



**ANA LUÍSA CORRÊA SOARES**

**MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO E  
CONSERVAÇÃO *in vitro* DE MARACUJAZEIRO  
NATIVO**

**LAVRAS – MG  
2013**

**ANA LUÍSA CORRÊA SOARES**

**MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE  
MARACUJAZEIRO NATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador  
Renato Paiva, Ph.D.

Co-orientador  
Dr. Luciano Coutinho Silva

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Soares, Ana Luísa Corrêa.

Multiplicação, enraizamento e conservação *in vitro* de  
maracujazeiro nativo / Ana Luísa Corrêa Soares. – Lavras : UFLA,  
2013.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. *Passiflora*. 2. Criopreservação. 3. Micropropagação. 4. Espécie  
nativa. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.4560416

**ANA LUÍSA CORRÊA SOARES**

**MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE  
MARACUJAZEIRO NATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de julho de 2013.

Dr. Breno Régis Santos

UNIFAL

Dr<sup>a</sup>. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

EMBRAPA CAFÉ

Renato Paiva, Ph.D.

Orientador

Dr. Luciano Coutinho Silva

Co-orientador

**LAVRAS – MG  
2013**

*Aos meus pais, Glaucia e José Maria, por me permitirem sonhar,  
mesmo  
que o sonho esteja cada vez mais longe, e pela força sempre.  
Ao Ivan, que me orgulho chamar de irmão, pela inteligência,  
amor e  
humanidade.  
À tia Laetitia, tia Zezé, à minha querida vó e à tia Leca,  
exemplos de  
força e humildade e por me fazerem acreditar que tudo pode  
ser melhor.  
À família que pude escolher, Márcia, Silvia e Teté, que me  
permitiram  
crescer rodeada de amor, esperança e dignidade.  
À Naná (in memorian), primo Glad (in memorian), tio  
Alexandre (in  
memorian) e tio Zé (in memorian) que começaram esse  
caminho comigo e,  
tenho certeza, me deram forças para segui-lo.  
Aos meus amigos de Lavras, Carol, Elis, Mari, Camila, Dé, Stela,  
Coca e  
Bené, pois só com eles chegaria até aqui.  
Aos meus amigos de BH, em especial à Lu, Michelle, Araújo e  
Claudinha, sempre me recebendo com muito carinho a cada  
volta.  
Aos grandes amigos que fiz no LCTP, pelos dias que passamos  
lutando,  
sonhando e crescendo juntos.*

*DEDICO*

**AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Renato Paiva, pela orientação, pelos conselhos, incentivo e confiança em mim depositada.

Ao Luciano Coutinho, pela co-orientação, amizade, por toda a paciência e por compartilhar sua imensa sabedoria.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - UFLA, em especial Fernanda, Cibele, Tina, Diogo, Dani, Mayara, Paulo e Cecília, pela ajuda e apoio em qualquer momento.

Aos meus grandes amigos, companheiros na trajetória em Lavras, Carol, Stela, Débora, Elis, Mari Yankous, Coca e Bené, pelo apoio e por tudo que passamos juntos.

Às minhas amigas da Fisiologia Vegetal - UFLA, Mari, Dayane, Tássia e Patrícia, por toda força sempre.

À Lena, Tanhan e Evaristo, pela companhia todos os dias.

Aos meus pais, Maria Glaucia e José Maria, pelas oportunidades, pela confiança e sincera orientação.

Ao Ivan, meu irmão mais velho, sempre fonte de inspiração.

A toda minha família, pelo amor incondicional.

Obrigada por tudo!

## **RESUMO GERAL**

As espécies de maracujazeiro *Passiflora cincinnata*, *Passiflora giberti* e *Passiflora setacea* são nativas do Brasil e, apesar da baixa produtividade, essas espécies apresentam potencial de mercado, em função das características medicinal, alimentícia e ornamental. Além disso, são resistentes a algumas doenças às quais os maracujazeiros comerciais são suscetíveis, o que faz delas fontes de material genético para uso em programas de melhoramento e como porta-enxerto. A micropropagação é uma técnica utilizada para a produção em larga escala de material vegetal em condições assépticas, e a criopreservação é o armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido (NL) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a micropropagação e a criopreservação para as três espécies. A indução de brotações *in vitro*, a partir de segmentos nodais das três espécies, foi avaliada, utilizando diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), e o enraizamento de *P. giberti* foi estudado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) assim como a presença e ausência de carvão ativado (CA). Um meio de cultivo, para regeneração de ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea*, utilizando meio MS com diferentes concentrações de BAP, foi estabelecido. Para a criopreservação das três espécies, ápices caulinares foram tratados por diferentes tempos de exposição à solução de vitrificação (PVS2) antes da imersão em NL. Para a regeneração dos ápices caulinares de *P. cincinnata*, após a criopreservação, diferentes concentrações e períodos de tratamento de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) foram testados. Foi observado que a maior indução de brotações de *P. setacea*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, foi obtida em meio MS, contendo  $2,0\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, entretanto, o maior comprimento foi obtido na ausência deste regulador. O enraizamento, bem como o crescimento da parte aérea de *P. giberti*, é favorecido pelo tratamento prévio com  $2,0\text{ mg L}^{-1}$  de AIB antes da transferência para meio contendo CA. A maior sobrevivência de ápices caulinares ou de gemas laterais de *P. setacea* é obtida em meio de cultivo MS acrescido de  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, e a utilização de  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  deste regulador promove uma maior formação de cluster de gemas nos explantes. Para a criopreservação das três espécies, a sobrevivência de ápices caulinares não foi afetada pelos diferentes tempos de exposição a PVS2, entretanto, na comparação entre as espécies, *P. cincinnata* e *P. giberti* apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência comparada a *P. setacea*. A utilização de  $\text{GA}_3$  não promoveu qualquer efeito na regeneração dos ápices caulinares de *P. cincinnata* após a criopreservação.

**Palavras-chave:** Criopreservação. *Passiflora*. Micropropagação. Espécie nativa. Ultra-baixa temperatura.

#### GENERAL ABSTRACT

*Passiflora cincinnata*, *Passiflora setacea* and *Passiflora giberti* are passion flower species, native to Brazil, that belongs to *Passiflora* genus. Despite the low productivity, these species have commercial potential due to the ornamental and medicinal characteristics, and the edible fruits. Moreover, they are resistant to some diseases that commercial passion fruits are susceptible, what makes them a possible source for using in breeding programs and/or as rootstock. Micropropagation is a technique for large-scale production of plant material under aseptic conditions and cryopreservation is the storage of biological material in liquid nitrogen (LN) at  $-196^{\circ}$  C. Thus, *in vitro* conservation is a viable alternative for the production and conservation of plant species for prolonged periods. Therefore, this work aimed to study micropropagation and establish a cryopreservation protocol for these three species. *In vitro* shoot induction from nodal segments of the three species was evaluated using different concentrations of benzylaminopurine (BAP), and the rooting of *P. giberti* was studied with different concentrations of indolebutyric acid (IBA). The presence and absence of activated charcoal (AC) were also studied for rooting. Before cryopreservation, culture medium for apical and lateral buds of *P. setacea* regeneration, using MS medium with different BAP concentrations, was established. For the three species cryopreservation, shoot tips were treated with vitrification solution (PVS2) for different times, before plunge into LN. For shoot tips of *P. cincinnata* regeneration after cryopreservation, different concentrations and periods of treatment of gibberellic acid ( $GA_3$ ) were tested. It was observed that a greater induction of shoots of *P. setacea*, *P. cincinnata* and *P. giberti* was obtained on MS medium containing  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, however, the greatest length was obtained in the absence of the regulator. Shoots rooting and growth of *P. giberti*, are favored by pretreatment with  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  IBA before transfer to medium containing AC. The higher survival of *P. setacea* shoot tips or lateral buds is obtained on MS medium supplemented with  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, and the use of  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of this regulator promotes higher bud cluster formation in explants. For cryopreservation of the three species, shoot tips survival was not affected by the different times of exposure to PVS2, however, in the comparison between species, *P. cincinnata* and *P. giberti* presented higher survival percentages than *P. setacea*. The use of  $GA_3$  did not promote any effect on the shoot tips regeneration of *P. cincinnata* after cryopreservation.

