



MARCO ANTONIO ALVES DE PAULA

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE
Passiflora Gibertii

LAVRAS-MG
2023

MARCO ANTONIO ALVES DE PAULA

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE
Passiflora Gibertii

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

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

LAVRAS-MG
2023

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

Alves de Paula, Marco Antonio.

Criopreservação de gemas laterais e análises bioquímicas de
Passiflora Gibertii / Marco Antonio Alves de Paula. - 2023.

42 p.

Orientador(a): Renato Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Gemas axilares. 2. Conservação. 3. Cultura de tecidos. I.
Paiva, Renato. II. Título.

MARCO ANTONIO ALVES DE PAULA

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS LATERAIS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE
Passiflora Gibertii

CRYOPRESERVATION OF AXILLARY BUDS AND BIOCHEMICAL ANALYSIS
OF Passiflora Gibertii

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

APROVADA em 31 de maio de 2023.
Prof. Renato Paiva, PhD – UFLA
Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis – UFLA
Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva – UFPB

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

LAVRAS-MG
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal, ao Instituto de Ciências Naturais e a Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e infraestruturas cedidas para a realização do trabalho.

Agradeço as instituições financiadoras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa e bolsa de estudo.

Ao meu orientador Renato Paiva e todos os integrantes do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP UFLA) pela parceria e apoio.

A todo o corpo docente do Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos repassados durante o meu mestrado.

Resumo

O gênero *Passiflora* compreende mais de 600 espécies de plantas espalhadas pelo mundo, apresentando alto potencial comercial para a produção de frutos, ornamentação e fins medicinais. A diversidade de espécies do gênero e características intrínsecas, como dormência de sementes e fecundação cruzada, podem exigir condições específicas de armazenamento e cuidados especiais para manter a viabilidade e integridade genética ao longo do tempo apresentando dificuldades na manutenção nos campos de germoplasma, maneira tradicional de conservação. A criopreservação é uma prática cada vez mais consolidada, sendo uma alternativa para a conservação das espécies apresentando vantagens como a capacidade de manter o material conservado em pouco espaço, baixa necessidade de manutenção e livre de patógenos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo promover e avaliar a criopreservação de gemas axilares como explantes de plantas da espécie *Passiflora gibertii* em meio de cultura do tipo Murashige e Skoog (MS) padrão acrescido de 6-benzilaminopurina (BAP) e sacarose. A técnica criopreservadora empregada foi a droplet vitrification. Inicialmente, os explantes passaram por um pré-tratamento em meio de cultura contendo alta concentração de sacarose por 24 horas. Em seguida, foram submetidos à solução LS (Loading Solution) por 30 minutos para desidratação. As tiras de alumínio foram preparadas a uma temperatura de 0°C e sobre elas foram aplicadas gotas da solução de vitrificação VSL (Vitrification Solution L). Os explantes foram imersos em nitrogênio líquido (NL) dentro de criotubos por uma hora. O processo de reaquecimento foi realizado utilizando a solução RS (Recovery Solution) por um período de 30 minutos. Na etapa subsequente, os explantes foram reidratados em meio de pós-tratamento contendo alta concentração de sacarose, durante 24 horas. Após esse período, os segmentos foram transferidos para um meio de regeneração (MS + BAP) para avaliar a taxa de sobrevivência. O tratamento que apresentou a maior taxa de sobrevivência foi de 66,7% e ocorreu com uma exposição de 45 minutos à solução VSL. Cortes dos explantes foram feitos para a avaliação anatômica qualitativa, gemas sobreviventes do melhor tratamento e gemas mortas foram conservadas, emblocadas e analisadas em microscópio para comparação. Células rompidas com extravasamento de conteúdo celular foram observadas com bastante expressão em gemas mortas, indicando que mesmo utilizando a técnica de droplet vitrification, a cristalização ocorre em grande parte dos explantes. As análises bioquímicas, abrangendo diversos parâmetros como açúcares, enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, foram realizadas em explantes criopreservados em comparação aos não criopreservados e durante o enraizamento, investigando aspectos fisiológicos, antioxidantes e osmorregulação. No processo de criopreservação, a exposição à solução gerou estresse nas gemas, refletido pelo aumento de malondialdeído (MDA). Altos níveis de MDA, combinados com a redução de antioxidantes protetores, indicaram a morte celular, enquanto a aplicação de VSL permitiu a sobrevivência e estimulou a regeneração, evidenciada pelo aumento de açúcares solúveis e peróxido de hidrogênio. O enraizamento diferiu entre as espécies, com *Passiflora gibertii* apresentando dificuldades, enquanto *Passiflora alata* demonstrou maior eficiência, com distinções nos marcadores bioquímicos entre explantes enraizados e não enraizados.

Palavras chave: Gemas axilares. Conservação. Cultura de tecidos. Respostas bioquímicas.

Abstract

The *Passiflora* genus encompasses over 600 plant species worldwide, with high commercial potential for fruit production, ornamentation, and medicinal purposes. The diversity and intrinsic characteristics of *Passiflora*, such as seed dormancy and cross-fertilization, may require specific storage conditions and special care to maintain viability and genetic integrity over time, posing challenges in germplasm fields, a traditional conservation method. Cryopreservation is described as an increasingly established practice, offering an alternative for species conservation with advantages like space efficiency, low maintenance, and pathogen-free preservation. This study aimed to promote and assess the cryopreservation of axillary buds as explants from *Passiflora gibertii* plants in Murashige and Skoog (MS) standard culture medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and sucrose. The cryopreservation technique employed was droplet vitrification. Initially, the explants underwent pre-treatment in a culture medium with a high sucrose concentration for 24 hours. Subsequently, they were subjected to Loading Solution (LS) for 30 minutes for dehydration. Aluminum strips were prepared at 0°C, and Vitrification Solution (VSL) drops were applied. The explants were immersed in liquid nitrogen (LN) inside cryotubes for one hour. The re-warming process used Recovery Solution (RS) for 30 minutes. In the subsequent stage, explants were rehydrated in post-treatment medium with a high sucrose concentration for 24 hours. After this period, segments were transferred to a regeneration medium (MS + BAP) to assess survival rates. The treatment with the highest survival rate was 66.7%, achieved with a 45-minute exposure to VSL. Explant sections were made for qualitative anatomical evaluation. Surviving buds from the best treatment and dead buds were preserved, embedded, and analyzed under a microscope for comparison. Cells with ruptured membranes and cellular content leakage were prominently observed in dead buds, indicating that even with droplet vitrification, crystallization occurs in a significant portion of the explants. Biochemical analyses, covering various parameters such as sugars, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation, were performed on cryopreserved explants compared to non-cryopreserved, both during cryopreservation and rooting, investigating physiology, antioxidants, and osmoregulation. In the cryopreservation process, exposure to the solution induced stress in the buds, reflected by a significant increase in malondialdehyde (MDA). High levels of MDA, combined with a reduction in protective antioxidants, indicated cell death. However, the application of VSL allowed survival and stimulated regeneration, evidenced by increased soluble sugars and hydrogen peroxide. Rooting differed between species, with *Passiflora gibertii* facing difficulties, while *Passiflora alata* demonstrated greater efficiency, supported by biochemical distinctions between rooted and non-rooted explants.

Keywords: Axillary buds. Conservation. Tissue culture. Biochemical responses.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1 Gênero <i>passiflora</i>	7
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	8
2.3 Criopreservação	8
2.4 <i>Droplet vitrification</i>	9
2.5 Soluções crioprotetoras e tempo de exposição	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	11
3.1.1 Desinfestação dos explantes	11
3.1.2 Multiplicação <i>in vitro</i>	11
3.2 Criopreservação via <i>Droplet Vitrification</i>	12
3.2.1 Pré-tratamento	12
3.2.2 Solução de vitrificação	12
3.2.3 Regeneração pós-criopreservação	13
3.3 Análises histológicas	14
3.4 Análises Bioquímicas	14
3.4.1 Peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio	15
3.4.2 Proteínas totais e prolina	15
3.4.3 Açúcares solúveis e açúcares redutores	16
3.4.4 Atividade enzimática do sistema antioxidante	16
3.5 Análises Estatísticas	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Criopreservação	17
4.2 Análises bioquímicas	21
4.3 Enraizamento	26
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de maracujá do mundo, se destacando também por conter o maior número de espécies do gênero em seu território (IBGE, 2021). Essa liderança na produção e diversidade de espécies ressalta o potencial comercial dessa cultura. No entanto, algumas dificuldades enfrentadas, como doenças, pragas e a variabilidade genética limitada, podem comprometer o crescimento e a rentabilidade dessa atividade. Plantas do gênero *Passiflora*, ao qual o maracujá pertence, apresentam características relevantes, como a produção de compostos utilizados na indústria farmacêutica para a fabricação de medicamentos. Além disso, essa espécie também se destaca pela beleza de suas flores, ramos e folhas, sendo utilizadas no setor ornamental (SANTOS et al., 2012; PACHECO et al., 2016).

Plantas nativas como *Passiflora gibertii* se destacam por conter belas flores e frutos comestíveis, tendo seu potencial ornamental e econômico pouco explorado (PACHECO et al., 2016). Além disso, essa espécie tem uma importância como porta enxerto, é nativa do Cerrado, apresenta resistência a patógenos de solo em comparação com cultivares de alta produção, destacando-se para programas de melhoramento (CAVICHIOLO et al., 2020). Programas de melhoramento trabalham com algumas espécies do gênero *Passiflora*, mas a grande maioria é voltada para a produção de frutos, ou melhoramento de espécies que produzem frutos comerciais.

A conservação dessas espécies nativas é necessária devido à aumento da expansão dos centros urbanos, intensificação dos desmatamentos e ocorrência de queimadas reduzindo o espaço de sobrevivência natural de espécies (PACHECO et al., 2016). O método de conservação tradicional de espécies nativas é a conservação *ex situ* em bancos de germoplasma que envolve a coleta e armazenamento de sementes, esporos, embriões, tecidos vegetais em condições controladas, como em bancos de sementes ou bancos de células, garantindo a preservação da diversidade genética.

Passiflora gibertii é uma espécie que apresenta entraves no processo de produção e conservação, pela dificuldade imposta em seu cultivo e pela maneira que as plantas são tradicionalmente conservadas hoje no país. Grande maioria dos bancos de germoplasma para conservação de espécies nativas, são mantidos em campo, em áreas de instituições federais ocupando um espaço considerável, suscetível a pragas e doenças com alta necessidade de manejo (MIKOSVKI et al., 2019).

Para *Passiflora gibertii*, é descrito na literatura a técnica de crescimento lento como a melhor forma de conservação *in vitro* para a espécie (FARIA et al. 2006). No entanto, essa técnica dispõe de menor custo-benefício uma vez que demanda maiores investimentos e manutenção constante, além de apresentar menor tempo de preservação comparado a técnica de criopreservação. A criopreservação é considerada uma técnica que necessita de alto investimento em sua implantação, porém com relação ao custo-benefício, tem-se que esta promove uma melhor preservação das espécies quanto ao tempo e manutenção das informações celulares e teciduais (BETTONI, 2021). A criopreservação consiste em vitrificar o conteúdo celular e manter sua viabilidade, utilizando a desidratação celular para evitar a formação de cristais de gelo dentro da célula (COELHO et al. 2020).

Geralmente, a criopreservação utiliza sementes como explante por serem tecidos menos hidratados e mais protegidos fisicamente. Contudo, no gênero *Passiflora* as sementes tem como característica a tolerância a desidratação, porém não resistem ao estoque prolongado nessa condição (VEIGA-BARBOSA et al. 2013, SHEIKHOESLAMI et al. 2020). Por outro lado, as gemas axilares geralmente possuem maior taxa de viabilidade e sucesso na criopreservação em comparação com as sementes recalcitrantes. Isso ocorre porque as gemas axilares contêm tecidos meristemáticos, que são responsáveis pelo crescimento e regeneração das plantas. Esses tecidos possuem células em estado indiferenciado e, portanto, têm maior capacidade de sobreviver e se recuperar após o processo de criopreservação.

