro* de plantas de *P. edulis* (A) Tampas com membranas e (B) Tampas rígidas. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Observou-se que o tratamento tampas com membranas proporcionou a maior média para altura. Esse dado sugere que as tampas com membranas atuam de forma a proporcionar maior intercâmbio gasoso e, com isso, maior disponibilidade de CO₂, reduzindo, assim, a umidade dentro dos frascos, favorecendo maior crescimento das plantas. Também foi observada maior média para o índice de verde com a utilização de tampas com membranas, o que comprova a maior concentração de clorofila nas folhas.

Assim como no trabalho de Saldanha et al. (2012), a utilização de membranas, quando comparada com frascos sem membrana, possibilitou maior troca gasosa, o que gerou aumento no crescimento das plantas e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em razão da maior entrada de CO₂.

Walter (2018) destaca o uso das tampas com membranas em trabalho desenvolvido com pimenta, em que foram observadas as maiores médias para a variável altura da planta em comparação com a utilização de PVC e tampa rígida, sugerindo que as tampas com membranas proporcionaram maiores trocas gasosas nos frascos de cultivo, proporcionando crescimento das plantas.

A análise de variância após os 90 dias de aclimatização mostrou que não houve interação significativa entre o tipo de vedação e a concentração de AgNO₃ para a altura da planta, número de folhas, volume de raiz e massa seca total. A suplementação de nitrato de prata não influenciou as variáveis analisadas. Já para a variável altura da planta, houve influência do tipo de vedação (Tabela 3). As tampas com membranas apresentaram as maiores médias para altura da planta (Figura 6).

Os tratamentos com as tampas com membranas microporosas proporcionaram maior troca gasosa nos recipientes utilizados no cultivo, fazendo com que gases, como o etileno, não se acumulassem no interior desses recipientes e não causassem danos indesejáveis às plantas cultivadas *in vitro*. Levando em consideração esse benefício, poderia ser proposta a utilização das tampas com membranas microporosas no cultivo mínimo *in vitro*, visando a atenuar o efeito do etileno. Walter (2018) destaca que as plantas tiveram incremento em altura como também foi observado no presente experimento quando utilizadas as membranas microporosas. O que para o cultivo mínimo *in vitro* não seria viável, pois é uma técnica para manter por mais tempo as plantas *in vitro* com crescimento reduzido. Observamos que as plantas suplementadas

com AgNO₃ apresentaram menor média para altura, podendo ser utilizadas para o cultivo mínimo *in vitro*.

Tabela 3. Altura da planta (cm), número de folhas, volume de raiz (cm³) e massa da matéria seca total (g) em plantas de *P. edulis* após 90 dias na aclimatização. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

FV	G L	QM			
		Altura da planta	Número de folhas	Volume de raiz	MMST
Tampa (T)	1	56,412191*	0,212560 ^{ns}	615,919219 ^{ns}	0,000602 ^{ns}
Nitrato (N)	4	9,297190 ^{ns}	17,281910 ^{ns}	534,324093 ^{ns}	0,200934 ^{ns}
T x N	4	18,601989 ^{ns}	15,080193 ^{ns}	546,619563 ^{ns}	0,200934 ^{ns}
Bloco	1	17,023459 ^{ns}	0,134952 ^{ns}	560,106495 ^{ns}	0,008375 ^{ns}
Resíduo	58	6,356159	8,321360	603,563537	0,206733
CV (%)		16,12	37,91	447,86	44,61