**Keywords:** Cryopreservation. *Passiflora*. Micropropagation. Native species. Ultra-low temperature.

## SUMÁRIO



CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1 Maracujazeiro .....	14
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> .....	16
2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de maracujazeiro.....	18
2.3 Conservação e criopreservação.....	19
2.3.1 Conservação de maracujazeiro.....	23
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 Multiplicação e enraizamento de maracujazeiro nativo.....	32
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
1 INTRODUÇÃO .....	35
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 Material vegetal .....	38
2.2 Multiplicação .....	39
2.3 Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Passiflora giberti</i> .....	39
2.4 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4 CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 3 Conservação <i>in vitro</i> de maracujazeiro nativo.....	62
RESUMO .....	63
ABSTRACT .....	64
1 INTRODUÇÃO .....	65
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
2.1 Material vegetal .....	69
2.2 Cultivo de ápices caulinares e gemas laterais .....	69

2.3	<i>Droplet vitrification</i> .....	70
2.4	Otimização da retomada de crescimento de ápices criopreservados.....	71
2.4.1	Inoculação de ápices em meio com GA3 por 30 dias (Experimento1)...	71
2.4.2	Inoculação de ápices em meio com GA3 por 15 dias (Experimento 2) ..	72
2.5	Análise estatística.....	72
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
4	CONCLUSÕES .....	81
	REFERÊNCIAS.....	82

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e o gênero *Passiflora* apresenta diversas espécies com grande importância econômica, sendo considerado o mais importante e, de acordo com Maruki-Uchida et al. (2013), no Brasil existem 140 espécies nativas, sendo 83 endêmicas. De forma geral, os frutos de espécies do gênero *Passiflora* são consumidos *in natura* ou utilizados para produção de sucos e doces, e muitas espécies possuem valor ornamental, em função da vistosidade e exuberância de suas flores, além de apresentarem propriedades medicinais (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2008).

As espécies *Passiflora cincinnata* Mast., popularmente conhecida como maracujá-do-mato, *Passiflora giberti* N.E. Brown, de nome popular maracujá-do-campo, e *Passiflora setacea* DC, chamada de maracujá-do-sono, são nativas do cerrado (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; KIILL et al., 2010), possuem baixa produtividade e seus frutos são coletados de forma extrativista por populações locais (PAULL; DUARTE, 2012). As três espécies são, de forma geral, resistentes a doenças às quais os maracujazeiros são mais suscetíveis, característica esta favorável à utilização em programas de melhoramento genético e como porta-enxerto para *Passiflora edulis* (maracujá-azedo), que é a espécie mais cultivada e comercializada (AGUIAR et al., 2010; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; MELETTI et al., 2005).

O Brasil possui condições climatológicas favoráveis para o cultivo do maracujazeiro e a cultura está presente em quase todas as regiões (MELO; MANICA; JUNQUEIRA, 2001). O país é, também, o maior produtor e consumidor do fruto e seus derivados (LIMA et al., 2013). Nos últimos 30 anos, o cultivo de maracujazeiros vem crescendo e, de 1990 a 1996, a área de cultivo aumentou em, aproximadamente, 75% (MELETTI, 2011). Apesar disso, a

produtividade, ainda, é considerada baixa em relação ao seu potencial de mercado, principalmente, em virtude da carência de informações técnico-científicas e do baixo nível tecnológico dos produtores no manejo da cultura (MELO; MANICA; JUNQUEIRA, 2001). Além disso, a produção de materiais isentos de contaminantes e a propagação vegetativa de clones elites podem auxiliar no incremento da produção desta cultura.

A cultura de tecidos constitui-se como uma ferramenta para obtenção de plantas saudáveis e vigorosas em escala comercial, sendo a micropropagação, uma das mais importantes técnicas de cultivo *in vitro*. A partir dela é possível propagar espécies com sementes que apresentam alguma dificuldade de germinação por métodos convencionais, produzir material vegetal em condições assépticas e em larga escala independente da época do ano, além de facilitar trocas de materiais genéticos entre instituições de pesquisa (PINHAL et al., 2011). Além disso, o cultivo *in vitro* pode contribuir para programas de melhoramento genético e constitui-se como um importante método de conservação, por viabilizar a inclusão e manutenção de espécies em bancos de germoplasma *in vitro* (KELLER et al., 2013).

A utilização em equilíbrio de substâncias reguladoras de crescimento é um dos fatores que afetam o sucesso do cultivo *in vitro*. As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas e o balanço destes dois irá conduzir o desenvolvimento do explante. De maneira geral, as citocininas estão relacionadas com a indução de formação de brotos e as auxinas com a indução da rizogênese (EDWIN et al., 2008; SAINI et al., 2013).

Outro problema acerca das três espécies em questão é o fato de o cerrado, bioma considerado ameaçado, ser um de seus domínios fitogeográficos (BERNACCI et al., 2013; CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN, 2013). Sendo assim, *P. setacea*, *P. cincinnata*, e *P. giberti* estão,

também, sujeitas às pressões antrópicas exercidas sobre o cerrado, aumentando a necessidade de encontrar alternativas para conservação dessas espécies.

Dentre as formas de conservação da biodiversidade, a criopreservação tem se mostrado um método eficiente e prático, pois os materiais armazenados apresentam-se em volumes pequenos e exigem pouca manutenção, além do baixo custo (PENNY, 2011). Por conservar o material vegetal em nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}$  C ou em sua fase de vapor, a  $-150^{\circ}$  C, o metabolismo e a degradação celular são praticamente paralisados, garantindo a preservação em longo prazo. Além disso, a repetibilidade do método é garantida após a determinação do protocolo apropriado para a espécie (REED, 2008).

A *droplet vitrification* é uma das técnicas de criopreservação recentemente desenvolvidas e que envolvem o uso da técnica de vitrificação, na qual a solidificação dos líquidos ocorre sem passar pela fase de cristalização. Isso é possível, em virtude da utilização de soluções crioprotetoras muito concentradas às quais as amostras são expostas antes da imersão em nitrogênio líquido (NL). Nesta técnica, os explantes são usualmente pré-cultivados em meios com altas concentrações de sacarose (0,3 – 0,7 M), sendo, posteriormente, tratados em solução de carregamento e imersos em uma solução de vitrificação de plantas conhecida como PVS2 a  $0^{\circ}$  C. Antes da imersão em NL, os explantes (ápices caulinares) são dispostos em uma folha de papel alumínio com uma gota de PVS2 e, então, rapidamente congelados. O descongelamento é efetuado em uma solução de descarregamento rica em sacarose à temperatura ambiente (ENGELMANN, 2011). Esta técnica é uma alternativa para conservação *in vitro* das três espécies de maracujazeiro, sendo complementar às outras formas de preservação.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a micropropagação e estabelecer protocolos de criopreservação de três espécies de maracujazeiro nativo: *P. setacea*, *P. cincinnata* e *P. giberti*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Maracujazeiro

A família dos maracujazeiros (Passifloraceae) é composta por, aproximadamente, 18 gêneros e 530 espécies, que vão desde herbáceas a árvores, sendo estas raras, e trepadeiras lenhosas (PAULL; DUARTE, 2012). Quatro gêneros são reconhecidos no Brasil: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (BERNACCI et al., 2013), sendo este último o gênero mais importante da família (PAULL; DUARTE, 2012). No país, o gênero *Passiflora* inclui 140 espécies nativas e 83 endêmicas e um de seus domínios fitogeográficos é o cerrado (BERNACCI et al., 2013).

Segundo Paull e Duarte (2012), aproximadamente 60 espécies do gênero *Passiflora*, produzem frutos comestíveis, mas geralmente são desconhecidos fora de sua área de origem ou cultivados apenas pela população local de sua área de ocorrência. No Brasil, a espécie mais cultivada é a *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo) com o Nordeste sendo o responsável por, aproximadamente, 73% da produção, seguida pelo Sudeste, com 15% do total (ANUÁRIO..., 2012). Entretanto, apesar da cultura estar presente em quase todas as regiões, em razão das condições climáticas favoráveis para o cultivo, a produtividade, em geral, é baixa (SILVEIRA et al., 2012).

A baixa produtividade de *P. edulis* ocorre, principalmente, pela elevada dependência da polinização causada pela auto-incompatibilidade da espécie e por problemas fitossanitários como doenças provocadas por patógenos do solo (SILVEIRA et al., 2012). Ainda assim, o Brasil é o maior produtor e consumidor das frutas e de seus derivados (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2013). Nos últimos 30 anos, houve um aumento no cultivo do maracujá de um modo geral, em função do progresso

tecnológico, permitindo o uso de sementes selecionadas e cultivares híbridas, além da qualidade das mudas (MELETTI, 2011).

