



**BEATRIZ GARBIM VERONESE**

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown A  
PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS**

**LAVRAS-MG  
2022**

**BEATRIZ GARBIM VERONESE**

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown A PARTIR DE  
SEGMENTOS NODAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Renato Paiva, PhD  
Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis  
Coorientadora

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Veronese, Beatriz Garbim.

Conservação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown a partir  
de segmentos nodais / Beatriz Garbim Veronese. - 2022.

68 p. : il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis, Diogo Pedrosa  
Corrêa da Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Maracujá silvestre. 2. Armazenamento. 3. Crescimento lento.  
I. Paiva, Renato. II. Reis, Michele Valquíria dos. III. Silva, Diogo  
Pedrosa Corrêa da. IV. Título.

**BEATRIZ GARBIM VERONESE**

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown A PARTIR DE  
SEGMENTOS NODAIS**

***In vitro* CONSERVATION OF *Passiflora gibertii* N. E. Brown FROM NODAL  
SEGMENTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2022.

Prof. Renato Paiva, PhD – UFLA

Profa. Dra. Raírys Cravo Herrera – UFPA

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva – UFPB

Prof. Renato Paiva, PhD  
Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis  
Coorientadora

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2022**

*Aos meus pais, Gislene e José Renato.*

*À minha irmã Giovana.*

*Ao meu companheiro Samuel.*

*Minhas fontes de amor diário e todo o meu mundo,*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pelos 7 anos de acolhimento e por ser minha casa;

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal da UFLA, pelo aprendizado e evolução;

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e às demais agências de fomento pelo financiamento concedido à realização deste projeto;

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, pelas oportunidades às quais serei sempre grata, principalmente a de fazer parte de um laboratório referência durante todos esses anos;

Aos meus coorientadores, Michele Valquíria dos Reis e Diogo Pedrosa Corrêa da Silva, pelo incentivo de sempre e, acima de tudo, por investirem no meu crescimento, pelo carinho e amizade que sempre guardarei por onde eu for;

Aos meus colegas do LCTP, em especial à Bruna, Caroline e Afonso, pela nossa rotina que amenizava os dias estressantes e por dividirem tantas conquistas e dificuldades;

Aos meus pais, Gislene e José Renato, pela força diária e pelos vários privilégios que tenho. À minha irmã Giovana, pela torcida e presença constante, por me lembrar que sou capaz;

Ao meu companheiro Samuel, por encarar qualquer coisa ao meu lado e não ter deixado de acreditar em mim (nem por um segundo);

Aos amigos, em especial à Beatriz, minha melhor, por todo apoio e por crescer comigo;

Aos dias difíceis, por me ensinarem sobre resiliência e aos dias felizes, por me lembrarem do que realmente importa.

Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Hoje sei o que vem depois do sonho.”*

(Cícero)

## RESUMO

A fragmentação e perda de habitats provenientes das atividades humanas têm ameaçado cada vez mais espécies, principalmente as silvestres como *Passiflora gibertii*, um maracujazeiro nativo do Cerrado que possui potenciais alimentício, ornamental e terapêutico. Nesse contexto, torna-se importante o uso das ferramentas de conservação para esses indivíduos, como as alternativas *in vitro*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para a espécie *P. gibertii*, a partir do uso de segmentos nodais, por meio da técnica de armazenamento via crescimento lento. Para a indução do crescimento lento, foram utilizados segmentos nodais de 0,5 cm de comprimento, previamente isolados de brotações micropropagadas com 2 mg L<sup>-1</sup> de 6 – benzilaminopurina (BAP) e posteriormente inoculados em meio de cultivo variando nas concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 ou 60 g L<sup>-1</sup>) e nos tipos de luminosidade durante o armazenamento (normal, com densidade de fótons de 50,71 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ou reduzida, com densidade de fótons de 16,66 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Ao longo de 180 dias, as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, número e comprimento de brotos, número e comprimento de raízes, número de folhas e índice de senescência. Após 90 e 180 dias de crescimento, os ápices caulinares foram retirados e transferidos, para verificar a capacidade de retomada do crescimento. Ao final dos 180 dias, os brotos enraizados foram submetidos à aclimatização por 60 dias, para avaliação do peso fresco, comprimento de brotos, raízes e número de folhas. Recomenda-se o cultivo de segmentos nodais em 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose e armazenamento em luminosidade normal, para obter melhores parâmetros de crescimento nas três etapas, simultaneamente. Com a finalização deste trabalho, foi possível estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para *P. gibertii*, a partir do uso de segmentos nodais, por meio da técnica de armazenamento via crescimento lento, que permitiu a retomada do crescimento dos ápices caulinares e aclimatização das plantas resultantes, após um ciclo de 240 dias.

**Palavras-chave:** Maracujá silvestre. Armazenamento. Crescimento lento. Conservação à médio prazo. Potencial osmótico.

## ABSTRACT

Fragmentation and loss of habitats resulting from human activities have increasingly threatened species, especially wild ones such as *Passiflora gibertii*, a passionfruit plant native to Cerrado that has food, ornamental and therapeutic potential. In this context, the use of conservation tools for these individuals, such as *in vitro* alternatives, becomes important. Thus, the objective of this work was to establish an *in vitro* conservation protocol for the species *P. gibertii*, using nodal segments, through the technique of storage via slow growth. For the induction of slow growth, 0,5 cm long nodal segments were used, previously isolated from micropropagated shoots with 2 mg L<sup>-1</sup> of 6 – benzylaminopurine (BAP) and subsequently inoculated in a culture medium varying in sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 or 60 g L<sup>-1</sup>) and types of luminosity during storage (normal, with a photon density of 50,71  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , or reduced, with a photon density of 16,66  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Over 180 days, seedlings were evaluated for survival, number and length of shoots, number and length of roots, number of leaves and senescence index. After 90 and 180 days of growth, the shoot tips were removed and transferred to verify the ability to resume growth. At the end of 180 days, the rooted shoots were submitted to acclimatization for 60 days, to evaluate fresh weight, shoot length, roots and number of leaves. It is recommended the cultivation of nodal segments in 45 g L<sup>-1</sup> of sucrose and storage in normal light, to obtain better growth parameters in the three stages, simultaneously. With the completion of this work, it was possible to establish an *in vitro* conservation protocol for *P. gibertii*, from the use of nodal segments, through the technique of storage via slow growth, which allowed the resumption of shoot apices growth and acclimatization of the resulting seedlings, after a 240-day cycle.

**Keywords:** Wild passion fruit. Storage. Slow growth. Medium-term conservation. Osmotic potential.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
2.1	<i>Passiflora</i> spp. (Passifloraceae Juss. ex Roussel).....	11
2.1.1	Conservação <i>ex situ</i> .....	14
2.1.2	Conservação <i>in vitro</i> .....	17
2.1.3	Crescimento lento .....	19
3	OBJETIVOS .....	21
3.1	Objetivo geral .....	21
3.2	Objetivos específicos .....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1	Local de realização dos experimentos .....	22
4.2	Obtenção do material vegetal .....	22
4.3	Desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais.....	22
4.4	Crescimento lento .....	23
4.4.1	Indução e armazenamento .....	23
4.4.2	Retomada do crescimento.....	24
4.4.3	Aclimatização .....	24
4.5	Análises estatísticas .....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1	Desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais.....	25
5.2	Crescimento lento .....	29
5.2.1	Indução e armazenamento .....	29
5.2.2	Retomada do crescimento.....	43
5.2.3	Aclimatização .....	49
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui cerca de 500 espécies, dentre as quais 157 ocorrem no Brasil e 87 são endêmicas, contribuindo para que o país possua a maior diversidade genética desses indivíduos, conhecidos como “maracujás”. As espécies estão distribuídas em quase todos os estados e em maior abundância na Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado (ULMER & MACDOUGAL, 2004; BERNACCI et al., 2020).

Seu valor econômico é proveniente de aspectos nutricionais, ornamentais e medicinais, sendo *P. edulis* o mais comercializado, representando mais de 95% da produção. Além das comercializadas, o interesse pelas espécies silvestres tem aumentado cada vez mais, já que muitas apresentam características vantajosas de produção e diversos potenciais econômicos. Um exemplo é a *P. gibertii*, ou “maracujá do campo”, planta nativa do Cerrado brasileiro (FALEIRO et al., 2019; SOARES et al., 2021).

Aumentar o conhecimento sobre as espécies silvestres também contribui para a sua preservação, principalmente em um contexto de fragmentação e perda de habitats nos biomas mais biodiversos (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016). No caso do gênero *Passiflora*, o desmatamento crescente para fins agrícolas e expansão urbana é uma das principais causas da erosão genética, tornando-se importante o uso das ferramentas de conservação para esses indivíduos (PACHECO et al., 2016; FALEIRO et al., 2019).

A conservação de recursos genéticos é dividida nos modelos *in situ*, quando a população é mantida no seu ecossistema natural, e *ex situ*, quando a conservação é fora do ambiente natural, incluindo os bancos de sementes, coleções de campo e armazenamento *in vitro* (O'DONNELL & SHARROCK, 2017; LIU et al., 2018). Dentro do gênero *Passiflora*, a conservação de algumas espécies é feita pelas coleções de campo e bancos de sementes, apesar das dificuldades de armazenamento (VEIGA-BARBOSA et al., 2013; PACHECO et al., 2016). Sendo assim, as metodologias *in vitro* representam uma importante alternativa a ser utilizada.

Suas vantagens incluem a produção e armazenamento de explantes com alta taxa de multiplicação, de forma asséptica e em espaço reduzido, que pode ser feita por vários períodos de tempo, via alterações nas condições de cultura (PACHECO et al., 2016; SILVA et al., 2019). A produção de sementes sintéticas e o crescimento lento são formas de armazenamento a curto e médio prazo, respectivamente. Já a conservação a longo prazo é obtida pela criopreservação em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011; DA SILVA et al., 2019).

Em *Passiflora* spp., a conservação é feita majoritariamente por meio da criopreservação, utilizando sementes e embriões (MERHY et al., 2014; PACHECO et al., 2016; PRUDENTE et al., 2019). Outras técnicas como a de crescimento lento e produção de sementes sintéticas são menos relatadas para o gênero (DA SILVA et al., 2015; PACHECO et al., 2016). Em *P. gibertii*, há apenas um trabalho de criopreservação de sementes e um de armazenamento por crescimento lento (FARIA et al., 2006; VEIGA-BARBOSA et al., 2013).

Além da redução da taxa metabólica, a técnica do crescimento lento resulta no prolongamento do tempo entre subcultivos e tem como objetivo manter a capacidade de retomada de crescimento das plantas na pós-conservação (KAMIŃSKA et al., 2018; CHAUHAN; SINGH; QURAIISHI, 2019). Como é um método capaz de ser otimizado por meio de vários fatores e/ou condições de cultivo, representa inúmeras possibilidades para se avançar nos estudos de conservação *in vitro*, tendo em vista os poucos trabalhos relatados para o gênero e sendo ainda mais escassos para *P. gibertii*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Passiflora* spp. (Passifloraceae Juss. ex Roussel)

A família botânica Passifloraceae pertence ao Filo Magnoliophyta, à Classe Magnoliopsida e à Ordem Malpighiales. Nela estão incluídas cerca de 700 espécies, distribuídas principalmente nos climas tropicais e subtropicais. Sua ocorrência é maior nas Américas Central e do Sul, sendo 30% da riqueza de espécies pertencente à Colômbia e Brasil, com menor abundância na África, Ásia e Austrália. A família se subdivide em duas tribos e dezessete gêneros, sendo quatro deles de ocorrência nacional: *Ancistrothyrsus* spp., *Dilkea* spp., *Mitostemma* spp. e *Passiflora* spp., este último de maior abundância e importância dentro da família (ULMER & MACDOUGAL, 2004; CERQUEIRA-SILVA et al., 2016).

O gênero *Passiflora* spp. inclui trepadeiras herbáceas ou lenhosas, árvores e arbustos; com ou sem estípulas, do tipo lineares ou foliáceas; presença de gavinhas axilares (podem estar ausentes nas espécies arbóreas); folhas inteiras ou lobadas, com ou sem glândulas nectaríferas nos pecíolos; as flores são actinomorfas, pentâmeras, com um a vários filamentos na corona e androginóforo típico; os frutos são indeiscentes do tipo baga (raramente deiscente tipo cápsula), contendo polpa mucilagínosa e sementes envolvidas por um arilo também mucilagínoso (PAIVA et al. 2014; BERNACCI et al., 2020).

Apesar de possuir aspectos morfológicos típicos, existe uma ampla plasticidade fenotípica entre seus indivíduos, como a forma e tamanho das folhas e coloração das flores, resultando em uma alta variabilidade intraespecífica (BORGES et al., 2020). As espécies de *Passiflora* spp. se adaptam bem aos diversos tipos de solos brasileiros, desde que possuam umidade adequada, além de dependerem principalmente de luz solar em abundância, chuvas bem distribuídas e ventos moderados, características dos trópicos que habitam. A temperatura média ideal para o desenvolvimento das plantas possui amplitude elevada, variando entre 15 a 25 °C (FISCHER & MIRANDA 2021).

*Passiflora* spp. é o maior gênero de trepadeiras e lianas da região Neotropical, compreendendo mais de 530 espécies, dentre as quais 166 ocorrem no Brasil e 90 são endêmicas. Assim, o território brasileiro é o maior centro de diversidade genética do gênero, cujos indivíduos são conhecidos popularmente como “maracujás”, nome de origem Tupi, que significa “alimento em formato de cuia”. Seus indivíduos estão distribuídos em todas as regiões biogeográficas, sendo a Mata Atlântica, Amazônia e o Cerrado os biomas com maior abundância de maracujazeiros. Só no estado de Minas Gerais, existem cerca de 52 espécies distribuídas (ULMER & MACDOUGAL, 2004; IMIG; MILWARD-DE-AZEVEDO; CERVI, 2018; BERNACCI et al., 2020).

A cultura do maracujá começou a ganhar importância econômica entre as décadas de 1960 e 1970 no país, que é hoje seu maior produtor e consumidor mundial (MADALENA; COSTA; LIMA, 2013; BERNACCI et al., 2020). As plantações se encontram em quase todos os estados brasileiros, destacando Bahia e Ceará como seus principais produtores, com 168.457 e 145.102 toneladas produzidas em 2019, respectivamente, seguido de Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2019).

E apesar de toda a riqueza existente no país, sua biodiversidade ainda é muito pouco conhecida. A espécie *P. edulis* representa mais de 95% da produção, de grande relevância para a economia brasileira, devido à colheita contínua da safra ao longo do ano todo. É mais reconhecido pela população nas suas variedades de “maracujá-amarelo” ou “azedo” (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener), principalmente, e também de “maracujá-roxo” (*P. edulis* f. *edulis* Sims) (FALEIRO et al., 2019).

A segunda espécie mais cultivada é a *P. alata* Curtis, ou “maracujá doce”, que possui menor comercialização devido à sua popularidade mais restrita (BERNACCI et al., 2003; MUNHOZ et al., 2018). Também a espécie *P. incarnata* Linnaeus, ou “maracujá-vermelho”, ainda mais rara de ser comercializada e que, embora não seja nativa nem possua frutos comestíveis, é bastante utilizada pela indústria farmacêutica (LEE et al., 2020). Por fim, a

espécie *P. cincinnata* Mast., ou “maracujá-do-mato”, que tem se popularizado no mercado, especificamente na região semiárida, seu local de ocorrência natural (CARMO et al., 2017).

O valor comercial das espécies está associado principalmente aos aspectos nutricionais dos seus frutos, ornamentais de suas flores e medicinais de suas folhas, sementes e raízes. Os frutos do maracujá-amarelo possuem polpa rica em nutrientes e vitaminas, sendo consumidos *in natura* ou processados de forma integral, incluindo sementes, casca e albedo (SOZO et al., 2016; DE MOURA et al., 2021). Já as suas folhas são utilizadas para fins farmacológicos, pois apresentam princípios ativos com diversas propriedades benéficas, com destaque para as ações sedativas, ansiolíticas e anti-inflamatórias (LEAL, 2016; RAVI et al., 2021).

Além disso, as espécies silvestres têm apresentado cada vez mais potencialidades de interesse, além de possuírem características vantajosas de produção (FALEIRO et al., 2018). Dentre estas, destaca-se *P. gibertii* N. E. Brown, ou “maracujá-do-campo”, nativa do Cerrado, muito produtiva e de fácil adaptação, com potenciais alimentício, ornamental e terapêutico (ARTIOLI-COELHO et al., 2015), ainda pouco explorados (FIGURA 1).

Figura 1 – Flor e fruto de *P. gibertii* N. E. Brown.



Fonte: Da autora (2022). Barra = 1 cm.

O interesse pela produção de frutos de espécies silvestres tem aumentado significativamente devido às potencialidades nutricionais, sensoriais e terapêuticas cada vez mais evidenciadas nos estudos. Também a maior longevidade, adaptação a condições climáticas adversas e período de florescimento são características vantajosas que estas espécies apresentam, de grande importância para a produção. Atrelado a isso, são fonte de genes resistentes aos principais patógenos da cultura, com várias aplicações para os programas de melhoramento genético. Sendo assim, a grande variabilidade existente no país fornece recursos suficientes para o desenvolvimento de novas alternativas de produção e uso dos maracujás silvestres (CARVALHO et al., 2013; FALEIRO et al., 2019; SOARES et al., 2021).

Além disso, aumentar o conhecimento sobre espécies silvestres é uma das formas de contribuir com a sua preservação. Diversas espécies de maracujás encontram-se ameaçadas devido às diversas pressões antrópicas como fragmentação, perda de habitats e desmatamento extremo, principalmente as espécies silvestres, que ocorrem nos biomas mais impactados. Como consequência, a crescente expansão agrícola e urbana pode levar à erosão genética dessas espécies e seus polinizadores, causando sua extinção (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016; FALEIRO et al., 2019).

Desse modo, é de grande importância o uso das ferramentas de conservação para esses indivíduos. A conservação da diversidade garante tanto a fonte de genes e produtos naturais a serem estudados como também é necessária devido ao seu valor ecológico, pois se trata de plantas nativas pertencentes às regiões mais biodiversas do país. Alguns recursos genéticos de *Passiflora* spp. já são conservados em bancos de germoplasma, por meio de estratégias de conservação *ex situ* (ENGELMANN, 2011; PACHECO et al., 2016; FALEIRO et al., 2019).

### **2.1.1 Conservação *ex situ***

As mudanças climáticas e a perda de biodiversidade são os dois maiores desafios ambientais dos tempos atuais (WATSON & VENTER, 2017). A biodiversidade mundial, por exemplo, está decrescendo a uma taxa sem precedentes. De 2019 para 2020, cerca de 3.668 espécies vegetais foram adicionadas à *The Red List of Threatened Species*, refletindo um aumento de 191% e 263% nas categorias “ameaçada” e “criticamente ameaçada” de extinção, respectivamente (IUCN, 2021). Adicionalmente, pela portaria nº 443 do Ministério do Meio Ambiente, cerca de 2.113 espécies, estão incluídas na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção” (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014). Tendo em vista a gravidade desse cenário, estabelecer prioridades para conservar espécies é um desafio tanto científico quanto prático (SOUZA & BERNARD, 2019).

Assim, cada vez mais estratégias de conservação de germoplasma têm sido desenvolvidas nesse contexto. A conservação de recursos genéticos tem como objetivo primordial manter uma ampla diversidade de espécies, sejam de valor econômico, cultural, conhecido ou potencial, incluindo espécies cultivadas, silvestres, medicinais e ornamentais. Os métodos para a conservação de germoplasma dividem-se em *in situ*, quando uma população é mantida em seu ecossistema de desenvolvimento natural, e *ex situ*, quando a conservação é realizada fora do ambiente natural (ENGELMANN, 2011). Apesar de possuírem características

próprias, a combinação dos modelos *in situ* e *ex situ* tem sido determinada como a chave para a conservação de espécies (NADARAJAN et al., 2018).

A conservação *in situ* mantém as espécies dentro do seu ambiente natural, favorecendo a regeneração individual por sementes. Sua principal vantagem é permitir a continuidade dos processos evolutivos diante das pressões seletivas, tanto de ocorrência natural quanto induzidas, pois garante que os materiais conservados (populações em equilíbrio com o ecossistema) permaneçam parte do ambiente natural em constante alteração. Diferente das coleções *ex situ* que, apesar do seu valor, possuem a limitação de refletirem apenas a estrutura e variação genética das populações em um dado momento, não representando toda a realidade (BELLON et al., 2017; GALLO-CAJIAO et al., 2018; ENGELS & EBERT, 2021).

A conservação *in situ* tem sido há tempos foco da conservação pelo mundo. Entretanto, o requerimento de espaço amplo, alto custo e riscos bióticos e abióticos levaram à busca por outras estratégias (VOLIS, 2017; CHAUHAN; SINGH; QURAIISHI, 2019). Além disso, com o aumento das práticas agrícolas, cresceu também a preocupação referente à eliminação da biodiversidade no campo, expandindo a criação dos bancos *ex situ* (FAO, 2014). Suas coleções fornecem germoplasma para reintrodução aos habitats originais ou ambientes restaurados, possibilitando a conservação de espécies já extintas na natureza e assegurando a proteção das plantas contra erosão genética e ameaças naturais e antrópicas, como poluição, guerras, conflitos políticos e queimadas (O'DONNELL & SHARROCK, 2017).

Na conservação *ex situ*, as áreas onde as populações serão mantidas são previamente identificadas e protegidas, por meio de medidas de gestão cuidadosamente projetadas (VOLIS, 2017; BIDADAK et al., 2021). Suas vantagens incluem: a capacidade de estocar vários acessos em uma coleção; a reprodutibilidade e padronização de procedimentos para grandes culturas; a manutenção de genótipos específicos ao longo do tempo; o acesso rápido ao germoplasma para caracterização, pesquisa e intercâmbio; maior segurança e condições sanitárias do material conservado, reduzindo o risco de doenças (FAO, 2014; ENGELS & EBERT, 2021).

O modelo *ex situ* inclui os bancos de sementes, bancos gênicos, coleções de campo, jardins botânicos e armazenamento *in vitro* (O'DONNELL & SHARROCK, 2017; LIU et al., 2018). A maioria das plantas é encontrada nas coleções dos jardins botânicos, mantidas por instituições agronômicas e florestais do país. As maiores coleções pertencem aos cereais como milho e trigo, sendo apenas 10% das coleções globais representado pelas frutíferas. Nesse grupo, a conservação é feita majoritariamente no campo (93%), sendo 7% voltada aos bancos de sementes e conservação *in vitro* (FERREIRA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2018).

A fragmentação e perda de habitats provenientes das atividades humanas têm ameaçado cada vez mais espécies. E, apesar dos avanços recentes, a conservação *ex situ* de espécies ameaçadas ainda é uma questão negligenciada no Brasil. Recentemente, um estudo de levantamento verificou que 452 espécies ameaçadas de extinção são conservadas pelo modelo *ex situ*, correspondendo a cerca de 21% da *Brazilian Red List*, sendo 440 delas mantidas em casas de vegetação, 52 em bancos de sementes, 18 em bancos no campo e 8 são conservadas *in vitro* (SILVEIRA et al., 2018).

Estima-se que 75% da superfície terrestre esteja sofrendo pressões humanas, sendo 40% atribuído à agricultura. Nesse contexto, para plantas de ocorrência natural em ambientes impactados, a conservação *ex situ* pode representar sua única forma de sobrevivência (MOUNCE; SMITH; BROCKINGTON, 2017). De acordo com o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), dentro da família Passifloraceae, 35% das espécies encontram-se “em perigo” e outras 5% “criticamente em perigo”. Além disso, para o gênero *Passiflora*, o desmatamento crescente nas regiões Centro-Norte para fins agrícolas é uma das principais causas da perda de diversidade, principalmente de espécies silvestres, que pertencem aos biomas mais biodiversos (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016; FALEIRO et al., 2019). Desse modo, fica nítida a importância das ferramentas de conservação para esses indivíduos.