Dessa maneira, utilizar explantes de mais fácil acesso, como as gemas axilares, pode garantir um aumento significativo na preservação dessa espécie. Alinhado a isso, pode-se utilizar a *droplet vitrification* (PANIS et al, 2005), uma das técnicas mais eficientes da criopreservação, com taxa de sobrevivência maiores que 90% (BI et al. 2021), formando assim uma alternativa interessante e viável para o sucesso da criopreservação de *Passiflora gibertii*.

Porém as gemas axilares apresentam um sistema antioxidante mais ativo em comparação com as sementes. Isso ocorre porque as gemas axilares são tecidos meristemáticos que estão constantemente envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento, os quais geram maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como subprodutos do metabolismo celular. Portanto, as gemas axilares possuem mecanismos de defesa antioxidante mais eficientes para neutralizar os ROS e proteger as células contra danos oxidativos, que podem ser causados pelos processos de criopreservação. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a *droplet vitrification* como técnica para criopreservar a espécie de *Passiflora gibertii*, bem como avaliar a influência e as respostas histológicas e bioquímicas de diferentes

tempos de exposição dos explantes (gemas axilares) a solução crioprotetora e que passaram pela vitrificação.

2. Referencial teórico

2.1 Gênero passiflora

Passiflora é um gênero grande e diverso, contendo mais de 600 espécies distribuídas por vários continentes, sendo América do Sul o destaque contendo cerca de 95% destas (SOARES et al. 2011). O Brasil se destaca por ser o maior produtor e exportador mundial de maracujás (GAMA et al. 2013, EMBRAPA, 2021) aproximadamente 600 mil toneladas da fruta por ano de acordo com os dados IBGE (2018), apresentando cerca de 150 espécies com sua distribuição geográfica concentrada mais no centro norte do país (SILVEIRA et al., 2015).

Mesmo havendo um grande número de espécies, poucas são utilizadas para o consumo e comercialização, onde as que mais se destacam são o maracujazeiro-roxo (*P. edulis Sims.*) e o maracujazeiro-amarelo (*P. edulis f. flavicarpa Degener.*) (CROCHEMORE et al. 2003). Além da produção de frutos, o maracujazeiro é amplamente utilizado para fins medicinais (SESAN et al. 2016) e devido a variedade de cores, tamanhos e formas de suas flores, o gênero *Passiflora* tem revelado um potencial enorme no ramo ornamental.

O maracujazeiro é propagado de forma sexuada pelo plantio de sementes e de forma assexuada utilizando de técnicas agrônomicas como enxertia, estaquia e cultura de tecidos. A maioria das sementes apresentam dormência e essa característica pode fazer com que a germinação somente aconteça após três meses. Com o prolongamento da fase de germinativa, técnicas agrônomicas são utilizadas a fim de uniformizar e aumentar as taxas de germinação. Programas de melhoramento têm atuado nessa área a fim de selecionar genótipos com menor índice de dormência (ALEXANDRE et al. 2004).

A propagação assexuada apresenta vantagens, como a obtenção de um stand uniforme e a clonagem de características essenciais do exemplar selecionado, incluindo uniformidade de produção, tamanho dos frutos e flores de qualidade. Contudo, é importante salientar que a maioria das espécies do gênero *Passiflora* possui uma característica conhecida como autoincompatibilidade, o que requer a utilização de um número de plantas enorme para promover a fecundação cruzada no pomar. Além disso, devido à compartilhamento das mesmas características reprodutivas pelos clones, há uma maior suscetibilidade a doenças. Nesse

sentido, diversos estudos têm sido realizados com espécies selvagens, que geralmente apresentam boas respostas às doenças observadas. Essas pesquisas, em grande parte, são direcionadas ao desenvolvimento de porta-enxertos (JUNQUEIRA et al. 2006; FALEIRO, 2019).

2.2 Cultivo *in vitro* de plantas

Apesar da cultura de tecidos ainda não ser utilizada para produção de mudas de maracujazeiro em maior escala, diversas espécies do gênero apresentam protocolos elaborados para o estabelecimento e a multiplicação de explantes. Com a diferenciação para as espécies no sentido de facilitar o manejo no laboratório e ter um resultado melhor na propagação das plantas *in vitro*, os explantes são de variados tipos como: segmento nodal, gemas laterais, recorte foliar, raízes, tecidos meristemáticos, sementes, ápice caulinar e calos (FALEIRO et al. 2019).

A conservação *in vitro* é uma técnica fundamental para a preservação de plantas por meio da cultura de tecidos. Englobando diversas técnicas avançadas de manejo, como a limpeza clonal de vírus até a transformação genética de plantas. Essa abordagem também proporciona altas taxas de multiplicação e apresenta facilidade na implementação de sistemas de cultivo, permitindo trabalhar com processos como embriogênese somática, organogênese e bancos de germoplasma *in vitro*. A conservação *in vitro* oferece a possibilidade de conservar espécies utilizando técnicas como o crescimento lento e a criopreservação. Essas metodologias representam alternativas aos métodos tradicionais de conservação, como os bancos de germoplasma em campo e os bancos de sementes. Ao utilizar a conservação *in vitro*, é possível manter uma maior diversidade genética e preservar espécies de forma mais eficiente, considerando a capacidade de regeneração das células e tecidos vegetais em condições controladas de laboratório (PACHECO et al. 2016).

2.3 Criopreservação

Devido a auto incompatibilidade na reprodução das plantas do gênero *Passiflora*, várias espécies são mantidas em campo nos bancos de germoplasma em instituições para a conservação, porém necessita de espaço e manejo adequado para ser viável essa manutenção. Com a possibilidade de doenças, acidentes e até desastres climáticos inviabilizarem o uso das

espécies preservadas, há uma necessidade de desenvolver melhores técnicas para o acondicionamento do material (FALEIRO, 2019).

A técnica de criopreservação com explantes vegetais é baseada na cultura de tecidos, onde um explante cultivado *in vitro* é armazenado em temperaturas muito baixas, cerca de -196°C em nitrogênio líquido, estando protegido do envelhecimento convencional, livre de contaminações e não necessitando de manutenção regularmente (PACHECO et al. 2016).

Na criopreservação, há o congelamento ou vitrificação do explante, sendo que, geralmente, os vegetais possuem uma grande quantidade de água intracelular que pode cristalizar e romper os tecidos causando a morte da célula. Assim, primeiramente, o explante é submetido ao tratamento de desidratação evitando o acontecimento deste fenômeno. Atualmente, a técnica de criopreservação mais utilizada é a vitrificação, onde o material é submetido previamente a uma solução concentrada desidratante e protetora e, após o explante ser retirado da solução, ocorre rapidamente a imersão em nitrogênio líquido, evitando que ocorra a formação de cristais dentro das células, mantendo assim a viabilidade (ENGELMANN, 2011, COELHO et al. 2020).

Devido ao avanço da ciência e desenvolvimento de tecnologias de preservação de materiais vegetais, muitas espécies de maracujazeiro já foram criopreservadas. Além disso, existem desafios relacionados à obtenção de sementes de *Passiflora gibertii*, o que pode dificultar sua propagação. Adicionalmente, a utilização de ápices como explantes também pode resultar em um número reduzido de material disponível para estudos e manipulações genéticas (SHEIKHOLESLAMI et al., 2020). No entanto, é importante ressaltar que a utilização de espécies selvagens em programas de melhoramento genético oferece vantagens significativas, proporcionando oportunidades para o desenvolvimento de novas cultivares e tecnologias agrícolas (SAKAI et al., 1990). Como disse Zamecnik (2021), a técnica utilizada, o tempo de tratamento da solução, concentração, temperatura, tamanho da ponta do broto, idade e sua fisiologia são fatores que devem ser levados em consideração no momento da criopreservação.

2.4 Droplet vitrification

Técnicas de vitrificação estão sendo amplamente testadas em diversos tipos de materiais vegetais de diversas espécies, são elas o encapsulamento e vitrificação (MATSUMOTO et al, 1995) e a droplet vitrification (PANIS et al, 2005), os protocolos já estabelecidos mostram eficiência em conservação do material (PACHECO et al. 2016, SAKAI e ENGELMANN,

2007). A *droplet vitrification* consiste em desidratar o explante com solução concentrada LS (*Loading solution*), composta por sacarose e glicerol, em seguida, permanência na solução de vitrificação por um determinado tempo de tratamento. O explante é então colocado sobre tiras de alumínio que contem pequenas gotas da solução de vitrificação que é imersa rapidamente no nitrogênio líquido (NL). Posteriormente, o material é reaquecido rapidamente em uma solução com sacarose, definida como solução de recuperação RS (*Recovery solution*) onde ocorre também a reidratação lenta do explante (PANIS et al, 2005). Para *Passiflora*, a literatura cita geralmente o uso de PVS2 e PVS3 como solução crioprotetora e as técnicas utilizadas são as de vitrificação e encapsulamento vitrificação, porém, muita perda ocorre devido a intoxicação das soluções crioprotetoras aos explantes (PACHECO et al, 2016).

2.5 Soluções crioprotetoras e tempo de exposição

As soluções utilizadas na criopreservação são compostas por agentes crioprotetores pouco nocivos aos tecidos como: glicol (álcool contendo pelo menos dois grupos de hidroxila) e o etilenoglicol, mas existem outros compostos crioprotetores com uma toxicidade maior como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol, que causam riscos para os tecidos como degradação de membrana, mudança no estado físico da membrana, criação de espécies reativas de oxigênio, aumentando a chance de ocorrer a mortalidade das células apenas pela exposição do material as soluções (SYDYKOV et al. 2018). Muitos destes agentes crioprotetores citados atuam na retenção do conteúdo celular ou no extravasamento do conteúdo celular, pois aumentam a distância intermembranar, aumentam a área da parte polar da membrana, alteram a temperatura da transição de membrana, mantendo o fluido celular dentro ou fora da célula (GORDELIY et al. 1998). Contudo, com a exposição prolongada aos agentes, rompimentos na membrana podem ocorrer, liberando o conteúdo celular para o ambiente e conseqüentemente matando a célula (SYDYKOV et al. 2018), este efeito é o mesmo observado quando há o congelamento de água dentro da célula, causando danos pela formação de cristais que podem romper a membrana.

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a *droplet vitrification* como técnica para criopreservar a espécie de *Passiflora gibertii*, bem como estudar a influência e as respostas histológicas e bioquímicas de diferentes tempos de exposição dos explantes (gemas axilares) a solução crioprotetora VSL e que passaram pelo congelamento, avaliando o melhor meio para enraizamento e regeneração das gemas.

3. Material e Métodos

Como material vegetal, plantas com um ano de idade provenientes de segmentos nodais estabelecidos *in vitro* de *Passiflora gibertii*, alocadas em sala de crescimento com temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) e luminosidade controlada (fotoperíodo de 16h) na Universidade Federal de Lavras – Lavras -MG, Brasil localizado a $21^{\circ},22'69\text{ S}$, $44^{\circ},98'14\text{ W}$, foram utilizadas como doadoras de gemas axilares. A pesquisa foi realizada no Instituto de Ciências Naturais, Setor de Fisiologia Vegetal, no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Estabelecimento *in vitro*

3.1.1 Desinfestação dos explantes

Para desinfestação dos explantes em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram submersos por um minuto em álcool 70% e, posteriormente, em uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo por 15 minutos, enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada, a uma temperatura de 120°C e 1,0 atm, por 20 minutos (DORNELAS e VIEIRA, 1994).

3.1.2 Multiplicação *in vitro*

Após a desinfestação, os segmentos de 0,3 a 0,5 cm foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com adição de 30g L^{-1} de sacarose, $0,1\text{g L}^{-1}$ de Inositol, gelificado em 7g L^{-1} de ágar e pH do meio ajustado para $5,8 \pm 0,1$, com acréscimo de 2mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP) (KANTHARAJAH e DODD, 1990) e autoclavados a 120°C e 1,0 atm, por 20 minutos. Foi inoculado um explante por tubo (Figura 1, A), permanecendo na sala de crescimento por no mínimo 30 dias, em ambiente controlado com fotoperíodo de 16 horas a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, após esse tempo decorrido as plantas cultivadas *in vitro* (Figura 1, B), foram usadas como doadoras das gemas (Figura 1, C) sendo os novos explantes. A regeneração das gemas ocorreu no mesmo meio de cultura citado para a

inoculação inicial. Todo o processo de manuseio dos explantes foi conduzido na câmara de fluxo laminar para evitar contaminantes.