Dentre as espécies de maracujazeiro, encontra-se a *Passiflora setacea* DC que, não somente é nativa, como é uma espécie endêmica do Brasil, tendo o cerrado como um de seus domínios fitogeográficos (BERNACCI et al., 2013). O maracujá-do-sono, como é popularmente chamado, apresenta alto potencial de mercado, apesar de sua produção ser, ainda, limitada à extração em áreas de ocorrência. Um dos aspectos que favorecem a incorporação desta espécie ao mercado, além de potencial ornamental, é que seu fruto pode ser consumido *in natura* ou em forma de doces (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012). Possui, também, característica medicinal, em razão da detecção de taninos e alcaloides em suas folhas, podendo ser utilizado no controle da hipertensão e como calmante (PEREIRA et al., 2008). Além disso, apresenta tolerância à morte precoce, à fusariose e a doenças das partes aéreas, como a antracnose (JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

*Passiflora cincinnata* Mast. é uma espécie, também, nativa do Brasil e encontrada no cerrado (BERNACCI et al., 2013). Popularmente conhecida como maracujá-do-mato, atualmente é explorada de forma extrativista ou é cultivada em escala doméstica, sendo seus frutos vendidos em feiras livres de cidades do interior (CORREIA; ARAUJO; ARAUJO, 2010). Entretanto, possui potencial de mercado por apresentar fruto de sabor característico e diferenciado do maracujá-azedo, além de possuir vantagens no cultivo por sua natureza perene e resistência à seca (KIILL et al., 2010). Suas flores são vistosas, grandes e perfumadas, tornando-a uma espécie com potencial ornamental. Além disso, a espécie possui resistência a doenças e pragas, como a causada pela *Xanthomonas campestris* f. sp. *passiflorae* (SÃO JOSÉ, 1994) e *Phytophthora* sp. (JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). Apresenta, ainda, amplo período de



florescimento, longevidade e maior concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica (MELETTI et al., 2005).

Outra espécie nativa do Brasil e do cerrado, a *Passiflora giberti* é popularmente denominada maracujá-do-campo (BERNACCI et al., 2013). Possui potencial alimentício e ornamental, sendo sua planta rústica, muito produtiva e de fácil adaptação (AGUIAR et al., 2010). Apresenta resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, à morte precoce, ao *Fusarium oxysporum*, além de tolerância ao *Fusarium solani* e *Phytophthora* sp. (AGUIAR et al., 2010; MENEZES et al., 1994).

Em função de suas características, as espécies *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. giberti* são recomendadas como fonte de resistência a doenças e pragas e podem ser utilizadas como porta-enxerto dos maracujazeiros comerciais ou em programas de melhoramento genético. Entretanto, sendo nativas do cerrado, bioma considerado ameaçado, pela expansão da fronteira agrícola, queimadas e crescimento não planejado das áreas urbanas (CENARGEN, 2005), estão sujeitas à erosão genética (FARIA et al., 2007) o que aumenta a necessidade de concentrar esforços visando à conservação destas.

## **2.2 Cultivo *in vitro***

A cultura de tecidos é uma alternativa para a propagação de espécies vegetais por meio de diferentes técnicas. Essa ferramenta permite a propagação de espécies que apresentam dificuldade de germinação, a produção de mudas em larga escala, a inclusão de espécies em bancos de germoplasma, além de aumentar a facilidade de trocas de materiais genéticos (PINHAL et al., 2011). A micropropagação é a técnica da cultura de tecidos de maior impacto, com resultados mais concretos e tem sido utilizada para obtenção de plantas saudáveis e em larga escala (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diferentes etapas, desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até o enraizamento, finalizando com a aclimatização da planta devem ser estabelecidas em um eficiente protocolo de micropropagação. Um sistema radicular bem desenvolvido, assim como uma boa relação raiz/broto, é de suma importância para a sobrevivência das plantas, principalmente, para a aclimatização e transplante para o campo (KLERK, 2002).

Entre os fatores que afetam o sucesso do cultivo *in vitro*, podem ser citados: a utilização em equilíbrio de substâncias reguladoras de crescimento, a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, o ambiente de crescimento que inclui o fotoperíodo, a qualidade da luz e a temperatura, entre outros (PINHAL et al., 2011). Segundo George, Hall e Klerk (2008), as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas e o balanço destes dois irá conduzir o desenvolvimento do explante.

As citocininas desempenham um papel crucial em muitas fases do crescimento e desenvolvimento das plantas e, quando adicionados ao meio de cultivo *in vitro*, promovem a superação da dominância apical quebrando a dormência das gemas laterais, estando, assim, relacionadas com a indução de brotos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

As auxinas, por sua vez, são utilizadas em meio de cultivo geralmente para a indução de raízes adventícias. Na micropropagação, o enraizamento é uma fase de suma importância, em virtude do envolvimento das raízes na aquisição de água e de nutrientes, entre outros (SAINI et al., 2013). Entretanto, existem espécies recalcitrantes ao enraizamento adventício, o que pode se tornar um obstáculo para a micropropagação (KLERK, 2002).

Em um primeiro momento, durante o processo de enraizamento, certas células do explante tornam-se capazes de responder ao sinal da auxina, fase essa denominada desdiferenciação celular. Em seguida, na fase de indução, essas células dividem-se e são determinadas à formação de raízes. Por fim, na fase de

diferenciação, na qual a presença de auxina não é mais necessária e pode, inclusive, tornar-se inibitória, o meristema radicular já está bem definido e há o crescimento das raízes. Apenas na fase de desdiferenciação, a presença de uma pequena quantidade de citocinina pode ser favorável, enquanto nas outras é sempre inibitória (KLERK, 2002).

Auxinas e citocininas podem ter efeitos antagônicos ou complementares, de acordo com a etapa de desenvolvimento da plântula (BIELACH et al., 2012; KLERK, 2002). Auxinas, sendo um forte sinal à dominância apical, mantêm a dormência de gemas laterais, funcionando em sentido oposto às citocininas nesse caso. Entretanto, a formação de raízes, induzida muitas vezes pela adição de auxina, pode promover o crescimento dos brotos, já que são as raízes as principais fontes de citocinina (MULLER; LEYSER, 2011). As citocininas, por sua vez, são capazes de inibir o enraizamento nas três fases descritas acima, porém, o alongamento dos brotos aumenta a capacidade de enraizamento (KLERK, 2002).

### **2.2.1 Cultivo *in vitro* de maracujazeiro**

Segundo Garcia et al. (2011), o primeiro trabalho de micropropagação, realizado com espécies do gênero *Passiflora*, foi em 1978, no qual Moran Robles testou diferentes meios de cultura para o crescimento de parte aérea e raízes de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molíssima* (MORAN ROBLES, 1978). Desde então, muitos protocolos foram estabelecidos para diferentes espécies do gênero, a maior parte para *P. edulis*, utilizando, principalmente, citocininas, para indução de organogênese direta ou indireta, em combinação ou não com auxinas. Como o sucesso do cultivo *in vitro* depende, também, do genótipo com o qual se está trabalhando, faz-se necessário o estabelecimento de protocolos para cada espécie (PINHAL et al., 2011).

Em relação à *P. giberti*, um estudo sobre a germinação *in vitro* de sementes detectou que a escarificação mecânica foi suficiente para alcançar a melhor porcentagem para esse parâmetro, não havendo a necessidade de uso de giberelina (CARVALHO et al., 2012). Foram realizados, também, para essa espécie trabalhos visando à indução de calos a partir de diferentes explantes e com a utilização de diferentes concentrações e reguladores de crescimento (ARTOLI, 2010; CAMPOS, 2008; FIGUEIREDO et al., 2007).

A micropropagação de segmentos nodais de *P. setacea* foi estudada por Santos (2006) e o meio de cultura MSM suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose promoveu maior comprimento da parte aérea e número de gemas. Entretanto, o enraizamento *in vitro* não foi obtido.

Para a espécie *P. cininnata*, a organogênese direta foi obtida a partir da inoculação de segmentos de raízes em meio MS suplementado com GA<sub>3</sub> (SILVA et al., 2011) e, utilizando segmentos foliares e radiculares, o maior número de gemas foi obtido para a espécie em meio MS acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de benziladenina (BA).

A micropropagação viabiliza a inclusão e manutenção de espécies em bancos de germoplasma (KELLER et al., 2013). Sendo assim, é um importante método a ser utilizado na conservação de espécies de maracujazeiro.

### **2.3 Conservação e criopreservação**

Em todo o mundo, diversas atividades humanas têm contribuído com o desaparecimento de ecossistemas naturais, levando muitas espécies vegetais à ameaça de extinção. O desmatamento, por exemplo, pode ocasionar erosão do solo, salinização, desertificação, além de permitir, em alguns casos, a invasão por espécies vegetais exóticas. Além disso, surgindo como ameaça recente, as mudanças climáticas, também, têm sido motivo de preocupação aos

pesquisadores como possíveis formas de perturbação ambiental (REED et al., 2011).