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

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

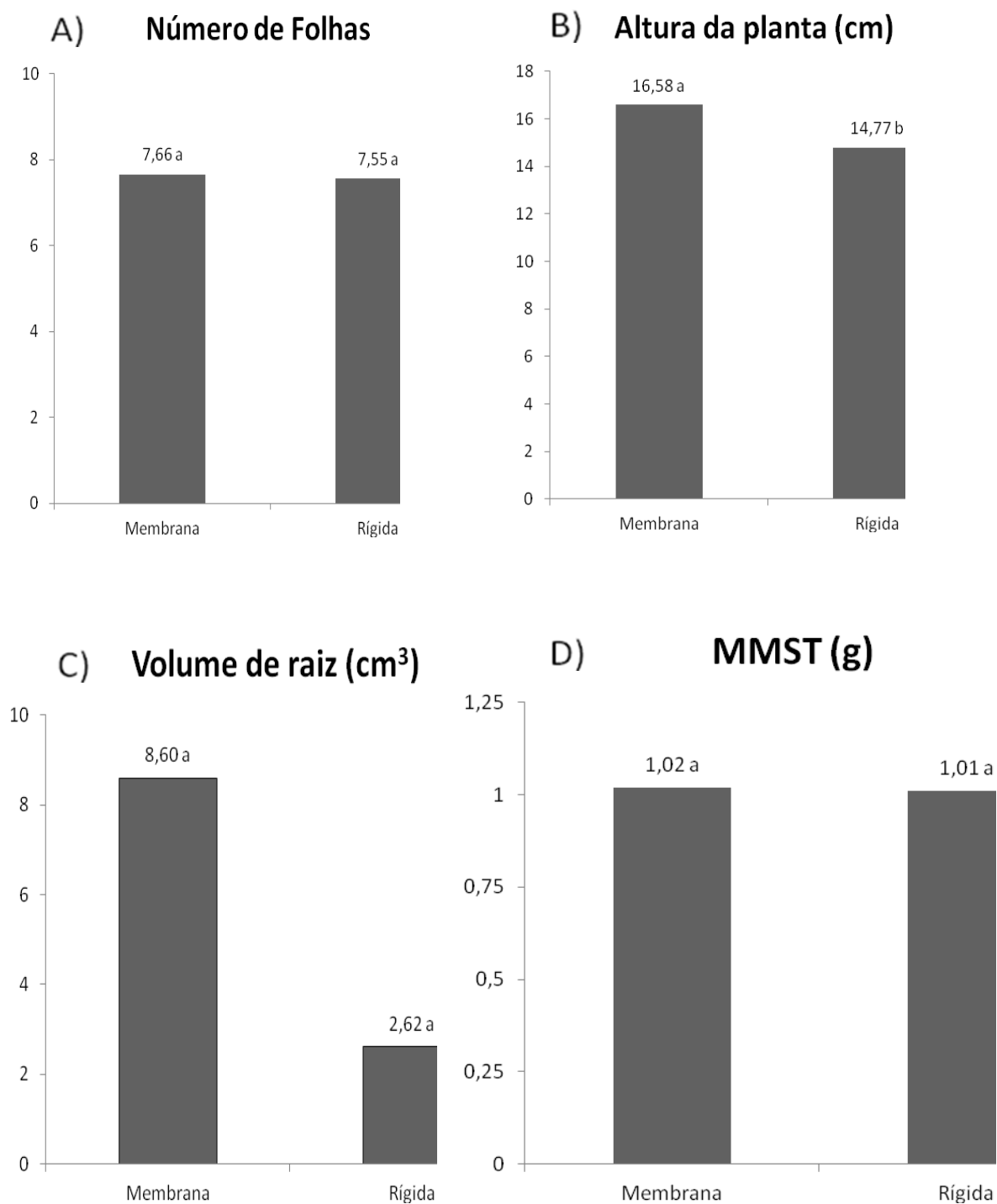


Figura 6. Experimento de cultivo *in vitro* de plantas de *P. edulis* após 90 dias na aclimatização. (A) altura da planta (cm), (B) número de folhas, (C) volume de raiz (cm³) e (D) massa da matéria seca total (MMST) (g). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

5.2. Experimento II: Nitrato de prata no cultivo mínimo *in vitro* do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) 'UENF Rio Dourado'

No experimento I, foi observado que a suplementação de AgNO_3 ao meio de cultivo resultou na menor média para altura da planta, em comparação com a utilização das tampas com membranas. Diante deste contexto, a suplementação do meio de cultivo com AgNO_3 foi investigada no experimento II como forma de inibir a ação de resposta do etileno visando à elaboração de um protocolo eficiente para conservação *in vitro* por cultivo mínimo de *Passiflora edulis*.

A análise de variância do cultivo mínimo *in vitro* durante 180 dias mostra a interação significativa entre o tempo e a concentração de AgNO_3 para a sobrevivência, número de folhas, cor e altura dos segmentos nodais. Houve diferença significativa no tempo e na concentração de AgNO_3 para as variáveis sobrevivência, número de folhas, cor e altura maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (Tabela 4). Não houve diferença para o tratamento em todas as variáveis analisadas.

Tabela 4. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para o cultivo mínimo *in vitro* de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado', cultivados por 180 dias com diferentes concentrações de AgNO_3 em diferentes tempos. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

QM						
FV	GL	Sobrevivência	Folhas	Cor	Altura	Raiz
Tempo (T)	5	2987,1022*	3,4695*	0,6414*	48,4653*	412,5453 ^{ns}
Tratamento (TR)	4	11758,5055 ^{ns}	22,0867 ^{ns}	4,5264 ^{ns}	109,8260 ^{ns}	209,1679 ^{ns}
TxTR	20	2269,7355*	0,89547*	0,8237*	21,6625*	93,6057*
Resíduo	5	27,3523	0,1001	0,0443	5,1442	105,1494
CV (%)		5,88	17,08	13,48	32,02	209,34

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

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

No desdobramento da interação entre o tempo e a concentração de nitrato de prata, observa-se que a combinação entre as concentrações de AgNO_3 e o tempo favoreceu a sobrevivência das plantas em comparação com o controle durante 180 dias de cultivo mínimo *in vitro* (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de desdobramento da sobrevivência, número de folhas, cor e altura de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' em função da interação entre as concentrações de nitrato de prata e o tempo após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Sobrevivência (%)						
Tempo (dias)	Nitrato de prata (mg L⁻¹)					Média
	0	2	4	6	8	
30	95,6 Aa	99,1 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	99,1 Aa	98,8 a
60	87,6 Bab	97,5 Aa	100,0 Aa	93,6 Abab	100,0 Aa	95,7 ab
90	81,8 Bbc	96,6 Aa	100,0 Aa	92,5 Aab	98,3 Aa	93,8 b
120	76,6 Bb	92,5 Aa	100,0 Aa	94,0 Aab	100,0 Aa	92,6 b
150	0,0 Cc	92,5 Aa	100,0 Aa	94,0 Aab	100,0 Aa	77,3 c
180	0,0 Cc	90,8 Aba	97,5 Aba	90,0 Bb	99,1 Aa	75,5 c
Média	56,9C	94,8 B	99,5 A	94,0B	99,4 A	
Folhas (n°)						
Tempo (dias)	Nitrato de prata (mg L⁻¹)					Média
	0	2	4	6	8	
30	0,67 Ba	1,57 Ac	1,48 Ac	1,72 Aa	1,48 Ad	1,38 c
60	0,97 Ba	1,89 Abc	1,81 Abc	2,07 Abc	1,88 Acd	1,72 b
90	0,62 Ba	1,82 Abc	2,22 Ab	2,16 Abc	2,15 Abc	1,79 b
120	0,47 Bab	2,18 Ab	2,23 Ab	2,36 Ab	2,46 Ab	1,94 b
150	0,00 Bb	2,18 Ab	2,23 Ab	2,36 Ab	2,36 Abc	1,82 b
180	0,00 Bb	2,84 Ba	3,31 Ba	2,99 Ba	3,01 Ba	2,43 a
Média	0,45 B	2,08 A	2,21 A	2,27 A	2,22 A	
Coloração						
Tempo (dias)	Nitrato de prata (mg L⁻¹)					Média
	0	2	4	6	8	
30	1,29 Bb	1,61 Aba	1,53 Ba	1,90 Aa	1,60 Aba	1,59 a
60	1,39 Bb	1,67 Aba	1,48 Ba	1,85 Aa	1,59 Aba	1,60 a
90	1,56 Bba	1,73 Aba	1,59 Ba	1,94 Aa	1,66 Aba	1,70 a
120	1,75 Aab	1,87 Aa	1,50 Ba	1,96 Aa	1,45 Ba	1,71 a
150	0,00 Cc	1,87 Aa	1,50 Ba	1,97 Aa	1,50 Ba	1,37 b
180	0,00 Cc	1,84 Aa	1,68 ABa	2,01 Aa	1,44 Ba	1,39 b
Média	1,00 D	1,76 B	1,553 C	1,943 A	1,542 C	
Altura (mm)						
Tempo (dias)	Nitrato de prata (mg L⁻¹)					Média
	0	2	4	6	8	
30	5,30 Aa	5,19 Aa	5,16 Ab	5,23 Ac	5,29 Aa	5,23 d
60	6,15 Aa	6,93 Aa	7,00 Ab	7,68 Ac	6,64 Aa	6,88 bcd
90	7,38 Aa	8,54 Aa	9,30 Aa	9,43 Aab	8,34 Aa	8,60 a
120	6,45 Ba	7,07 Ba	9,05 Aba	12,52 Aa	7,11 Aa	8,43 ba
150	0,00 Bb	7,05 Aa	9,05 Aa	8,77 Aabc	7,00 Aa	6,37 cd
180	0,00 Bb	8,56 Aa	9,59 Aa	8,76 Aabc	7,93 Aa	6,97 abc
Média	4,21 C	7,21 B	8,19 AB	8,73 A	7,05 B	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). No intervalo de 1 a 1,6 das médias de coloração, foi considerada a cor verde. No intervalo de 1,7 a 1,9, foi considerado verde claro.