Figura 1: (A) Planta de *Passiflora gibertii* recém cultivada em meio de cultura. (B) Planta de *Passiflora gibertii* cultivada por cinco meses. (C) Caule de *Passiflora gibertii* contendo gemas que foram utilizadas no experimento (setas).

Fonte: Do autor (2022)

3.2 Criopreservação via *Droplet Vitrification*

3.2.1 Pré-tratamento

Como pré-tratamento, os explantes coletados das plantas regeneradas *in vitro*, com tamanho entre 1 a 3mm, foram previamente desidratados por 24 horas em meio MS padrão gelificado e autoclavado, acrescido de 0,3 M de sacarose, adaptado Vianna et al. (2019).

3.2.2 Solução de vitrificação

Posterior ao pré-tratamento, os explantes passaram por outro tratamento de desidratação em solução LS (*Loading Solution*) [2 M glicerol e 0,4 M sacarose em meio MS padrão (SAKAI e ENGELMANN, 2007)] por 30 minutos em temperatura ambiente em placas de Petri. Posteriormente, 12 gemas foram imersas em solução VSL em banho de gelo a 0°C por diferentes tempos de permanência (15, 30, 45 e 60 minutos), logo após, expostas em tiras de folha de alumínio estéril pré-preparadas (~ 5 x 25 mm) colocadas em uma placa de Petri, com três gotas de 3 µL de VSL (*Vitrification Solution L*) em cada tira de alumínio. Este processo foi repetido com outros tempos de permanência (40, 45 e 50 minutos). A solução VSL é composta por 5% de sacarose, 20% de glicerol, 10% de DMSO (Dimetilsufóxido), 30% de etileno glicol e 10mM de CaCl₂ (Cloroeto de cálcio) (SUZUKI et al. 2008).

Após o período de crioproteção, as tiras de alumínio com os explantes, foram colocadas nos criotubos já previamente imersos em NL onde permaneceram por pelo menos uma hora e para os tratamentos controle, os explantes não foram imersos em NL. Em seguida, houve a retirada das tiras de alumínio do NL e a rápida inserção na placa com a solução RS (*Recover Solution*) contendo 1,2 M de sacarose em meio MS (GALLARD et al., 2008; BARRACO et al. 2011) por 30 minutos, voltando os explantes para temperatura ambiente com hidratação lenta.

Após a volta a temperatura ambiente, a inoculação ocorreu em meio de cultura pós-tratamento por 24h com MS padrão, com adição de 0,3 M de sacarose, 0,1g L⁻¹ de Inositol, gelificado em 7g L⁻¹ de ágar e pH do meio ajustado para 5,8 ± 0,1, e autoclavado, com exposição direta ao fotoperíodo de 16 horas.

3.2.3 Regeneração pós-criopreservação

Decorrido o tempo de pós-tratamento, a regeneração das gemas ocorreu em meio MS padrão, com adição de 30g L⁻¹ de sacarose, 0,1g L⁻¹ de Inositol, gelificado em 7g L⁻¹ de ágar e pH do meio ajustado para 5,8 ± 0,1, com acréscimo de 2mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). O material foi exposto ao fotoperíodo de 16 horas, com temperatura média de 25°C. Na avaliação da sobrevivência, foi realizada uma contagem sete dias após a inoculação das gemas, posteriormente houve o acompanhamento diário para observar alterações, até trinta dias. Para a regeneração das gemas criopreservadas, foi utilizado o meio MS em placas de Petri, contendo cinco tratamentos com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L⁻¹), com seis gemas por placa e seis placas por tratamento. Para o enraizamento, quatro repetições foram avaliadas com três gemas em cada, os meios MS foram preparados com variação de

concentrações de AIA e AIB (0; 0,25; 0,5 e 1 mg L⁻¹). A título de comparação do crescimento de raízes, duas espécies do mesmo bioma, *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata* foram utilizadas.

3.3 Análises histológicas

Após 14 dias do processo de criopreservação, foi observada a sobrevivência dos tratamentos e foram coletadas amostras vivas e mortas para a realização dos cortes. A conservação foi feita com a imersão das gemas em recipientes com a solução fixadora FFA (5% de formaldeído, 5% de ácido acético e 90% de álcool 70%) (JOHANSEN, 1940) e mantidas na geladeira. Para o seccionamento do material em estudo, foi realizado um processo de preparação histológica que envolveu etapas sequenciais de desidratação em vácuo (Bomba a vácuo TECNAL TE-058), utilizando-se soluções alcoólicas de concentrações graduadas de 70%, 92%, 100%, além de uma solução composta por 50% de álcool 100% e 50% de resina ativada, seguida da utilização exclusiva de resina ativada a 100%. Em seguida, foi realizado o processo de emblocamento. Todas as etapas foram conduzidas utilizando-se a resina histológica Historesin[®] Leica. Cortes com espessura de 5 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091), posteriormente corados com solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN et al., 1965) e visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

3.4 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em explantes coletados quatro semanas após o estabelecimento das plantas *in vitro*, sendo observado e separado explantes com presença e ausência de raiz.

Gemas que passaram pelo processo de criopreservação foram coletadas para análise em quatro tratamentos: pré-criopreservação, pós solução VSL (45 minutos), mortas pós-criopreservação e vivas pós-criopreservação. Todo o material coletado foi armazenado em freezer a -80 °C até o momento das análises. Amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os açúcares redutores e não redutores, proteínas totais, prolina, peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio, e atividade enzimática da peroxidase (POD) e da catalase (CAT).

3.4.1 Peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio

A quantificação de peroxidação lipídica em plantas foi feita pelo método do ácido tiobarbitúrico, descrito por HEATH E PACKER (1968) e modificado por PEIXOTO et al. (1999). Uma alíquota do sobrenadante foi submetida ao meio de reação composto por ácido tiobarbitúrico 0,5% e TCA 20% e mantida em banho maria a 95 °C durante 30 min. Após resfriamento e paralização da reação em banho de gelo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 540 nm, 535 nm e 600 nm e através de cálculos específicos a peroxidação lipídica foi estimada, utilizando o coeficiente de extração molar 155.

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram quantificados pelo método de VELIKOVA et al. (2000). Uma alíquota do sobrenadante foi submetida à reação com tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄) 10 mM, pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) a 1M. Posteriormente, estas amostras foram analisadas em espectrofotômetro com leitura da absorbância à 390 nm e os níveis de H₂O₂ foram quantificados por meio de comparação com curva padrão.

3.4.2 Proteínas totais e prolina

A determinação de proteínas se deu de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando o corante Comassie Blue G-250, H₃PO₄ 85% (v/v) e etanol 95% (v/v). Durante o procedimento, Comassie Blue G-250 foram diluídos em etanol 95%, acrescentando H₃PO₄ 85%. Para a quantificação, 5 µL do extrato foram acrescentados de 295 µL do reagente preparado. A absorbância de cada amostra foi lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Ao final, o teor de proteínas pôde ser determinado por intermédio de curva de calibração, fazendo uso de albumina de soro bovino (BSA) 1 mg. mL⁻¹ como padrão.

O método utilizado para quantificação de prolina foi o descrito por CARILLO E GIBBON (2011) contendo algumas modificações. Em um eppendorf contendo 50 µL do sobrenadante, foi adicionado 100 µL de meio de reação contendo, ninhidrina 1% em ácido acético 60% e etanol 20%. Posteriormente, foi aquecido por 20 minutos em banho-maria a 95° C, seguido de resfriamento em banho de gelo. Após resfriada, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma curva-padrão de prolina e os resultados foram expressos em µg.mg⁻¹MF

3.4.3 Açúcares solúveis e açúcares redutores

A quantificação de açúcares solúveis totais ocorreu de acordo com o método de antrona (hidroxiantraceno) (Miller, 1959). 100 mg de antrona foram pesadas e adicionadas à 2,5 mL de água destilada, seguido de um incremento de 50 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a solução. Posteriormente, alíquotas do extrato bruto foram submetidas a reação com a solução de antrona mantendo-se o sistema em banho de gelo. Em seguida, a solução resultante foi levemente agitada e levada à banho-maria a 100 °C durante três minutos. Por fim, fez-se a leitura da solução em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

A quantificação de açúcares redutores foi baseada na metodologia por DNS (MILLER 1959), que contém os seguintes reagentes: ácido dinitrossalicílico (DNS), hidróxido de sódio, tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (sal de Rochelle) e glicose 10 mM. Após o preparo da solução de DNS, adicionou-se o extrato bruto sob agitação em vórtex. Posteriormente, esta solução foi mantida em banho-maria a 100°C durante cinco minutos. Após o resfriamento, as leituras em espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de 540 nm.

3.4.4 Atividade enzimática do sistema antioxidante

O meio de reação para CAT consistiu em tampão fosfato de potássio 67 mM (pH 7,0), H_2O_2 10 mM e a alíquota do extrato. O consumo de H_2O_2 foi mensurado seguindo sua absorvância a 240 nm (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995), o coeficiente de extinção utilizado foi 36.

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada em uma mistura de reação composta pelo extrato, tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 6,0) contendo peróxido de hidrogênio 0,9% e guaiacol 0,8%. O aumento da absorvância a 470 nm (coeficiente de extinção molar $26,6 M^{-1} cm^{-1}$) foi registrado por três minutos (FANG, KAO, 2000).

3.5 Análises Estatísticas

O experimento da criopreservação foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e ao teste de homogeneidade de variância de Levene, verificando a

normalidade dos dados. Em seguida, foi feita a análise de variância dos tratamentos (ANOVA), realizando o teste F a 5% de probabilidade e posterior comparação das médias pelo teste Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R[®] por meio dos pacotes tidyverse (WICKHAM, 2019), gvlma (PENA, 2019), emmeans (LENTH, 2019), e car (FOX, WEISBERG, 2019). O gráfico foi confeccionado utilizando o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016) do respectivo programa.

Os dados bioquímicos foram verificados quanto sua distribuição por meio da análise de variância (ANOVA) e, em caso de normalidade, tiveram suas médias comparadas por teste de Tukey a nível de significância de 5%, através do software estatístico RBio.

4. Resultados e Discussão

4.1 Criopreservação

Como resultado do teste inicial da criopreservação, utilizando os explantes que não passaram pelo NL, nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos, verificou-se uma intoxicação causada pela solução VSL em tempos maiores, como apresentados na Tabela 1. Com 15 e 30 minutos não foi observado nenhuma alteração em comparação aos explantes que não foram imersos em NL. Em 45 minutos foi observado que todas as gemas sobrevivem por duas semanas aproximadamente. Todavia, com 60 minutos todas as gemas estavam mortas após o NL. No teste com nitrogênio líquido as gemas expostas ao VSL em 15, 30 e 60 minutos não sobreviveram, porém, houve alta taxa de sobrevivência das gemas no tratamento de 45 minutos.

Tabela 1: Descrição dos dados obtidos no experimento de criopreservação da espécie *Passiflora gibertii* com a solução VSL em diferentes tempos. NL- indica onde não houve a imersão em nitrogênio líquido e NL+ onde houve imersão em nitrogênio líquido. Valores com *, indicam morte do explante após duas semanas.

Tempo na solução crioprotetora (min)	Sobrevivência (%)	
	NL -	NL +
0	100	
15	100	0
30	100	0
45	100*	70
60	0	0

Com os resultados obtidos no primeiro teste, foi realizado um novo experimento com a faixa de tempo mais adequada, próxima ao tempo que foi verificado a sobrevivência, utilizando três repetições com 12 gemas em cada, adaptado de Halmagyi et al. (2020). Foi observado diferença significativa entre os tempos para a taxa de sobrevivência dos explantes, indicando que o tempo de exposição das gemas em solução de VSL interfere completamente na sobrevivência dos explantes (Tabela 2). Foi observado que no tratamento de 45 minutos em solução VSL houve a maior taxa de sobrevivência das gemas axilares, correspondendo a 67%, diferindo estatisticamente dos demais tempos (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Halmagyi et al (2020) utilizando gemas axilares de *Dhiantus callizonus* com a técnica de *droplet vitrification* e solução PVS2, obtendo taxa de sobrevivência de 63%. Em contraste, em um estudo utilizando gemas axilares de *Ludisia discolor* em solução PVS2 com a mesma técnica citada acima, obteve-se apenas 17% de sobrevivência (BURKHAN, 2022). Dessa maneira, o resultado encontrado no presente trabalho indica uma ótima alternativa, visto a alta taxa de sobrevivência relatada.