Em 1992, a Organização das Nações Unidas (ONU) criou a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) (BRASIL, 1992), que determina duas formas de conservação da biodiversidade: a conservação *in situ*, na qual as espécies são mantidas e preservadas no seu ambiente natural e a *ex situ*, em que as espécies são conservadas fora de seu hábitat, por meio de bancos de sementes, criobancos e bancos de germoplasma em campos, por exemplo, reconhecendo que ambas as medidas desempenham um papel igualmente importante. Exemplos conservados *in situ* estão sob constantes riscos de catástrofes naturais ou antrópicas, sendo, então, os métodos de conservação *ex situ* complementares, servindo como uma forma de “backup” de espécies preservadas em seu ambiente (LI; PRITCHARD, 2009).

O método de conservação *ex situ* é subdividido, de acordo com o tempo em que o material pode ser mantido em armazenamento, que pode ser por curto prazo, por crescimento ativo; médio prazo, por crescimento lento; e longo prazo, por meio da criopreservação (PILATTI et al., 2011). Este último diminui drasticamente o metabolismo e, conseqüentemente, a degradação celular é praticamente paralisada, em função da ultra-baixa temperatura do NL na qual os materiais são mantidos (REED, 2008).

Atualmente, a criopreservação é o método de conservação que melhor garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma (PENCE, 2011). Possui vantagens em relação a outras metodologias, como a redução ou eliminação de danos causados no DNA, diminuição na necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade. O material não fica exposto a riscos como doenças e a variações ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos. Além disso, é armazenado em pequenos

volumes e, teoricamente, por período de tempo ilimitado (KACZMARCZYK et al., 2011; PENCE, 2011).

Alguns materiais vegetais, como sementes ortodoxas, podem ser desidratados em níveis bem baixos, logo, podem ser criopreservados sem qualquer pré-tratamento. No entanto, a maioria dos materiais utilizados na criopreservação (suspensões de células, calos, meristemas, embriões somáticos), contém quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo quando expostos a baixas temperaturas (REED, 2008). As células devem, então, ser desidratadas artificialmente para que fiquem protegidas dos danos causados pela cristalização da água. As técnicas empregadas são classificadas, de acordo com os mecanismos sobre os quais se baseiam e são diferenciadas em metodologia clássica e metodologias contemporâneas (ENGELMANN, 2011).

A técnica clássica de criopreservação envolve o resfriamento lento do material a uma temperatura pré-determinada, seguida de imersão rápida em NL. As metodologias contemporâneas baseiam-se na vitrificação, na qual a solidificação dos líquidos ocorre sem passar pela fase de cristalização, pela utilização de crioprotetores em altas concentrações às quais as amostras são expostas. O sistema passa, então, a um “estado vítreo”, amorfo, sem estrutura organizada, porém com as mesmas propriedades físicas e mecânicas de um sólido (REED, 2008).

Tao e Li (1986) classificaram os crioprotetores mais utilizados na criopreservação de plantas de acordo com sua capacidade de penetração celular: (i) incapazes de penetrar a parede celular (polímeros de alto peso molecular – PEG<sub>6000</sub>, PVP – polissacarídeos e proteínas); (ii) capazes de penetrar apenas a parede celular (oligossacarídeos, manitol, aminoácidos e polímeros de baixo peso molecular); e (iii) capazes de penetrar a parede celular e a membrana plasmática (DMSO e glicerol). A maioria das soluções de vitrificação utiliza

uma mistura de crioprotetores penetrantes e não-penetrantes com a finalidade de se reduzir a toxicidade e ajudar a estabilizar o estado vítreo (REED, 2008).

Uma das técnicas que utiliza solução de vitrificação é denominada *droplet vitrification* (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). É uma das mais recentes e geralmente inicia-se com o pré-cultivo dos explantes em meios com altas concentrações de sacarose (0,3 – 0,7 M). Este processo inicia a desidratação, contribuindo, portanto, para a elevação da viscosidade do citoplasma (REED, 2008). O passo seguinte é o pré-tratamento em solução de carregamento (*Loading Solution* – LS; 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose) seguido por imersão em solução de vitrificação (PVS2) a 0° C. Após esse processo, os explantes são dispostos em folha de papel alumínio com uma gota de PVS2 e, rapidamente, imersos em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, realizado à temperatura ambiente, utiliza-se uma solução de descarregamento rica em sacarose (*Unloading Solution* – US; 0,4 M de sacarose) (ENGELMANN, 2011). Posteriormente, os explantes são inoculados em meio previamente estabelecido para a retomada do crescimento.

A PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) consiste de uma mistura de crioprotetores, composto por 3,26 M de glicerol + 2,42 M de etileno glicol + 1,9 M de dimetilsufóxido + 0,4 M de sacarose, dissolvidos em meio MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Volke e Walters (2006) propuseram que esta solução age, por meio de dois mecanismos de crioproteção: um no qual a solução ocupa o lugar da água e o outro em que a PVS2 muda o comportamento de congelamento da água remanescente nas células. Primeiramente, os componentes não penetrantes da solução de carregamento agem desidratando, osmoticamente, o interior celular. Posteriormente, quando a temperatura é reduzida, os crioprotetores penetrantes do PVS2 restringem a mobilidade das moléculas de água dentro da célula e previnem a nucleação de cristais de gelo (REED, 2008).

O sucesso da criopreservação pelas técnicas de vitrificação depende, além do controle da desidratação, da prevenção em relação à toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado no PVS2. Este componente é considerado tóxico, em virtude da elevação de sua temperatura, quando concentrado, principalmente, quando misturado à água, a capacidade de induzir diferenciação celular, podendo exercer influência no nível de regulação gênica, além de promover desnaturação proteica, sendo esses fatores influenciados pelo tempo de exposição e temperatura (YU; QUINN, 1994). Sendo assim, deve-se determinar, previamente, o tempo ótimo de imersão do explante em PVS2 e a temperatura (geralmente utilizada a 0° C), para que haja alta taxa de regeneração após a criopreservação (ENGELMANN, 2011).

Depois da criopreservação, o explante deve ser inoculado em um meio previamente elaborado, para que sua regeneração seja satisfatória. A combinação e concentração de reguladores de crescimento, como um suplemento em um meio de cultivo ideal, além de importante, variam de acordo com a espécie e o explante a ser utilizado (MUKHERJEE et al., 2009).

### **2.3.1 Conservação de maracujazeiro**

Muitas espécies do gênero *Passiflora* estão presentes no cerrado, um bioma constantemente ameaçado (BERNACCI et al., 2013; CENARGEN, 2005). A Embrapa Mandioca e Fruticultura possuem um Banco de Germoplasma de Maracujazeiro, constituído de 478 acessos, de um total de 52 espécies, em campo, telados e *in vitro* (EMBRAPA, 2013). Outras coleções de germoplasma *in vitro* têm sido estabelecidas com sucesso para algumas espécies, porém o uso extensivo desta técnica ainda não é permitido, em função da falta de protocolos específicos (MELETTI et al., 2007).



Já existem alguns trabalhos de criopreservação de maracujazeiro, principalmente utilizando sementes, que podem ser classificadas como intermediárias em sua maioria, recalcitrantes (MELETTI et al., 2007) ou ortodoxas (GONZALEZ-BENITO; AGUILAR; AVILA, 2009). Meletti et al. (2007) e Veiga-Barbosa et al. (2013) criopreservaram com sucesso sementes de dez e três espécies de *Passiflora*, respectivamente, após desidratação ou não. Em um trabalho realizado por Gonzalez-Benito, Aguilar e Avila (2009), sementes de *Passiflora* classificadas como intermediárias foram criopreservadas após terem sido determinados os graus de tolerância máxima à dessecação.

Há registro de apenas um trabalho de criopreservação de maracujazeiro, utilizando técnicas de vitrificação em ápices caulinares, em que Garcia et al. (2011) obtiveram 11% de sobrevivência de ápices caulinares de *P. suberosa* criopreservados pela técnica de vitrificação e 28% de regeneração com a técnica encapsulamento - vitrificação. Desse modo, percebe-se a necessidade de investimento no estudo desse tipo de preservação para as diversas espécies de maracujazeiro nativo, visando à conservação de germoplasma.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. V. M. et al. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como porta-enxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Patos, v. 6, n. 4, p. 17-22, 2010.

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2012. 482 p.