Os primeiros projetos de conservação das espécies de *Passiflora* spp. datam de 1980, quando foi criado o primeiro banco de germoplasma para o gênero, e tais coleções foram se expandindo com o tempo e envolvendo várias instituições. Já em âmbito nacional, em 1990, a Embrapa Cerrados deu início às pesquisas com espécies silvestres e comerciais. Posteriormente, em 2005, foi criado o Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* spp. “Flor da Paixão”, que abriga até hoje uma das maiores coleções de maracujás do mundo. São cerca de 50 coleções mundiais, com 1235 acessos distribuídos em 32 países. Só no Brasil, há 8 coleções e 500 acessos do gênero (FALEIRO et al., 2019).

A conservação *ex situ* do maracujazeiro envolve, principalmente, a manutenção dos indivíduos nas coleções de campo, mantidas por instituições de pesquisa do país (FALEIRO et al., 2019). Também pode ser feita nos bancos de sementes, apesar da falta de conhecimento sobre a melhor maneira de armazenamento para algumas espécies, já que muitas produzem sementes recalcitrantes, intolerantes à dessecação, ou intermediárias, que toleram a dessecação, mas não as temperaturas baixas por longos períodos, além de outras ainda não possuírem informações suficientes disponíveis (VEIGA-BARBOSA et al., 2013; PACHECO et al., 2016).

O modo convencional de conservação do germoplasma é feito atualmente pela manutenção da planta no campo e também pelos bancos de sementes (PATHIRANA et al.,

2016; WERDEN et al., 2020). Porém, tendo em vista os riscos de doenças, ataque de patógenos no campo e perdas devido a desastres ambientais e ação humana, além dos desafios que algumas espécies apresentam, impossibilitando o armazenamento de suas sementes, tem-se aumentado o interesse pelos métodos alternativos, ofertados principalmente pela biotecnologia. O uso do sistema *in vitro*, como a cultura de tecidos, permitiu o desenvolvimento de ferramentas eficazes utilizados atualmente para a conservação (CHAUHAN; SINGH; QURAIISHI, 2019).

### 2.1.2 Conservação *in vitro*

Baseada na cultura de tecidos, a conservação *in vitro* é uma estratégia complementar aos métodos convencionais e uma ferramenta eficiente para conservar espécies, especialmente as de origem tropical, sendo crescente o número de protocolos estabelecidos para várias espécies (CHAUHAN et al., 2016; DA SILVA et al., 2018). Suas vantagens incluem a produção de plantas livres de doenças e com altas taxas de multiplicação, além de permitir a manutenção dos explantes de forma asséptica e em espaço reduzido (PACHECO et al., 2016; SHARMA et al., 2018). Além disso, a conservação do material pode ser feita por vários períodos de tempo, a partir de alterações nas condições de cultura (SILVA et al., 2019).

Existem diferentes métodos *in vitro* para se empregar na conservação dos explantes, de acordo com a duração de armazenamento. A curto prazo, também chamada estratégia ativa, objetiva-se reduzir o metabolismo vegetal permitindo um armazenamento de alguns meses, como ocorre no crescimento lento e na produção de sementes sintéticas (KAMIŃSKA et al., 2018; QAHTAN et al., 2019). Já a conservação a longo prazo, que é uma estratégia de base, é realizada pela criopreservação em temperaturas ultrabaixas, visando a paralisação dos processos metabólicos, teoricamente, por tempo indeterminado (COELHO et al., 2017; NORMAH; SULONG; REED, 2019).

A conservação *in vitro* de *Passiflora* spp. é feita majoritariamente pela criopreservação de sementes e embriões, somáticos ou zigóticos (MELLETTI et al., 2007; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009; VEIGA-BARBOSA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2019; PRUDENTE et al., 2019) e, em menor nível, de outros propágulos, como segmentos nodais (MERHY et al., 2014), ápices radiculares (SIMÃO et al., 2018) e caulinares (GARCIA et al., 2011; VIANNA et al., 2019). O crescimento lento é relatado em poucos trabalhos (PACHECO et al., 2016). E em relação à produção de sementes sintéticas, há um trabalho com embriões somáticos e outros que utilizaram a técnica associada à criopreservação (GARCIA et al., 2011; MERHY et al., 2014; DA SILVA et al., 2015).

A conservação *in vitro* a curto prazo pode ser obtida via encapsulamento de propágulos, pela formação da chamada “semente sintética”, ou semente artificial. Esse foi um conceito abordado pela primeira vez em 1977 e os primeiros protocolos datam de 1980, utilizando embriões somáticos (QAHTAN et al., 2019). Para o encapsulamento é frequentemente usado o alginato de sódio, devido a sua baixa toxicidade, baixo custo e alta biocompatibilidade que, ao se juntar com os íons de cloreto de cálcio, sofre uma reação química de complexação, formando cápsulas cuja consistência dependerá da concentração das soluções e tempos de complexação (BENELLI et al. 2017; MICHELI & BENELLI, 2019).

Atualmente, a produção de sementes sintéticas é uma técnica que permite encapsular não só embriões, mas ápices caulinares, gemas laterais, segmentos nodais, grãos de pólen e meristemas (STEWART, 2016). Os segmentos nodais são os mais utilizados, devido à facilidade de manuseio e regeneração, que são cultivados visando regenerar uma planta viável após o armazenamento (MAGRAY et al., 2017; QAHTAN et al., 2019). Essa tecnologia é cada vez mais relevante para a conservação *ex situ*, cujo tamanho reduzido das cápsulas torna mais fácil seu armazenamento, transporte e intercâmbio. Por ser a curto prazo, podem ser mantidas em condições assépticas por vários meses ou mais, quando associadas à criopreservação (JAVED et al., 2017; PRUDENTE; DE SOUZA; PAIVA, 2019).

Vários fatores contribuem para o sucesso da produção de sementes sintéticas, principalmente a concentração de alginato, a composição do meio e o tipo de explante. As condições de armazenamento também podem influenciar no crescimento das sementes, como a temperatura, qualidade de luz, disponibilidade de oxigênio e de açúcares (FAISAL & ALATAR, 2019). Sementes sintéticas têm sido aplicadas para a conservação de espécies medicinais, ornamentais, frutíferas e lenhosas (QAHTAN et al., 2019). Em *Passiflora*, poucos trabalhos foram realizados (GARCIA et al., 2011; MERHY et al., 2014; DA SILVA et al., 2015), nenhum deles para a espécie *P. gibertii*.

Já para o armazenamento *in vitro* a longo prazo, a criopreservação em temperaturas ultrabaixas (nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}$  C) é o único método atualmente conhecido. O armazenamento de tecidos vegetais em nitrogênio líquido tem o potencial de manter o material biológico viável e estável, em um processo no qual todas as divisões celulares e demais atividades metabólicas cessam, teoricamente, por tempo indeterminado (COELHO et al., 2017; NORMAH; SULONG; REED, 2019). Na criopreservação não é necessário realizar subcultivos, como ocorre em outras técnicas, dependendo da espécie. Com isso, diminui-se o risco de variação somaclonal e contaminação do material, além de possibilitar o armazenamento em um espaço limitado pelo tamanho reduzido dos explantes e criotubos (ENGELMANN, 2011).

A maioria dos explantes usados na criopreservação, como embriões, ápices caulinares, gemas laterais e meristemas, possuem níveis elevados de água intracelular, sendo suscetíveis aos danos por cristalização após o armazenamento em temperaturas ultrabaixas. Sendo assim, é necessária uma etapa de desidratação do tecido antes de criopreservá-lo, que deve reduzir o estado hídrico de forma suficiente e não prejudicial às células (MATHEW et al., 2018; PRUDENTE; DE SOUZA; PAIVA, 2019). Assim, a técnica da vitrificação, uma das mais utilizadas, permite a conversão da solução aquosa das células para um estado vítreo, a partir do uso de substâncias crioprotetoras (ENGELMANN, 2011; MATSUMOTO, 2017).

A criopreservação de *Passiflora* spp. é feita, principalmente, com sementes inteiras ou apenas embriões zigóticos (MELLETTI et al., 2007; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009; VEIGA-BARBOSA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2019; PRUDENTE et al., 2019). Segmentos nodais geralmente não são utilizados, pelo seu tamanho maior que pode impedir a completa vitrificação dos tecidos, apesar das vantagens de se utilizar esse explante, como a facilidade de manuseio e de regeneração (PACHECO et al., 2016; QAHTAN et al., 2019). O primeiro e único protocolo de criopreservação de segmentos nodais foi estabelecido para *P. pohlii*, pela técnica de vitrificação, com 65% de regeneração dos brotos (MERHY et al., 2014).

Diante desse contexto, nota-se que os dados sobre conservação *in vitro* para o gênero *Passiflora* spp. são escassos e, mais ainda, para a espécie *P. gibertii*. Para esta última, destaca-se um trabalho de criopreservação de sementes (VEIGA-BARBOSA et al., 2013), onde foi possível verificar sua tolerância à dessecação e ao nitrogênio líquido, sem afetar a germinação. Além disso, existe apenas um trabalho envolvendo a técnica de crescimento lento (FARIA et al., 2006), que é um método de conservação capaz de ser otimizado por meio de vários fatores e/ou condições de armazenamento, representando inúmeras possibilidades para se avançar nos estudos de conservação *in vitro*, ainda incipientes.

### 2.1.3 Crescimento lento

Além da conservação a curto e longo prazo, existe o método a médio prazo, como por exemplo o crescimento lento, também denominado “crescimento mínimo”. Essa técnica é baseada não apenas na redução do crescimento das culturas, mas também no prolongamento do tempo entre subcultivos (ou mesmo na eliminação dessa necessidade), economizando reagentes e diminuindo os custos, sem prejudicar a capacidade de retomada de crescimento e a uniformidade genética das plantas na pós-conservação (KAMIŃSKA et al., 2018; CHAUHAN; SINGH; QURAIISHI, 2019). Ao diminuir a taxa metabólica, o crescimento lento pode garantir

o armazenamento por vários meses ou anos (OZUDOGRU et al., 2017; HAMMOND et al., 2019), minimizando a mão de obra para manutenção e os riscos de contaminação, sendo uma excelente alternativa para as espécies que não suportam a criopreservação, por exemplo.

Para o crescimento lento utiliza-se principalmente ápices caulinares e gemas laterais como fonte de explantes, sendo que a diminuição da taxa metabólica pode ser alcançada por diversas modificações no meio e/ou nas condições de cultivo e armazenamento. Entre essas alterações, destacam-se a diminuição da temperatura (SHAHZAD et al., 2017; OZUDOGRU et al., 2017), uso de diferentes tipos e concentrações de açúcares (KLAVINA & KLAVINA, 2018; MUÑOZ et al., 2019; GOMES et al., 2021), retardantes de crescimento (BANASIAK & SNYMAN, 2017; TONGSAD et al., 2020), mudanças na qualidade ou intensidade luminosa (RODRIGUES et al., 2021), nos componentes do meio de cultura, como nutrientes e reguladores de crescimento (MANCILLA-ÁLVAREZ et al., 2019) e até mesmo na disponibilidade de oxigênio dentro dos recipientes (DE LACERDA et al., 2021).

Além dos fatores externos, o sucesso dessa técnica depende das características intrínsecas da espécie, seleção dos explantes e seu estado fisiológico (ENGELMANN, 2011). O crescimento lento tem sido usado para a conservação de espécies de propagação clonal, frutíferas, cultivadas, medicinais e ornamentais, pelo seu baixo custo de manutenção, fácil armazenamento e manipulação, em comparação a outras técnicas. Apesar de ser uma opção mais simples e prática de conservação, requer adequação para as espécies, como ocorre na maioria das metodologias *in vitro*, principalmente em relação às limitações de crescimento que possam ter. Assim, não é sempre possível aplicar o mesmo protocolo para espécies ou genótipos dentro de uma coleção, ainda que similares (QURAISHI et al., 2017; EL-DAWAYATI, 2020).

Uma das abordagens mais utilizadas para se induzir o crescimento lento é o uso de agentes osmóticos, como a sacarose, sejam em concentrações mais altas ou baixas que o padrão. Sua diminuição no meio de cultivo reduz a disponibilidade de carbono como fonte de energia, garantindo o crescimento lento. Já as maiores concentrações reduzem o potencial hídrico do meio, restringindo a absorção de água e nutrientes para a atividade metabólica, também limitando o crescimento (HUANG et al., 2014; ALVIM et al., 2020). Além disso, outro aspecto pouco relatado nos trabalhos é a modificação da qualidade ou intensidade luminosa durante o armazenamento, sendo que a redução de irradiância também pode ser uma forma de atenuar o metabolismo vegetal, promovendo o crescimento mínimo (RODRIGUES et al., 2021).

São poucos os protocolos de crescimento lento determinados para espécies de *Passiflora* spp. (FARIA et al., 2006; GARCIA et al., 2011; SOUZA et al., 2021), incluindo o uso de diferentes concentrações, tipos de açúcares e componentes do meio de cultivo. Em *P. gibertii*,

apenas um trabalho utilizou a técnica, no qual se verificou o efeito da sacarose e sorbitol no meio de cultivo, durante quatro meses (FARIA et al., 2006). Utilizando meio MS suplementado com 10 ou 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose, ou 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foi possível obter crescimento reduzido das plântulas, adquirindo bom desenvolvimento radicular e foliar ao mesmo tempo.

Outro trabalho mais recente com *P. gibertii* não aplicou diretamente a técnica de crescimento lento, porém investigou a influência do nitrato de prata durante o desenvolvimento de plântulas *in vitro*, ao longo de três meses (FARIA et al., 2017). O uso de meio de cultivo suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata, foi capaz de mitigar a perda de vigor das plântulas e desacelerar a senescência *in vitro*, além de promover maior número de raízes e folhas em comparação com o tratamento controle, possuindo diversas aplicações para a micropropagação e conservação dessa espécie de maracujazeiro.

Tendo em vista os poucos trabalhos de conservação *in vitro* relatados para o gênero, e ainda mais para a espécie *P. gibertii*, torna-se necessário, portanto, a realização de novos estudos, visando ampliar o conhecimento sobre a conservação dessa espécie silvestre, bem como sobre o desempenho de ápices caulinares e aclimatização das plantas após a conservação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para a espécie *P. gibertii*, a partir de segmentos nodais, por meio da técnica de armazenamento via crescimento lento, que permita a retomada do crescimento dos ápices caulinares e aclimatização das plantas resultantes.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estabelecer um protocolo de desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais para *P. gibertii*, que permita a multiplicação eficiente dos explantes;
- Definir a concentração de sacarose e tipo de intensidade luminosa mais adequadas para promover melhores resultados durante o armazenamento *in vitro* via crescimento lento.
- Definir a concentração de sacarose e tipo de intensidade luminosa mais adequadas para promover melhores resultados de retomada, após o armazenamento *in vitro*;

- Definir a concentração de sacarose e tipo de intensidade luminosa mais adequadas para promover melhores resultados de aclimatização, após o armazenamento *in vitro*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de realização dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP – UFLA), situado no Setor de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras, localizada na cidade de Lavras – MG, Brasil.

### **4.2 Obtenção do material vegetal**

Foram utilizadas plantas de *P. gibertii* de 3 anos de idade (provenientes de sementes germinadas *ex vitro*) cultivadas em estufa a  $25 \pm 1$  °C, como fonte de explantes para a realização deste trabalho. Os segmentos nodais necessários para os experimentos foram coletados no sentido apical-basal de crescimento da planta, com preferência para os ramos mais jovens.

Após a coleta nas plantas-matriz, os explantes foram pré lavados em água corrente e, posteriormente, levados à câmara de fluxo laminar para a desinfestação. Foi feita a imersão do material em álcool 70% durante 1 minuto e, em seguida, hipoclorito de sódio 2,5% durante 15 minutos. Ao final, foi feita lavagem por 3 vezes em água destilada autoclavada, para a retirada dos produtos excedentes.

Depois da desinfestação, foram excisados, com auxílio de um bisturi, segmentos nodais de aproximadamente 1 cm e contendo 1 gema, que foram usados nos experimentos seguintes.

### **4.3 Desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais**

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de mio-inositol, solidificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e suplementado com 1, 2, 4 ou  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de 6 – benzilaminopurina (BAP), além do tratamento controle, sem a adição deste regulador de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $121^\circ \text{ C}$ , por 20 minutos. A finalidade dessa etapa foi verificar qual o melhor meio para o desenvolvimento dos segmentos nodais, para auxiliar na obtenção de brotações para os experimentos seguintes.

Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo cada tubo de ensaio 1 repetição contendo 1 segmento nodal cada. Os tubos foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 16h. Após esse período, foram avaliados os seguintes parâmetros: sobrevivência, número e comprimento de brotos e formação de calos.

O melhor tratamento foi utilizado para a realização dos próximos subcultivos, feitos a cada 30 dias, consistindo na transferência dos explantes em novo meio de cultura, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, visando a multiplicação dos segmentos nodais.

#### **4.4 Crescimento lento**

##### **4.4.1 Indução e armazenamento**

Para a indução do crescimento lento, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e contendo pelo menos 1 gema lateral, isolados das brotações micropropagadas anteriormente.

Os explantes foram inoculados em meio MS variando nas concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 ou 60 g L<sup>-1</sup>), acrescido de 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e sem a adição de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C, por 20 minutos.

Os tubos foram primeiro mantidos na sala de crescimento a  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16h e densidade de fótons de 50,71  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 1 semana. Depois desse prazo, metade do experimento foi mantida nas mesmas condições e outra foi transferida à uma condição de irradiância reduzida a 16,66  $\mu\text{M}$  de fótons por  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo utilizada uma tela sombrite ao redor dos tubos. A irradiância de fótons foi medida com um luxímetro digital LI-COR® (modelo LI-1400).

Foram utilizadas 30 repetições por tratamento, sendo cada tubo de ensaio 1 repetição contendo 1 segmento nodal cada. Todos os tratamentos permaneceram nas condições descritas anteriormente durante 180 dias.

A cada 30 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: sobrevivência, número e comprimento de brotos, número e comprimento de raízes, número de folhas e índice de senescência (razão entre o número de folhas senescidas e o número total de folhas). Para a etapa de indução e armazenamento, foi considerado um fatorial triplo 5x5x2, sendo 5 tempos de cultivo, 5 concentrações de sacarose e 2 intensidades luminosas.

#### 4.4.2 Retomada do crescimento

Após 90 e 180 dias de armazenamento, 10 explantes de cada tratamento tiveram os ápices caulinares excisados e transferidos para novo meio de cultura, para verificar a capacidade de retomada do crescimento a partir do desenvolvimento do meristema caulinar.

Ápices caulinares de aproximadamente 0,3 cm foram isolados desses explantes e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e suplementado com BAP, na melhor concentração obtida anteriormente para desenvolvimento dos segmentos nodais. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C, por 20 minutos.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16h, por 60 dias. Aos 30 e 60 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: sobrevivência, comprimento de brotos e número de folhas. Para a etapa de retomada do crescimento, foi considerado um fatorial triplo 2x5x2, sendo 2 tempos de cultivo, 5 concentrações de sacarose e 2 intensidades luminosas.

#### 4.4.3 Aclimatização

Após 180 dias de armazenamento, 10 plantas provenientes apenas dos tratamentos que apresentaram formação de raízes foram submetidas à aclimatização, para verificar a capacidade de crescimento no substrato e potencial de transferência para o campo. Primeiramente foram retirados os ápices caulinares dessas plantas, na câmara de fluxo laminar, para serem utilizados no experimento de retomada do crescimento, descrito anteriormente.

Posteriormente, as plantas foram transferidas dos tubos de ensaio para copos plásticos contendo o substrato comercial Tropstrato<sup>®</sup> e foram cobertas com sacos plásticos transparentes, permanecendo em sala de crescimento a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16h. O saco plástico foi removido gradativamente, tendo as pontas superiores cortadas a cada semana até a sua retirada completa, aos 30 dias. As plantas foram regadas com água destilada a cada 3 dias.

Aos 30 e 60 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: peso fresco, comprimento de brotos, comprimento de raízes e número de folhas. Para a etapa de aclimatização de explantes cultivados sob luminosidade normal foi considerado um fatorial triplo 3x3, sendo 3 tempos de cultivo e 3 concentrações de sacarose. Já para os cultivados sob luminosidade reduzida, foi considerado outro fatorial triplo 3x2, sendo 3 tempos de cultivo e 2 concentrações de sacarose.

#### 4.5 Análises estatísticas

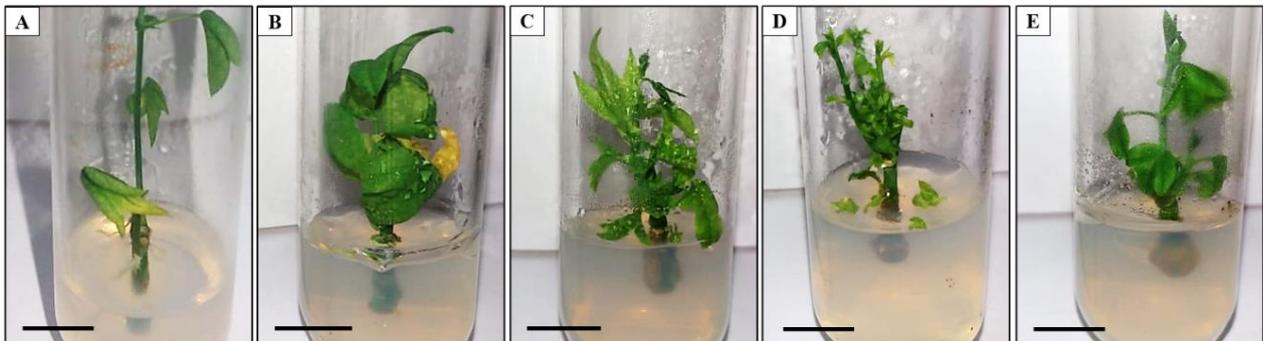
Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância com uso do software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2014) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais

Após 30 dias de cultivo de segmentos nodais submetidos a diferentes concentrações de BAP (FIGURA 2), foram observadas diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) para todas as variáveis de crescimento analisadas, com 100% de sobrevivência para todos os tratamentos testados.

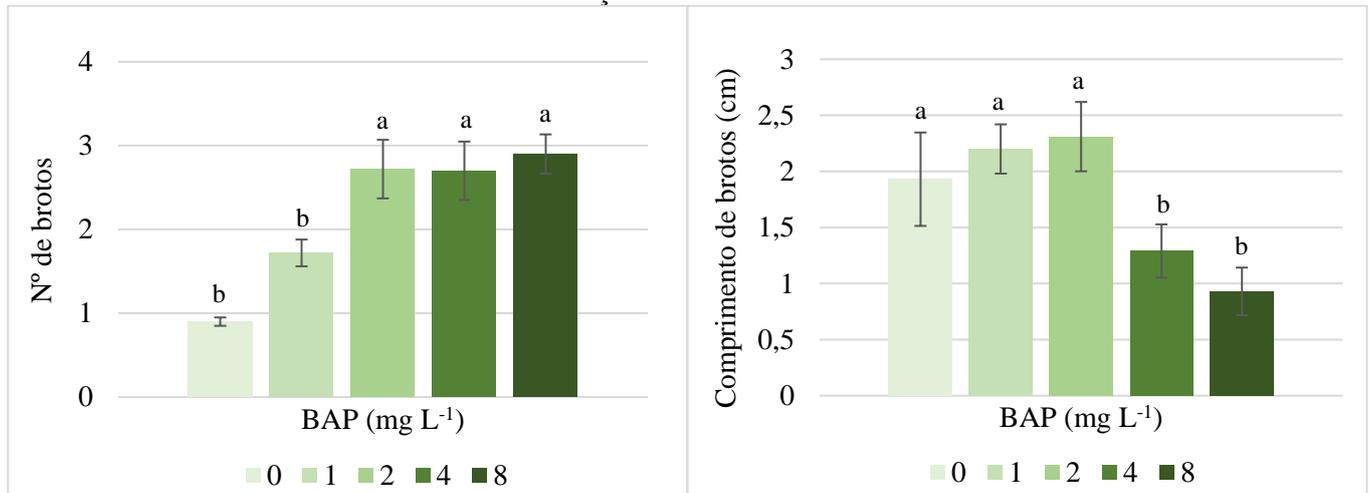
Figura 2 – Segmentos nodais após 30 dias de crescimento, submetidos a diferentes concentrações de BAP no meio de cultivo.