Tabela 2: Descrição dos dados obtidos no experimento de criopreservação da espécie *Passiflora gibertii* com a solução VSL em diferentes tempos.

Tempo na solução crioprotetora (min)	Sobrevivência (%)
40	26
45	67
50	31

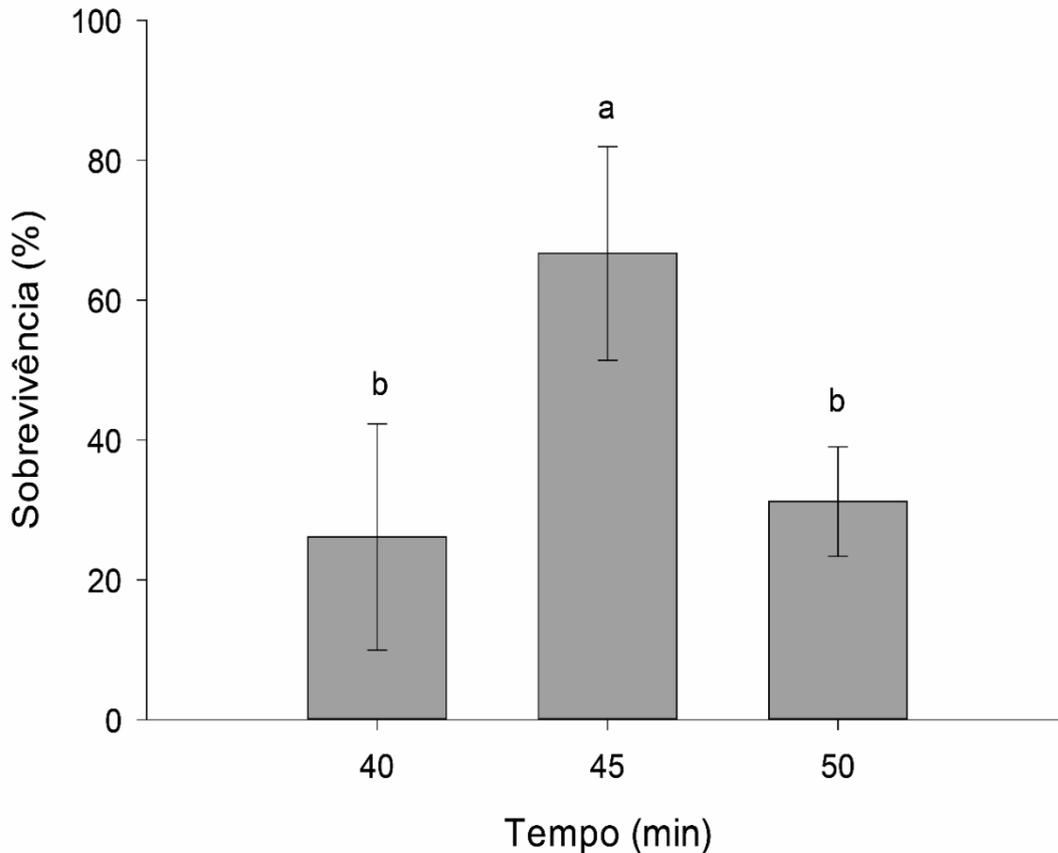


Figura 2: Taxa de sobrevivência de gemas da espécie *Passiflora gibertii*, após o processo de criopreservação com a solução VSL, nos tempos de 40, 45 e 50 minutos. As letras representam o teste de Tukey a 5%, em que letras diferentes indicam diferença mínima significativa. As barras representam o erro padrão da média.

Por outro lado, Lee (2021) utilizando ápices caulinares de outra espécie ornamental, a *Pogostemon yatabeanus*, obteve taxa de sobrevivência de 80% por meio da droplet vitrification. Delgado-Aceves (2021) com a espécie *Agave tequilana* alcançou taxa de sobrevivência de 83% e 73% usando PVS2 e PVS3, respectivamente, mas ambas as soluções prejudicaram o desenvolvimento quando os explantes foram expostos a um tempo de solução igual ou superior a 30 minutos. Estudando criopreservação por meio da mesma técnica usando a espécie *Agave peacockii*, Delgado-Aceves (2022) conseguiu sobrevivência de 80%. Para espécies frutíferas como o kiwizeiro (ZHANG et al. 2020) e macieira (WANG, 2021) foram encontradas sobrevivências de 68 e 48% respectivamente, utilizando a mesma técnica do presente trabalho, porem com ápices caulinares.

Vale ressaltar também que para a espécie *Passiflora gibertii*, pequenas variações no tempo de exposição à solução crioprotetora é um fator determinante para o sucesso da técnica, tendo em vista que 45 minutos apresentou a maior taxa de sobrevivência em comparação a 40 e 50 minutos (Figura 2). O tempo de tratamento na solução é um dos fatores importantes na criopreservação, uma vez que os métodos de criopreservação não são universalmente protetores, e devem ser otimizados para cada nova espécie de planta conservada (CARRA et al. 2019, SAMUELS et al 2021). Assim, tendo em vista que a proteção através da solução é alcançada pelo aumento a viscosidade da célula até o ponto em que a formação de gelo é inibida, tanto intra quanto extracelular, um baixo tempo de exposição pode não ser suficiente para que tal situação seja alcançada (BENSON, 2008). Em contrapartida, um alto tempo de exposição em soluções crioprotetoras ou com alta concentração dos agentes crioprotetores, podem ser prejudiciais devido aos efeitos prolongados que causam na célula, como a desidratação ou /hidratação da membrana e alteração da sua temperatura de transição de fase (SYDYKOV et al. 2018).

Danos celulares foram observados nos tecidos através dos cortes histológicos, tendo esta diferença diferido entre os explantes sobreviventes e os mortos (Figura 3). Durante a vitrificação, um líquido é transformado em um estado sólido não cristalino semelhante ao vidro devido ao super-resfriamento sem congelamento (EROL et al., 2021), caso não aconteça a vitrificação, cristais de gelo podem ser formada dentro e fora da célula no tecido vegetal e causam danos físicos (JANG et al., 2017). Os explantes mortos apresentam alta quantidade de células vazias, evidenciando o rompimento da membrana plasmática, parede celular e perda de suas estruturas para o meio (Figura 3A, B e C).

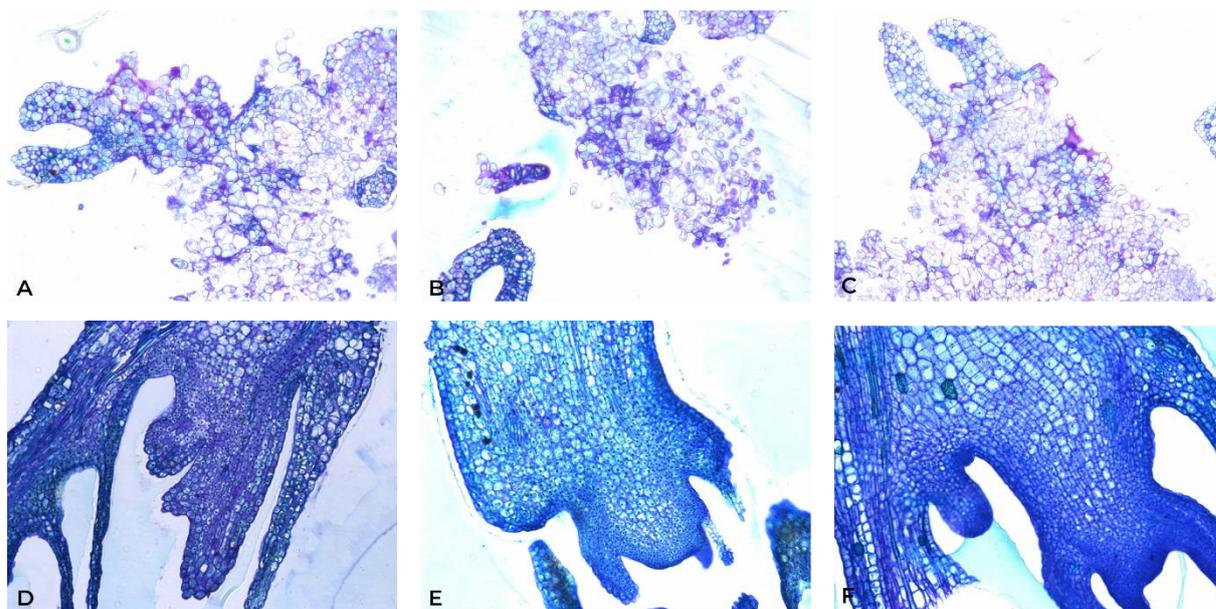


Figura 3 – Cortes anatômicos das gemas axilares do melhor tratamento (45 minutos), uma semana após a imersão em nitrogênio líquido. A, B e C representam as gemas que não sobreviveram ao teste de criopreservação, D, E e F representam as gemas que sobreviveram após o tratamento com o nitrogênio líquido. Fonte: Do autor (2022)

Os explantes sobreviventes possuem maior organização celular, maior volume de solutos e de células normais (Figura 3D, E e F). Espaços vazios das gemas mortas cria um contraste com o espaço completamente preenchido das gemas sobreviventes, mostrando alto dano sofrido no tecido. Pontuações coradas presentes nas células das gemas vivas representam a membrana plasmática reduzida devido a desidratação, enquanto que não há pontuações nos explantes mortos.

4.2 Análises bioquímicas

A criopreservação é um método comum para armazenamento de material biológico, mas pode levar a danos celulares causados pela peroxidação lipídica, que é medida pelo teor de malondialdeído (MDA). Gemas de maracujá que passaram pelo processo de vitrificação com solução VSL apresentaram a maior média de MDA, enquanto as gemas que não passaram pelo processo e as gemas já mortas apresentaram uma média intermediária, porém, maior que as gemas que sobreviveram ao processo de criopreservação (Figura 4). Prudente (2019) e Xing (2022) obtiveram resultados semelhantes, mostrando que o tratamento com melhor sobrevivência apresentou uma média de MDA menor. Além disso, o tratamento com agentes

criopreservadores promove o aumento de ROS, o que pode levar a um tempo prolongado de recuperação do explante após o reaquecimento (POPOVA, 2023).

A tabela montada por Ren et al. (2021) onde diversos estudos sobre criopreservação mostraram médias altas de MDA na etapa de vitrificação, que podem ser um indicador de danos celulares e espécies reativas de oxigênio em maior número. Estudos adicionais, como o de Ren et al. (2021), demonstraram que as atividades antioxidantes estão diretamente ligadas ao sucesso da criopreservação, correlacionando a viabilidade de pólen ao baixo conteúdo de MDA e de POD. Já para embriões, o momento de maior concentração de MDA é justamente na etapa de osmoproteção, conforme relatado por Soonthornkalump et al. (2020).