Aos 30 dias de cultivo mínimo *in vitro*, com relação à variável sobrevivência, observou-se que todas as concentrações de AgNO_3 utilizadas e o tratamento controle não apresentaram médias com diferença estatística significativa.

Para a variável número de folhas, observa-se que aos 30 dias de cultivo mínimo *in vitro* o tratamento controle apresentou a menor média de número de folhas (0,67), quando comparado com os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 e suas respectivas médias (1,57; 1,48; 1,72; 1,48), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Com relação à variável cor, observa-se que aos 30 dias de cultivo mínimo *in vitro* os tratamentos (0, 4 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 apresentaram as menores médias para coloração (1,29; 1,53; 1,60), quando comparados com os tratamentos de 2 e 6 mg L^{-1} (1,61; 1,90), apresentando diferença estatística significativa. Os tratamentos 2 e 6 mg L^{-1} não diferiram estatisticamente da concentração de 8 mg L^{-1} (Tabela 5).

Com relação à variável altura do explante, observa-se que aos 30 dias de cultivo mínimo *in vitro* todos os tratamentos com (0, 2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 e suas respectivas médias (5,30; 5,19; 5,16; 5,23; 5,29) não apresentaram médias com diferença estatística significativa (Tabela 5).

Aos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle 0 mg L^{-1} apresentou a menor média de sobrevivência, 87,6%, quando comparado com os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 e suas respectivas médias (97,5; 100,0; 93,6 e 100,0%), apresentando diferença estatística significativa. O tratamento controle não diferiu estatisticamente da concentração de 6 mg L^{-1} de AgNO_3 , a qual tem a segunda menor média de sobrevivência. Ao mesmo tempo, a concentração 6 mg L^{-1} AgNO_3 não diferiu estatisticamente das demais concentrações utilizadas (Tabela 5).

Com relação ao número de folhas aos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle 0 mg L^{-1} apresentou a menor média, 0,97, quando comparado aos demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 e suas respectivas médias (1,89; 1,81; 2,07 e 1,88%), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Com relação à variável cor aos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*, os tratamentos (0, 4 e 8 mg L^{-1}) de AgNO_3 apresentaram as menores médias com

(1,39; 1,48 e 1,59;) quando comparados com os tratamentos 2 e 6 mg L⁻¹ (1,67 e 1,85), apresentando diferença estatística significativa. Os tratamentos com 2 e 6 mg L⁻¹ não diferiram estatisticamente da concentração de 8 mg L⁻¹ (Tabela 5).

Com relação à variável altura do explante aos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*, todos os tratamentos com 0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ e suas respectivas médias (6,15; 6,93; 7,00; 7,68 e 6,64) não apresentaram médias com diferença estatística significativa (Tabela 5).

Aos 90 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle 0 mg L⁻¹ apresentou a menor média de sobrevivência, 81,8%, quando comparado com os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) de AgNO₃ e suas respectivas médias (96,6; 100,0; 92,5 e 98,3%), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Garcia et al. (2011), após três meses de crescimento de *P. suberosa* destacam que o uso de ½ MSM, ¼ MSM e MSM suplementado com ABA proporcionou 100% de sobrevivência das plantas.

Para a variável número de folhas aos 90 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle 0 mg L⁻¹ manteve a menor média, 0,62 quando comparado com os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) de AgNO₃ e suas respectivas médias (1,82; 2,22; 2,16 e 2,15), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Para a variável cor aos 90 dias de cultivo mínimo *in vitro* os tratamentos com 0, 4 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ mantiveram as menores médias para a variável, com 1,56; 1,59 e 1,66, quando comparados com os tratamentos 2 e 6 mg L⁻¹ e suas respectivas médias (1,73; 1,94;), apresentando diferença estatística significativa. Os tratamentos com 2 e 6 mg L⁻¹ não diferiram estatisticamente da concentração de 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ (Tabela 5).

Com relação à variável altura do explante aos 90 dias de cultivo mínimo *in vitro*, todos os tratamentos com 0, 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃ e suas respectivas médias (7,38; 8,54; 9,30; 9,43 e 8,34) não apresentaram médias com diferença estatística significativa (Tabela 5).

Aos 120 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle teve a menor média de sobrevivência, 76,6%, sendo que os demais tratamentos (2 mg L⁻¹, 4 mg L⁻¹, 6 mg L⁻¹ e 8 mg L⁻¹) de AgNO₃ apresentaram as maiores médias

(92,5; 100,0; 94,0 e 100,0%), respectivamente, apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Garcia et al. (2011) destacam que, após seis meses de crescimento de *P. suberosa*, as plantas apresentaram 100% de sobrevivência com o uso de $\frac{1}{2}$ MSM e $\frac{1}{4}$ MSM; já as plantas mantidas na combinação de MSM suplementado com ABA sofreram redução de 50% na sobrevivência e apresentaram queda das folhas e raízes espessas. Esses dados diferem dos dados encontrados por Generoso (2018), pois as plantas mantidas no tratamento controle $\frac{1}{4}$ MSM, 10g L de sacarose e 0 mg L⁻¹ de AgNO₃ morreram aos cinco meses de crescimento lento.