Letras representam concentrações de BAP no meio de cultivo: 0 mg L<sup>-1</sup> (A), 1 mg L<sup>-1</sup> (B), 2 mg L<sup>-1</sup> (C), 4 mg L<sup>-1</sup> (D) e 8 mg L<sup>-1</sup> (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

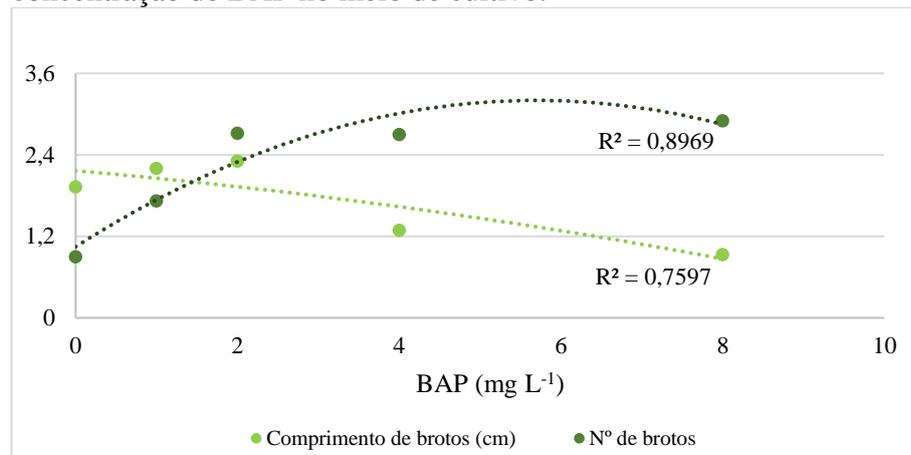
As maiores concentrações de BAP (2, 4 e 8 mg L<sup>-1</sup>) promoveram maior número de brotos (2,77), em comparação com as demais concentrações (1,78). Por outro lado, foi visto que as menores concentrações de BAP (1 e 2 mg L<sup>-1</sup>) e o tratamento controle promoveram maior comprimento de brotos (2,15 cm), em comparação com as demais concentrações (1,11 cm) (FIGURA 3). Desse modo, foi possível verificar que, quanto maior a concentração de BAP utilizada no meio de cultivo, maior foi o número de brotações e, conseqüentemente, menor foi o seu comprimento, atribuindo-se uma relação inversamente proporcional entre as duas variáveis (FIGURA 4).

Figura 3 – Número e comprimento de brotos de segmentos nodais após 30 dias de desenvolvimento, submetidos a diferentes concentrações de BAP.



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

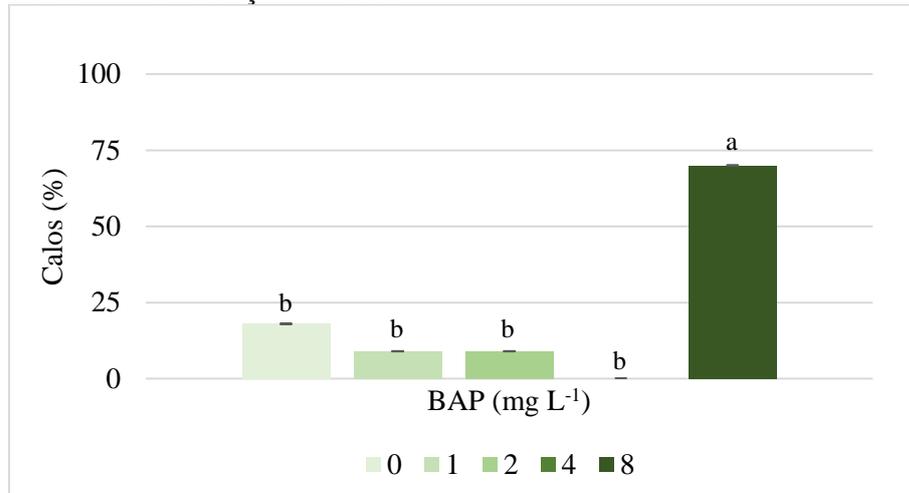
Figura 4 – Número e comprimento de brotos de segmentos nodais após 30 dias, em função da concentração de BAP no meio de cultivo.



Médias segundo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Em relação à porcentagem de calos, foi visto que apenas a maior concentração de BAP (8 mg L<sup>-1</sup>) promoveu maior calogênese (70,00%), em comparação com as demais concentrações (9,00%), que não diferiram entre si. Não houve formação de calos utilizando 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultivo (FIGURA 5).

Figura 5 – Porcentagem de formação de calos em segmentos nodais após 30 dias, submetidos a diferentes concentrações de BAP.



Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Com base nos resultados observados para as variáveis de crescimento, concluiu-se que 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi o melhor tratamento para o desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais de *P. gibertii*. Nessa concentração, foi possível ao mesmo tempo a obtenção de maior comprimento e número de brotos, possibilitando melhor extração de segmentos nodais por explante, com menor formação de calos ao mesmo tempo.

Em concentrações maiores de BAP (4 e 8 mg L<sup>-1</sup>), o maior número de brotos foi também acompanhado de menor espaço entrenós, o que prejudicaria a extração de segmentos nodais das plantas *in vitro* em comprimentos viáveis para os futuros subcultivos necessários. Além disso, a ausência ou menor concentração de BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) foram tratamentos que, apesar de terem possibilitado maior comprimento de brotos, não resultaram na multiplicação eficiente dos explantes, em relação ao número de brotos, como era o objetivo esperado nessa etapa.

A regeneração *in vitro* ocorre por meio de duas vias morfogênicas principais: embriogênese somática, quando células somáticas originam estruturas similares a um embrião zigótico, e a organogênese *de novo*, quando ocorre o estímulo para a produção de novos órgãos (ROCHA et al., 2018). A competência para regeneração varia entre espécies, genótipos e explantes, sendo os reguladores de crescimento os principais agentes promotores desses processos (ZHANG et al., 2018; BIDABADI & JAIN, 2020).

Para a organogênese *de novo*, o BAP é uma das citocininas mais utilizadas, devido à sua maior estabilidade química, sendo a que melhor promove as respostas em *Passiflora* spp. (OTONI et al., 2013; PHILLIPS & GARDA, 2019). Dentro do gênero, seu uso já foi relatado para diferentes espécies e explantes, incluindo ápices caulinares, segmentos nodais, foliares e

até mesmo raiz e estruturas da semente, como o endosperma (DE CARVALHO et al., 2017; HUH; LEE; NAM, 2017; ANTONIAZZI et al., 2018; DE FARIA et al., 2018).

Segmentos nodais são os mais utilizados para a multiplicação clonal, pela ativação meristemática da gema preexistente (HARTMANN; KESTER; GENEVE, 2010; ROCHA et al., 2018). À medida que se aumenta a concentração exógena de BAP, aumenta-se a proporção de citocinina para auxina no meio e, conseqüentemente, a indução de brotos, uma tendência observada nesse trabalho. Além disso, a eficácia do BAP na multiplicação de *P. gibertii* também foi verificada, uma vez que a organogênese não é tão efetiva no tratamento controle, em comparação com os tratamentos na presença de BAP, que obtiveram quase o triplo de brotos.

Em *P. caerulea*, o maior número de brotações em explantes cotiledonares (8,86) e nodais (9,86) foram obtidos em meio MS com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,15 mg L<sup>-1</sup> de AIB, indicando a necessidade também de auxina exógena para essa espécie (JAFARI; DANESHVAR; LOTFI, 2017). Já *P. cincinnata* obteve o maior número de brotações (24,85) com 1,6 mg L<sup>-1</sup> de BAP (DA SILVA et al., 2020). A concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, assim como nesse trabalho, foi melhor na indução de gemas adventícias em cultura de endosperma de *P. cristalina* e para formação de calos, facilitando a organogênese indireta (DE FARIA et al. 2018). Já na espécie comercial *P. edulis*, a multiplicação de brotos foi favorecida com 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP, uma dose um pouco maior em comparação com as espécies silvestres citadas (ASANDE et al., 2020).

Outra consequência do uso de BAP nesse trabalho foi a correlação inversa entre número e comprimento de brotos, associada à concentração do regulador no meio de cultivo. Em segmentos nodais de *P. gibertii*, é possível verificar que o número de brotos é maior quando se aumenta as concentrações de BAP e menor quando se diminui as doses, e o contrário é visto para o comprimento de brotos. Em *P. edulis*, efeito similar foi observado em segmentos nodais na presença de BAP, sendo que as menores concentrações (0,1 e 0,2 mg L<sup>-1</sup>) resultaram no alongamento do broto, mas não foram eficazes na multiplicação (CHEN; CHANG; LIN, 2020).

Além do maracujá, o efeito do BAP é amplamente investigado em diversas espécies. Em *Citrus lemon*, por exemplo, essa correlação inversa também foi vista após 30 dias de cultivo, com maior número de brotos (5,8) aos 0,75 mg L<sup>-1</sup> de BAP e maior comprimento de brotos (5,7 cm) no tratamento controle (NOORI et al., 2020). BAP, como qualquer citocina, possui papel na quebra da dominância apical, promovendo as ramificações da parte aérea. No entanto, a adição de doses exógenas de reguladores pode resultar em respostas inversas de alguns parâmetros controlados, devido à busca pela estabilização e balanço hormonal interno nos tecidos (FENTAHUN et al., 2017), o que pode auxiliar a explicar esse comportamento.

Além disso, apesar de seu efeito benéfico, o BAP pode promover anormalidades nos explantes *in vitro*, principalmente em maiores concentrações. Consequências adversas incluem: clorose, hiperidricidade, necrose e retardo do crescimento (CHEN; CHANG; LIN, 2020). Neste trabalho, não foi visto nenhum comportamento atípico nos explantes, exceto pelo fato de que a dose mais alta de BAP resultou em maior calogênese, uma resposta indesejada ao esperado.

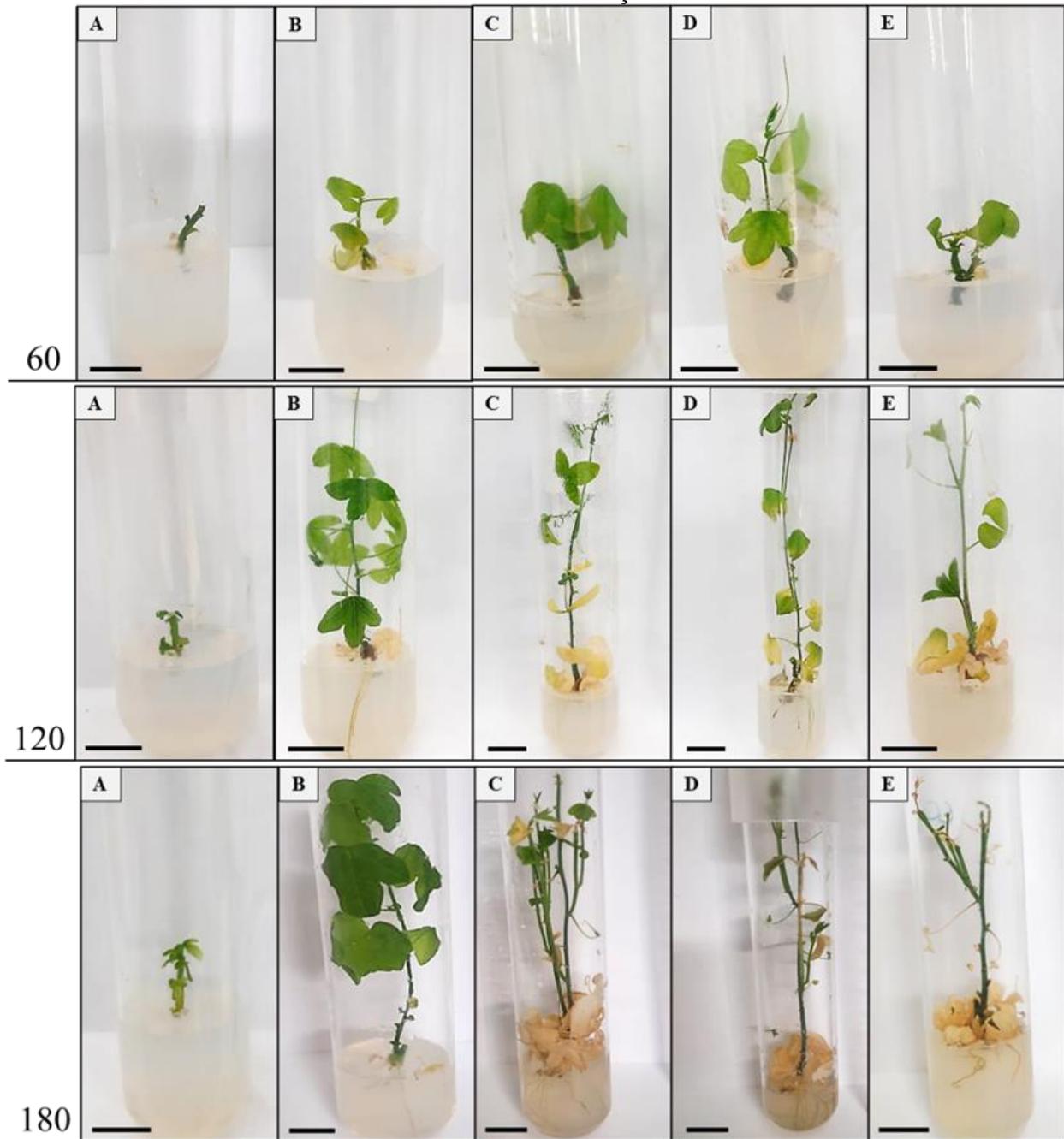
É bem estabelecido o fato de que uma razão mais equilibrada entre níveis de citocininas e auxinas podem resultar na proliferação de uma massa celular denominada calo (SKOOG & MILLER, 1957). Nesse contexto, a alta concentração de BAP aplicada pode ter desencadeado desvios metabólicos na tentativa de se buscar a homeostase celular, que possivelmente causou o aumento da produção endógena de auxina para essa regulação hormonal (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; FEHÉR et al., 2019), resultando na calogênese mais evidenciada. Apesar dos diversos potenciais da cultura de calos, sua formação não é almejada durante a regeneração *in vitro* direta, quando se tem como objetivo o desenvolvimento de plântulas normais.

## **5.2 Crescimento lento**

### **5.2.1 Indução e armazenamento**

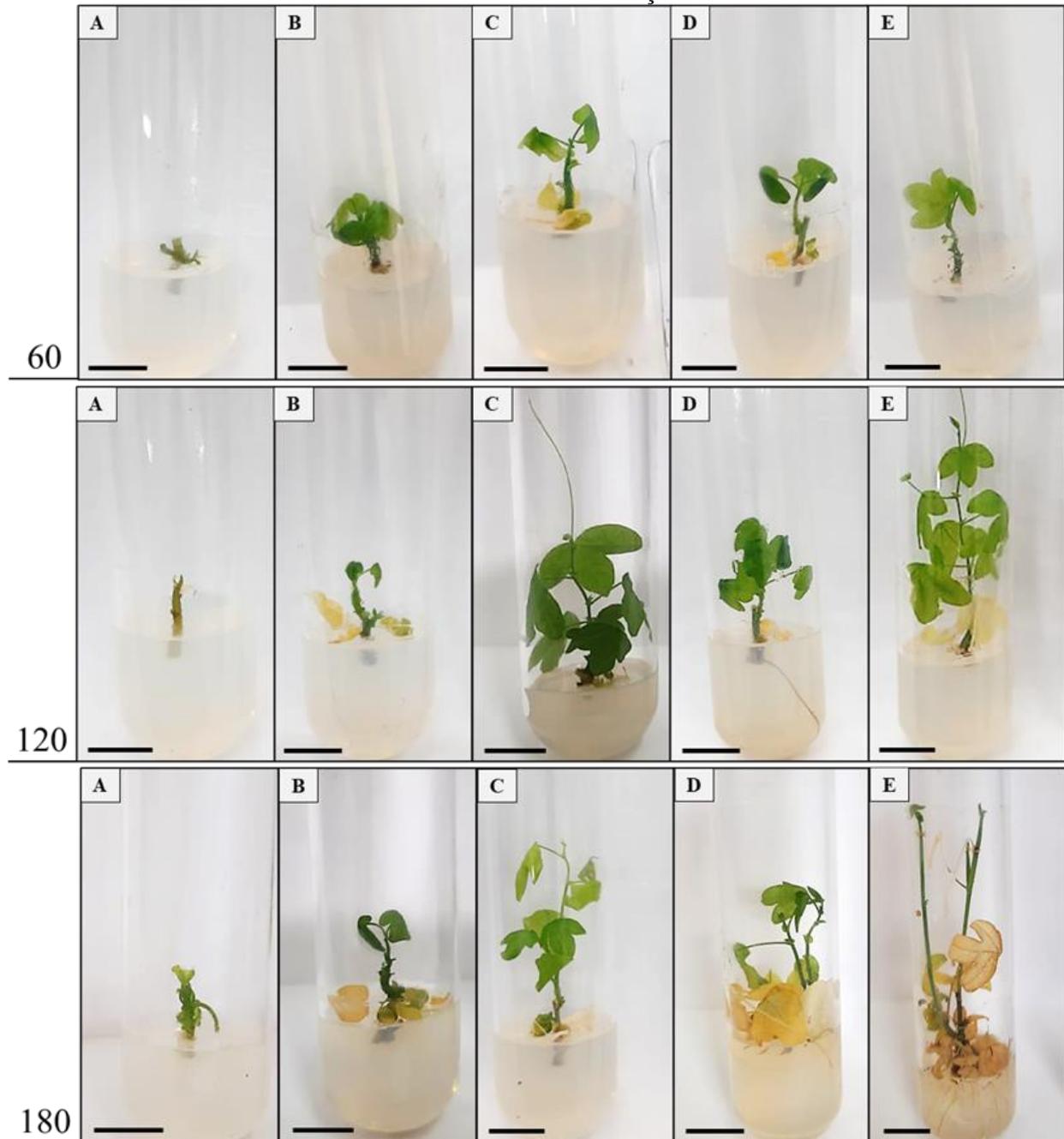
Após 180 dias de crescimento lento dos segmentos nodais, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose (FIGURAS 6A e 6B), foram observadas diferenças estatísticas e interação tripla significativa entre os fatores tempo de cultivo, concentração de sacarose e intensidade luminosa ( $p \leq 0,05$ ), para todas as variáveis.

Figura 6A – Segmentos nodais aos 60, 120 e 180 dias de crescimento lento, submetidos a luminosidade normal e diferentes concentrações de sacarose.



Primeira, segunda e terceira linhas representam plantas aos 60, 120 e 180 dias de crescimento lento, respectivamente. Letras representam concentrações de sacarose no meio de cultivo: 0 g L<sup>-1</sup> (A), 15 g L<sup>-1</sup> (B), 30 g L<sup>-1</sup> (C), 45 g L<sup>-1</sup> (D) e 60 g L<sup>-1</sup> (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

Figura 6B – Segmentos nodais aos 60, 120 e 180 dias de crescimento lento, submetidos a luminosidade reduzida e diferentes concentrações de sacarose.

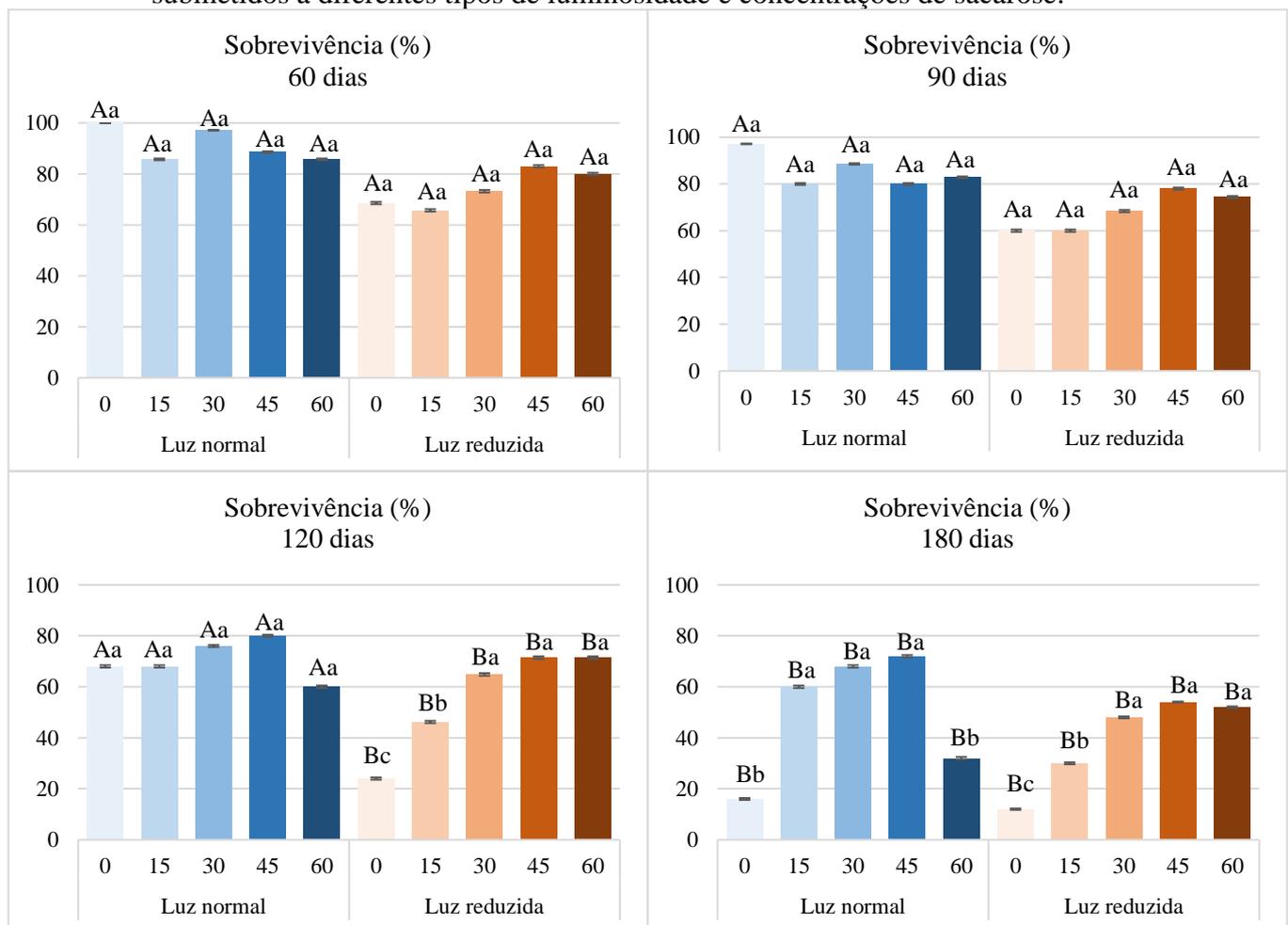


Primeira, segunda e terceira linhas representam plantas aos 60, 120 e 180 dias de crescimento lento, respectivamente. Letras representam concentrações de sacarose no meio de cultivo: 0 g L<sup>-1</sup> (A), 15 g L<sup>-1</sup> (B), 30 g L<sup>-1</sup> (C), 45 g L<sup>-1</sup> (D) e 60 g L<sup>-1</sup> (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, a porcentagem de sobrevivência inicial (82,51%) diminuiu a partir dos 150 dias (52,40%), período no qual foi observada maior sobrevivência dos explantes quando cultivados em 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (68,00%), em comparação com as concentrações de 0 e 60 g L<sup>-1</sup> (29,00%).

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, a porcentagem de sobrevivência inicial (74,37%), diminuiu a partir dos 120 dias (49,29%), período no qual foi observada maior sobrevivência dos explantes quando cultivados em 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (61,96%), seguido de 15 g L<sup>-1</sup> (43,86%), com a menor taxa de sobrevivência vista para o tratamento controle (16,72%) (FIGURA 7).