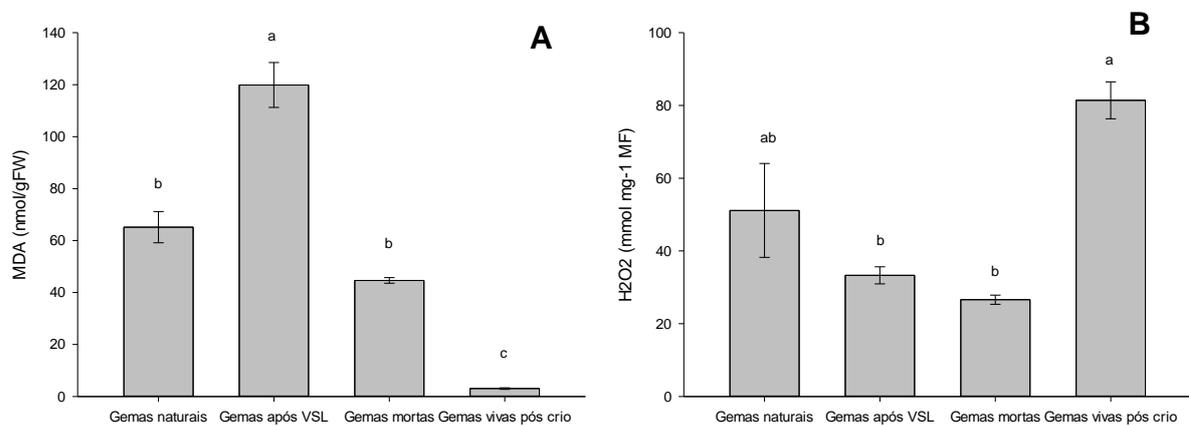


Figura 4: Peroxidação lipídica mensurada pelo marcador malondialdeído (MDA) (A), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B), em gemas de diferentes estágios durante a criopreservação de *Passiflora gibertii* (gemas sem nenhum tratamento, gemas após 45 minutos de solução, gemas mortas após o processo de crio e gemas vivas após a crio). Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

No conteúdo de H₂O₂, a maior média foi encontrada nas gemas vivas após a criopreservação, seguida de médias menores nas gemas naturais e pequenas nas gemas mortas e após o processo de desidratação. ALKAHTANI (2021) associou a maior quantidade de H₂O₂ ao momento de maior estresse por desidratação em plantas de beterraba açucareira e com a aplicação de prolina, esse estresse foi diminuído. ZHANG (2021) encontrou níveis maiores de H₂O₂ na fase de descarregamento, concentrações médias no carregamento, e baixas no pré-

tratamento, em calos de *Dendrobium*. JIANG (2019) mostrou que o conteúdo de H_2O_2 é menor na etapa de vitrificação em relação ao momento de carregamento e descarregamento dos explantes, com a mais baixa concentração nos calos antes do processo. Resultados obtidos na criopreservação de *Paeonia emodi* por REN (2022) mostraram que os níveis de H_2O_2 são menores antes do NL em todos os tratamentos, onde a viabilidade e umidade são diferentes, mostrando também que a aplicação externa de H_2O_2 pode interferir na produção interna de mais ROS, alterando a viabilidade.

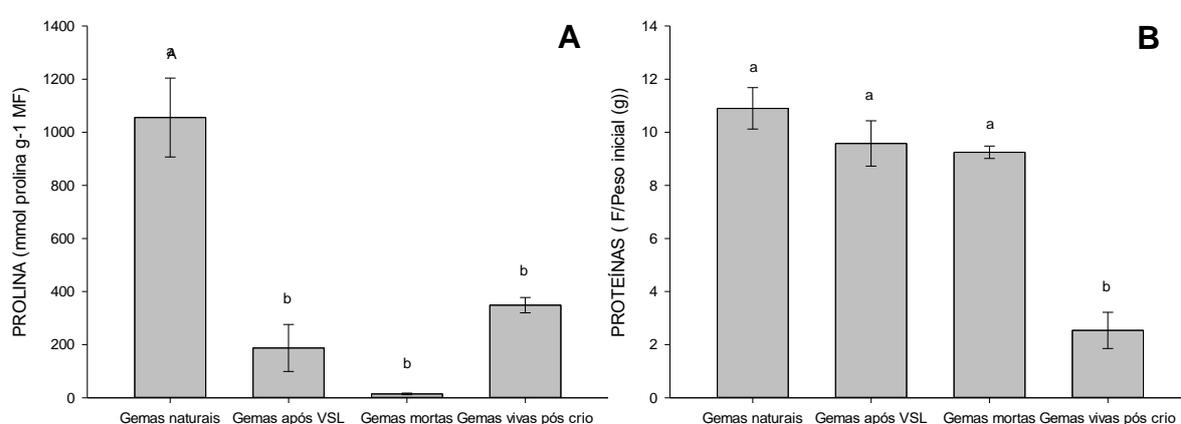


Figura 5: Prolina (A) e proteínas (B), em gemas de diferentes estágios durante a criopreservação de *Passiflora gibertii* (gemas sem nenhum tratamento, gemas após 45 minutos de solução, gemas mortas após o processo de crio e gemas vivas após a crio). Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

O conteúdo de prolina em gemas foi avaliado em diversos estudos relacionados à estresses por congelamento e criopreservação. Yang (2016) correlacionou um aumento no conteúdo de prolina e açúcares solúveis durante o congelamento natural, como uma maneira da planta tolerar esse estresse. Os resultados do presente estudo (Figura 5) mostraram que gemas não processadas apresentaram as maiores médias deste aminoácido, enquanto gemas após vitrificação, mortas e vivas após criopreservação tiveram médias estatisticamente iguais, com valores maiores nas gemas sobreviventes. Resultados suportados por Suzuki (2006) e James Antony (2019), que encontraram médias semelhantes de prolina durante o início do processo de criopreservação, médias menores após a vitrificação e o reaquecimento, e novamente médias crescentes no início do crescimento em gemas. No entanto, BURKHAN (2022) encontrou

resultados opostos em gemas laterais da orquídea *Ludisia discolor*, com médias altas de prolina durante o processo de criopreservação. Estes resultados indicam que o conteúdo de prolina pode ser um indicador importante do estresse das gemas durante e após a criopreservação, embora a correlação exata possa variar dependendo das condições experimentais e das espécies vegetais envolvidas.

O conteúdo de proteínas em gemas de diferentes condições apresentou variação estatística, sendo maiores em gemas naturais, pós VSL e mortas, e menor nas gemas vivas após a criopreservação (Figura 5B). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por James Antony em 2019 em *Dendrobium Sabin Blue* e por POOBATHY et al. (2013) em *Dendrobium Sonia-28*, indicando uma correlação entre a preservação de proteínas e a viabilidade celular após o processo de criopreservação. Além disso, VAN DER WALT et al. (2022) mostraram que o tempo de desidratação influencia no conteúdo de proteínas.

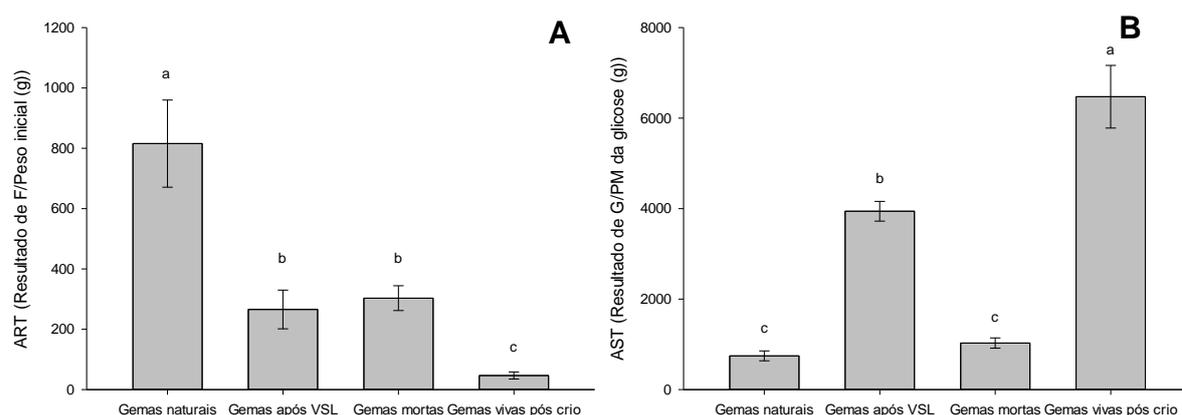


Figura 6: Açúcares redutores totais (A) e açúcares solúveis totais (B), em gemas de diferentes estágios durante a criopreservação de *Passiflora gibertii*. Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

Analisando o conteúdo de açúcares redutores nas gemas, a maior média foi obtida nas gemas naturais (Figura 6A). Já para os açúcares solúveis totais as gemas vivas após criopreservação apresentaram a maior média, seguido pelas gemas após VSL (Figura 6B). Esses resultados estão em linha com outros estudos que indicaram que o estresse induzido pelo processo de criopreservação pode aumentar os teores de açúcares solúveis, como demonstrado por Bian et al. (2002) em calos de *Dendrobium candidum*. No entanto, outros estudos, como o realizado por Wang et al. (2021) em *Allium cepa* var. *aggregatum*, não encontraram diferenças estatisticamente significativas nos teores de açúcares solúveis entre plantas criopreservadas ou

não. Além disso, estudos sobre a pré-cultura com altas concentrações de sacarose para melhorar a criopreservação de tecidos vegetais têm mostrado resultados positivos em várias espécies, como *Cleome spinosa*, crisântemo e tomate (Vilardo et al., 2019; Kulus et al., 2017; Kulus, 2019), sugerindo que esse fator pode influenciar no conteúdo de açúcares solúveis totais. Já calos criopreservados de *Pleione bulbocodioides*, apresentaram altos valores de açúcares solúveis em pré-tratamento e na criopreservação, enquanto que no controle e na regeneração as médias foram baixas (Cheng et al., 2020).

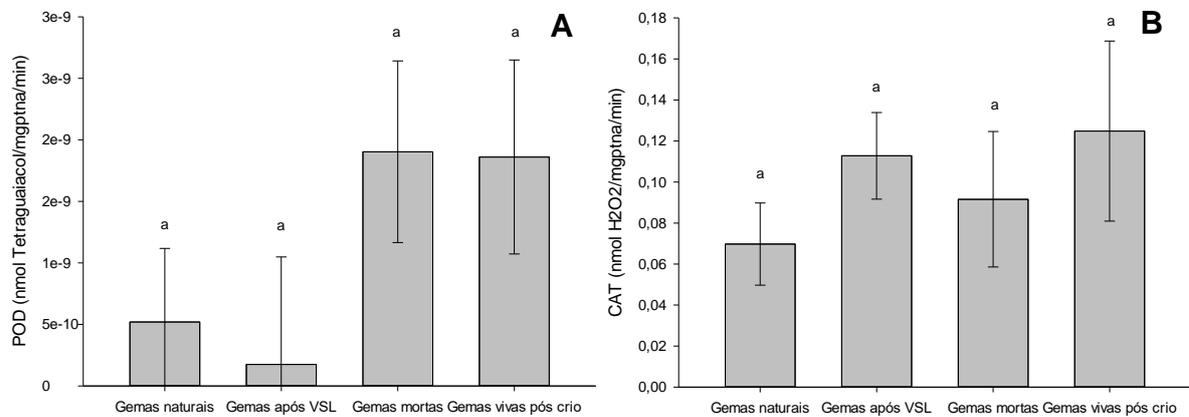


Figura 7: Atividade da peroxidase (POD) (A), e catalase (CAT) (B), em gemas de diferentes estágios durante a criopreservação de *Passiflora gibertii*. Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

As médias de conteúdo de PDO não apresentaram diferença estatística, mas ao considerar apenas os valores brutos vemos diferença (Figura 7A). Estudos realizados por GOETEN et al. (2023) em embriões de *Butia eriospatha* mostraram que o conteúdo de PDO aumentou com a desidratação do explante, sendo maior após 180 minutos em relação aos 15 minutos de desidratação. Por outro lado, o conteúdo de CAT foi maior nos 180 minutos de desidratação, embora as médias já fossem altas desde o início, exceto aos 300 minutos, quando houve uma queda drástica. James Antony et al. (2010) também encontraram um aumento no conteúdo de PDO após a desidratação em *Dendrobium Sabin Blue*, mas a média durante a etapa de recuperação do crescimento foi baixa.

O conteúdo de CAT presente nas gemas não apresenta diferença estatística significativa (Figura 7B). James Antony (2019) analisando a orquídea *Dendrobium Sabin Blue*, obteve um acréscimo no conteúdo de CAT no início do processo de criopreservação. Em contraste, POLESI (2023) estudando *Guadua chacoensis*, encontrou um conteúdo maior de CAT no momento do descongelamento, indicando maior estresse oxidativo nessa etapa. RUIZ-SÁENZ et al. (2022) relataram que médias maiores no conteúdo de CAT e PDO estão relacionadas a médias menores de H_2O_2 , o que aumenta a sobrevivência dos explantes. Contrário ao presente estudo POOBATHY et al. (2013) encontrou em *Dendrobium Sonia-28* médias altas no início e no final do processo, com médias baixas na etapa de desidratação.