Para a variável número de folhas aos 120 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle tem a menor média (0,47), sendo que os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) apresentaram as maiores médias (2,18; 2,23; 2,36 e 2,46), respectivamente, apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Para a variável cor aos 120 dias de cultivo mínimo *in vitro* dias, os tratamentos com 0, 2 e 6 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram as maiores médias (1,75; 1,87 e 1,96), quando comparados com os tratamentos 4 e 8 mg L⁻¹ de AgNO₃, que apresentaram as menores médias, 1,50 e 1,45, respectivamente, apresentando diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Com relação à variável altura do explante aos 120 de cultivo mínimo *in vitro* dias, os tratamentos com 0 e 2 mg L⁻¹ de AgNO₃ apresentaram as menores médias (6,45 e 7,07) para altura do explante, sendo que os demais tratamentos, 4, 6 e 8 mg L⁻¹, apresentaram as maiores médias (9,05; 12,52 e 7,11), respectivamente, apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média de sobrevivência, 0,0%, quando comparado aos tratamentos com AgNO₃. Esse resultado se deve ao fato de os explantes inoculados no tratamento controle terem morrido nesse estágio do cultivo mínimo *in vitro*, devendo ser ressaltado que o tratamento controle vem sendo utilizado para conservação dessa espécie. Já os tratamentos com AgNO₃ (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) apresentaram as maiores médias de sobrevivência (92,5; 100,0; 94,0 e 100,0%), respectivamente (Tabela 5).

Para a variável número de folhas aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média, 0,00, quando comparado aos

tratamentos com nitrato de prata. Já os tratamentos com AgNO_3 (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) apresentaram as maiores médias de número de folhas (2,18; 2,23; 2,36 e 2,36), respectivamente (Tabela 5).

Para a variável cor aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média, 0,00, quando comparado aos tratamentos com AgNO_3 . Já os tratamentos com 2 e 6 mg L^{-1} de nitrato de prata apresentaram as maiores médias com (1,87 e 1,97;), e os tratamentos com 4 e 8 mg L^{-1} apresentaram as menores médias entre os tratamentos com AgNO_3 .

Para a variável altura do explante aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média para altura do explante, 0,00, quando comparado aos tratamentos com AgNO_3 (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) e suas respectivas médias (7,05; 9,05; 8,77 e 7,00), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Aos 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle teve a menor de sobrevivência, 0,0%, sendo que os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) apresentaram as maiores médias (90,8; 97,5; 90 e 99,1%), respectivamente, apresentando diferença estatística significativa. Além disso, a concentração de 6 mg L^{-1} de AgNO_3 apresentou a menor média de sobrevivência em comparação com as demais concentrações utilizadas, diferindo estatisticamente das demais concentrações (Tabela 5).

Para a variável número de folhas aos 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle teve a menor média, 0,00, sendo que os demais tratamentos (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) apresentaram as maiores médias (2,84; 3,31; 2,99 e 3,01), respectivamente, não apresentando diferença estatística significativa, ou seja, os tratamentos não diferem entre si (Tabela 5).

Para a variável altura do explante aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média, 0,00. quando comparado aos tratamentos com AgNO_3 (2, 4, 6 e 8 mg L^{-1}) e suas respectivas médias (7,05; 9,05; 8,77 e 7,00), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

Para a variável cor aos 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle teve a menor média, 0,00, sendo que os demais tratamentos com 2 e 6 mg L^{-1} de AgNO_3 apresentaram as maiores médias (1,84 e 2,01); já os tratamentos com 4 e 8 mg L^{-1} de AgNO_3 apresentaram as menores médias (1,53 e 1,54), respectivamente (Tabela 5).

Para a variável altura do explante aos 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, o tratamento controle apresentou a menor média, 0,00, quando comparado aos tratamentos com nitrato de prata (2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹) e suas respectivas médias (8,56; 9,59; 8,76 e 7,93), apresentando diferença estatística significativa (Tabela 5).

De acordo com os dados apresentados, observa-se que, após 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, mesmo ocorrendo a morte dos explantes do tratamento controle (aos 150 dias), os explantes dos tratamentos com AgNO₃ permaneceram vivos até 180 dias, com folhas.

Trevisan et al. (2005), em seu trabalho com organogênese de *P. edulis*, destacam o uso de AgNO₃ no meio de indução e crescimento, com o intuito de minimizar os efeitos provocados pela acumulação de etileno nos frascos de cultura. Observaram que brotos adventícios mantidos em meio com AgNO₃ se apresentaram mais vigorosos do que os brotos mantidos em meio sem AgNO₃.

Aos 30 dias de cultivo mínimo *in vitro* para as variáveis sobrevivência e altura do explante, as médias do tratamento controle e dos tratamentos com AgNO₃ não apresentaram diferença estatística significativa. Para as variáveis número de folhas e cor, a suplementação com nitrato de prata apresentou as maiores médias, em comparação com o tratamento controle (Tabela 5).

A partir dos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*, as maiores médias para a variável sobrevivência foram observadas com a suplementação de nitrato de prata (Tabela 5).

Observou-se que a sobrevivência para o tratamento controle apresentou decréscimo nas suas médias a partir dos 60 dias, seguindo até a média zero de sobrevivência aos 150 dias de cultivo mínimo *in vitro* (Tabela 5). Generoso (2018), em seu trabalho com *P. edulis*, destaca que a temperatura influencia a sobrevivência das plantas no cultivo mínimo *in vitro*. Aos 180 dias na temperatura de 20°C, apresentou maior média de sobrevivência quando comparado com as plantas mantidas no cultivo mínimo na temperatura de 27°C.

Podemos observar que a suplementação ao meio de cultivo com nitrato de prata favoreceu as maiores médias de sobrevivência por 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*. Generoso (2018), com a combinação de ¼ de MSM e 10 mg L⁻¹ de sacarose na temperatura de 27°C, obteve média de 77,7% para a variável sobrevivência aos 180 dias, apresentando média menor para a variável em

comparação aos tratamentos com 2 , 4 , 6 e 8 mg L⁻¹ de nitrato de prata com suas respectivas médias 90,8%, 97,5%, 90% e 99,1%. De acordo Bayer (1976), o íon de prata compete pelo sítio de ligação do cobre, que é o cofator responsável pela ligação do etileno a seu sítio ativo, inibindo, assim, sua ação de resposta, que desencadeia a senescência das plantas, consequentemente causando sua morte.