ARTIOLI, F. A. **Caracterização celular e avaliação de vitamina C e fenóis totais em calos de *Passiflora gibertii* N. E. Brown**. 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BERNACCI, L. C. et al. *Passifloraceae*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, June 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre diversidade biológica**. Brasília, 1992. (Série Biodiversidade, 1). Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_dpg/\\_arquivos/cdbport.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf)>. Acesso em: 1 jul. 2013.

CAMPOS, A. C. A. L. **Organogênese indireta de maracujazeiro nativo**. 2008. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CARVALHO, M. A. F. et al. *In vitro* germination of *Passiflora gibertii* N. E. Brown with mechanical scarification and gibberellic acid. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1027-1032, 2012.

CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS. **Cerrado pode sumir até 2030**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 731-738, Jan./Feb. 2012.

CORREIA, R. C.; ARAUJO, F. P.; ARAUJO, J. L. P. Maracujá (*Passiflora cincinnata*) alternativa para o incremento da fruticultura de sequeiro no Semiárido brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. **Anais...** Natal: SBF, 2010. 1 CD-ROM.

EDWIN, S. et al. Wound healing and antioxidant activity of *Achyranthes aspera*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 46, n. 12, p. 824-828, Jan. 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Perguntas e respostas**: maracujá. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas\\_e\\_respostas-maracuja.php](http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-maracuja.php)>. Acesso em: 13 jul. 2013.

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

FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, July 2007.

GARCIA, R. O. et al. *In Vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. **CryoLetters**, Lewes, v. 32, n. 5, p. 377-388, 2011  
\_\_\_\_\_. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 47-54, July 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. The Background: Springer, 2008. v. 1, 709 p.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; AVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. **CryoLetters**, Lewes, v. 30, n. 2, p. 142-147, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. 78 p.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KELLER, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KIILL, L. H. P. et al. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina, Pernambuco, Brasil. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 115-127, maio 2010.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, n. 5, p. 415-422, Sept./Oct. 2002.

LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 614-621, Nov. 2009.

LIMA, A. A. et al. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPMPF, 2013. (Boletim, 29). Disponível em: <[http://www.cnpmpf.embrapa.br/publicacoes/produto\\_em\\_foco/maracuja\\_29.pdf](http://www.cnpmpf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/maracuja_29.pdf)>. Acesso em: 3 jul. 2013.

MARUKI-UCHIDA, H. et al. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 5, p. 845-849, 2013.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M. et al. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 6, n. 1/2, p. 13-20, abr./jun. 2007.

\_\_\_\_\_. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 55-78.

MELO, K. T.; MANICA, I.; JUNQUEIRA, N. T. V. Produtividade de seis cultivares de maracujazeiro-azedo durante três anos em Vargem Bonita, DF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 9, p. 1117-1125, set. 2001.

MENEZES, J. M. T. et al. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à morte prematura de plantas. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 95-104, 1994.

MORAN ROBLES, M. J. *In vitro* vegetative multiplication of axillary buds of *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener and *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, p. 701-715, 1978.

MUKHERJEE, P. et al. Cryopreservation of asian *Dioscorea bulbifera* L. and *D. alata* L. by vitrification: importance of plant growth regulators. **CryoLetters**, Lewes, v. 30, n. 2, p. 100-111, Mar./Apr. 2009.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 7, p. 1203-1212, Apr. 2011.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 143-158.

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

PAULL, R. E.; DUARTE, O. **Tropical fruits**. 2. ed. Wallingford: CABI, 2012. 371 p.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 176-187, Feb. 2011.

PEREIRA, W. V. S. et al. Avaliação histoquímica em folhas de *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae). In: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2008. 1 CD-ROM.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 82-98, Feb. 2011.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer, 2008. 513 p.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 1-4, Feb. 2011.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. ***Plant Cell Reports***, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741-757, Apr. 2013.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis Tanaka*) by vitrification. ***Plant Cell Reports***, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, June 1990.

SANTOS, F. C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.)**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. 255 p.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 407-416, 2011.

SILVEIRA, M. V. et al. Is manual pollination of yellow passion fruit completely dispensable? **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 99-103, Oct. 2012.

TAO, D.; LI, P. H. Classification of plant cryoprotectants. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 123, p. 305-310, 1986.

VEIGA-BARBOSA, L. et al. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 41, n. 1, p. 89-97, 2013.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 48-61, Feb. 2006.

YU, Z. W.; QUINN, P. J. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. **Bioscience Reports**, Colchester, v. 14, n. 6, p. 259-281, Dec. 1994.



## **CAPÍTULO 2**

### **Multiplicação e enraizamento de maracujazeiro nativo**

## RESUMO

As espécies *Passiflora cincinnata*, *Passiflora giberti* e *Passiflora setacea* são nativas do Brasil e, de forma geral, possuem características medicinais, ornamentais e alimentícias. Estas espécies são resistentes a doenças às quais os maracujazeiros comerciais são suscetíveis, característica favorável à utilização como porta-enxerto e em programas de melhoramento genético. Assim, objetivou-se neste trabalho estudar a indução de brotos e o enraizamento *in vitro* das espécies. Para indução de brotações, segmentos nodais (1,0 cm) das três espécies foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>). Para o enraizamento, foram inoculados segmentos (3 – 4 cm) de *P. giberti*, em meio MS acrescido de AIB nas concentrações: 0, 2, 4 ou 8 mg L<sup>-1</sup>, durante 7 dias. Posteriormente, metade dos explantes foi transferida para meio MS e metade para meio MS com 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (CA). Os dados foram submetidos à ANAVA, dados qualitativos tiveram as médias comparadas por Skott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) e os dados quantitativos foram avaliados por regressão. Quanto à indução de brotação *in vitro*, houve diferença significativa para: a interação “espécie x regulador de crescimento” para número de brotos, em que *P. setacea* apresentou a maior média (3,0) com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; entre as espécies e entre as concentrações de BAP para comprimento de brotos, na qual *P. cincinnata*, sem o regulador, apresentou maior média (1,2 cm); entre as espécies para número de gemas, com *P. cincinnata* apresentando a maior média (4,9), e entre as concentrações de BAP, com maior valor observado de 4,4 gemas em 1,0 mg L<sup>-1</sup> do regulador; entre a interação “espécie x regulador de crescimento” para formação de calo, com a maior formação (72%) em *P. setacea*, com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Houve formação de cluster de gemas apenas na espécie *P. cincinnata*, com diferença significativa entre as diferentes concentrações de BAP e maior valor observado de 44%, em 1,5 mg L<sup>-1</sup> do regulador. Para indução de raiz, houve diferença significativa para: número de raízes com maior média (4,1) em meio com 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB; comprimento de raízes, com o maior comprimento (1,4 cm) obtido com adição de 2 mg L<sup>-1</sup> deste regulador antes da transferência para meio com adição de CA; para número de gemas, com maior valor de 5,6, quando transferido para meio MS + 0,5 g L<sup>-1</sup> de CA; e para comprimento dos brotos, em que a melhor média (5,8 cm) foi observada na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> do regulador de crescimento.

**Palavras-chave:** Cerrado. Cultivo *in vitro*. Espécie nativa. Planta medicinal. *Passiflora*.

## ABSTRACT

The passion flower species *Passiflora cincinnata*, *Passiflora setacea* and *Passiflora giberti* are native from Brazil and generally, *Passiflora* genus, in which they are included, presents medicinal and ornamental characteristics, and edible fruits. They are resistant to diseases to which commercial passion fruit are most susceptible, characteristic that supports their use in breeding programs and/or as a rootstock for commercial varieties. For these reasons, the aim of this work was to study the micropropagation for the three species in order to induce shoot formation and *in vitro* rooting. For shoot induction, nodal segments (1 cm) of the three species, were inoculated in MS medium supplemented with different BAP (0; 0.5; 1.0; 1.5 or 2.0 mg L<sup>-1</sup>) concentrations. For rooting, *P. giberti* shoots (3-4 cm) were inoculated in MS medium supplemented with IBA at the following concentrations: 0, 2, 4 or 8 mg L<sup>-1</sup> for 7 days. After this period, half of the explants were transferred to MS medium and the other half to MS medium supplemented with 0.5 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal (AC). The data were subjected to ANOVA, the qualitative data were compared by Skott-Knott and quantitative data were analysed by regression ( $P \leq 0.05$ ). Regarding the *in vitro* shoot induction, there was significant differences to: the interaction "species x growth regulator", for shoots number, in which the species *P. setacea* presented higher number of shoots (3.0) using 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP; between species and BAP concentrations to shoot length, in which *P. cincinnata*, in the absence of this growth regulator, presented higher length (1.2 cm); between species to number of buds, with *P. cincinnata* presenting the best average (4,9), and between different BAP concentrations in which the highest value observed was 4.4 shoots per explant at 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP; between the interaction "species x growth regulator" for callus formation and the highest percentage of callus formation (72%) was in *P. setacea*, using 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Only *P. cincinnata* presented cluster of buds, with a significant difference between the different BAP concentrations, in which the higher observed value was 44% at 1.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. For root induction, there was a significant difference to: number of roots, with the highest number of roots per shoot (4.1) obtained in medium with 2 mg L<sup>-1</sup> IBA; for root length, in which the longest root (1.4 cm) was obtained by adding 2 mg L<sup>-1</sup> IBA before transfer to a medium containing AC; number of buds (5.6) when the explants were transferred to MS medium + 0.5 g L<sup>-1</sup> AC; and for shoot length, where the highest average (5.8 cm) was observed when explants were treating with 2 mg L<sup>-1</sup> IBA.