4.3 Enraizamento

No experimento de regeneração de gemas pré-crio para espécie *Passiflora gibertii*, a concentração de 2 mg L^{-1} de BAP foi a que apresentou melhores resultados, observando apenas as médias, proporcionando a maior taxa de gemas desenvolvidas e o menor número de gemas mortas (Figura 8).

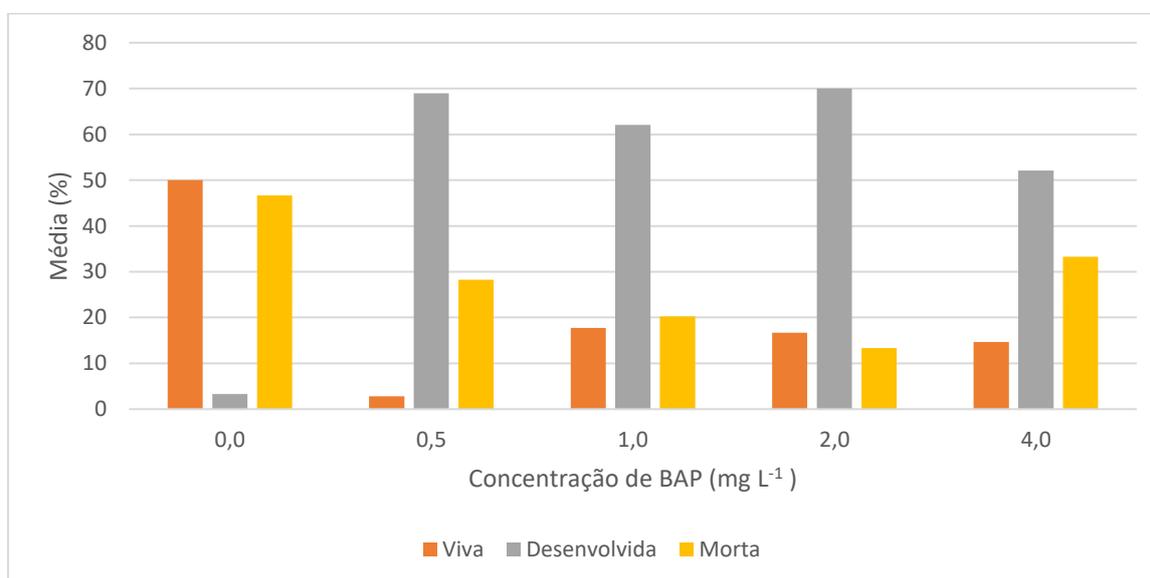


Figura 8: Média de gemas vivas, desenvolvidas e mortas de *Passiflora gibertii* em porcentagem (%) após o experimento de concentrações diferentes de BAP, para regeneração.

No experimento de enraizamento, constatou-se que todas as concentrações de ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) não foram efetivas para a enraizamento da

espécie *Passiflora gibertii*. Em contraste, todas as concentrações de AIA e AIB utilizadas para a espécie *Passiflora alata* promoveram o desenvolvimento de raízes.

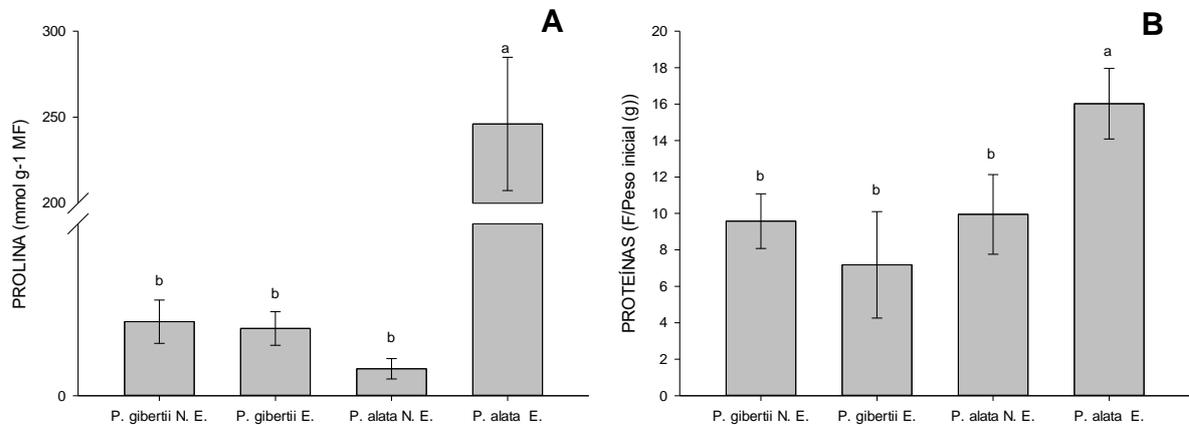


Figura 9: Prolina (A) e proteínas totais (B), em plantas de *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata* enraizadas ou não. A letra (E) significa enraizada. Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

O conteúdo de e prolina (Figura 9A) e de proteínas (Figura 9B) foi avaliado sendo o tratamento com a *Passiflora alata* enraizada estatisticamente superior em relação aos demais. Estudos anteriores, como o de BAUDUIN em 2022 e BIANCUCCI em 2015, analisando a planta *Arabidopsis sp.*, sugerem que a prolina e o H_2O_2 podem agir de maneira conjunta ou independente para influenciar o tamanho do meristema e o alongamento da raiz, provavelmente controlando a proporção entre a divisão e a diferenciação celular, independente dos fitormônios. Portanto, é possível que a presença de maior teor de proteínas e prolina na *Passiflora alata* tenha contribuído para sua maior capacidade de enraizamento.

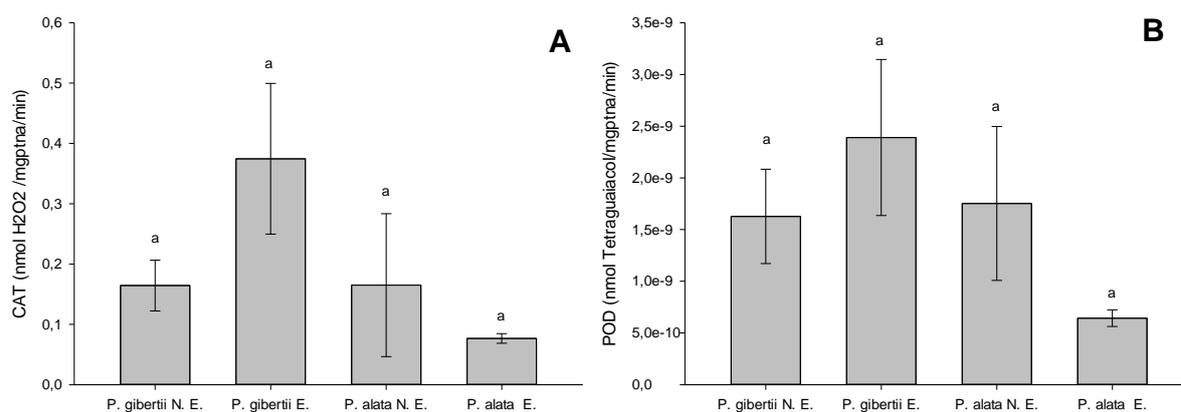


Figura 10: Atividade de catalase (CAT) (A) e peroxidase (POD) (B), em plantas enraizadas ou não de *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata*. A letra (E) significa enraizada. Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

Plantas enraizadas ou não de *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata* não apresentaram diferença estatística para as enzimas CAT (Figura 10A) e POD (Figura 10B).

O crescimento e desenvolvimento de organismos multicelulares dependem da divisão e diferenciação celular, e a interrupção do equilíbrio entre esses eventos pode levar à terminação prematura da organogênese e, conseqüentemente, ao crescimento (ZHANG et al., 2008). As células meristemáticas presentes no meristema apical da raiz (MAR) são organizadas em uma zona central (CZ) em torno de uma zona organizadora (OZ) ou centro quiescente (QC) (YADAV et al., 2009). A manutenção do meristema depende da interação entre o OZ/QC e a zona central, bem como tecidos diferenciados (SCHERES et al., 2002). As diferenças no desenvolvimento do meristema da raiz e do caule estão relacionadas às redes gênicas que regulam a sua atividade e à resposta aos hormônios de crescimento. A atividade do MAR é afetada pela interação entre ROS, componentes redox e fitohormônios (SCHIPPERS et al., 2016).

As células QC dos meristemas apicais de plantas são expostas a um ambiente altamente oxidado, onde formas oxidadas de glutatona e ascorbato estão presentes, enquanto o NADPH é mal detectável. Por outro lado, células adjacentes apresentam maiores capacidades antioxidantes e um ambiente mais redutor (TOGNETTI et al., 2017). A expressão diferencial de genes associados a ROS (espécies reativas de oxigênio) também foi observada em meristemas apicais do caule e da raiz e a atividade interrompida da glutaredoxina (GRX) está intimamente associada com deficiências do meristema (CHOUDHARY et al. 2020). Em

Arabidopsis, GRXS17 controla a translocação e a sensibilidade da auxina (CHENG et al., 2011). A enzima flavina monooxigenase YUCCA6, que é responsável pela síntese de auxinas, possui atividade de tiol redutase, sugerindo a existência de uma conexão entre o sistema redox e a sinalização da auxina (Cha et al., 2015).

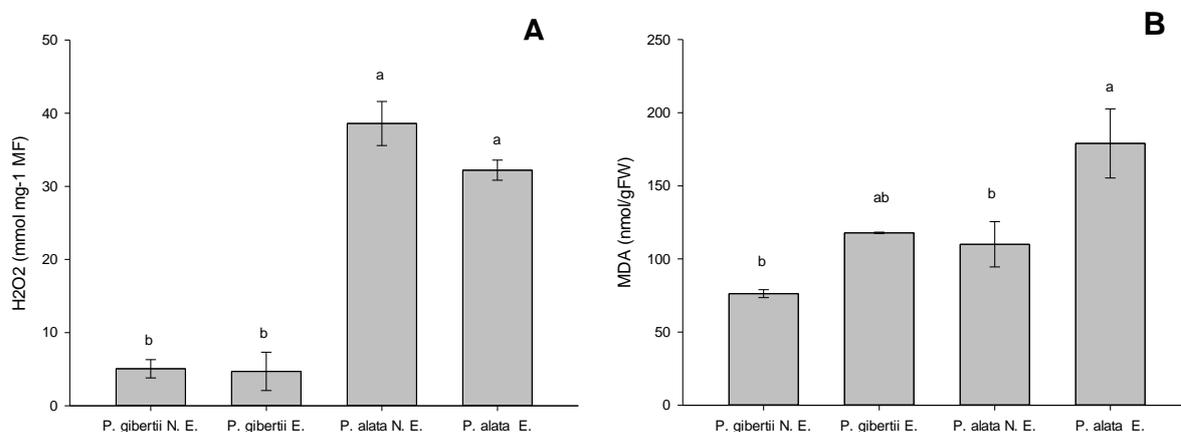


Figura 11: Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A) e peroxidação lipídica (B) mensurada pelo marcador malondialdeído (MDA), em plantas enraizadas ou não de *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata*. A letra (E) significa enraizada. Barras representam valores de média ± erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

As médias do conteúdo de MDA (Figura 11B) foram maiores nas plantas enraizadas *in vitro* em comparação com as não enraizadas, indicando um possível estresse causado pela remoção ou realocação de paredes celulares, realocação de recursos e intensa divisão celular para a formação de novos tecidos. Em relação ao conteúdo de peróxido (Figura 11A) nas raízes, a espécie *Passiflora alata* apresentou médias significativamente maiores em ambas as condições de enraizamento em comparação com a *Passiflora gibertii*.