Aos 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*, as maiores médias para a folhas foram observadas com a suplementação de AgNO₃ ao meio de cultivo. Generoso (2018), com a combinação de ¼ de MSM e 10 mg L⁻¹ de sacarose na temperatura de 27°C, obteve média de 3,3 para número de folhas aos 180 dias, sendo esta a maior média para a variável em comparação com os demais tratamentos cultivados na temperatura de 27°C. No presente trabalho, a concentração com 4 mg L⁻¹ de nitrato de prata apresentou média de 3,31 para número de folhas, sendo semelhante à média obtida por Generoso (2018).

Faria et al. (2017) destacam que a suplementação com AgNO₃ favoreceu o aumento de folhas durante 30 e 60 dias, períodos em que foram feitas as avaliações. Além disso, ressaltam que a concentração de 1 mg L⁻¹ após 90 dias não apresentou diferença estatística significativa em comparação com o controle. No presente trabalho, foi observado que todas as concentrações de nitrato de prata proporcionaram maior número de folhas durante o período de 180 dias, em comparação com o controle.

Para a variável cor, as concentrações 2, 4 e 8 mg L⁻¹ apresentaram as médias no intervalo de 1 a 1,8, o que caracteriza coloração verde pela escala utilizada. Esse resultado difere do resultado de Generoso (2018), que observou coloração amarela já nos 60 dias de cultivo mínimo *in vitro*. A senescência foliar faz parte do desenvolvimento da planta e induz a morte celular programada como mecanismo de adaptação das plantas. Durante esse estágio, ocorrem rápida degradação da clorofila e degeneração do cloroplasto. Uma das características da senescência nas plantas é a mudança gradativa na coloração das folhas, passando de verde para marrom (Gao et al., 2017). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas plantas atua em condições de estresse como molécula sinalizadora de vários processos, entre eles, a senescência (Jajic et al., 2015). Observou-se que, quando o meio de cultivo é suplementado com nitrato de prata, ocorre redução da atividade enzimática da H₂O₂ (Paladi et al., 2017). Desse modo, a suplementação

de nitrato de prata ao meio de cultivo inibe o efeito da senescência, mantendo, assim, as plantas verdes.

Aos 180 dias, para a variável altura da planta, os tratamentos com nitrato de prata não apresentaram diferença estatística significativa. Durante esse período, as plantas cultivadas no meio com suplementação de nitrato de prata não cresceram muito, mantiveram sua altura e, ao mesmo tempo, conseguiram se desenvolver.

Nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, ocorre atuação de vários hormônios, podendo ocorrer, entre eles, uma relação sinérgica ou antagônica. O antagonismo dos hormônios é caracterizado pelo desbalanço em suas concentrações, que pode ser maior ou menor na planta, levando a uma determinada resposta e ao desencadeamento de funções. Podemos citar, por exemplo, a relação entre o etileno e a auxina (Iqbal et al., 2017).

Paladi et al. (2017) destacam em seu trabalho o perfil dos genes envolvidos no mecanismo de ação de resposta do etileno e reforçam a atuação do nitrato de prata, elucidada por Bayer (1976). A inibição da resposta à ação do etileno provocada por nitrato de prata induz o aumento da concentração de citocinina na planta, fazendo, assim, uma regulação negativa do gene da via de síntese da auxina CYP83B1, induzindo baixa concentração de auxina na planta. A auxina é um hormônio que desempenha várias funções nas plantas, sendo responsável pelo alongamento dos caules das plantas, ou seja, pelo crescimento da planta e pela abscisão foliar. Esse dado é importante para o cultivo mínimo *in vitro*, pois possibilita manter as plantas *in vitro* por 180 dias sem crescer muito, favorecendo, assim, a diminuição do tempo entre os subcultivos (Figura 7).