**Key words:** Cerrado. *In vitro* culture. Native species. Medicinal plant. *Passiflora*.

## 1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, sendo esta composta por 18 gêneros, com 500 a 600 espécies descritas, embora possa haver até 750 espécies (BERNACCI; SOUZA, 2012; VANDERPLANK, 1996). O maior gênero, *Passiflora*, apresenta diversas espécies com grande importância econômica, concentradas na América do Sul (BERNACCI; SOUZA, 2012). No Brasil, o centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte, com 140 espécies nativas e 83 endêmicas (BERNACCI et al., 2013). Por possuir características medicinal, alimentícia e ornamental (MARUKI-UCHIDA et al., 2013), este gênero possui grande potencial econômico.

Apesar de o Brasil possuir condições climáticas favoráveis para o cultivo do maracujazeiro, com a presença da cultura em quase todas as regiões, a produtividade é baixa (MELO; MANICA; JUNQUEIRA, 2001). Isso ocorre, principalmente, em razão do baixo nível tecnológico dos produtores no manejo da cultura e da carência de informações técnico-científicas. Ainda assim, o país é o maior produtor e consumidor do fruto e de seus derivados (LIMA et al., 2013). Nos últimos 30 anos, a cultura do maracujá vem crescendo. De 1990 a 1996, a área de cultivo aumentou em, aproximadamente, 75% (MELETTI, 2011) e, desde então, vem se expandindo continuamente até atingir uma produção de 920.158 toneladas em um total de 62.243 hectares em 2010 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013).

Segundo Meletti (2011), o aumento da produtividade obtida nos pomares de maracujazeiro é resultado de progresso tecnológico. A partir de mudas selecionadas e utilização de ferramentas para o melhoramento genético, ampliou-se a qualidade e produtividade do cultivo, em função da diminuição da incidência de doenças que afetam os pomares, destacando-se a bacteriose,

causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, virose e fusariose (*Fusarium oxysporum*).

As espécies *Passiflora cincinnata* (maracujá-do-mato), *Passiflora giberti* (maracujá-de-veado) e *Passiflora setacea* (maracujá-do-sono) são espécies nativas do cerrado, ainda exploradas de forma extrativista e comercializadas localmente e apresentam uma baixa produtividade em relação às espécies mais comercializadas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; KIILL et al., 2010). As três espécies são, de forma geral, resistentes a doenças às quais os maracujazeiros comerciais são mais suscetíveis, característica esta favorável à utilização em programas de melhoramento genético e/ou como porta-enxerto de *Passiflora edulis* (maracujá-azedo), espécie com maior produção de frutos e área cultivada.

Uma ferramenta para obtenção de plantas sadias e vigorosas em escala comercial é a cultura de tecidos. A micropropagação, uma das mais importantes técnicas de cultivo *in vitro*, permite a produção de material vegetal em condições assépticas, a propagação de espécies que apresentam dificuldade de germinação, a produção de mudas em larga escala. Além disso, pode contribuir em programas de melhoramento genético e facilitar a troca de materiais genéticos entre instituições de pesquisa (PINHAL et al., 2011). Mais ainda, considerando a velocidade em que as espécies vêm sofrendo erosão genética, a micropropagação constitui-se como importante método de conservação, por viabilizar a inclusão e manutenção de espécies em bancos de germoplasma *in vitro* (KELLER et al., 2013).

Os reguladores de crescimento constituem um dos fatores mais importantes para o sucesso do sistema de micropropagação. Além de outros fatores, a interação e o balanço destes são responsáveis por regular o crescimento e a morfogênese *in vitro*, sendo as auxinas e citocininas

consideradas as mais importantes fitorreguladores (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

As auxinas são reguladores centrais na indução, crescimento e desenvolvimento de raízes (SAINI et al., 2013). Geralmente, a indução da rizogênese requer um ajuste entre os níveis de auxina e citocinina, mas é usualmente alcançada apenas com tratamentos com auxina. De maneira geral, as citocininas estão relacionadas com a indução de formação de brotos, pela superação da dominância apical e a dormência das gemas laterais (EDWIN et al., 2008).

Pelas suas características, que confirmam seu potencial para utilização em estudos de melhoramento genético e visando à maior conservação das mesmas, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a multiplicação dessas três espécies nativas de maracujazeiro e o enraizamento de *P. giberti*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, da Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Lavras - MG.

### 2.1 Material vegetal

As sementes de maracujazeiro das espécies *Passiflora giberti* (acesso: BGP 008), *Passiflora setacea* (acesso: BGP 272) e *Passiflora cincinnata* (acesso: BGP 290) foram fornecidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico, 70% durante um minuto e, posteriormente, em hipoclorito de sódio 2,5% durante 20 minutos. Após o intervalo, estas foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. As sementes foram, então, escarificadas na extremidade da micrópila, por meio de cortes com bisturi e inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 50% das concentrações de sais, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de Agar (SANTOS et al., 2010). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C, durante 20 minutos.

Os ciclos de multiplicação das brotações iniciaram-se, após 30 dias da germinação, sendo excisados segmentos nodais e multiplicados em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Este procedimento foi repetido a cada 30 dias.

As plântulas estabelecidas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25\pm 2$  °C e com irradiância de fótons de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## 2.2 Multiplicação

Para a multiplicação das três espécies, foram utilizados segmentos nodais de plântulas estabelecidas *in vitro* com, aproximadamente, 1,0 cm e contendo uma gema. Os explantes foram inoculados em meio MS, suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e geleificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (SANTOS, 2006). Foram testadas diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5 ou  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) de BAP ou o mesmo meio de cultivo ausente deste regulador. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a  $121$  °C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25\pm 2$  °C. Os parâmetros avaliados foram o número de brotações laterais, comprimento de brotos, número de gemas da plântula, formação de calo e formação de cluster de gemas. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada uma composta por cinco tubos de ensaio e em cada tubo foi inoculado um segmento nodal.

## 2.3 Enraizamento *in vitro* de *Passiflora giberti*

Brotações de plântulas da espécie *P. giberti*, estabelecidas *in vitro*, entre 3 – 4 cm de comprimento e contendo três gemas laterais, foram excisadas em câmara de fluxo e inoculadas em meio MS suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose em combinação com diferentes concentrações (2, 4 ou  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) de AIB (ácido indolbutírico) ou sem este regulador, durante sete dias. Este



procedimento foi realizado em duplicata e, após esse período, metade dos explantes foi transferida para meio MS e a outra metade para meio MS acrescido de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado. Os segmentos utilizados tiveram seus ápices caulinares mantidos. O meio foi geleificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de  $36 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, cada uma composta por três tubos de ensaio e em cada tubo foi inoculado um segmento nodal. Aos 30 dias de cultivo foram avaliados: formação de raízes, número e comprimento das raízes, presença de raízes secundárias, presença de calo na base, número e comprimento dos brotos e número de gemas.

#### **2.4 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados qualitativos tiveram as médias comparadas por Scott-Knott e os dados quantitativos foram avaliados por regressão ( $P \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao número de brotos, houve diferença significativa para a interação “espécie × regulador de crescimento” ( $p=0,0113$ ), em que a espécie *P. setacea* apresentou a maior média (3,0) na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, seguida de *P. cincinnata*, com média de 2,4 brotos por explante na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e, novamente, *P. setacea* (2,0), em meio com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 1).