Figura 7 – Porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.

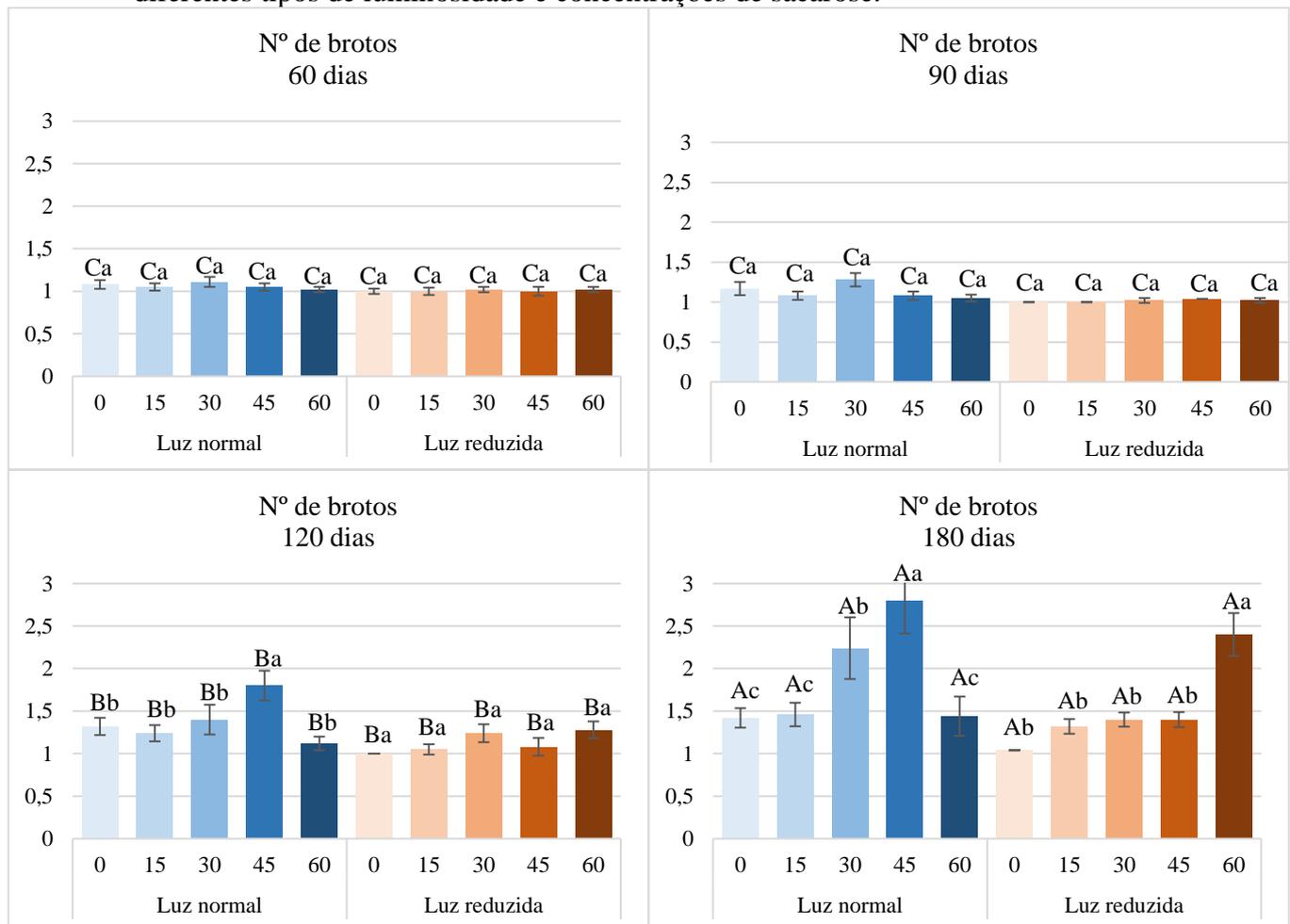


Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, o número de brotos por explante foi maior aos 180 dias de crescimento (1,87), em comparação com 120 e 150 dias (1,46), com o menor valor até 90 dias (1,09). Aos 120 dias, foi observado maior número de brotos em explantes cultivados em 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,80), em comparação com as demais concentrações (1,27). Aos 180 dias, foi visto maior valor para 45 g L<sup>-1</sup> (2,80), seguido de 30 g L<sup>-1</sup> (2,24), em comparação com as demais concentrações (1,44).

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, o número de brotos por explante foi maior aos 180 dias de crescimento (1,51), em comparação com 120 e 150 dias (1,19), com o menor valor até 90 dias (1,01). Além disso, a partir dos 150 dias, foi observado maior número de brotos em explantes cultivados em 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (2,00), em comparação com as demais concentrações (1,23) (FIGURA 8).

Figura 8 – Número de brotos por segmento nodal ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.



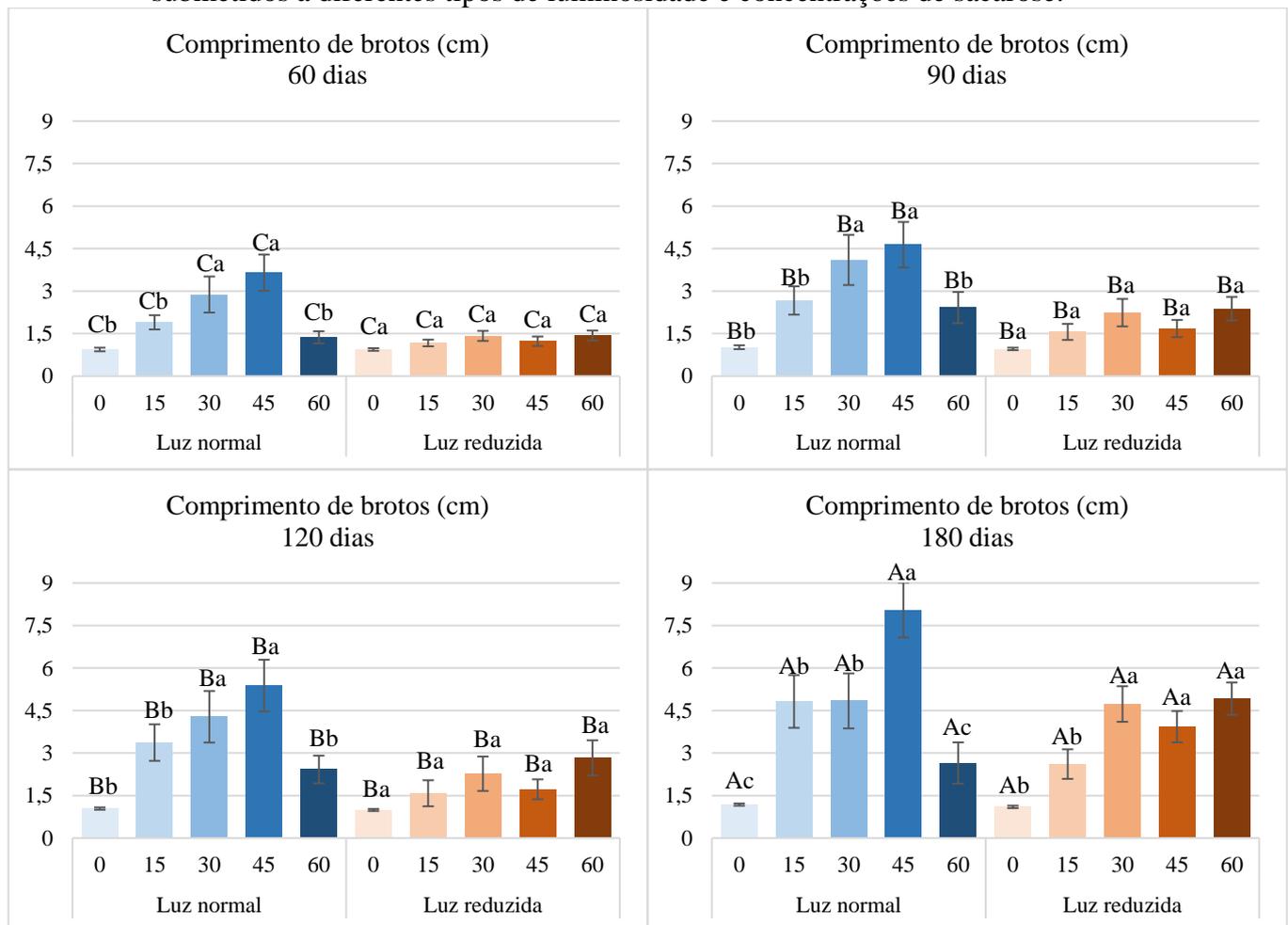
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, o comprimento inicial dos brotos (2,14 cm) aumentou aos 90 dias (3,13 cm) e novamente a partir de 150 dias (4,08 cm). Aos 60 dias, os maiores valores foram vistos para as concentrações de 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (3,26 cm), em comparação com as demais (1,40 cm). Aos 90 dias, também foram observados maiores valores para 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (4,60 cm), em comparação com as demais (2,15 cm). A partir de 150 dias, o maior valor foi obtido pela concentração de 45 g L<sup>-1</sup>

de sacarose (7,42 cm), seguido de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> (4,61 cm) e o menor valor para as demais concentrações (1,89 cm).

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, o comprimento inicial dos brotos (1,23 cm) aumentou aos 90 dias (1,82 cm) e novamente a partir de 150 dias (3,23 cm). A partir de 150 dias, os maiores valores foram vistos para as concentrações de 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (4,19 cm), em comparação com as demais (1,80 cm) (FIGURA 9).

Figura 9 – Comprimento de brotos por segmento nodal ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.



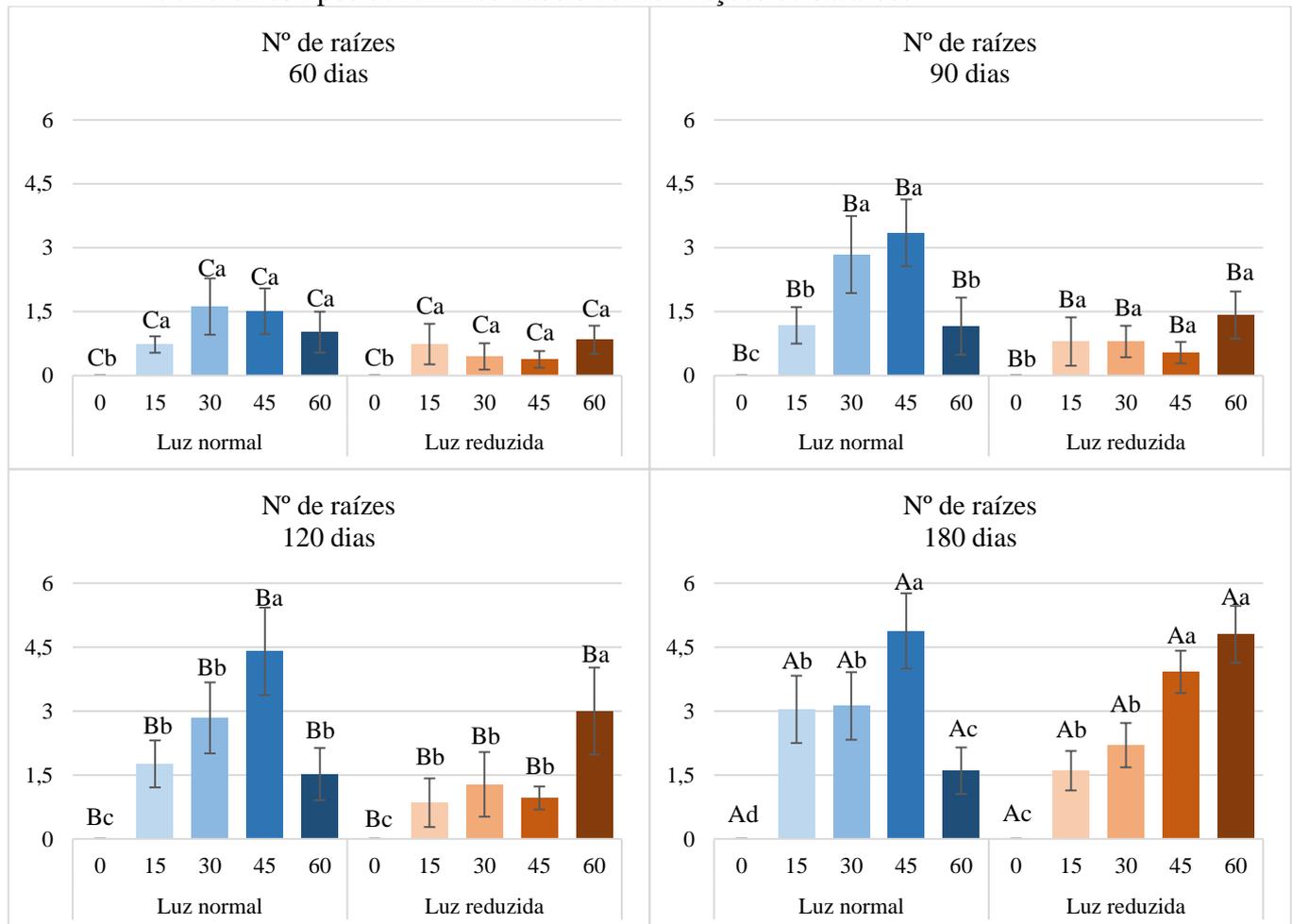
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, o número inicial de raízes (0,90) aumentou aos 90 dias (1,91) e novamente a partir de 150 dias (2,46). Aos 60 dias, não houve diferença entre as concentrações de sacarose para o número de raízes. Já aos 90 dias, os maiores valores foram obtidos nas concentrações 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (3,40),

seguido de 15 e 60 g L<sup>-1</sup> (1,38). Aos 120 dias, 45 g L<sup>-1</sup> promoveu o maior número de raízes (4,28), em comparação com as demais (1,50). A partir dos 150 dias, os maiores valores foram vistos para 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> (3,59), em comparação com 60 g L<sup>-1</sup> (1,56). Não houve enraizamento no tratamento controle.

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, o número inicial de raízes (0,48) aumentou aos 90 dias (0,95) e novamente a partir de 150 dias (2,17). Aos 60 e 90 dias, não houve diferença entre as concentrações de sacarose para o número de raízes. Já aos 120 dias, a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose promoveu o maior número de raízes (3,7), em comparação com as demais (0,94). Aos 180 dias, os maiores valores foram observados nas concentrações 45 e 60 g L<sup>-1</sup> (4,36), seguido de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> (1,9). Não houve enraizamento no tratamento controle (FIGURA 10).

Figura 10 – Número de raízes por segmento nodal ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.

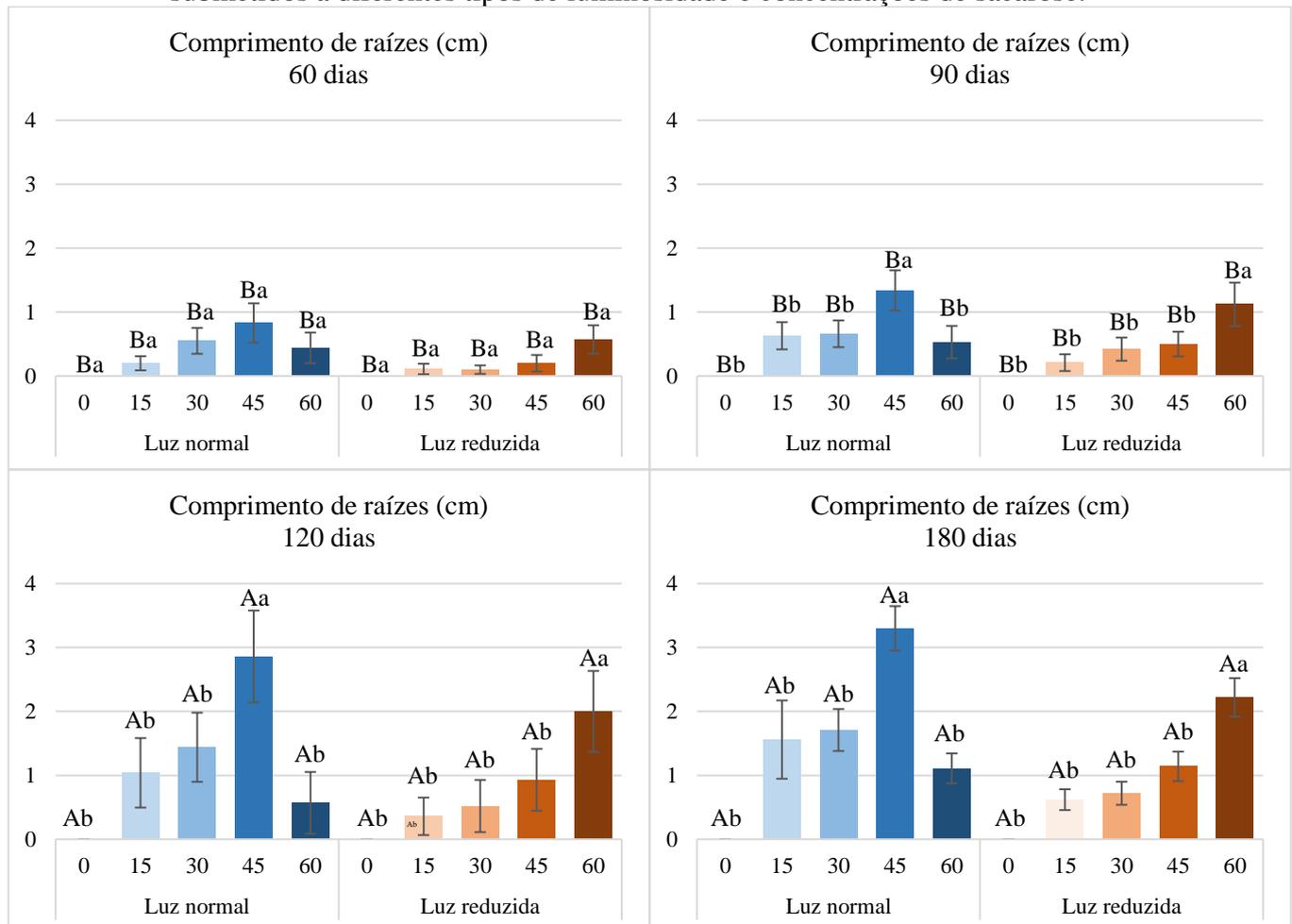


Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, o comprimento das raízes foi maior a partir dos 120 dias (1,19 cm), em comparação com o valor de até 90 dias (0,52 cm). Aos 90 dias, o maior comprimento de raiz foi visto na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,34 cm), em comparação com as demais (0,46 cm). A partir dos 120 dias, o maior comprimento de raiz também foi visto na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (2,54 cm), em comparação com as demais (0,85 cm).

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, o comprimento das raízes foi maior a partir dos 120 dias (0,85 cm), em comparação com o valor de até 90 dias (0,32 cm). A partir dos 90 dias, o maior comprimento de raiz foi visto na concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,84 cm), em comparação com as demais concentrações testadas (0,47 cm) (FIGURA 11).

Figura 11 – Comprimento de raízes por segmento nodal ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.

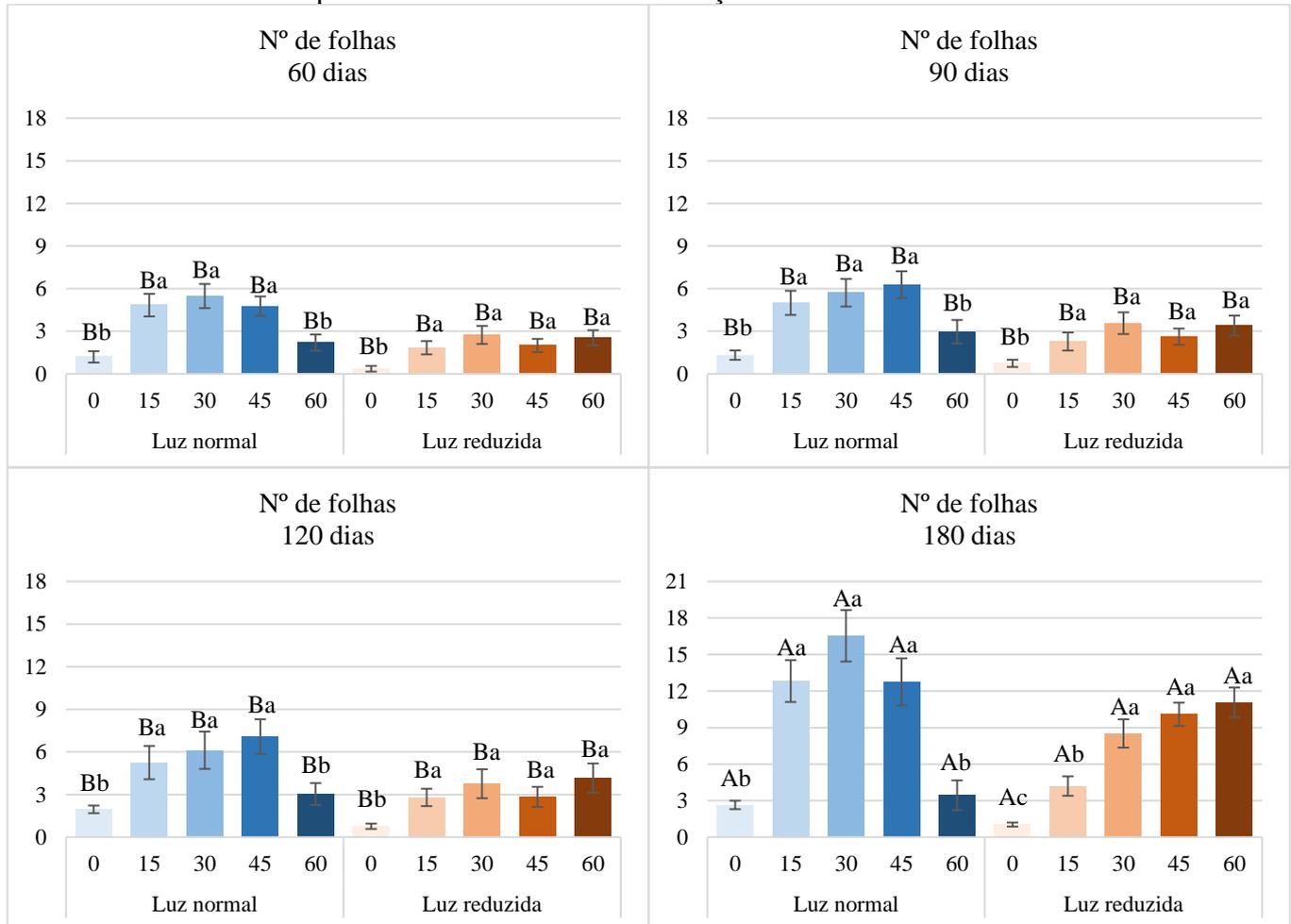


Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Para os explantes armazenados em condição normal de luminosidade, o número de folhas foi maior a partir dos 150 dias (7,87), em comparação com o valor de até 120 dias (4,21). Em todos os tempos de cultivo foi observado maior número de folhas por explante nas concentrações 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (7,85), em comparação com 0 e 60 g L<sup>-1</sup> (2,41). Além disso, o índice de senescência inicial (20,97%) aumentou a partir de 150 dias (26,31%), sendo maior com 30 e 45 g L<sup>-1</sup> (38,62%), em comparação com as demais (23,28%). Aos 180 dias, foi maior com 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> (32,04%), em comparação com as demais (11,32%).

Já para os explantes armazenados em condição de luminosidade reduzida, o número de folhas foi maior a partir dos 150 dias (6,30), em comparação com o valor de até 120 dias (2,42). Até 120 dias, houve maior número de folhas na presença de sacarose (2,87) em relação ao tratamento controle (0,62). A partir dos 150 dias, as concentrações 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose promoveram maior número de folhas por explante (8,92), seguido de 15 g L<sup>-1</sup> (3,82) e o menor valor obtido pelo tratamento controle (0,93). Além disso, o índice de senescência inicial (10,45%) aumentou a partir de 150 dias (24,25%), sendo maior com 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (36,75%), em comparação com as demais (11,75%) (FIGURA 12).