A atividade do MAR é influenciada por mudanças no estado redox celular. Um exemplo disso é a redução do número de células meristemáticas no MAR por aplicação de H₂O₂ exógeno (TSUKAGOSHI et al., 2010). Ademais, o dano ao DNA leva ao acúmulo de H₂O₂ pela FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 1, resultando em uma diminuição no tamanho do meristema da raiz, indicando que o H₂O₂ atua como um regulador negativo da manutenção do MAR. Estudos de gradiente de ROS em diferentes zonas de raízes revelaram que H₂O₂ tem picos na zona de alongamento, enquanto O₂⁻ tem picos na zona de divisão celular (RUBIO-DIAZ et al., 2012; TSUKAGOSHI, 2016). Essas distribuições sugerem que O₂⁻ e H₂O₂ atuam antagonicamente (ZENG et al., 2017).

A homeostase de ROS regula a transição da proliferação para o alongamento celular durante a diferenciação inicial, em que H₂O₂ se acumula na região de alongamento e O₂⁻ na região meristemática em *Arabidopsis* raiz (DUNAND et al., 2007; TSUKAGOSHI et al., 2010). A região de transição, entretanto, apresenta uma sobreposição de O₂⁻ e H₂O₂, e o equilíbrio entre essas duas ROS é controlado por UPBEAT1 (UPB1), um fator de transcrição regulado positivamente na região de transição das raízes (TSUKAGOSHI et al., 2010). A expressão gênica de peroxidases é mediada pelo UPB1, que regula negativamente os genes que codificam para um conjunto de peroxidases, mantendo o equilíbrio necessário entre radicais de oxigênio e H₂O₂ (TSUKAGOSHI et al., 2010). Além disso, a diferenciação de pelos radiculares é regulada por PFT1/MED25 e MED8, em que PFT1/MED25 é responsável pela produção de ROS durante a diferenciação, enquanto MED8 regula independentemente o crescimento de órgãos e a homeostase de ROS em raízes (XU and LI, 2011). Dessa forma, a produção de ROS é necessária para manter o equilíbrio na diferenciação celular, e o perfil transcricional é importante para elucidar o papel de fatores de transcrição e peroxidases na regulação da homeostase de ROS durante o crescimento e desenvolvimento de organismos multicelulares.

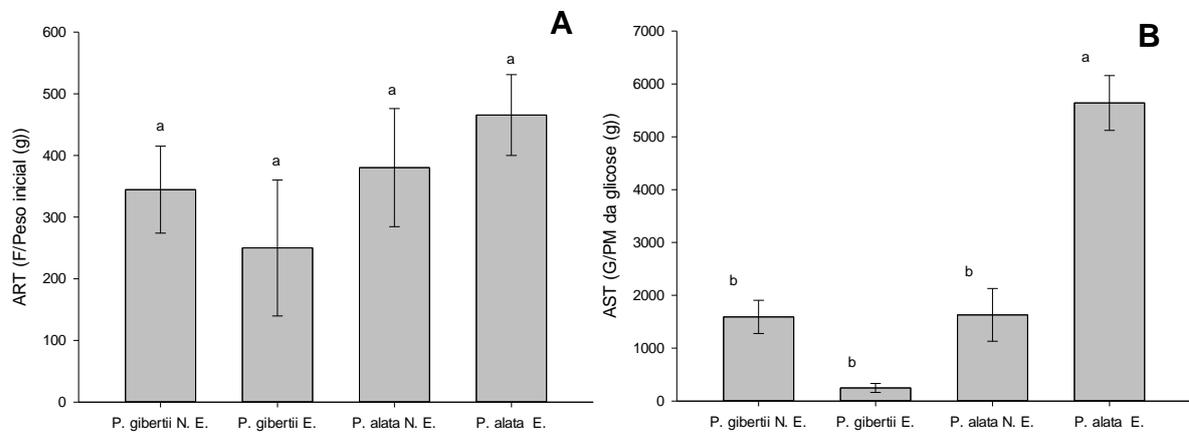


Figura 12: Açúcares redutores totais (ART) (A) e açúcares solúveis totais (AST) (B), em plantas enraizadas ou não de *Passiflora gibertii* e *Passiflora alata*. A letra (E) significa enraizada. Barras representam valores de média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as variáveis a nível de significância de 5% pelo teste Tukey. Fonte: Do autor (2023).

Os resultados mostraram que a *Passiflora alata* enraizada apresentou um conteúdo estatisticamente superior de açúcares solúveis em relação aos demais tratamentos (Figura 12B). Já em relação aos açúcares redutores, não houve diferença estatística (Figura 12A).

De forma geral, a formação de raízes adventícias em tecidos *in vitro* é influenciada por fatores endógenos ou exógenos. Dentre os endógenos, destaca-se os níveis hormonais e a realocação adequada de recursos entre os tecidos existentes e as novas células radiculares em formação (DRUEGE et al., 2019). Inicialmente na formação de raízes há uma fase de atraso anatômico desprovida de alterações celulares, durante a qual ocorre a reprogramação celular inicial, onde as células são convertidas diretamente em células fundadoras de raiz por meio de um sinal de indução de raiz, sendo este sinal geralmente associado a presença de auxina (IKEUCHI et al., 2016). Após este momento, as novas células potenciais de raiz apresentam mudanças celulares a nível morfológico e fisiológico que resultam na diferenciação dos primórdios em células radiculares completas, com conexão vascular ao tecido original (DRUEGE et al., 2019).

Verstraeten e colaboradores (2014) constataram o acúmulo de auxina nas fases iniciais da formação de raízes adventícias. Li et al. (2018) também observaram um aumento nos níveis de açúcares solúveis totais nesta fase. Tahir et al. (2021) verificaram a ativação de genes relacionados ao metabolismo de açúcares induzida pela auxina nas fases iniciais de indução de raízes adventícias.

De fato, açúcares são considerados tanto como fonte energética como moléculas sinalizadoras envolvidas na formação deste tipo de raízes. El-Banna et al. (2023) verificaram uma correlação positiva entre o aumento de auxina e níveis de açúcares solúveis e fenóis em *Zanthoxylum beecheyanum* K. Koch. Além disso sugere-se a atuação destas moléculas como fonte de energia e com papel estrutural celular na formação dos primórdios radiculares. Komami e Sugimoto (2012) descrevem que açúcares atuam como importantes reguladores do ciclo celular, estimulando ciclinas e fatores de transcrição durante a fase de indução de raízes que levam a um aumento da divisão e expansão celular nas fases seguintes.

Dessa forma, a maior capacidade da espécie *Passiflora alata* em enraizar pode ser devido a maior proporção de conversão de células diferenciadas em primórdios radiculares, induzida pelos maiores níveis de açúcares solúveis totais (AST). Além disso, o aumento de AST pode ter estimulado o aumento da divisão celular e fornecido maiores quantidades de carbono como energia que resultaram em maior formação de raízes. Essa maior facilidade de enraizamento também pode estar relacionada a maior sinalização redox, também induzida pela presença de auxina, evidenciada pelos maiores níveis de peróxido de hidrogênio nesta espécie. Da mesma forma, a dificuldade da espécie *Passiflora gibertii* pode estar associada a baixos

níveis de ROS e AST que atrasaram ou não foram suficientes para sinalizarem para conversão dos primórdios radiculares e conseqüentemente, formação de raízes adventícias.

5. Conclusões

Concluiu-se com o presente trabalho que a técnica modificada droplet vitrification é eficiente na criopreservação de gemas axilares de *Passiflora gibertii*, juntamente com a concentração de 2mg de BAP em meio MS 100% para sua regeneração. Além disso, foi constatado que o tempo de 45 minutos de exposição a solução VSL é o de maior eficiência para a respectivas espécie e técnica. Durante o processo de criopreservação, a exposição a solução ocasionou um certo grau de estresse às gemas, evidenciado pelo aumento significativo de MDA. A manutenção de altos níveis de MDA juntamente com a redução de mecanismos antioxidantes protetores (como açúcares redutores e prolina) resultaram na morte celular dessas gemas, como observado nas gemas mortas. Por outro lado, após a aplicação da solução de VSL, quando houve redução do conteúdo de MDA, as gemas puderam se manter vivas e investir no processo de regeneração, sendo o aumento de açúcares solúveis e peróxido de hidrogênio provavelmente relacionados a obtenção de energia e sinalização, respectivamente.

O enraizamento das duas espécies de *Passiflora* não aconteceu da mesma forma em nenhuma concentração dos reguladores de crescimento testados e os testes bioquímicos serviram para nos esclarecer possíveis razões para este acontecimento. No caso de *Passiflora gibertii*, houve uma aparente dificuldade de enraizamento, não havendo diferença em nenhum marcador bioquímico analisado, que pode ter refletido, mesmo nos explantes enraizados dessa espécie, em raízes curtas ou calos com pouca diferenciação em raiz. Por outro lado, a espécie *Passiflora alata*, apresentou maior facilidade de enraizamento. Além disso, há claramente diferenças nos marcadores bioquímicos avaliados que explicam a diferença de explantes enraizados dos não enraizados.

6. Referencias Bibliográficas

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 109, p. 1247-1257, 1995.

ALEXANDRE, Rodrigo Sobreira; WAGNER JÚNIOR, Américo; NEGREIROS, Jacson Rondinelli da Silva; *et al.* Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1239–1245, 2004.

BARRACO, Giuseppe; SYLVESTRE, Isabelle; ENGELMANN, Florent. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum spp.*) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 1, p. 320–324, 2011.

BAUDUIN, Sara; LATINI, Martina; BELLEGGIA, Irene; *et al.* Interplay between Proline Metabolism and ROS in the Fine Tuning of Root-Meristem Size in Arabidopsis. **Plants**, v. 11, n. 11, p. 1512, 2022.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*; Springer pp. 15–32. 2008.

BETTONI, Jean Carlos; BONNART, Remi; VOLK, Gayle M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 1, p. 21–34, 2021.

BI, Wenlu; SAXENA, Akansha; AYYANATH, Murali-Mohan; *et al.* Conservation, propagation, and redistribution (CPR) of Hill's thistle: paradigm for plant species at risk. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, n. 1, p. 75–88, 2021.

BIANCUCCI, Marco; MATTIOLI, Roberto; MOUBAYIDIN, Laila; *et al.* Proline affects the size of the root meristematic zone in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 263, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURKHAN, H.; RAJAN, K.S.; APPALASAMY, S.; POOBATHY, R.; CHEW, B.L.; MARIAPPAN, V.; SUBRAMANIAM, S. Effect of Cryopreservation Method Supported with Biochemical Analyses in the Axillary Bud of Jewel Orchid, *Ludisia discolor*. **Plants**. 2022.

CARILLO, P.; GIBON, Y. PROTOCOL: Extraction and determination of proline. PrometheusWiki, 2011.

CAVICHIOLO, José Carlos; MATA, Fernando Dantas da; RONDA, Jeancesar de Souza; *et al.* Desempenho produtivo de maracujazeiro amarelo em área com *Fusarium solani*. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 16, n. 5, p. 96–102, 2020.

COELHO, Natacha; GONÇALVES, Sandra; ROMANO, Anabela. Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 345, 2020.

CROCHEMORE, Maria Lúcia; MOLINARI, Hugo Bruno; STENZEL, Neusa Maria Colauto. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 5–10, 2003.

DELGADO-ACEVES, Lourdes; PORTILLO, Liberato; FOLGADO, Raquel; ROMO-PAZ, Felipe de Jesús; GONZALES-ARNAO, Maria Tereza. New approaches for micropropagation and cryopreservation of *Agave peacockii*, an endangered species. **Springer Nature B.V.**, 2022.

DELGADO-ACEVES, Lourdes; GONZÁLEZ-ARNAO, María Teresa; SANTACRUZ-RUVALCABA, Fernando; FOLGADO, Raquel; PORTILLO, Andliberato. Indirect Somatic Embryogenesis and Cryopreservation of *Agave tequilana* Weber Cultivar ‘Chato’. **Plants**. 2021.

DORNELAS, Marcelo Carnier; CARNEIRO VIEIRA, Maria Lucia. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 2, p. 211–217, 1994.

DRUEGE, Uwe; HILO, Alexander; PÉREZ-PÉREZ, José Manuel; *et al.* Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. **Annals of Botany**, v. 123, n. 6, p. 929–949, 2019.

EL-BANNA, Mostafa F; FARAG, Nardin, B.B; MASSOUD, Hekmat Y; KASEM, Mahmoud M.; Exogenous IBA stimulated adventitious root formation of *Zanthoxylum beecheyanum* K. Koch stem cutting: Histo-physiological and phytohormonal investigation, **Plant Physiology and Biochemistry**. v 197, 2023.