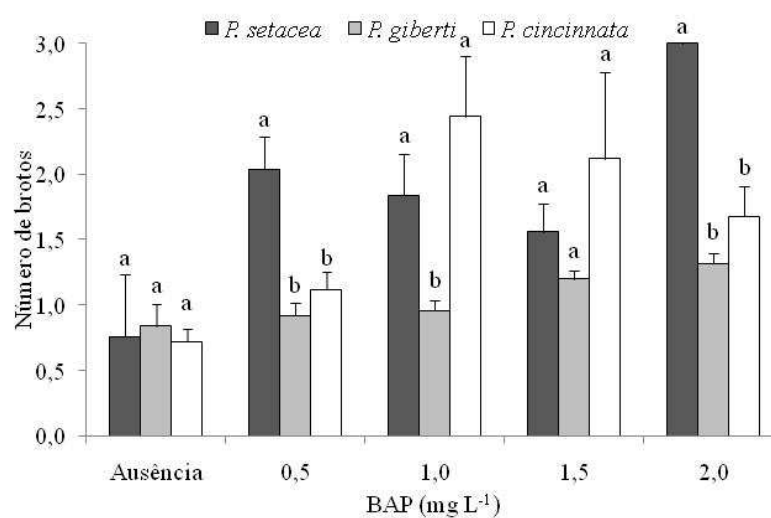


Figura 1 Média do número de brotos de segmentos nodais de espécies de maracujazeiro utilizando diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de BAP não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Garcia et al. (2011), utilizando segmentos internodais de plântulas da espécie *Passiflora suberosa* inoculados em meio MS, não encontraram diferença significativa no número de brotos formados em relação a diferentes concentrações da citocinina benziladenina (BA). Já para *Passiflora alata*, em um trabalho de Pacheco et al. (2012), houve formação de brotos em segmentos internodais inoculados em meio MSM nas concentrações de 1 e 3 mg L<sup>-1</sup> de BA. Para concentrações mais altas, não houve formação de brotos por organogênese direta.

Foram observadas diferenças significativas para comprimento dos brotos entre as espécies ( $p=0,0004$ ) e entre as concentrações de BAP ( $p=0,0038$ ). Em relação às espécies, *P. cincinnata* apresentou a maior média (1,2 cm), enquanto as outras não diferiram significativamente (Figura 2).

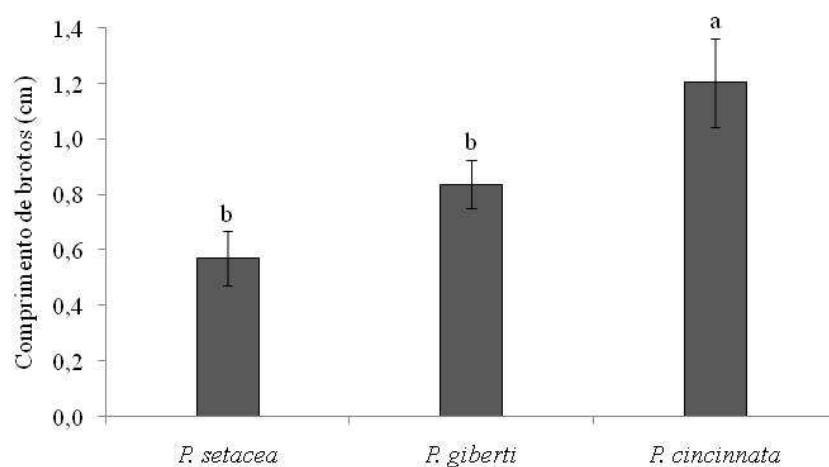


Figura 2 Média do comprimento de brotos de diferentes espécies de maracujazeiro tratados com BAP. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de BAP não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Com relação às diferentes concentrações de BAP, a maior média de comprimento de brotos (1,2 cm) foi obtida na ausência deste regulador de crescimento. A tendência para esse parâmetro seguiu um comportamento linear decrescente, na qual maiores concentrações de BAP determinam menores comprimentos de brotos (Figura 3).

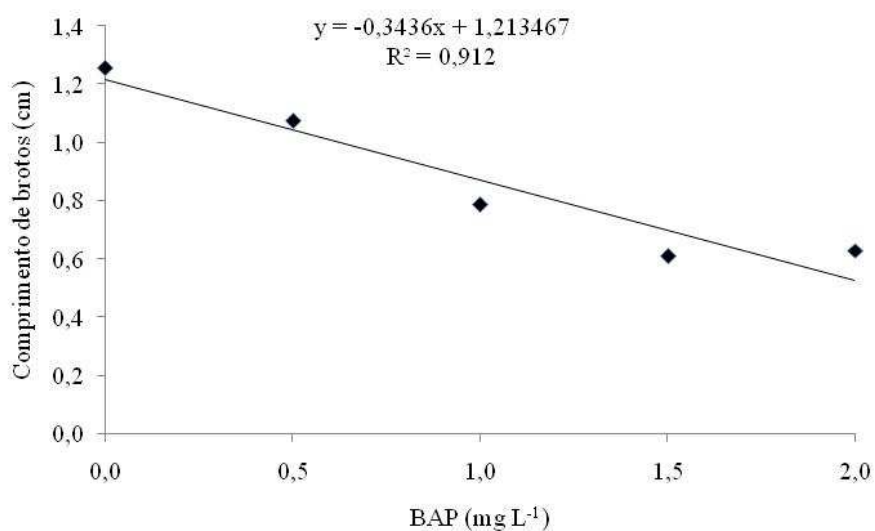


Figura 3 Média do comprimento de brotos de segmentos nodais de maracujazeiros tratados com diferentes concentrações de BAP.

Para a espécie *Passiflora foetida*, em um trabalho realizado por Anand et al. (2012), o maior comprimento de brotos foi obtido a partir de segmentos nodais em meio MS suplementado com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA).

De forma geral, para as espécies deste presente trabalho, segmentos nodais possuem respostas antagônicas de número de brotos e comprimento dos mesmos, em relação à concentração de BAP. Dessa forma, concentrações mais

elevadas deste regulador de crescimento favorecem a formação de maior número de brotos (Figura 1), enquanto concentrações mais baixas, ou sua ausência, favorecem o crescimento de cada broto (Figura 3).

A média do número de gemas apresentou diferença significativa tanto para espécies ( $p < 0,0001$ ) quanto para as diferentes concentrações de BAP ( $p = 0,0014$ ). Entre as espécies, a que apresentou o maior número de gemas por explante (4,9) foi a *P. cincinnata* (Figura 4).

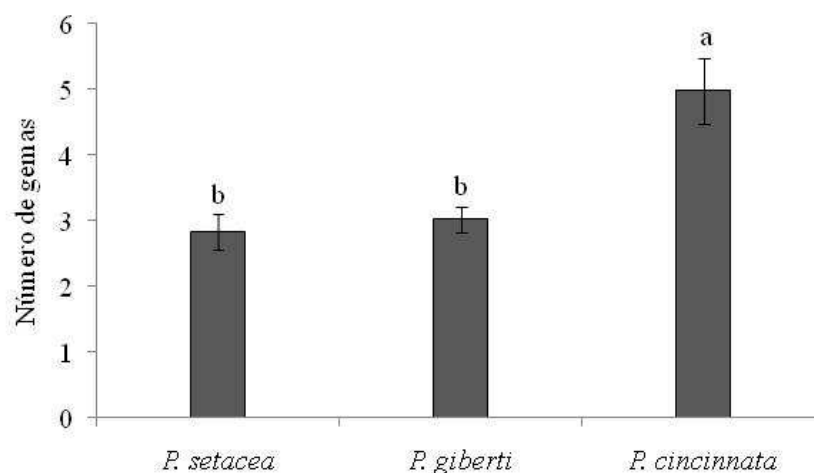


Figura 4 Média do número de gemas de diferentes espécies de maracujazeiro tratadas com BAP. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de BAP não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

De acordo com a derivada da equação, o maior valor estimado do número de gemas (4,4) em relação às diferentes concentrações de BAP seria obtido em uma concentração de  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  deste regulador de crescimento. A maior média observada, 4,5 gemas por explante, foi obtida em uma concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 5).