Figura 12 – Número de folhas por segmento nodal ao longo de 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma concentração de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Com base nos resultados observados para as variáveis de crescimento, concluiu-se que o armazenamento em luminosidade normal, com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultivo, foi a melhor combinação para o crescimento lento de segmentos nodais de *P. gibertii*, após 180 dias.

Geralmente, tecidos vegetais são subcultivados em novo meio a cada três ou quatro semanas, dependendo da taxa de crescimento, tipo de explante e características da espécie. Como já foi dito, um dos propósitos do crescimento lento é prolongar esse período, economizando gastos. E, apesar de o objetivo primário ser a redução do metabolismo, o armazenamento não deve prejudicar a capacidade de retomada de crescimento após a conservação (KAMIŃSKA et al., 2018; PHILLIPS & GARDA, 2019). Nesse tipo de luminosidade e dose de sacarose, foram favorecidas tanto a retomada do crescimento dos ápices caulinares quanto a aclimatização das plantas resultantes, respondendo ao objetivo proposto mesmo sem realizar subcultivos ao longo do tempo.

Nessas condições, houve melhor desempenho em relação à quase todas as variáveis avaliadas. Foi observada maior sobrevivência após 180 dias de cultivo, tanto para o crescimento lento quanto para a retomada do ápice, após 60 dias. Também houve maior formação e comprimento de raízes, o que garantiu, conseqüentemente, melhor estabelecimento durante a aclimatização, sendo confirmado pelo maior comprimento de plantas *ex vitro*, após 60 dias. Apesar disso, também foi uma das combinações que resultaram em maior comprimento e número de brotos, folhas e índice de senescência durante o armazenamento *in vitro*, parâmetros que indicam taxa metabólica elevada, o contrário do que se espera no crescimento mínimo.

Maiores concentrações de sacarose resultaram em maior número e comprimento de brotos nesse trabalho. Em doses menores de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e luminosidade normal, apesar de terem sido observadas respostas positivas como sobrevivência e enraizamento após o crescimento lento, houve maior desenvolvimento da parte aérea e menor desenvolvimento das plantas *ex vitro*. Já na maior concentração de sacarose (60 g L<sup>-1</sup>), não houve boa formação de raízes em luminosidade normal, impossibilitando a aclimatização. No entanto, em luminosidade reduzida, foi a dose que melhor favoreceu essa etapa.

O uso de agentes osmóticos, como a sacarose, resulta em diminuição do potencial hídrico do meio de cultivo, restringindo a absorção de água e, com isso, a assimilação de nutrientes para os processos metabólicos (HUANG et al., 2014; ALVIM et al., 2020). No entanto, em *P. gibertii*, existe um limite em relação à dose necessária para que isso ocorra, sendo verificado que o número e comprimento de brotos, raízes e folhas são maiores até 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com a redução desses parâmetros de crescimento a partir do uso de 60 g L<sup>-1</sup>.

Adicionalmente, notou-se que a luminosidade normal foi capaz de promover maiores valores para todos os parâmetros estudados durante o crescimento lento, em comparação com a reduzida, incluindo aqueles não desejados para o armazenamento em longo prazo, mas também maior sobrevivência e formação de raízes, importante para o sucesso da aclimatização. Além disso, possibilitou maior sobrevivência de ápices caulinares após 60 dias de retomada, em comparação com a luminosidade reduzida.

A redução da luminosidade pode ser uma forma de atenuar a taxa metabólica, resultando no crescimento mínimo (RODRIGUES et al., 2021). Nos experimentos *in vitro*, mudanças nesse parâmetro são utilizadas para se analisar as conseqüências da radiação em um processo biológico, principalmente em valores entre 45 a 50  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , podendo variar de 25 a 85  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (BARCELÓ-MUÑOZ et al., 2022). Nesse trabalho, reduzir a irradiância luminosa gerou diferenças entre as variáveis de crescimento. Respostas à diminuição da irradiância no armazenamento ainda não tinham sido relatadas para a espécie *P. gibertii*.

Em outro trabalho de crescimento lento de *P. gibertii*, verificou-se o efeito da sacarose e sorbitol no meio de cultivo, após quatro meses (FARIA et al., 2006). Os autores observaram que todos os tratamentos apresentaram comprimento das brotações e raízes menor que o controle, e que o uso de 20 ou 40 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, na ausência de sacarose, resultou em menor comprimento de brotos (1,18 cm). No entanto, ao se utilizar 15 ou 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, maiores valores foram observados para os parâmetros de crescimento, indicando que a presença desse açúcar é essencial para o desenvolvimento nessa espécie.

Em *P. suberosa*, após 12 meses de crescimento lento (GARCIA et al., 2011), verificou-se maior comprimento de brotos (8,0 cm) em meio com metade da concentração padrão de sacarose, e menor valor (2,7 cm) em explantes na concentração normal, porém acrescido de ABA. Apesar de reduzir o crescimento, que é favorável para se aumentar o período de armazenamento *in vitro*, a presença de ABA também levou à redução da sobrevivência e capacidade de retomada de crescimento em 50%, após 12 meses e 30 dias, respectivamente. Embora alguns retardantes vegetais sejam aplicados durante o crescimento mínimo (BANASIAK & SNYMAN, 2017; TONGSAD et al., 2020), esses resultados indicam que seu uso pode não ser adequado para algumas espécies de *Passiflora* spp.

Já em *P. edulis*, após quatro meses de crescimento lento (SOUZA et al., 2021), verificou-se menor comprimento de brotos (5,13 cm) em meio com um quarto da concentração de sais e 15 ou 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Além disso, essas condições possibilitaram 100% de sobrevivência após aclimatização, o que também foi obtido nesse trabalho, após 180 dias de cultivo, na presença de maiores concentrações de sacarose.

A sacarose é metabolizada para prover energia necessária para a síntese de esqueletos de carbono durante o crescimento, sendo uma molécula sinalizadora influenciada por diversas condições externas, como a intensidade luminosa (TOGNETTI; PONTIS; MARTÍNEZ-NOËL, 2013; YOON et al., 2021). O efeito da luz em associação à sacarose já foi estudado para algumas variáveis de crescimento, destacando o crescimento radicular, e tem sido amplamente relacionada com esse processo (WALTER & NAGEL, 2006; WINGLER et al., 2018).

Durante o crescimento lento de *P. gibertii* utilizando sacarose e sorbitol, os autores verificaram que apenas os tratamentos na presença de sacarose favoreceram o enraizamento dos explantes (FARIA et al., 2006), mostrando a facilidade dessa espécie em enraizar sem a presença de reguladores de crescimento. Isso também foi comprovado no presente trabalho, apesar de não ter ocorrido de forma homogênea para os tratamentos. Em *P. edulis*, os maiores valores de número e comprimento de raiz foram obtidos com 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose sendo que, na ausência desse açúcar, o enraizamento foi inexistente (SOUZA et al., 2021), assim como

nesse trabalho com *P. gibertii*, mostrando a importância desse açúcar para o desenvolvimento radicular do maracujá.

No presente trabalho, também foi possível perceber a influência da sacarose no enraizamento, que foi intensificado em altas concentrações: aos 45 g L<sup>-1</sup>, em luz normal, e aos 60 g L<sup>-1</sup> na luz reduzida. Altas razões de auxina para citocinina são promotoras do desenvolvimento radicular. Adicionalmente, estudos recentes apontam para uma rede sinalizatória durante o enraizamento, envolvendo micro-RNAs no aumento na expressão de genes de biossíntese de auxina a partir da modulação do metabolismo da sacarose, auxiliando no entendimento das respostas na raiz em relação aos níveis desse açúcar (ROCHA et al., 2018; GADDAM et al., 2021), um processo complexo que ainda precisa ser melhor compreendido.

Além de auxiliar no desenvolvimento radicular, a sacarose está envolvida diretamente na sobrevivência dos explantes. Alguns autores afirmam que o enraizamento menos acentuado é capaz de aumentar a longevidade durante o armazenamento *in vitro*, atrasando o período em que os recursos do meio passam a ser limitantes para o crescimento (NASIRUDDIN & ISLAM, 2018). Nesse trabalho, utilizar 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose resultou em maior crescimento da raiz e ainda assim permitiu maior porcentagem de sobrevivência. Porém, concentrações menores desse açúcar, como 15 g L<sup>-1</sup>, também resultou em sobrevivência estatisticamente igual ao 45 g L<sup>-1</sup>, mas com menor desenvolvimento radicular.

Nesse contexto, também é preciso enfatizar que existe um nível ótimo de crescimento radicular para garantir maior sobrevivência (NASIRUDDIN & ISLAM, 2018), em uma associação com o índice de senescência foliar observado. Com 45 g L<sup>-1</sup>, apesar de alta sobrevivência e enraizamento após 180 dias, também foi o tratamento que obteve maior índice de senescência, podendo inferir que a maior taxa metabólica pode ter contribuído para esgotar mais rápido os recursos do meio, que poderia prejudicar o armazenamento *in vitro* por mais tempo. Além disso, nesse trabalho observou-se que outras doses de sacarose que resultaram em menor comprimento de raiz, não necessariamente tiveram melhores índices de sobrevivência, por exemplo 60 g L<sup>-1</sup>.

Um dos principais fatores que prejudicam o armazenamento *in vitro* e, conseqüentemente, a longevidade dos explantes, é a senescência. As espécies de *Passiflora* spp. são reconhecidas como produtoras naturais de etileno durante o cultivo *in vitro*, prejudicando a conservação a longo prazo na ausência de subcultivos (REIS et al., 2003). Seu acúmulo reduz a expansão foliar e comprimento de brotos, o que poderia até ser um aliado durante o crescimento mínimo. No entanto, sua ação inibe a regeneração de brotos e promove abscisão foliar, acelerando os processos senescentes que podem prejudicar a retomada e aclimatização

(TREVISAN & MENDES, 2005; FARIA et al., 2017). Uma forma de evitar esses danos é realizar subcultivos espaçados, aumentando o prazo de estoque sem o seu acúmulo indesejado.

Nesse trabalho, o índice de senescência foi maior aos 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Já no crescimento lento de *P. edulis*, os autores observaram pouca senescência foliar, porém já evidente aos 60 dias de cultivo, mostrando o rápido acúmulo do etileno nas espécies do gênero. Após 120 dias, o menor número de folhas senescentes foi observado em meio de cultura com um quarto das concentrações de sais e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, não sendo verificadas folhas senescentes na ausência de sacarose (SOUZA et al., 2021). O fato de que os tubos de ensaio são fechados impede as trocas gasosas com o meio externo, bloqueando a liberação do etileno e resultando na presença de folhas senescidas (ALVIM et al., 2020).

Nesse trabalho, a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> alcançou o mesmo número de folhas senescidas que 30 e 45 g L<sup>-1</sup> aos 150 dias, levando 30 dias a mais que esses tratamentos. Portanto, apesar de ser a mesma taxa aos 180 dias, ela é mais rápida com 30 e 45 g L<sup>-1</sup>, comparado com 15 g L<sup>-1</sup>. Durante a senescência foliar, os nutrientes são reciclados das folhas mais velhas, modificando as relações fonte e dreno. No entanto, na ausência de tecidos-dreno, os açúcares e demais nutrientes podem se acumular (WINGLER et al., 2018). Aos 15 g L<sup>-1</sup>, como também houve menor crescimento dos brotos, gerou menor demanda por recursos na parte aérea do que as demais doses, resultando na senescência menos acelerada ao longo do armazenamento, indicando haver uma relação entre as diferentes concentrações de sacarose na regulação dos processos senescentes.

Diversas evidências sustentam o papel do acúmulo de sacarose em desencadear a senescência foliar (WINGLER et al., 2018), o que poderia ajudar a explicar o observado nesse trabalho. No entanto, em contraste com as folhas, sintomas de senescência são retardados nas raízes quando se aumentam os níveis de sacarose no meio, sugerindo diferentes respostas desencadeadas pelo status de açúcar nos tecidos. No trabalho atual, observou-se que aumentar a concentração de sacarose resulta em maior desenvolvimento radicular, ao mesmo tempo que promove senescência foliar nas plantas de *P. gibertii*. A senescência é indesejável no crescimento *in vitro*, principalmente objetivando a conservação, devido ao risco de perda de vigor das plantas após o armazenamento (SILVA et al., 2019).

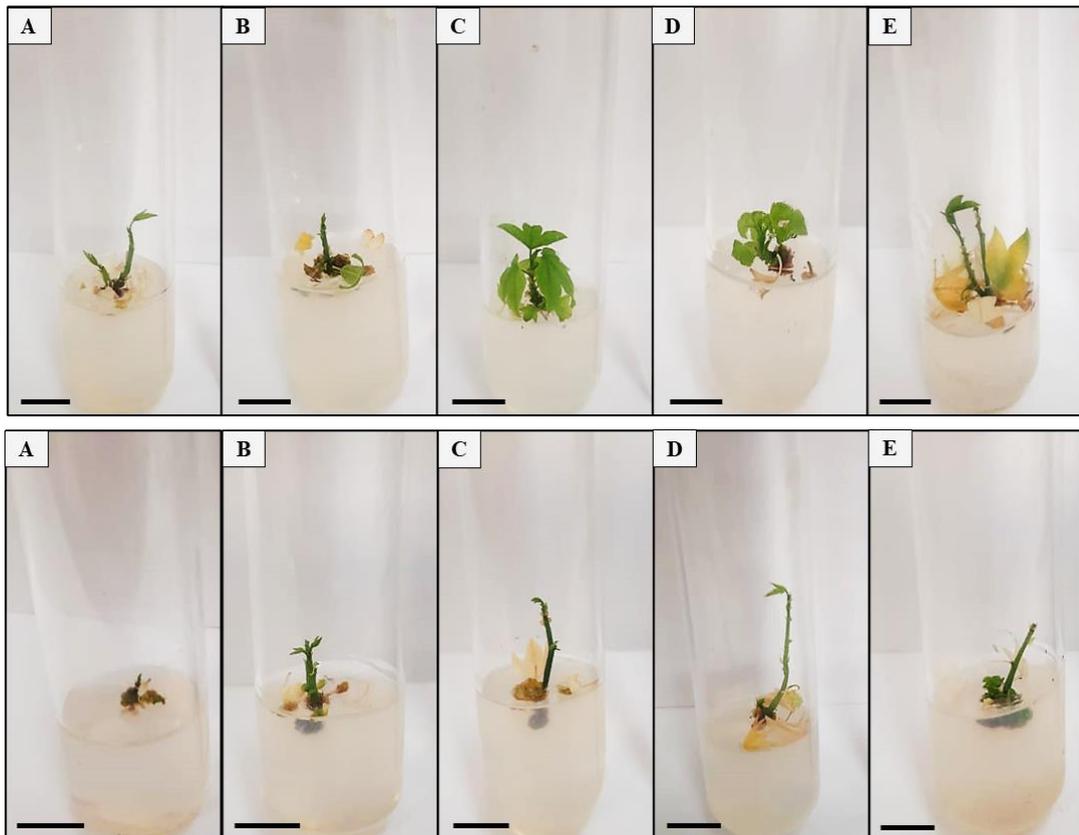
Para o cultivo de *P. gibertii* após três meses (FARIA et al., 2017), os autores estudaram uma possível solução para esse problema. Nesse trabalho, foi visto que 2 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata, um conhecido inibidor da ação do etileno, foi capaz de mitigar a perda de vigor das plantas e desacelerar os processos senescentes. Esses resultados poderiam ser aprofundados em relação à influência do nitrato de prata em conjunto com diferentes concentrações de sacarose

e tipos de luminosidade, após maior tempo de armazenamento dos explantes, contribuindo no avanço do conhecimento sobre a conservação *in vitro* dessa espécie de maracujazeiro.

### 5.2.2 Retomada do crescimento

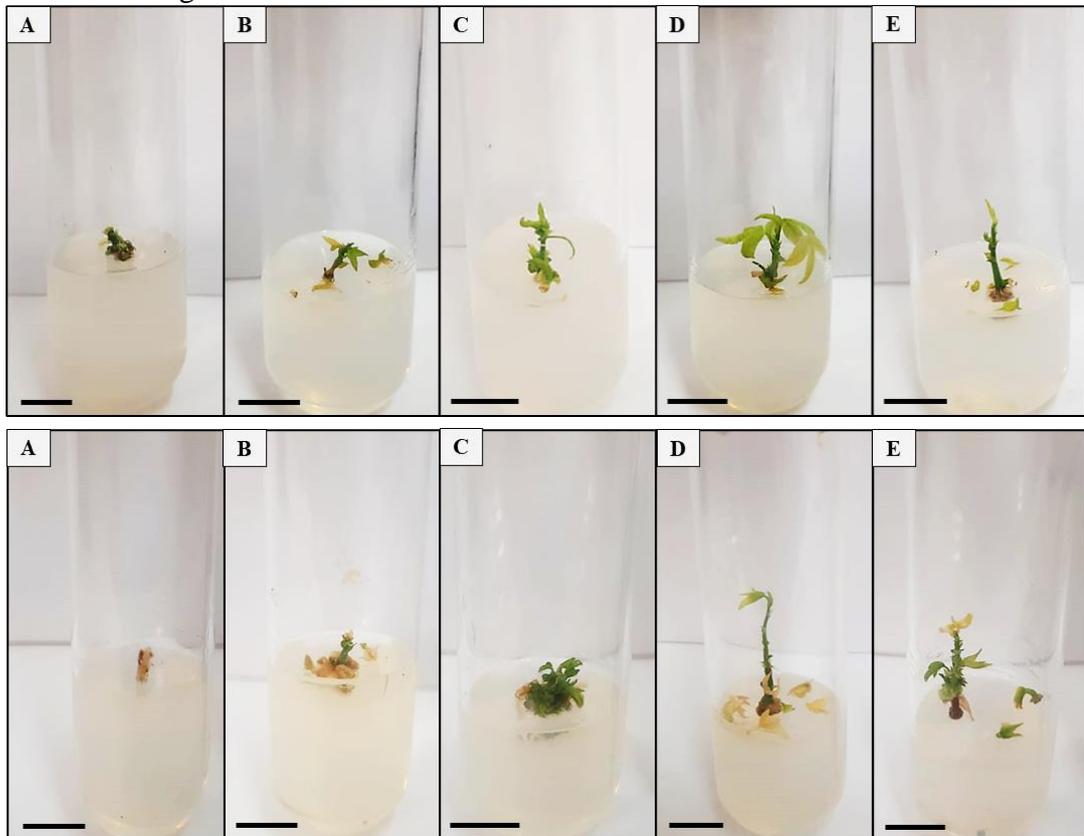
Após 90 e 180 dias de retomada do crescimento dos ápices caulinares, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose (FIGURAS 13A e 13B), foram observadas diferenças estatísticas e interação tripla significativa entre os fatores tempo de cultivo, concentração de sacarose e intensidade luminosa ( $p \leq 0,05$ ), para todas as variáveis (sobrevivência, comprimento de brotos e número de folhas).

Figura 13A – Ápices caulinares após 90 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose, após 60 dias de retomada em  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.



Primeira e segunda linhas representam plantas armazenadas em luminosidade normal e reduzida, respectivamente. Letras representam concentrações de sacarose no meio de cultivo:  $0 \text{ g L}^{-1}$  (A),  $15 \text{ g L}^{-1}$  (B),  $30 \text{ g L}^{-1}$  (C),  $45 \text{ g L}^{-1}$  (D) e  $60 \text{ g L}^{-1}$  (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

Figura 13B – Ápices caulinares após 180 dias de crescimento lento, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose, após 60 dias de retomada em  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

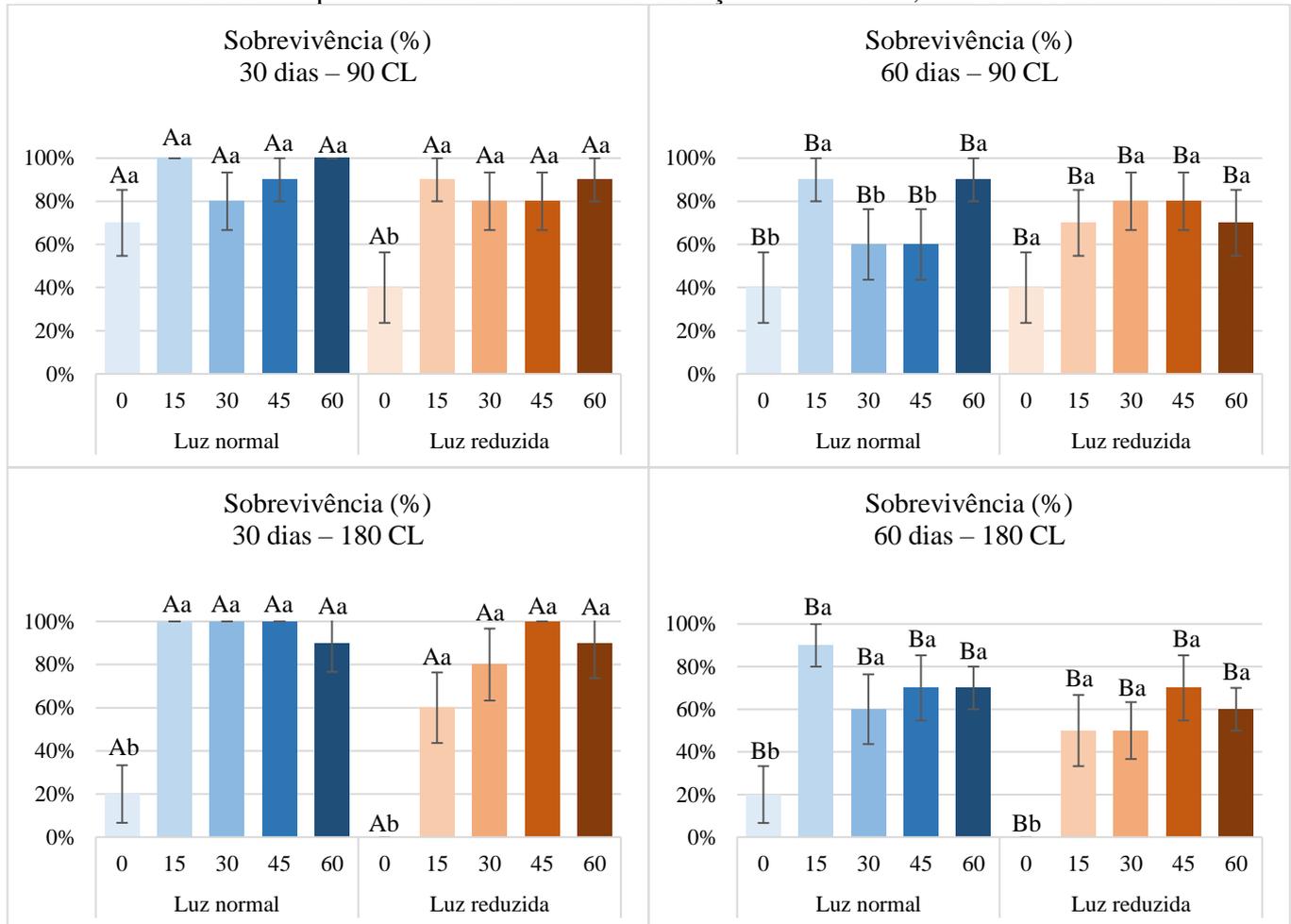


Primeira e segunda linha representam plantas armazenadas em luminosidade normal e reduzida, respectivamente. Letras representam concentrações de sacarose no meio de cultivo:  $0 \text{ g L}^{-1}$  (A),  $15 \text{ g L}^{-1}$  (B),  $30 \text{ g L}^{-1}$  (C),  $45 \text{ g L}^{-1}$  (D) e  $60 \text{ g L}^{-1}$  (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

Após 90 dias de crescimento lento, não houve diferença na porcentagem de sobrevivência entre os tipos de luminosidade, com diminuição dos 30 ( $82,00\%$ ) aos 60 dias ( $68,00\%$ ) de retomada. Após 60 dias, foi observada maior sobrevivência dos explantes quando cultivados em  $15$  e  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $90,00\%$ ), em comparação com as demais ( $53,00\%$ ), em luminosidade normal. Em luminosidade reduzida, a sobrevivência foi a mesma para todos os tratamentos ( $68,00\%$ ).