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

EROL, Ozgur Dogus; PERVIN, Burcu; SEKER, Mehmet Emin; *et al.* Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 9, p. 1197–1214, 2021.

FANG, Wei-Ching; KAO, Ching Huei. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v. 158, n. 1–2, p. 71–76, 2000.

FALEIRO, Fábio Gelape; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; JUNGHANS, Tatiana Góes; *et al.* Advances in passion fruit (*Passiflora spp.*) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, p. e-155, 2019.

FARIA, Gláucia Amorim; COSTA, Maria Angélica Pereira de Carvalho; JUNGHANS, Tatiana Góes; *et al.* Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267–270, 2006.

FOX, John; WEISBERG, Sanford. An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. **Thousand Oaks CA: Sage**. 2019.

GALLARD, Anthony; PANIS, Bart; DORION, Noëlle; *et al.* CRYOPRESERVATION OF *Pelargonium* APICES BY DROPLET-. p. 9, 2008.

GAMA, Vinícius Novo; CUNHA, Joilton Tavares; DE MELO LIMA, Inorbet; *et al.* Photosynthetic characteristics and quality of five passion fruit varieties under field conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 3, p. 941–948, 2013.

HALMAGYI, A.; COSTE, A.; JARDA, L.; BUTIUC-KEUL, A; HOLOBIUC, I; CRISTEA, V. A safeguard measure of endemic and endangered plant species: cryostorage of *Dianthus taxa*. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 11–12, p. 3445–3460, 2020.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v. 125, p. 189–198, 1968.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário e PAM – Produção Agrícola Municipal**, 2021.

IKEUCHI, Momoko; OGAWA, Yoichi; IWASE, Akira; *et al.* Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v. 143, n. 9, p. 1442–1451, 2016.

JANG, Tae Hoon; PARK, Sung Choel; YANG, Ji Hyun; KIM, Jung Yoon; SEOK, Jae Hong; PARK, Ui Seo; CHOI, Chang Won; LEE, Sung Ryul; HAN, Jin. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**. 2017.

JOHANSEN D. A. Plant Microtechnique. **Nature** 147, 222, 1941.

JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; LAGE, Daniel Anacleto da Costa; BRAGA, Marcelo Fideles; *et al.* Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *Passiflora silvestre*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 97–100, 2006.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A.; *In Vitro* Micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit), **Annals of Botany**, v 65, Issue 3, p 337–339, 1990.

KOMAKI, S.; SUGIMOTO, K. Control of the Plant Cell Cycle by Developmental and Environmental Cues. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 6, p. 953–964, 2012.

LEE, Hyoeun; PARK, Hana; POPOVA, Elena; LEE, Young-Yi; PARK, Sang-Un; KIM, Haeng-Hoon. Ammonium-Free Medium is Critical for Regeneration of Shoot Tips of the Endangered Species *Pogostemon Yatabeanus* Cryopreserved Using Droplet-vitrification. **Cryoletters**, v. 42, n. 5, p. 290-299, 2021.

LENTH R (2019) emmeans: Estimated Marginal Means, aka LeastSquares Means. R package version 1.3.5.

LI, Ke; LIANG, Yongqi; XING, Libo; *et al.* Transcriptome Analysis Reveals Multiple Hormones, Wounding and Sugar Signaling Pathways Mediate Adventitious Root Formation in Apple Rootstock. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2201, 2018.

MATSUMOTO T, SAKAI A, TAKAHASHI C, YAMADA K (1995) **CryoLetters**, v. 16, p. 189-196, 1995.

MIKOSVKI, Andreia Izabel; SILVA, Nayara Tayane; SOUZA, Claudinei Santos; *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, 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, jun, 1964.

PACHECO, Georgia; SIMÃO, Mariela J.; VIANNA, Marcela G.; *et al.* In vitro conservation of Passiflora —A review. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 305–311, 2016.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 45–55, 2005.

PEIXOTO, P. H. P. *et al.* Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 3, n.11, p. 137-143, 1999.

PENA, E. A; SLATE, E. H. Global Validation of Linear Model Assumptions. **J. American Statistical Association**. 2006.

SAKAI, Akira.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, 1990.

SAKAI, Akira; ENGELMANN, Florent. VITRIFICATION, ENCAPSULATION-VITRIFICATION AND DROPLET-VITRIFICATION: A REVIEW. **Cryoletters**. p. 23, 2007.

SAMUELS, Fionna M. D.; STICH, Dominik G.; BONNART, Remi; *et al.* Non-Uniform Distribution of Cryoprotecting Agents in Rice Culture Cells Measured by CARS Microscopy. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 589, 2021.

ŞESAN, Tatiana Eugenia; SÂRBU, Anca; SMARANDACHE, Daniela; *et al.* BOTANICAL AND PHYTOCHEMICAL APPROACH ON PASSIFLORA SPP. – NEW NUTRACEUTICAL CROP IN ROMANIA. **Journal Of Plant Development**. p. 30, 2016.

SHEIKHOLESLAMI, Bitia; SHUKLA, Mukund; TURI, Christina; *et al.* Saving threatened plant species: Reintroduction of Hill’s thistle (*Cirsium hillii*. (Canby) Fernald) to its natural habitat. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231741, 2020.

SILVEIRA, Márcia Régia Souza; GOMES, W. K. S.; SOUSA, A. E. D.; *et al.* CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS DE MARACUJAZEIRO. p. 7, 2015.

SOARES, W.S.; RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; *et al.* Caracterização de frutos e sementes em acessos de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. spe, p. 569–573, 2011.

SUZUKI, Mitsuteru; TANDON, Pramod; ISHIKAWA, Masaya; *et al.* Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 123–131, 2008.

SYDYKOV, Bulat; OLDENHOF, Harriëtte; BARROS, Lawrence de Oliveira; SIEME, Harald; WOLKERS, Willem F. Membrane permeabilization of phosphatidylcholine liposomes induced by cryopreservation and vitrification solutions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** v. 1860, p. 467-474, 2018.

TAHIR, Muhammad Mobeen; CHEN, Shiyue; MA, Xiaoyan; *et al.* Transcriptome analysis reveals the promotive effect of potassium by hormones and sugar signaling pathways during adventitious roots formation in the apple rootstock. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 165, p. 123–136, 2021.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; *et al.* Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 89–97, 2013.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VERSTRAETEN, Inge; SCHOTTE, SÃ©bastien; GEELEN, Danny. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014

VIANNA, Marcela G.; GARCIA, Renata O.; MANSUR, Elisabeth; *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 (PCTOC)**, v. 139, n. 2, p. 369–379, 2019.

WANG, M; BAO, J; MA, X; XIE, L; ZHU, L; LIU, M; LU, X; ZHANG, D; WANG, Q. Vitrification Cryo-Foil for Apple Cryopreservation and the Seesaw Effect Between Shoot Recovery and Virus Eradication. **Research Square**. 2021.

WICKHAM, Hadley; AVERICK, Mara; BRYAN, Jennifer; *et al.* Welcome to the Tidyverse. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag New York**. 2016.

ZAMECNIK, Jiri; FALTUS, Milos; BILAVCIK, Alois. Vitrification Solutions for Plant Cryopreservation: Modification and Properties. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2623, 2021.

ZHANG, Xiao-Chen; BAO, Wen-Wu; ZHANG, A-ling; *et al.* Cryopreservation of shoot tips, evaluations of vegetative growth, and assessments of genetic and epigenetic changes in cryo-derived plants of *Actinidia* spp. **Cryobiology**, v. 94, p. 18–25, 2020.

Material Suplementar

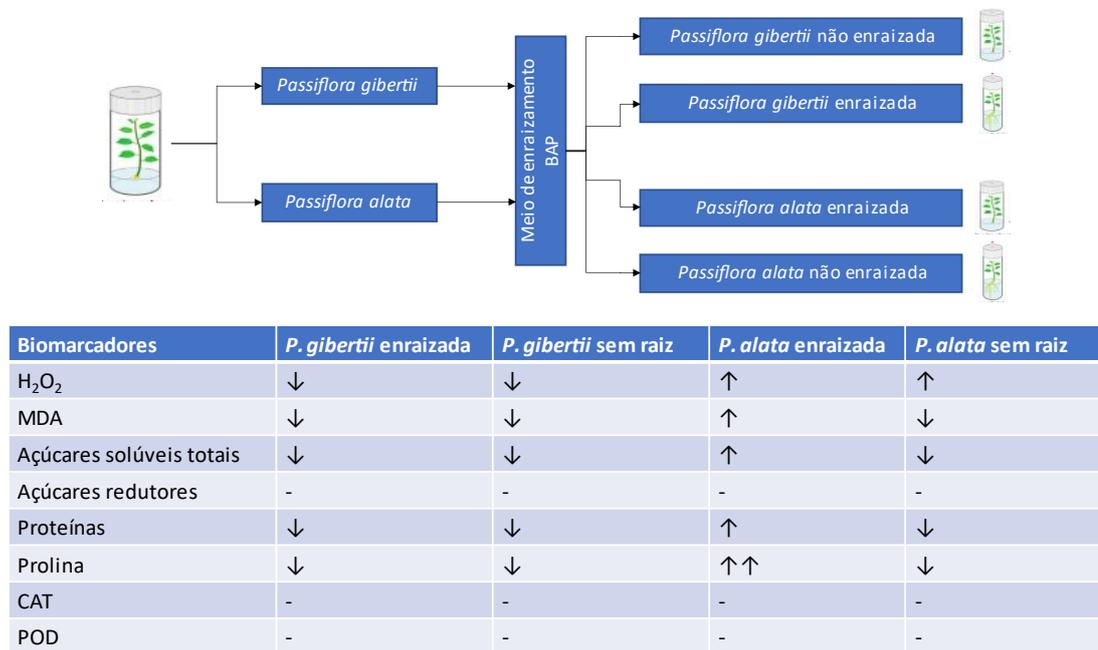


Figura 1 suplementar: Esquema com tabela de resultados das análises bioquímicas do experimento de enraizamento.

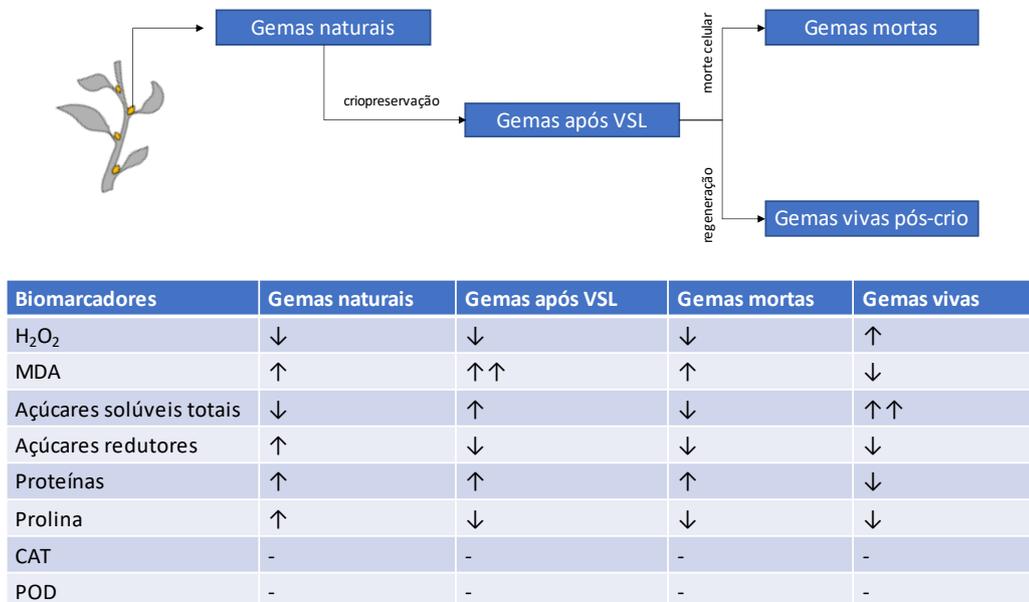


Figura 2 suplementar: Esquema do material analisado com tabela de resultados das análises bioquímicas do experimento de criopreservação.