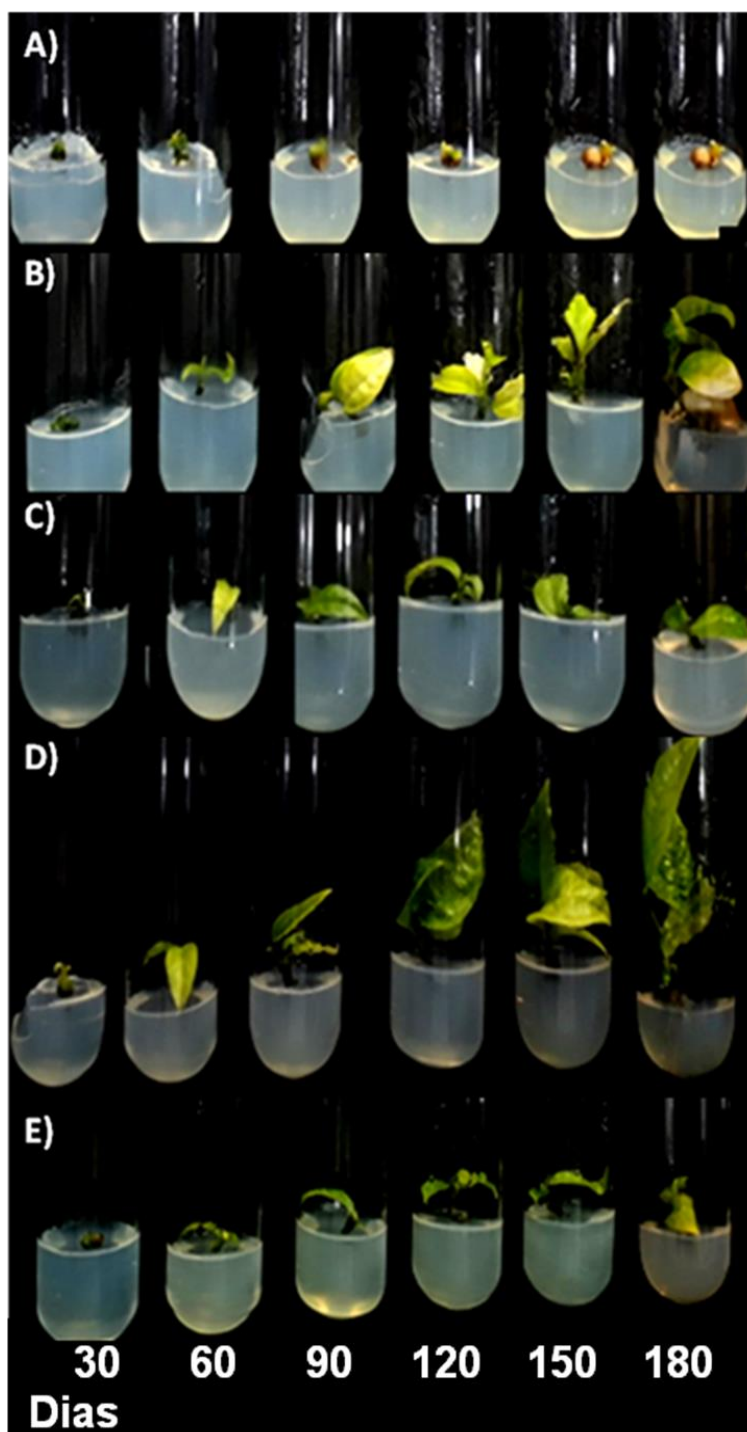


Figura 7. Morfologia dos segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' durante os 180 dias de cultivo mínimo *in vitro*. Em A) $0,0 \text{ mg L}^{-1}$, B) $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, C) $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, D) $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ e E) $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Com a relação à variável presença de raiz, ela apresentou maior média após 180 dias e foi observada pouca ou nenhuma porcentagem de raiz nas plantas (Tabela 6). Faria (2010) destaca que o maracujazeiro-azedo tem

dificuldade de enraizamento no cultivo *in vitro*, sendo necessária a adição de uma auxina ao meio de cultura.

Tabela 6. Médias da porcentagem raiz de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo UENF Rio Dourado após 180 dias em cultivo mínimo *in vitro* em diferentes concentrações de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Raiz (%)	
Tempo (dias)	Médias
30	0,354 c
60	1,030 c
90	5,231 ab
120	6,984 ab
150	5,579 ab
180	10,210 a
C.V. (%)	209,34

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

O uso do nitrato de prata no meio de cultivo pode ter contribuído para o pouco desenvolvimento das raízes, pois ele aumenta a concentração de citocinina, que regula negativamente o gene de ativação da auxina, o que induz sua baixa concentração na planta, comprometendo o desenvolvimento das raízes. Esse dado deve ser investigado posteriormente para melhor compreensão das relações existentes entre esses hormônios.

Na literatura existem poucos trabalhos com cultivo mínimo de *Passiflora* e este trabalho é segundo sobre conservação *in vitro* de *Passiflora edulis* por cultivo mínimo. É o primeiro a utilizar a suplementação de nitrato de prata no cultivo mínimo dessa espécie. Os dados deste trabalho mostram a potencialidade do uso do nitrato de prata para o cultivo mínimo, além de aumentar a taxa de sobrevivência das plantas e reduzir seu crescimento sem afetar seu desenvolvimento.

Aos 180 dias, as plantas foram transferidas para o meio de regeneração e aí permaneceram por 60 dias. Em metade das plantas, foram avaliados o número de folhas, a sobrevivência, altura, raiz e massa da matéria seca total. A outra parcela das plantas foi levada para aclimatização por 30 dias (Figura 8).



Figura 8. Experimento de cultivo mínimo *in vitro* de plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (A) Plantas no meio de regeneração, (B) plantas em casa de vegetação e (C) planta sendo avaliada após 30 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

A análise de variância das plantas oriundas do cultivo mínimo no meio de regeneração durante 30 dias mostra que não houve diferença estatística significativa entre as variáveis altura da planta, volume de raiz, número de folhas, sobrevivência e massa da matéria seca total para o maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância com os quadrados médios após 60 dias no meio de crescimento de segmentos nodais de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' submetidos ao cultivo mínimo, cultivados por 180 dias com diferentes concentrações de nitrato de prata em diferentes tempos. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

FV	GL	Sobrevivência	QM			
			Folhas	Altura	Raiz	MMST
Tratamento	3	500,00 ^{ns}	0,253 ^{ns}	14,83 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Resíduo	16	500,00	0,324	9,67	0,571	0,003
CV (%)		23,54	32,08	32,19	162,27	37,83

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

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

De acordo com Meletti et al. (2007), para a maioria das espécies de *Passiflora*, ainda não foram estabelecidos protocolos de regeneração e conservação *in vitro*, o que não tem permitido o uso extensivo desta técnica de manejo de germoplasma.

No presente trabalho, as plantas responderam de maneira semelhante ao meio de crescimento independentemente da concentração e da suplementação de nitrato de prata a que foram submetidas, já que apresentaram médias semelhantes (Figura 9).