Após 180 dias de crescimento lento, a sobrevivência foi maior em luminosidade normal ( $67,00\%$ ), do que em reduzida ( $56,00\%$ ), com diminuição dos 30 ( $68,00\%$ ) aos 60 dias ( $55,00\%$ ) de retomada. Após 60 dias, foi observada maior sobrevivência dos explantes quando cultivados na presença de sacarose em comparação com o controle, tanto em luminosidade normal ( $73,00\%$ ) quanto reduzida ( $58,00\%$ ) (FIGURA 14).

Figura 14 – Sobrevivência dos ápices caulinares após 90 e 180 dias de crescimento lento (CL), submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose, aos 30 e 60 dias de retomada.

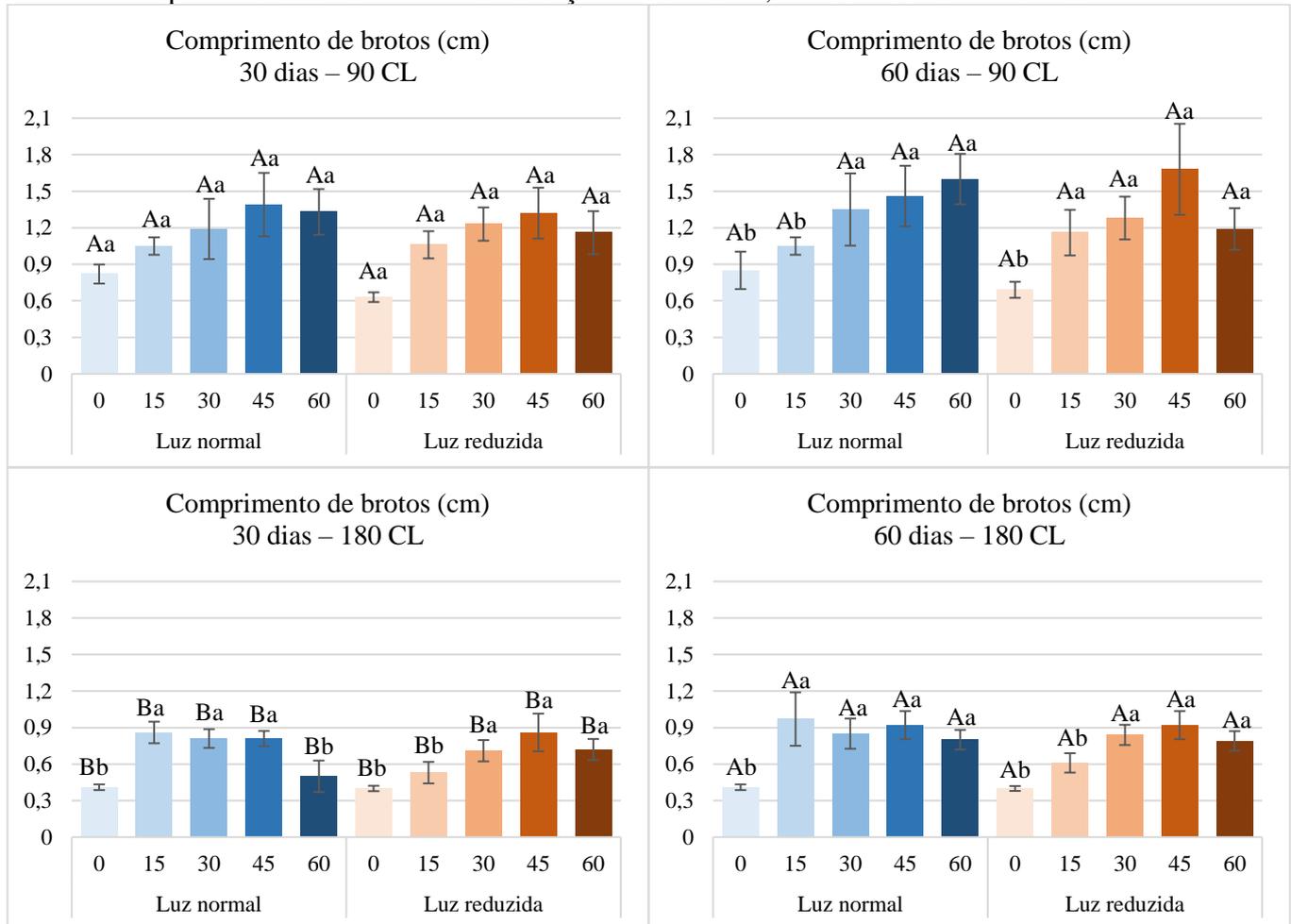


Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de crescimento lento e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre as concentrações de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Após 90 dias de crescimento lento, não houve diferença no comprimento de brotos entre os tipos de luminosidade nem entre os tempos de retomada. Após 60 dias, o comprimento de brotos foi maior nas concentrações 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> (1,47 cm), em comparação com as demais (0,95 cm), em luminosidade normal. Em luminosidade reduzida, o comprimento de brotos foi maior na presença de sacarose (1,32 cm), em comparação com o controle (0,69 cm).

Após 180 dias de crescimento lento, não houve diferença no comprimento de brotos entre os tipos de luminosidade, com aumento dos 30 (0,66 cm) aos 60 dias (0,75 cm) de retomada. Após 60 dias, o comprimento de brotos foi maior na presença de sacarose (0,88 cm), em comparação com o controle (0,41 cm), em luminosidade normal. Em luminosidade reduzida, o comprimento de brotos foi maior nas concentrações 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> (0,85 cm), em comparação com as demais (0,54 cm) (FIGURA 15).

Figura 15 – Comprimento de brotos após 90 e 180 dias de crescimento lento (CL), submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose, aos 30 e 60 dias de retomada.

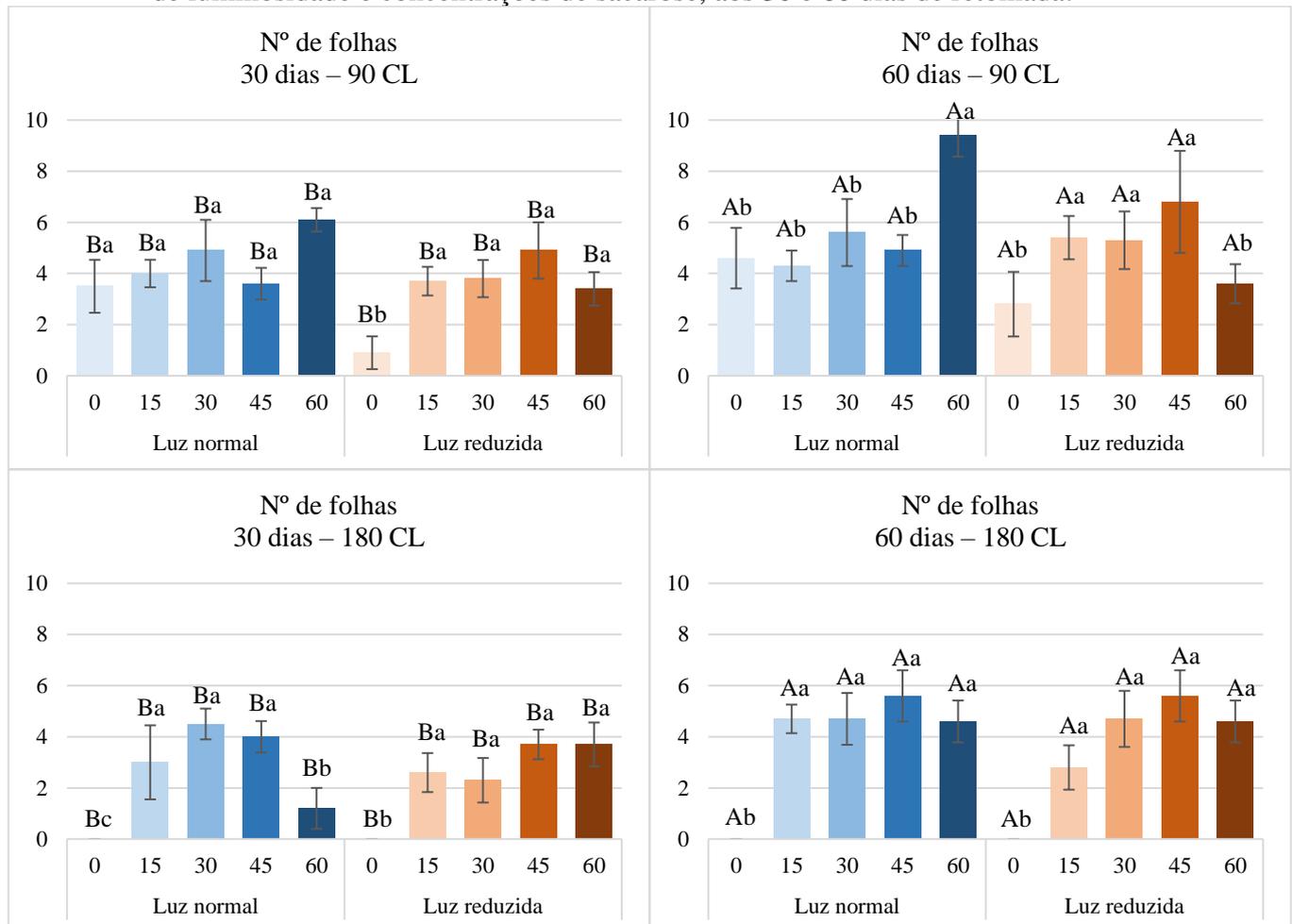


Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de crescimento lento e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre as concentrações de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Após 90 dias de crescimento lento, foi visto maior número de folhas em luminosidade normal (5,09) do que em reduzida (4,06), com aumento dos 30 (3,88) aos 60 dias (5,27) de retomada. Após 60 dias, o número de folhas foi maior com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (9,4), em comparação com as demais (4,85), em luminosidade normal. Em luminosidade reduzida, houve maior número de folhas com 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> (5,83), em comparação com as demais (3,2).

Após 180 dias de crescimento lento, não houve diferença no número de folhas entre os tipos de luminosidade, com aumento dos 30 (2,73) aos 60 dias (3,62) de retomada. Após 60 dias, o número de folhas foi o mesmo para todas as concentrações de sacarose, tanto em luminosidade normal (4,9) quanto reduzida (4,42), sendo ausente no tratamento controle para ambas as condições (FIGURA 16).

Figura 16 – Número de folhas após 90 e 180 dias de crescimento lento (CL), submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose, aos 30 e 60 dias de retomada.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de crescimento lento e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre as concentrações de sacarose, para cada tipo de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Com base nos resultados observados para as variáveis de crescimento, concluiu-se que o armazenamento em luminosidade normal, na presença de sacarose no meio de cultivo, foi a melhor combinação para a retomada de crescimento dos ápices caulinares, após 180 dias de crescimento lento de segmentos nodais de *P. gibertii* e 60 dias de retomada.

O melhor tratamento foi nas condições de luminosidade normal, pois resultou em maior sobrevivência dos explantes do que na reduzida. Em relação à sacarose, foi visto maior comprimento de brotos na presença desse açúcar no meio, em comparação com o controle, após 60 dias de retomada e 180 dias de crescimento lento, com destaque para 60 g L<sup>-1</sup> em relação ao número de folhas, que foi maior após 60 dias de retomada e 90 dias de crescimento lento.

Como dito anteriormente, um dos propósitos durante o armazenamento *in vitro* é que os explantes regenerados continuem apresentando capacidade de retomar o crescimento após a conservação, para que seja considerado um processo eficiente (KAMIŃSKA et al., 2018). Para

verificar a habilidade de retomada dos explantes após o armazenamento, os ápices caulinares podem ser subcultivados em novo meio, em condições que otimizem o crescimento ideal para cada espécie (GARCIA et al., 2011). Nesse trabalho, o meio de cultivo mais adequado para o desenvolvimento e multiplicação de segmentos nodais de *P. gibertii* foi com a presença de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, concentração que também foi escolhida para o subcultivo dos ápices.

Para avaliar a capacidade de retomada após o crescimento lento de *P. suberosa* (GARCIA et al., 2011), os ápices foram retirados e subcultivados em meio MSM, cuja formulação é baseada na composição mineral das folhas do maracujá-amarelo, variando nos tratamentos com 15 ou 7,5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sem citocininas. Após 30 dias, foi visto 100% de recuperação dos ápices em todos os tratamentos, exceto na presença de ABA, que reduziu a sobrevivência em 50% dos explantes. Além disso, não foram avaliados parâmetros de crescimento, que poderiam ser otimizados com o uso do BAP, como no presente trabalho.

Da mesma forma durante a etapa de desenvolvimento e multiplicação de segmentos nodais nesse trabalho, foi possível observar que a competência para a regeneração via organogênese *de novo* varia entre tipos de explantes (ROCHA et al., 2018; BIDABADI & JAIN, 2020). As respostas de crescimento foram distintas entre segmentos nodais e ápices caulinares de *P. gibertii*, na presença da mesma concentração de BAP no meio de cultivo. Além disso, foi possível observar diferenças nas variáveis de crescimento em relação ao tipo de luminosidade e presença de sacarose, principalmente após 180 dias, indicando também que o período de retirada dos ápices influencia no seu desempenho após armazenamento.

Nesse trabalho, a eficiência do processo de regeneração do ápice pode ser confirmada observando o comprimento de brotos. Para esse parâmetro houve aumento dos 30 aos 60 dias, indicando alta capacidade regenerativa, uma vez que as plantas dos quais esses ápices foram retirados já estavam a 180 dias em armazenamento *in vitro*, um resultado satisfatório, apesar de terem atingido pouca altura. Nesse contexto, uma etapa pode ser adicionada ao protocolo de retomada. Muitos trabalhos realizam subcultivos em meio livre de reguladores ou na presença de giberelinas, visando o alongamento de brotos (PHILLIPS & GARDA, 2019), o que poderia ser utilizado para otimizar essa etapa.

A proliferação celular que resulta em crescimento e alongamento, indica a viabilidade do meristema caulinar em retomar o desenvolvimento a partir da gema apical (ROCHA et al., 2018), o que foi representado pela produção de novos brotos e folhas nesse trabalho. Além da importância do BAP no cultivo *in vitro*, foi verificado também que a sacarose é fundamental para permitir a retomada do crescimento, como era esperado. Não houve diferença entre as doses de sacarose para o comprimento de brotos em luminosidade normal. No entanto, em

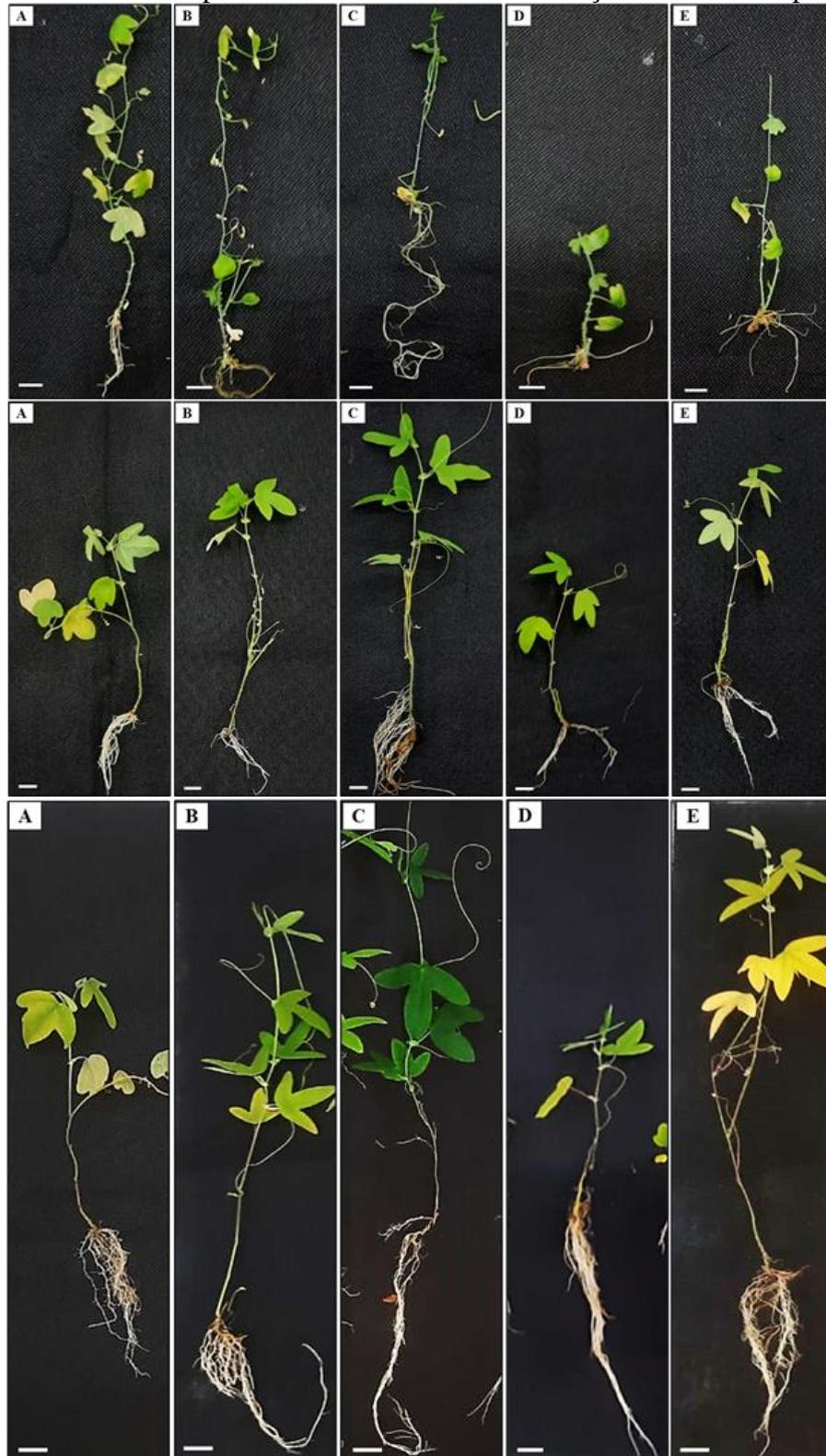
luminosidade reduzida, o comprimento de brotos foi maior nas concentrações maiores de sacarose, representando a necessidade de haver maior fonte de carbono em situações adversas, já que nesse caso a atividade fotossintética é ainda mais reduzida.

A adição exógena de citocinina no meio é fundamental para o desenvolvimento de brotações em algumas espécies, pois tecidos isolados *in vitro* são incapazes de sintetizar o suficiente para assegurar o crescimento, como é o caso dos ápices caulinares (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; OROS et al., 2020). No entanto, a concentração de BAP deve ser reduzida para permitir o alongamento dos brotos (OZAROWSKI & THIEM, 2013; DE FARIA et al., 2018), tendo em vista o menor comprimento obtido nesse trabalho. Nesse contexto, novos estudos podem ser realizados investigando diferentes concentrações de BAP juntamente com os melhores tratamentos para a retomada, na tentativa de otimizar a organogênese também após o armazenamento *in vitro*.

### **5.2.3 Aclimatização**

Após 60 dias de aclimatização das plantas, provenientes do crescimento lento em diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose (FIGURA 17), foram observadas diferenças estatísticas e interação dupla significativa entre os fatores tempo de cultivo e concentração de sacarose ( $p \leq 0,05$ ), para todas as variáveis (peso fresco, comprimento de brotos, comprimento de raízes e número de folhas).

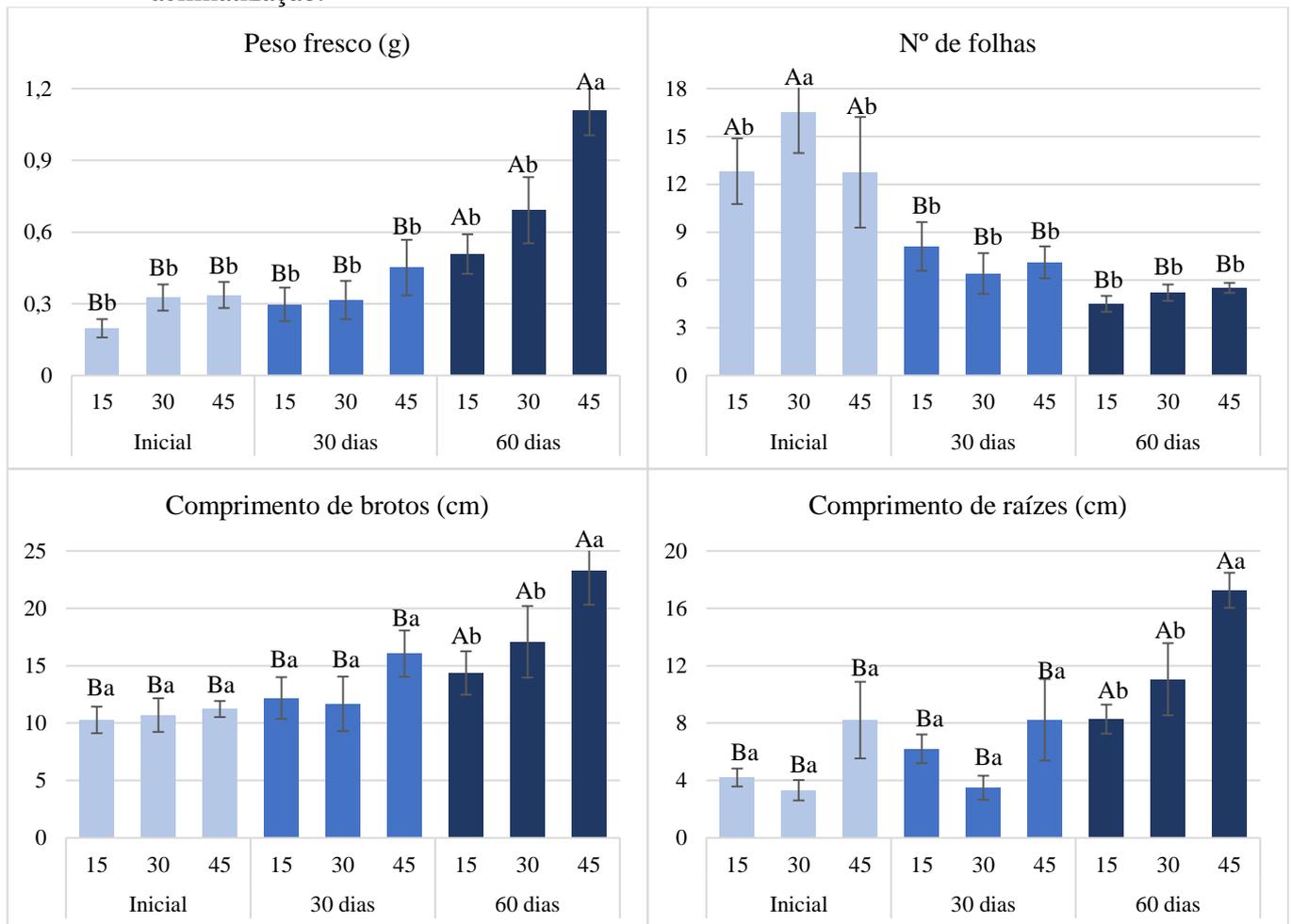
Figura 17 – Plantas ao longo de 60 dias de aclimatização, provenientes do crescimento lento em diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose por 180 dias.



Primeira, segunda e terceira linhas representam plantas aos 0, 30 e 60 dias de aclimatização. Letras representam concentrações de sacarose no meio de cultivo sob luminosidade normal: 15 g L<sup>-1</sup> (A), 30 g L<sup>-1</sup> (B) e 45 g L<sup>-1</sup> (C); e sob luminosidade reduzida: 45 g L<sup>-1</sup> (D) e 60 g L<sup>-1</sup> (E). Barras = 1 cm. Fonte: Da autora (2022).