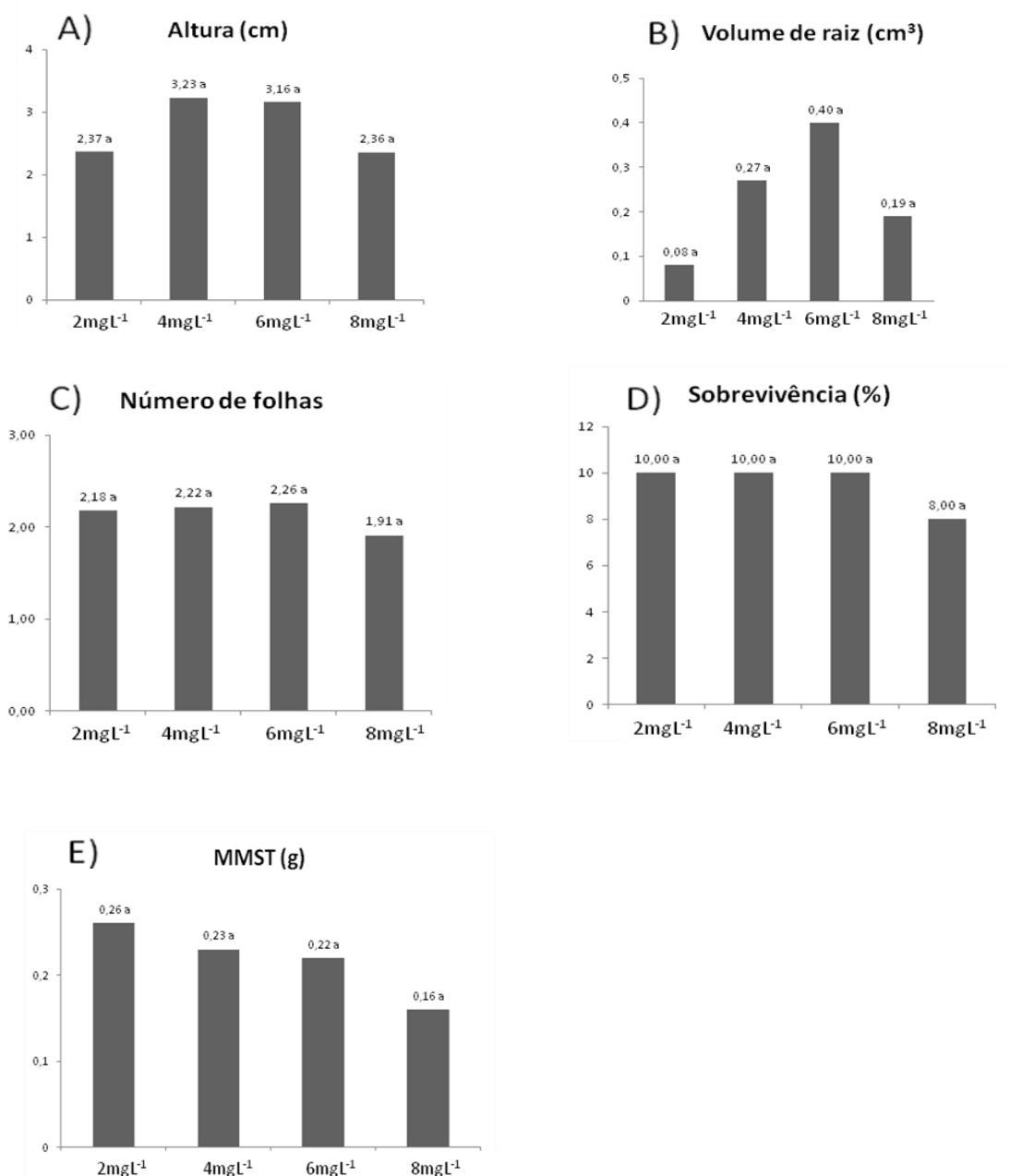


Figura 9. Plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' oriundas do cultivo mínimo *in vitro* após 60 dias em meio de crescimento (A) número de folhas, (B) sobrevivência, (C) altura da planta (cm), (D) volume de raiz (cm³) e (D) massa matéria seca total (MMST) (g). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Após 30 dias na aclimatização, as plantas apresentaram 100% de sobrevivência, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Esse dado sugere que não houve interferência da suplementação de nitrato de prata (Figura10).



Figura 10. Plantas de maracujazeiro-azedo 'UENF Rio Dourado' oriundas do cultivo mínimo *in vitro* após 30 dias na aclimatização (A) tratamento 2 (2 mg L^{-1}), (B) tratamento 3 (4 mg L^{-1}), (C) tratamento 4 (6 mg L^{-1}), (D) tratamento 5 (8 mg L^{-1}) de nitrato de prata. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, indica-se o uso de tampas com membranas porosas para o cultivo *in vitro* de *P. edulis*.

Para o cultivo mínimo *in vitro* de *Passiflora edulis*, cultivar 'UENF Rio Dourado' indica-se a concentração de 4 mg L⁻¹ AgNO₃ por ter proporcionado as maiores médias de sobrevivência. Além de favorecer a sobrevivência de plantas de *P. edulis* por 180 dias no cultivo mínimo *in vitro*, foi observado que o nitrato de prata também atua no crescimento nas plantas, fazendo com que mantenham sua altura praticamente estável durante os 180 dias.

Com relação à etapa de crescimento, pode-se indicar o meio utilizado no presente experimento, pois os explantes responderam de maneira semelhante independentemente do tratamento de nitrato de prata a que foram submetidos.

Esse dado é de suma importância para o desenvolvimento de protocolos eficientes de cultivo mínimo *in vitro* visando não somente à conservação de *P. edulis* como de outras culturas de interesse econômico e científico.

As plantas oriundas da aclimatização responderam de modo semelhante e com 100% de sobrevivência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernacci, L.C.; Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D.; Passos, I.R.S.; Junqueira, N.T.V. (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. *In: FALEIRO, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.559-586.
- Bernacci, L.C.; Soares-Scott, M.D.; Junqueira, N.T.V.; Passos, I.R.D.S.; Meletti, L.M.M. (2008). *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(2):566-576.
- Bernacci, L.C.; Cervi, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; Nunes, T.S.; IMIG, D.C.; Mezzonato, A.C. (2015) Passifloraceae *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>
- Beyer, E.M. (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*, 58(3):268-271.
- Biddington, N. L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant growth regulation*, 11(2), 173-187.
- Bleecker, A.B.; Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 1-18.

- Bruckner, C.H.; Casali, V.W.D.; Moraes, C.F.; Regazzi, A.J.; Silva, E.A.M. (1995) Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulture*, 370:45-57.
- Bugallo, V.; Cardone, S.; Julia, M.; Gabriela, P. (2011) Breeding advances in *Passiflora* spp. (Passionflower) native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 5(1):23-34.
- Carvalho, A.C.P.P.; Torres, A.C.; Braga, E.J.B.; Lemos, E.E.P.; Souza, F.V.D.; Peters, J.A.; Câmara, T.R. (2011). Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 7(1):30-60.
- Cervi, A.C. (2006) O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem*, 16:15.
- Cerqueira-Silva, C.B.M.; Faleiro, F.G.; Jesus, O.N.; Santos, E.S.L.; Souza, A.P. (2016) The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). In: Ahuja, M.R., Jain, S.M. (eds.) *Genetic diversity and erosion in plants*. New York: Springer International Publishing, p. 215-231.
- Civatti, L.M.; Marchi, M.N.G.; Torres-Silva, G.; Assis, J.G.A.; Bellintani, M.C. (2014) Cryoconservation of plant germplasm native to Brazil. *African Journal of Biotechnology*, 13:3847-3859.
- Costa, A.M.; Cardoso, E.; Silva, J.R.; Padua, J.; Faleiro, F.G.; Pereira, R.; Campos, G. (2016). Produção de mudas de maracujazeiro silvestre (*Passiflora setacea*). Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). Planaltina, Distrito Federal, 6p.
- Delanoe, E. (1991) Etude de la résistance de passiflores de Guyane française vis-à-vis de fusarium pathogènes de la culture des fruits de la passion (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fruits*, 46(5):593-600.
- Engelmann, F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospect. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40: 427-433.
- Engelmann, F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Wallingford, 47(1):5-16.