Em luminosidade normal, para o peso fresco, houve aumento aos 60 dias (0,77 g), em comparação com o valor inicial (0,32 g), sendo maior com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,10 g), em comparação com as demais (0,59 g). Para o comprimento de raízes, também houve aumento aos 60 dias (12,02 cm), em comparação com o valor inicial (5,61 cm), sendo maior com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (17,26 cm), em comparação com as demais (9,67 cm). Para o comprimento de brotos, também houve aumento aos 60 dias (18,25 cm), em comparação com o valor inicial (12,02 cm), sendo maior com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose (23,30 cm), em comparação com as demais (15,73 cm). Para o número de folhas, houve redução a partir dos 30 dias (6,13), sem diferenças entre as concentrações de sacarose, em comparação com o valor inicial (14,03), que foi maior com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (16,54), em comparação com as demais (12,78) (FIGURA 18).

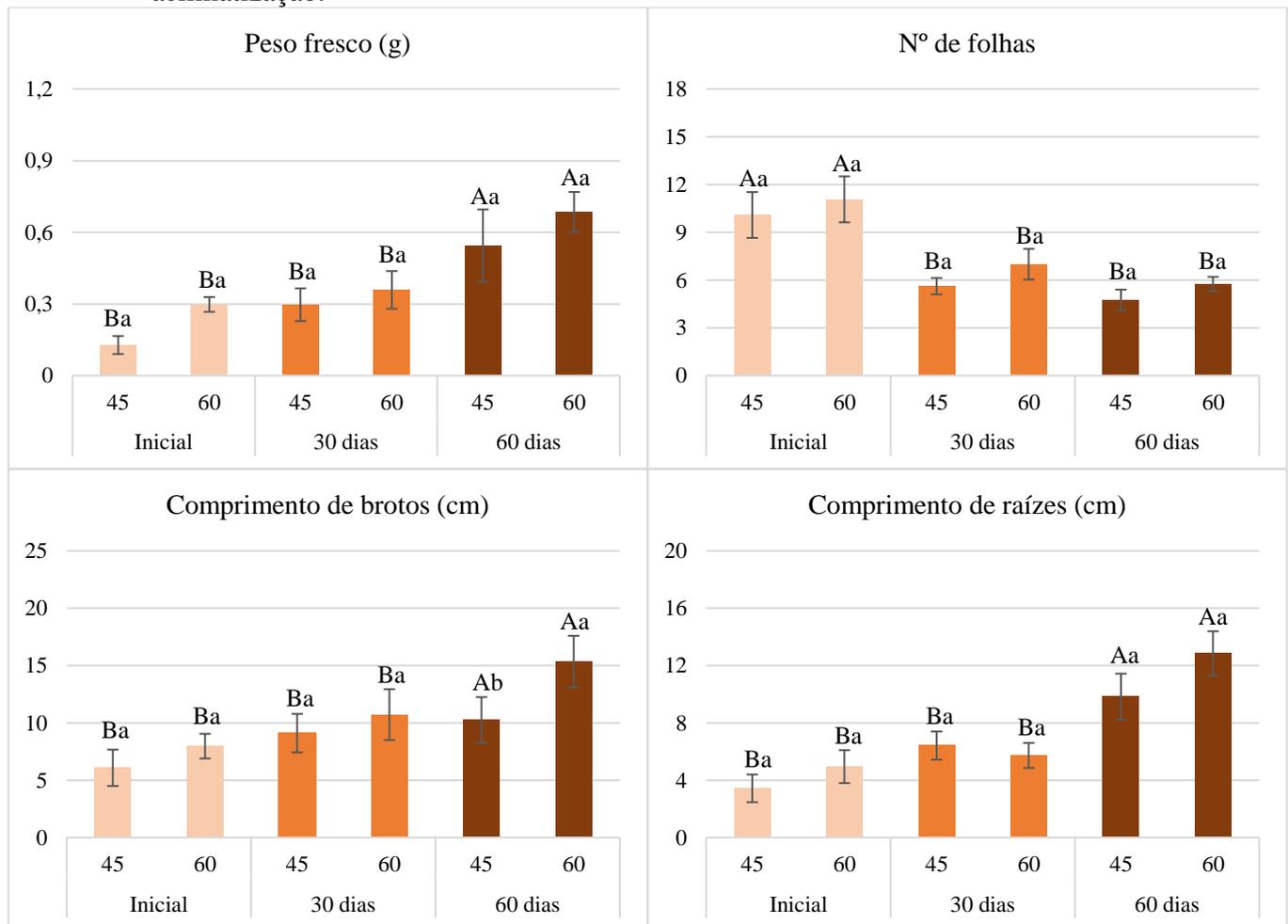
Figura 18 – Peso fresco, número de folhas e comprimento de brotos e raízes de plantas após crescimento lento sob luminosidade normal e diferentes concentrações de sacarose, aos 0, 30 e 60 dias de aclimatização.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre tempos de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre concentrações de sacarose dentro do mesmo tempo de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Já em luminosidade reduzida, para o peso fresco, houve aumento significativo aos 60 dias (0,61 g), em comparação com o valor inicial e aos 30 dias (0,27 g), sem diferenças entre as concentrações de sacarose. Para o comprimento de raízes, também houve aumento aos 60 dias (11,34 cm), em comparação com o valor inicial e aos 30 dias (5,13 cm), sem diferenças entre as concentrações. O mesmo foi visto para o comprimento de brotos, com aumento aos 60 dias (13,30 cm), em comparação com os demais tempos (8,46 cm), sendo maior para as plantas cultivadas em 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose (15,35 cm), em comparação com 45 g L<sup>-1</sup> (10,25 cm). Para o número de folhas, foi observada redução a partir dos 30 dias (5,65), em comparação com o valor inicial (10,58), sem diferenças entre as concentrações (FIGURA 19).

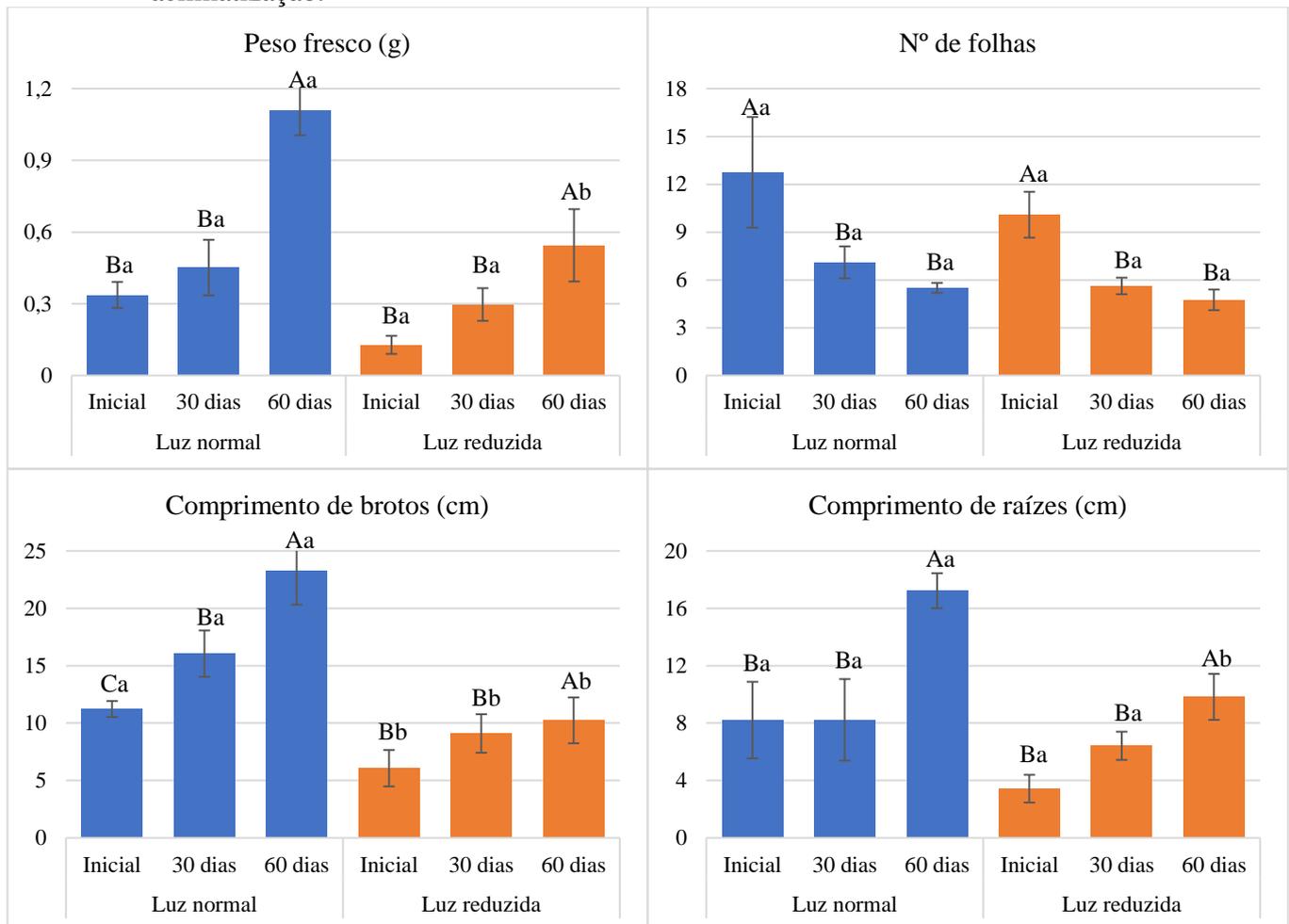
Figura 19 – Peso fresco, número de folhas e comprimento de brotos e raízes de plantas após crescimento lento sob luminosidade reduzida e diferentes concentrações de sacarose, aos 0, 30 e 60 dias de aclimatização.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre tempos de cultivo e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre concentrações de sacarose dentro do mesmo tempo de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Comparando-se as plantas cultivadas em 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foram observadas diferenças estatísticas e interação dupla significativa entre os fatores tempo de cultivo e intensidade luminosa ( $p \leq 0,05$ ). Para o peso fresco, houve aumento aos 60 dias (0,82 g), em comparação com o valor inicial (0,30 g), sendo maior em luminosidade normal (1,10 g), do que em reduzida (0,54 g). Para o comprimento de raízes, também houve aumento aos 60 dias (13,53 cm), em comparação com o valor inicial (6,57 cm), sendo maior em luminosidade normal (17,23 cm), do que em reduzida (9,83 cm). Para o comprimento de brotos, houve aumento do valor inicial (8,65 cm) para os 30 (12,58 cm) e 60 dias (16,77 cm), sendo maior em luminosidade normal (16,86 cm), do que em reduzida (8,47 cm), para todos os tempos observados. Para o número de folhas, houve redução a partir dos 30 dias (5,74), em comparação com o valor inicial (11,42), sem diferença entre os tipos de luminosidade (FIGURA 20).

Figura 20 – Peso fresco, número de folhas e comprimento de brotos e raízes de plantas após crescimento lento sob diferentes tipos de luminosidade e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, aos 0, 30 e 60 dias de aclimatização.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos de cultivo, para cada tipo de luminosidade, e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre os tipos de luminosidade, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2022).

Com base nos resultados observados para as variáveis de crescimento, a aclimatização foi melhor sucedida para plantas cultivadas em 45 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup>, provenientes do armazenamento em luminosidade normal e reduzida, respectivamente, após 180 dias de crescimento lento e 60 dias de cultivo *ex vitro*. No entanto, considerando os demais parâmetros avaliados anteriormente, concluiu-se que 45 g L<sup>-1</sup> em luminosidade normal foi a melhor combinação para garantir resultados satisfatórios em relação às três etapas, simultaneamente.

As técnicas de micropropagação de espécies de *Passiflora* spp. têm sido estudadas desde a década de 60, quando foi realizado o primeiro cultivo de segmentos nodais de *P. caerulea* (MIKOVSKI et al., 2019). Durante esse processo, os objetivos principais são o estabelecimento dos explantes e desenvolvimento dos brotos, seguido pelo seu enraizamento. Nesse contexto, uma das etapas mais críticas é a aclimatização, o último estágio que representa a transição do cultivo *in vitro* para *ex vitro* (ISUTSA et al., 2004). Dentro do gênero, alguns estudos refletem dificuldades nessa etapa, no que se refere à viabilidade das plantas (GARCIA et al. 2011; MANOKARI & SHEKHAWAT, 2017), o que não foi observado nesse trabalho, havendo 100% de sobrevivência para todos os tratamentos.

Diferentes concentrações de sacarose podem influenciar o desempenho de plantas na aclimatização, o que foi confirmado nesse trabalho e também para outras espécies. Após aclimação de plantas de *P. edulis* (SOUZA et al., 2021), os autores observaram desenvolvimento radicular adequado, condição necessária para sua sobrevivência no campo. Além disso, foi visto que a adição de sacarose resultou em maior número de folhas e raízes, quando comparado com plantas cultivadas sem sacarose. Em plantas de videira cultivadas em doses crescentes de sacarose e aclimatizadas por 35 dias (TANNO & BIASI, 2013), os autores observaram que, nas concentrações 15 e 30 g L<sup>-1</sup>, 100% das plantas desenvolveram raízes, com maior comprimento e número de folhas do que na ausência de sacarose.

Nas duas condições luminosas durante o armazenamento *in vitro*, a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> favoreceu o estabelecimento de plantas com raízes e sua aclimatização. No entanto, existe nesse trabalho uma interação significativa em relação ao tipo de luminosidade, já que melhores parâmetros de crescimento foram obtidos em luminosidade normal. Para o peso fresco e o comprimento de raízes, o efeito da luminosidade só é observado aos 60 dias, quando a diferença passa a ser significativa, sendo maior em luz normal. Para o comprimento da parte aérea, há diferenças em todos os tempos de avaliação, indicando que o crescimento é mais acelerado em luminosidade normal. Já para o número de folhas, o valor é o mesmo, independentemente da condição luminosa.

Nesse trabalho, o uso de 45 g L<sup>-1</sup> promoveu melhor desenvolvimento de plantas durante a aclimatização, em luminosidade normal. Em luz reduzida, a melhor concentração foi 60 g L<sup>-1</sup>, indicando que, havendo redução de luz, se faz necessário aumentar a concentração de sacarose para manter a viabilidade das plantas. A importância de concentrações maiores de sacarose para a aclimatização de plantas de *P. gibertii* foi confirmada, refletindo os resultados ao longo do crescimento lento. Isso implica afirmar que os explantes com 180 dias não perdem a viabilidade após a transição para o cultivo *ex vitro*, nos melhores tratamentos utilizados durante o armazenamento, reforçando que é possível o crescimento lento de *P. gibertii* durante pelo menos 180 dias, sem afetar o metabolismo das plantas pós conservação *in vitro*.

Em relação ao número de folhas, percebe-se um decréscimo ao longo da aclimatização, ao mesmo tempo que há aumento no comprimento da parte aérea. Isso pode ser explicado devido ao comportamento desses indivíduos *in vivo*. À medida que o maracujazeiro cresce em altura, seu espaço entrenó aumenta, diminuindo a quantidade de nós de inserção foliar e resultando em menor número de folhas nessa transição para o cultivo *ex vitro*. Assim, ocorre a perda de suas pequenas e numerosas folhas desenvolvidas *in vitro* para originar folhas maiores ao longo do desenvolvimento (SANTOS et al., 2012; BERNARDES et al., 2020). Em resumo, a redução do número de folhas indica, portanto, que houve crescimento das plantas.

Além disso, em luminosidade normal, o número de folhas decresce a partir dos 30 dias, porém o comprimento de brotos só aumenta estatisticamente aos 60 dias. Isso pode indicar uma adaptação gradual ao substrato e condições *ex vitro*, sendo que as folhas desenvolvidas nas plantas *in vitro* são primeiramente perdidas e, com isso, a planta desvia recursos metabólicos para o alongamento celular, resultando no crescimento mais tardio de brotos (BERNARDES et al., 2020). Esse comportamento foi independente da concentração de sacarose, apesar de ter sido visto maior crescimento dos brotos na dose 45 g L<sup>-1</sup>.

Existem várias maneiras de realizar a aclimatização, garantindo uma transição saudável das plantas para as condições *ex vitro*. Apesar de ter o ambiente controlado em sala de cultivo, é necessária a adaptação para uma condição de umidade mais baixa e maior luminosidade, fatores críticos para o estabelecimento. Nesse contexto, a formação de raízes *in vitro* é benéfica e favorável para a sobrevivência das plantas (ISUTSA et al., 2004). Nesse trabalho, foi visto que os mesmos tratamentos que promoveram maior enraizamento durante o crescimento lento foram também os que se desenvolveram melhor na aclimatização.

Sem um sistema radicular eficaz, a aclimatização se torna um processo difícil, impossibilitando o estabelecimento da planta e impedindo sua transferência ao campo (SHEKHAWAT et al., 2015). Dentre os fatores internos que regulam o enraizamento, o papel

mais importante é atribuído às auxinas. Após aclimatização de *P. caerulea* (JAFARI; DANESHVAR; LOTFI, 2017), foi obtida porcentagem máxima de enraizamento (90%) e maior número de raízes (9,83) na presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o que poderia ser utilizado em uma etapa adicional nesse trabalho, visando otimizar o enraizamento em *P. gibertii* e a aclimatização de mais plantas, já que o melhor tratamento gerou 60% de raízes nos explantes, após 180 dias.

Existem poucos relatos sobre diferenças na irradiância luminosa influenciando no estabelecimento e desempenho de plantas ao longo da aclimatização em *Passiflora* spp. Em um trabalho utilizando plântulas de uma espécie híbrida entre *P. subblanceolata* e *P. foetida*, os autores investigaram as variáveis de crescimento em relação a diferentes níveis de sombreamento. Foi visto que os genótipos híbridos sob 75 % de sombreamento tiveram maior número de folhas, aumento da distância entrenós e maior diâmetro do caule, apresentando tolerância à sombra moderada (SANTOS et al., 2012).

Além disso, alguns estudos já verificaram que a qualidade da luz é outro fator que pode otimizar o crescimento. Em *P. edulis*, os autores notaram que a aclimatização foi bem sucedida utilizando uma tela sombrite vermelha ao redor das plantas, que obtiveram maior diâmetro do caule, número de folhas e massa seca após 60 dias (DE OLIVEIRA et al., 2020). Isso também foi visto durante micropropagação de *P. edulis*, usando uma alta proporção de luz vermelha durante o cultivo (CHEN; CHANG; LIN, 2020), resultando em plantas de alta qualidade e até mesmo com maior teor de clorofila (2,71 mg g L<sup>-1</sup>), após 3 meses. Isso revela o potencial de se estudar respostas à luz como uma forma de melhorar os protocolos existentes. Adicionalmente, percebe-se a falta de estudos com espécies silvestres novamente na etapa de aclimatização.

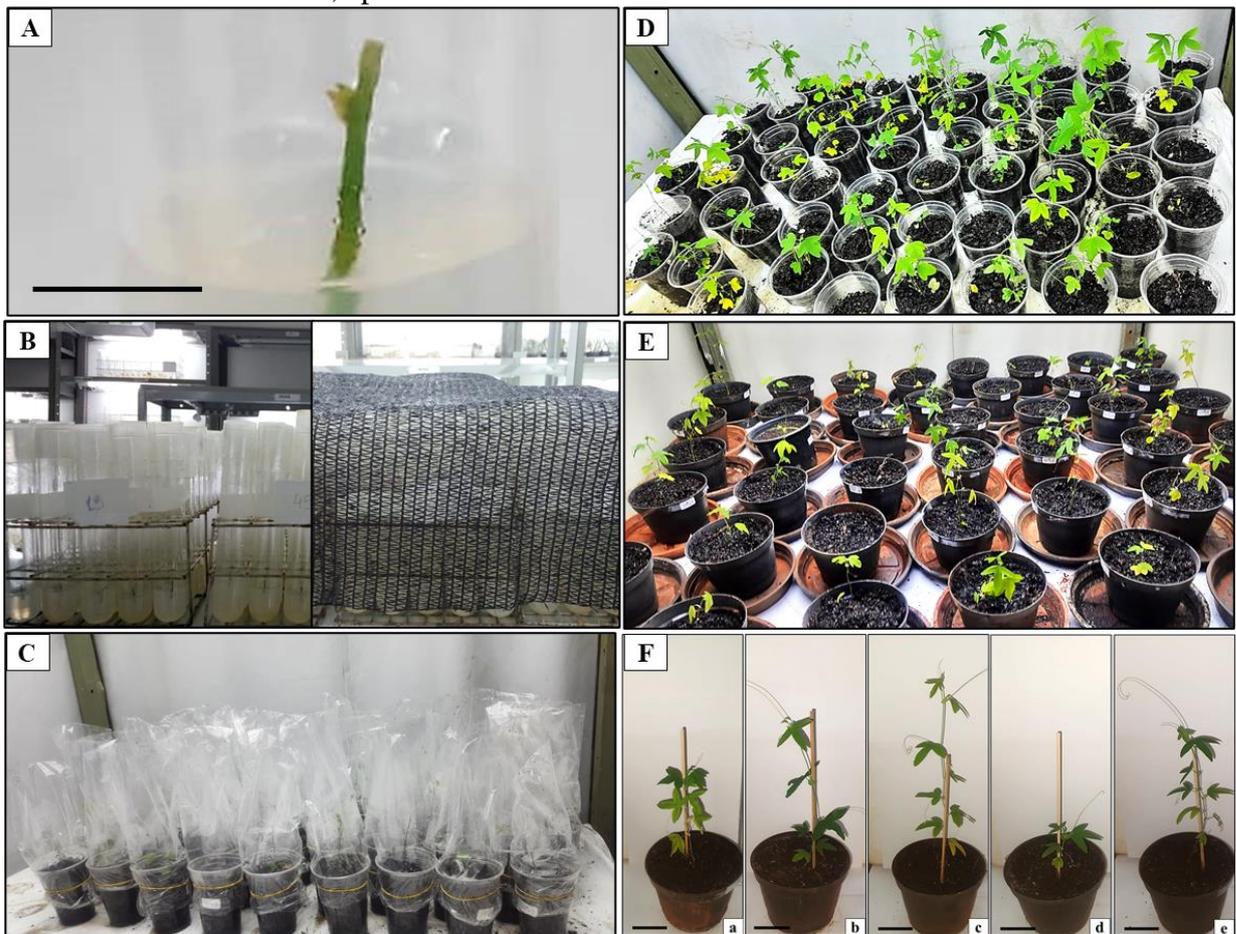
Diferenças morfológicas também acompanham a aclimatização. Em *Passiflora* spp., as folhas desenvolvidas *in vitro* são geralmente pequenas, raramente trilobadas e de coloração verde-clara. No campo, possuem folhas mais brilhantes, indicando melhor atividade fotossintética (MANOKARI & SHEKHAWAT, 2017). Durante a aclimatização de *P. gibertii*, notou-se características transicionais entre as condições *in vitro* e no campo, com folhas trilobadas, porém em verde mais claro. Os ajustes morfológicos são consequência da adaptação aos ambientes de cultivo (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), o que ajuda a explicar porque houve modificação nas variáveis de crescimento após 60 dias de aclimatação, em relação ao observado após 180 dias de armazenamento.

Por fim, em relação ao crescimento geral, destaca-se a importância da função meristemática em brotos e raízes, que são capazes de manter suas atividades mesmo após a remoção de parte de sua estrutura. E mesmo quando os meristemas são totalmente excisados, as células vegetais possuem capacidade de produzir novos brotos e raízes laterais, via

organogênese *de novo* (BIDABADI & JAIN, 2020). Assim como visto durante as etapas de desenvolvimento, multiplicação e retomada de crescimento, os segmentos nodais e ápices caulinares foram capazes de se regenerar *in vitro*. Além disso, após 180 dias, as plantas doadoras dos ápices foram as mesmas que foram submetidas à aclimatização, apresentando bom desenvolvimento *ex vitro*. Isso mostra o potencial de multiplicação de *P. gibertii* e aclimatização de plantas resultantes, sem haver perda de viabilidade após o armazenamento, um dos objetivos da conservação *in vitro* a partir da técnica utilizada.

Ao final da aclimatização, foram obtidas novas plantas-matrizes a partir do desenvolvimento de segmentos nodais armazenados via crescimento lento, após um total de 240 dias de experimento (FIGURA 21).

Figura 21 – Crescimento lento de segmentos nodais, submetidos a diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose e aclimatização das plantas resultantes, após 240 dias.



Segmento nodal inoculado em meio de cultivo para indução de crescimento lento. Barra = 1 cm (A). Segmentos nodais armazenados em diferentes tipos de luminosidade: normal e reduzida (B). Plantas após 180 dias de crescimento lento, no dia inicial da aclimatização (C). Plantas após 30 (D) e 60 (E, F) dias de aclimatização. Letras minúsculas representam concentrações de sacarose no meio de cultivo sob luminosidade normal: 15 g L<sup>-1</sup> (a), 30 g L<sup>-1</sup> (b) e 45 g L<sup>-1</sup> (c); e sob luminosidade reduzida: 45 g L<sup>-1</sup> (d) e 60 g L<sup>-1</sup> (e). Barras = 5 cm. Fonte: Da autora (2022).

## 6 CONCLUSÃO

Com a finalização deste trabalho, foi possível estabelecer um protocolo completo de conservação *in vitro* para a espécie *P. gibertii*, a partir do uso de segmentos nodais, por meio da técnica de armazenamento via crescimento lento, que permitiu a retomada do crescimento dos ápices caulinares e aclimatização das plantas resultantes, em um período de 240 dias.

Conclui-se que 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP é tratamento mais adequado para o desenvolvimento e multiplicação dos segmentos nodais. Além disso, o armazenamento em luminosidade normal, com 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose, é a combinação mais adequada para o crescimento lento, após 180 dias. Já o armazenamento em luminosidade normal, na presença de sacarose, é a combinação mais adequada para a retomada de crescimento dos ápices caulinares, após 60 dias. Por fim, a aclimatização é melhor sucedida para plantas cultivadas em 45 g L<sup>-1</sup> e 60 g L<sup>-1</sup>, provenientes do armazenamento em luminosidade normal e reduzida, respectivamente, após 60 dias de cultivo *ex vitro*.

De forma geral, recomenda-se o cultivo de segmentos nodais de *P. gibertii* em 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose e armazenamento em luminosidade normal, para obter melhores parâmetros de crescimento nas três etapas do protocolo de conservação *in vitro*, simultaneamente.

## REFERÊNCIAS

- ALVIM, B. F. M. et al. ***In vitro* conservation of *Amburana cearensis* (Fabaceae).** Ciência Rural, v. 50, n. 7, 2020.
- ANTONIAZZI, C. A. et al. ***In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims).** Scientia Horticulturae, v. 238, p. 408-415, ago. 2018.
- ARAÚJO, D. S. et al. **Crioprotetores na criopreservação de sementes de *Passiflora mucronata* Lam.** Iheringia Série Botânica, 74: e2019008, out. 2019.
- ARTIOLI-COELHO, F. A. et al. **Vitamin C and total phenols quantification in calli of native passion fruit induced by combinations of Picloram and Kinetin.** Ciência Rural, v. 45, n. 8, p. 1459-1465, ago. 2015.
- ASANDE, L. K. et al. **Efficient shoot organogenesis using leaf disc and nodal explants of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) and genetic fidelity assessment using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers.** International Journal of Agronomy, v. 2020, n.10, p. 1-10, jul. 2020.
- BANASIAK, M.; SNYMAN, S. J. **Exploring *in vitro* germplasm conservation options for sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) in South Africa.** In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v. 53, n. 4, p. 402-409, jul. /ago. 2017.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A. et al. **Effect of LED lighting on physical environment and microenvironment on *in vitro* plant growth and morphogenesis: the need to standardize lighting conditions and their description.** Plants, v. 11, n. 1, p. 60, jan. 2022.
- BELLON, M. R. et al. ***In situ* conservation – harnessing natural and human-derived evolutionary forces to ensure future crop adaptation.** Evolutionary applications, v. 10, n. 10, p. 965-977, set. 2017.
- BENELLI, C. et al. **An improved encapsulation protocol for the propagation and conservation of four ornamental species.** Acta Societatis Botanicorum Poloniae, v. 86, n. 3, p. 1-12, set. 2017.
- BERNACCI, L. C. et al. ***Passiflora* in Flora do Brasil 2020.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- BERNACCI, L.C. et al. **Maracujá–doce: O autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae).** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 2, p. 355-356, ago. 2003.
- BERNARDES, P. M. et al. **Vegetative and reproductive performance of species of the genus *Passiflora*.** Scientia Horticulturae, v. 265, p. 109193, fev. 2020.
- BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. **Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration.** Plants, v. 9, n. 6, p. 702, jun. 2020.

- BIDAK, L. M. et al. **Sustainability potential for *Ginkgo biloba* L. plantations under climate change uncertainty: An *ex-situ* conservation perspective.** Acta Ecologica Sinica, set. 2021.
- BORGES, K. F. et al. **A família Passifloraceae sensu stricto do Espírito Santo, Brasil.** Rodriguesia, v. 71, e03212018, jan. 2020.
- CARMO, T. V. B. et al. **Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers.** Revista Caatinga, v. 30, p. 68-77, jan. /mar. 2017.
- CARVALHO, M. A. D. F. et al. **Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli.** Brazilian Journal of Botany, v. 36, n. 2, p. 141-151, jul. 2013.
- CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA (CNCFLORA). **Passifloraceae.** Disponível em: <<http://www.cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha/PASSIFLORACEAE>>. Acesso em: 14 nov. 2021.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B, M. et al. **The genetic diversity, conservation and use of passion fruit (*Passiflora* spp.).** In: AHUJA, M. R.; MOHAN-JAIN, S. Sustainable Development and Biodiversity: Genetic Diversity and Erosion in Plants. 2. ed. New York: Springer International Publishing, v. 2, 2016.
- CHAUHAN, R. et al. ***In vitro* slow-growth storage of *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand: a critically endangered herb.** In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, v. 52, n. 3, p. 315-321, mar. 2016.
- CHAUHAN, R.; SINGH, V.; QURAIISHI, A. ***In Vitro* Conservation Through Slow-Growth Storage.** In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 482 p.
- CHEN, Y. C.; CHANG, C.; LIN, H. **Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) “Tainung No. 1”.** HortScience, v. 55, n. 8, p. 1337-1344, jul. 2020.
- COELHO, S. V. B. et al. **Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to subzero temperatures.** Ciência e Agrotecnologia, v. 41, p. 312-321, maio/ jun. 2017.
- DA SILVA, D. P. C. et al. ***In vitro* conservation of ornamental plants.** Ornamental Horticulture, v. 24, p. 28-33, jan. 2018.
- DA SILVA, M. L. et al. **Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental.** Ornamental Horticulture, v. 21, n. 3, p. 331-338, nov. 2015.
- DA SILVA, N. T. et al. **Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 142, n. 3, p. 613-624, set. 2020.

DE CARVALHO, P. P. et al. **Regeneração *in vitro* de *Passiflora miniata* Mast.** Ornamental Horticulture, v. 23, n. 1, p. 88-95, mar. 2017.

DE FARIA, R. B. et al. **High responsiveness in *de novo* shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species.** In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v. 54, n. 2, p. 166-174, jan. 2018.

DE LACERDA, L. F. et al. **Growth, anatomy and histochemistry of fast growing species under *in vitro* conservation through mineral oil and low-temperature combination.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 144, n. 1, p. 143-156, 2021.

DE MOURA, K. P. A. et al. **Farinha do albedo do maracujá (*Passiflora edulis* Sims) para o enriquecimento de produtos cárneos: uma revisão.** Research, Society and Development, v. 10, n. 8, p. e53110817603-e53110817603, jul. 2021.

DE OLIVEIRA, B. R. et al. **Different substrates and environments in the production of passion fruit seedlings.** Científica, v. 48, n. 2, p. 154-159, 2020.

EL-DAWAYATI, M. M. ***In vitro* slow growth storage of date palm *Phoenix dactylifera* cv. Gondelah using somatic embryo and the shoot cultures.** Middle East Journal of Agriculture Research, v. 9, n. 4, p. 721-736, out. /dez. 2020.

ENGELMANN, F. **Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity.** In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, v. 47, n. 1, p. 5-16, jan. 2011.

ENGELS, J. M. M; EBERT, A. W. **A critical review of the current global *ex situ* conservation system for plant agrobiodiversity.** I. History of the development of the global system in the context of the political/legal framework and its major conservation components. Plants, v. 10, n. 8, p. 1557, ago. 2021.

FAISAL, M.; ALATAR, A. A. **Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects.** Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 482 p.

FALEIRO, F. G. et al. 2011. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – histórico e perspectivas.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 36p.

FALEIRO, F. G. et al. **Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 41, n. 2, (e-155), abr. 2019.

FALEIRO, F. G. et al. **Avanços e Perspectivas do Melhoramento Genético de Passifloras no Brasil.** In: MORERA MP, MORERA M, COSTA A, FALEIRO F, CARLOSAMA A, CARRANZA C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. Embrapa Cerrados - Livro técnico. Brasília: ProImpress, p. 73-83, 2018.

FARIA, G. A. et al. **Concentrations of silver nitrate in the *in vitro* development and conservation of *Passiflora gibertii* N. E. Brown.** American Journal of Plant Sciences, v. 8, n. 12, p. 2944-2955, nov. 2017.

FARIA, G. A. et al. **Sucrose and sorbitol effect in the *in vitro* conservation of *Passiflora gibertii* N E. Brown.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 28, n. 2, p. 267-270, ago. 2006.

FEHÉR, A. **Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis:** what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 536, 2019.

FENTAHUN, M. et al. **In vitro protocol optimization for micropropagation of elite lemmon verbena (*Aloysia triphylla*).** *African Journal of Plant Science*, v. 11, n. 10, p. 369-376, out. 2017.

FERREIRA, D. F. **Sisvar:** a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar. /abr. 2014.

FERREIRA, F. R. **Germoplasma de fruteiras.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, p. 1-6, out. 2011.

FISCHER, G.; MIRANDA, D. **Review on the ecophysiology of important Andean fruits: *Passiflora* L.** *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, v. 74, n. 2, p. 9471-9481, maio/ ago. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Genebank Standards for Plant.** Genetic Resources for Food and Agriculture. Disponível em:

<<http://www.fao.org/3/i3704e/i3704e.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

GADDAM, S. R. et al. **miR775 integrates light, sucrose and auxin associated pathways to regulate root growth in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Science*, v. 313, p. 111073, dez. 2021.

GALLO-CAJIAO, E. et al. **Crowdfunding biodiversity conservation.** *Conservation Biology*, v. 32, n. 6, p. 1426-1435, dez. 2018.

GARCIA, R. O. et al. **In vitro conservation of *Passiflora suberosa* L.:** slow growth and cryopreservation. *CryoLetters*, v. 32, n. 5, p. 377-388, ago. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture.** Dordrecht: Springer Science & Business Media, 3. ed., 2008.

GOMES, F. et al. **Medium-term in vitro conservation of *Castanea* spp. hybrid clones.** *Vegetos*, v. 34, n. 1, p. 127-137, fev. 2021.

HAMMOND, S. D. H. et al. **Efficient slow-growth conservation and assessment of clonal fidelity of *Ullucus tuberosus* Caldas microshoots.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 138, n. 3, p. 559-570, 2019.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; GENEVE, R. L. **Hartmann & Kester's plant propagation principles and practices.** Prentice Hall, 8. ed., 2011. 921 p.

HUANG, H. P. et al. **Germplasm preservation in vitro of *Polygonum multiflorum* Thunb.** *Pharmacognosy Magazine*, v. 10, p. 179-184, abr. /jun. 2014.

HUH, Y. S.; LEE, J. K.; NAM, S. Y. **Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims).** Journal of Plant Biotechnology, v. 44, n. 3, p. 335-342, set. 2017.

IMIG, D. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; CERVI, A. C. **Passifloraceae sensu stricto de Minas Gerais, Brasil.** Rodriguesia, v. 69, p. 1701-1735, out. /dez. 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção Agrícola Municipal**, 2019. Disponível em:

<[http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/maracuja/b1\\_maracuja.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf)>. Acesso em: 13 nov. 2021.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **IUCN Red List of Threatened Species**, 2020. Disponível em:

<<https://www.iucnredlist.org/search/stats?query=plantae&searchType=species>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

ISUTSA, D. K. **Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties.** Scientia Horticulturae, v. 99, n. 3-4, p. 395-400, 2004.

JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H.; LOTFI, A. ***In vitro* shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants.** Biotechnologia, v. 98, n. 2, p. 113-119, jul. 2017.

JAVED, S. B. et al. **Synthetic seeds production and germination studies, for short term storage and long-distance transport of *Erythrina variegata* L.: a multipurpose tree legume.** Industrial Crops and Products, v. 105, p. 41-46, out. 2017.

KAMIŃSKA, M. et al. **Effect of jasmonic acid on cold-storage of *Taraxacum pinnatum* encapsulated shoot tips.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 135, p. 487-497, ago. 2018.

KLAVINA, D.; KLAVINA, D. ***Ex situ* conservation of endangered plant species of Latvia by slow growth storage.** Environmental and Experimental Biology, v. 16, n. 2, p. 129-138, 2018.

LEAL, A. E. P. B. et al. **Atividade ansiolítica e sedativa de espécies do gênero *Passiflora* – um mapeamento científico e tecnológico.** Cadernos de Prospecção, Salvador, v. 9, n. 3, p. 323-336, jul./set. 2016.

LEE, J. et al. **Effects of *Passiflora incarnata* Linnaeus on polysomnographic sleep parameters in subjects with insomnia disorder: a double-blind randomized placebo-controlled study.** International clinical psychopharmacology, v. 35, n. 1, p. 29-35, jan. 2020.

LIU, U. et al. **The conservation value of germplasm stored at Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK.** Biodiversity and Conservation, n. 27, p. 1347-1386, jan. 2018.

MADALENA, J. O.; COSTA, A. M.; LIMA, H. C. **Avaliação de usos e conhecimentos de maracujás nativos como meio para definição de estratégias de pesquisa e transferência**

**de tecnologia.** Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 30, n. 1/3, p. 55-72, jan./dez. 2013.

MAGRAY, M. M. et al. **Synthetic seed technology.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 6, n. 11, p. 662-674, nov. 2017.

MANCILLA-ÁLVAREZ, E. et al. **In vitro techniques to the conservation and plant regeneration of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott).** HortScience, v. 54, n. 3, p. 514-518, mar. 2019.

MANOKARI, M.; SHEKHAWAT, M. S. **Comprehensive analysis of *in vitro* to field transition of micromorphology and leaf architecture in *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.** Indian Journal of Plant Physiology, v. 22, n. 2, p. 240-246, 2017.

MATHEW, L. et al. **Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips.** Protoplasma, n. 255, p. 1065-1077, fev. 2018.

MATSUMOTO, T. **Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods.** Reviews in Agricultural Science, v. 5, p. 13-20, fev. 2017.

MERHY, T. S. M. et al. **Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants.** CryoLetters, v. 35, n. 3, p. 204-215, maio 2014.

MICHELI M.; BENELLI C. **Synthetic Seeds of Two Aquatic Plants.** In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 482 p.

MIKOVSKI, A. I. et al. **Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview.** Ornamental Horticulture, v. 25, n. 2, p. 189-199, jul. 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção.** Diário Oficial. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014.

MOUNCE, R.; SMITH, P.; BROCKINGTON, S. ***Ex situ* conservation of plant diversity in the world's botanic gardens.** Nature Plants, v. 3, n. 10, p. 795-802, set. 2017.

MUNHOZ, C. F. et al. **A gene-rich fraction analysis of the *Passiflora edulis* genome reveals highly conserved microsyntenic regions with two related Malpighiales species.** Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 1-18, ago. 2018.

MUÑOZ, M. et al. **Slow growth *in vitro* culture for conservation of *Chilotanum potato* germplasm.** Chilean journal of agricultural research, v. 79, n. 1, p. 26-35, mar. 2019.

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

NADARAJAN, J. et al. **Comparative biology of cycad pollen, seed and tissue** – a plant conservation perspective. *The Botanical Review*, v. 84, n. 3, p. 295-314, jul. 2018.

NASIRUDDIN, M. D.; ISLAM, A. K. M. R. ***In vitro* slow-growth conservation for two genotypes of *Solanum tuberosum* L.** *Bangladesh Journal of Botany*, v. 47, n. 3, p. 369-380, set. 2018.

NOORI, A. M.; LATEEF, M. A. A. ***In vitro* multiplication of *Citrus lemon* L. with different 6-Benzylaminopurine (BA) concentrations.** *Plant Archives*, v. 20, n. 2, p. 6966-6968, 2020.

NORMAH, M. N.; SULONG, N.; REED, B. M. **Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies.** *Cryobiology*, v. 87, p. 1-14, abr. 2019.

O'DONNELL, K.; SHARROCK, S. **The contribution of botanic gardens to *ex situ* conservation through seed banking.** *Plant Diversity*, n. 39, p. 373-378, nov. 2017.

OROS, P. B. et al. ***In vitro* plant tissue culture: means for production of *Passiflora* species.** *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, v. 4, n. 4, p. 505-523, dez. 2020.

OTONI, W. C. et al. **Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* spp.).** Somatic embryogenesis and gene expression. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. *Somatic Embryogenesis and Gene Expression*. Narosa Publishing House: New Delhi, 1. ed, 2013. p. 1-17.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. **Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: A mini-review.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Poznań, Polônia, n. 23, p. 937-947, dez. 2013.

OZUDOGRU, E. A. et al. **Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela® 5'.** *Acta physiologiae plantarum*, v. 39, n. 4, p. 94, 2017.

PACHECO, G. et al. ***In vitro* conservation of *Passiflora* – A review.** *Scientia Horticulturae*, v. 211, p. 305-311, set. 2016.

PAIVA, C. L. et al. **Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, p. 381-390, jun. 2014.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. **Plant tissue culture media and practices: an overview.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 55, n. 3, p. 242-257, abr. 2019.

PRUDENTE, D. O. et al. **The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism.** *Journal of Plant Physiology*, v. 239, p. 71-82, jun. 2019.

PRUDENTE, D. O.; DE SOUZA, L. B.; PAIVA, R. **Synthetic Seeds: Prospects and Advances in Cryopreservation.** In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects.* Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 482 p.

QAHTAN, A. A. et al. **An Introduction to Synthetic Seeds: Production, Techniques, and Applications.** In: FAISAL, M.; ALATAR, A. A. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects.* Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 482 p.

QURAIISHI, A. et al. ***In vitro* mid-term conservation of *Acorus calamus* L. via cold storage of encapsulated microrhizome.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 60, e17160378, jan. /dez. 2017.

RAVI, M. et al. **The active compounds of *Passiflora* spp. and their potential medicinal uses from both *in vitro* and *in vivo* evidences.** Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences, v. 4, n. 1, p. 45-55, jan. 2021.

REIS, L. B. et al. **Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors.** In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v. 39, n. 6, p. 618-622, nov. /dez. 2003.

ROCHA, D. I. et al. **Cellular and morpho-histological foundations of *in vitro* plant regeneration.** In: *Plant Cell Culture Protocols.* Humana Press, New York, NY, 2018. p. 47-68.

RODRIGUES, P. H. V. et al. **The effect of slow-grown *in vitro* storage under different light spectra on banana plantlets Cv. Prata Catarina (AAB).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2021.

SANTOS, E. A. et al. **Development and bloom in hybrids of wild passion fruit cultivated in different types of pots and shading levels.** Scientia Agricola, v. 69, p. 126-134, abr. 2012.

SHAHZAD, A. et al. **Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation.** In: *Plant Biotechnology: principles and applications.* Springer, Singapore, 2017. p. 37-72.

SHARMA, S. K. et al. ***In vitro* conservation of *Alectra chitrakutensis*: a critically endangered root parasitic plant of high medicinal importance.** Acta Physiologiae Plantarum, v. 40, n. 2, p. 1-10, fev. 2018.

SHEKHAWAT, M. S. et al. ***In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures.** Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 13, n. 2, p. 209-214, dez. 2015.

SILVA, T. S. et al. ***In vitro* conservation of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz under minimal growth conditions.** Ciência e Agrotecnologia, v. 43, e014519, set. 2019.

- SILVEIRA, F. A. O. et al. **Ex situ conservation of threatened plants in Brazil: a strategic plan to achieve Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation.** Rodriguesia, v. 69, n. 4, p.1547-1555, abr. 2018.
- SIMÃO, M. J. **Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique.** Protoplasma, v. 255, n. 3, p. 741-750, maio 2018.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*.** Symposia of the Society for Experimental Biology, v. 11, p. 118-131, 1957.
- SOARES, W. D. S. et al. **Shining light on anther culture, a poorly understood regeneration route in passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown): histological, hormonal, and phytochemical aspects.** In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, p. 1-11, maio 2021.
- SOUZA, E.; BERNARD, E. **Setting priorities in biodiversity conservation: An exercise with students, recent graduates, and environmental managers in Brazil.** Ambio, v. 48, n. 8, p. 879-889, ago. 2019.
- SOUZA, M. S. O. et al. **Assessment of minimum growth conditions for *in vitro* conservation of *Passiflora edulis* Sims.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 15, n. 8, p. 351-365, ago. 2021.
- SOZO, J. S. et al. ***In vitro* culture and phytochemical analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae).** Methods in Molecular Biology, v. 1391. In: MOHAN JAIN, S. Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. 2. ed., 2016.
- STEWART, C, N. **Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications.** 2 ed. J. Wiley, 2016. 432 p.
- TANNO, G. N.; BIASI, L. A. **Acclimatization of micropropagated grapevine plants in vessels with or without closed and different sucrose concentration.** Revista Acadêmica Ciência, v. 11, p. 19-25, 2013.
- TOGNETTI, J. A.; PONTIS, H. G.; MARTÍNEZ-NOËL, G. M. A. **Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored.** Plant Signaling & Behavior, v. 8, n. 3, e23316, mar. 2013.
- TONGSAD, P. et al. **The effects of abscisic acid and sorbitol on the slow growth *in vitro* preservation of Mahesak (*Tectona grandis* L.).** International Journal of Agricultural Technology, v. 16, n. 5, p. 1277-1286, 2020.
- TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. **Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).** Scientia Agricola, v. 62, n. 4, p. 346-350, ago. 2005.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: Passionflowers of the world.** Portland, Oregon: Timber Press, 2004. 430 p.

- VEIGA-BARBOSA, L. et al. **Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species.** Seed Science and Technology, v. 41, n. 1, p. 89-97, mar. 2013.
- VIANNA, M. G et al. **Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique:** determination of the critical stages of the protocol. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 139, p. 369-379, set. 2019.
- VOLIS, S. **Conservation utility of botanic garden living collections:** Setting a strategy and appropriate methodology. Plant Diversity, v. 39, n. 6, p. 365-372, dez. 2017.
- WALTER, A.; NAGEL, K. A. **Root growth reacts rapidly and more pronounced than shoot growth towards increasing light intensity in tobacco seedlings.** Plant Signaling & Behavior, v. 1, n. 5, p. 225-226, set. /out. 2006.
- WATSON, J. E. M; VENTER, O. **A global plan for nature conservation.** Nature, v. 550, n. 7674, p. 48-49, out. 2017.
- WERDEN, L. K. et al. ***Ex situ* conservation of threatened plant species in island biodiversity hotspots:** A case study from Hawaii. Biological Conservation, v. 243, p. 108435, mar. 2020.
- WINGLER, A. **Transitioning to the next phase:** the role of sugar signaling throughout the plant life cycle. Plant physiology, v. 176, n. 2, p. 1075-1084, fev. 2018.
- YOON, J. et al. **Sucrose signaling in higher plants.** Plant Science, v. 302, p. 110703, jan. 2021.
- ZHANG, H. et al. **Thioredoxin-mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration.** Plant Physiology, v. 176, n. 3, p. 2231-2250, mar. 2018.