- Faleiro, F. G., Tadeu, N., Junqueira, V., Braga, M. F., Oliveira, E. J., Peixoto, J. R., Costa, A. M. (2011) *Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro: histórico e perspectivas*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 36p.
- Faria, A.M.; Costa, M.A.P.C.; Junghans, T.G.; Ledo, C.A.S.; Souza, A.S.S. (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2):267-270.
- Faria, G.A. (2008) Tamanho ótimo de parcelas experimentais para experimentos *in vitro* com maracujazeiro. Tese (Doutorado em Agronomia), Ilha Solteira-SP, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, 101p.
- Faria, G.A.; Costa, M.A.P.C.; Ledo, C.A.S.; Junghans, T.G.; Souza, A.S.; Cunha, M.A.P. (2007) Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 66:535–543.
- Faria, G.A.; Felizardo, L.M.; Ferreira, A.F.A.; Rocha, P.S.; Suzuki, A.N.; Souza, A.D.S.; Junghans, T.G.; Costa, M.A.P.C.; Peixoto, A.P.B.; Morais, A.R.; Lopes, B.G.; Oliveira, T.A. (2017). Concentrations of silver nitrate in the *in vitro* development and conservation of *Passiflora gibertii* NE Brown. *American Journal of Plant Sciences* 8 (2017): 2944-2955.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.
- Ferreira, F. (2005) Recursos Genéticos de *Passiflora*. IN: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina-DF: Embrapa, p. 41–52.
- Flora do Brasil (2020) *Passiflora* in flora do Brasil 2020 (em construção). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, In: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FB12506> em 29/01/19.
- Freitas, J.P.X.; Oliveira, E.J.; Cruz Neto, A.J.; Santos, L. R. (2011) Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(9), 1013-1020.

- Gao, H., Xia, X., An, L., Xin, X., & Liang, Y. (2017). Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture. *Plant Science*, 254, 1-11.
- Garcia RO, Pacheco G, Vianna MG et al (2011) In vitro conservation of *Passiflora suberosa* L. slow growth storage and cryopreservation. *CryoLetters* 32(5):377–882
- Generoso, A. L. (2018) Conservação e cultivo *in vitro* de embriões de maracujazeiro-azedo *Passiflora edulis* Sims DC. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 184p.
- Generoso, A. L., Carvalho, V. S., Walter, R., Campbell, G., da Silva Araújo, L., Santana, J. G. S., & da Cunha, M. (2019). Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seeds. *Scientia Horticulturae*, 256, 108638.
- Heywood, V.H.; Iriondo, J.M. (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113(3):321-335.
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in plant science*, 8, 475.
- Jajic, I.; Sarna, T.; Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, 4(3), 393-411.
- Junqueira, N.T.V.; Lage, D.A.C.; Braga, M.D.; Peixoto, J.R.; Borges, T.A.; Andrade, S.R.M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de passiflora silvestre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 97-100.
- Kavini, B. (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal Crop Science*, 5: 778–800.
- Kerbauy, G.B. (2004) *Fisiologia vegetal*. Vol. 7. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Kozai, T., Kubota, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*, 114:525–537.
- Kumar, V.; Parvatam, G.; Ravishankar, G.A. (2009). AgNO₃: um potencial regulador da atividade do etileno e modulador do crescimento vegetal. *Revista Eletrônica de Biotecnologia*, 12 (2): 8-9.
- Meletti, L.M.M.; Barbosa, W.; Veiga, R.F.A.; Pio, R. (2007) Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. *Scientia Agraria Paranaensis*, 6:13-20
Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume especial, p. 83-91.
- Merhy, T.S.M., Vianna, M.G., Garcia, R.O., Pacheco, G. and Mansur, E. (2014) Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants. *CryoLetters* 35, 204–215
Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D.; Bernacci, L.C.; Alvares, V.; Azevedo Filho, J.A. (2011) Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam. Nova alternativa de maracujá ornamental. *Ornamental Horticulture*, 17(1):87-95.
- Monteiro, A.C.B.A.; Higashi, E.N.; Gonçalves, A. N.; Rodriguez, A.P.M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36:527–531.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 437-497.
- Muschner, V.C.; Zamberlan, P.M.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35:1036-1043.
- Nepomuceno, C.; Souza Rios, A.P.; Queiroz, S.R.O.D.; Pelacani, C.R.; Ferreira De Santana, J.R. (2007). Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*, 31(5).
- Paladi, R.K.; Rai, A. N.; Penna, S. (2017). Silver nitrate modulates organogenesis in *Brassica juncea* (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression. *Scientia Horticulturae*, 226, 261-267.

- Panis, B.; Lambardi, M. (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *The Role of Biotechnology*, 5:43-54.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., de Azevedo, J. L. F., Dias, L. L. C., do 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 (PCTOC)*, 110(3), 413-422.
- Schaller G.E.; Kieber, J.J. (2002) Ethylene. *The Arabidopsis book*. vol. 1 (2002): e0071. American Society of Plant Biologists.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.
- Pereira, T. N. S. (2020). Comunicação pessoal de Telma Nair Santana Pereira, em 24 de março de 2020, realizada in loco. Email para correspondência: telmasp@uenf.br.
- Trevisan, F.; Mendes, B.M.J. (2005) Optimization of in vitro organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *Scientia Agricola*, 62: 346–350.
- Vettorazzi, R.G.; Carvalho, V.S.; Sudré, C.P.; Rodrigues, R. (2017) Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. *Acta Scientiarum Agronomy*, 39(3): 359-367.
- Viana, A.P; Silva, F.H.L.; Gonçalves, G.M.; Silva, M.G.M.; Ferreira, R.T; Pereira, T.N.S; Pereira, M.G; Amaral Jr., A.T.; Carvalho, G.F. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(3), 250-253. <https://dx.doi.org/10.1590/1984-70332016v16n3c38>
- Walter, R. (2019) Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de *Capsicum annuum*: superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides. DC. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 164p
- Wang, K.L.C.; HAI, L.; Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 2002, S131-S151 Supplement.

- Wurgler-Murphy, S.M.; Saito, H. (1997) Two component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(5):172-176.
- Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105:149- 158.