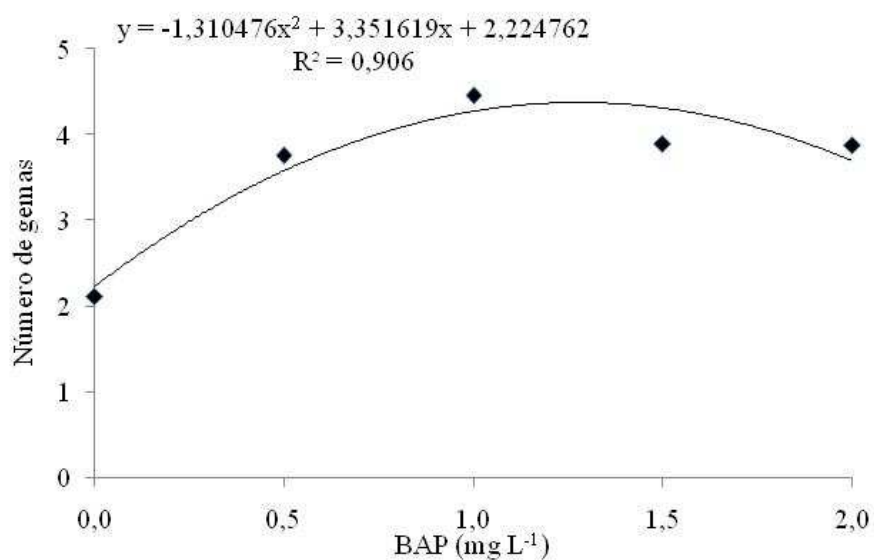


Figura 5 Média do número de gemas de segmentos nodais de maracujazeiros tratados com diferentes concentrações de BAP.

Para formação de calo, houve diferença significativa para a interação “espécie × regulador de crescimento” ( $p=0,0014$ ). As maiores porcentagens de formação de calo (72 e 40%) foram obtidas para a espécie *P. setacea*, nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. Não houve formação de calo para nenhuma espécie na ausência de BAP (Figura 6).

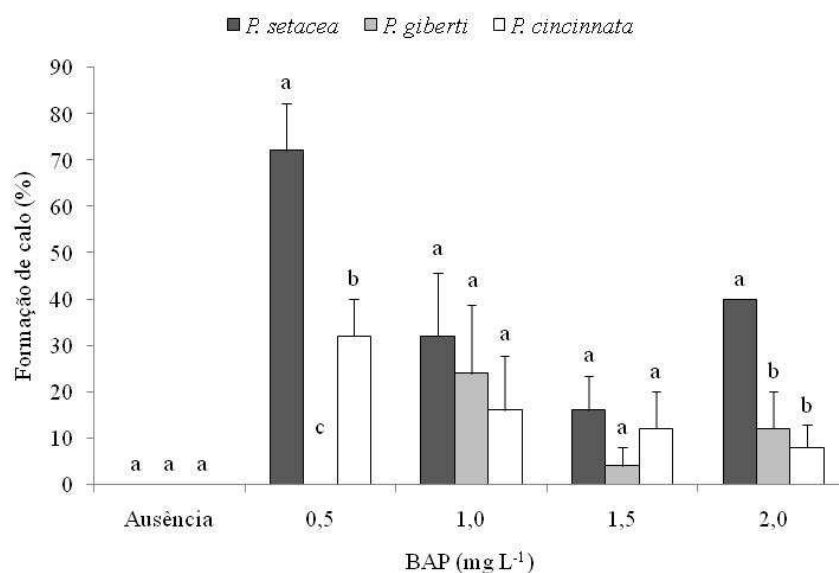


Figura 6 Média da formação de calo em segmentos nodais de espécies de maracujazeiro tratados com diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de BAP não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Em um trabalho realizado por Biasi et al. (2000), no qual segmentos internodais de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) foram cultivados em meio contendo diferentes concentrações de BAP, houve formação de calo em todos os tratamentos, inclusive na ausência deste regulador. Diferente do que ocorreu no presente trabalho, para *P. edulis* a máxima porcentagem de explantes com calos (73,2%) deu-se na concentração de 1,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Komathi et al. (2011), trabalhando com *Passiflora foetida*, obtiveram maior porcentagem de formação de calo (75%) em segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Demonstra-se dessa forma que a formação de calo é influenciada pela concentração deste regulador de crescimento e é variável de acordo com a espécie.

Não houve formação de cluster de gemas nas espécies *P. giberti* e *P. setacea*. Já para *P. cincinnata*, houve diferença significativa para esse parâmetro ( $p=0,0473$ ), entre as diferentes concentrações de BAP. De acordo com a derivada da equação, o maior valor estimado foi de 39,6%, em uma concentração de 1,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. A maior porcentagem de formação de cluster de gemas observada foi de 44%, em 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 7).

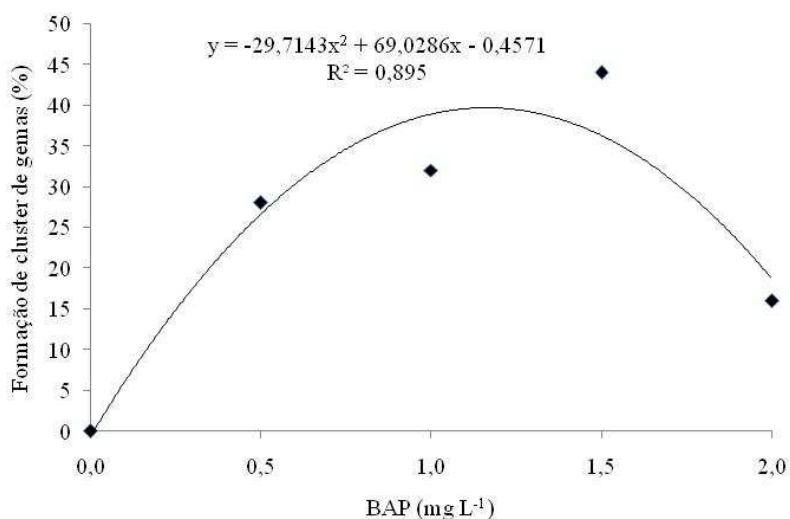


Figura 7 Média da porcentagem da formação de cluster de gemas em *P. cincinnata* em diferentes concentrações de BAP.

Em um trabalho realizado por Anand et al. (2012), com segmentos nodais da espécie *Passiflora foetida*, o tratamento que apresentou a maior formação de cluster de gemas foi em meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Com relação ao enraizamento em *P. giberti*, não houve diferença significativa para a porcentagem de explantes enraizados (62%) nem para o número de explantes apresentando raízes secundárias (60,8%). Já para o número



de raízes por explante, ocorreu diferença significativa ( $p=0,0002$ ) entre as diferentes concentrações de AIB, sendo que, segundo a equação, o maior valor estimado para esse parâmetro foi de 5,9 raízes por explante em  $3,9 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB. Entretanto, para esse parâmetro, o modelo polinomial de segundo grau não explica muito bem aos resultados observados nos quais o maior número de raízes (4,1) foi observado na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Figura 8).

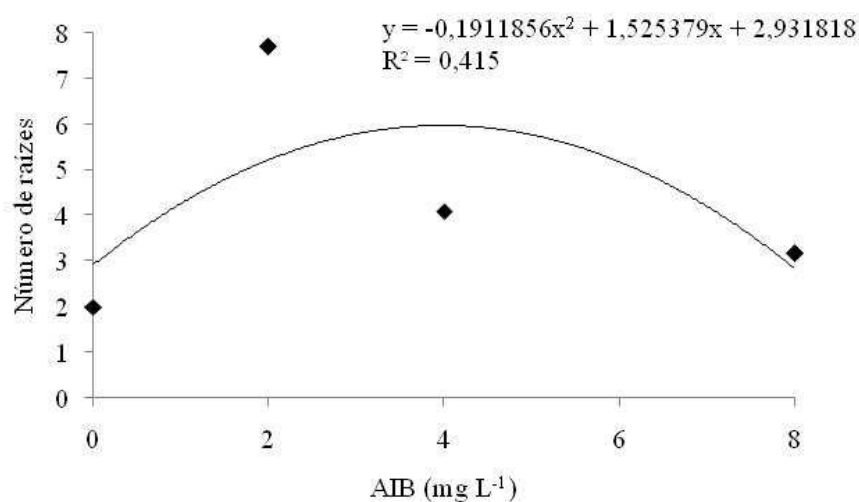


Figura 8 Média do número de raízes em segmentos nodais em *P. giberti* tratados com diferentes concentrações de AIB.

O comprimento de raízes diferiu significativamente na interação “meio de cultura  $\times$  regulador de crescimento” ( $p=0,0068$ ). A maior média estimada para comprimento de raízes por explante foi de 1,2 cm, obtida com o tratamento prévio com  $4,2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB antes da transferência dos explantes para meio MS suplementado com  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado (CA) enquanto que a maior média observada (1,4 cm) foi em meio suplementado com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB. Quando os explantes foram transferidos para meio MS sem CA após o tratamento com AIB, o comprimento de raízes seguiu uma tendência linear

decrecente, na qual maiores concentrações de AIB resultaram em menores comprimentos de raízes por explante. Assim, o maior comprimento médio estimado (1,3 cm) e observado (1,4 cm) foram obtidos na ausência de AIB (Figura 9).

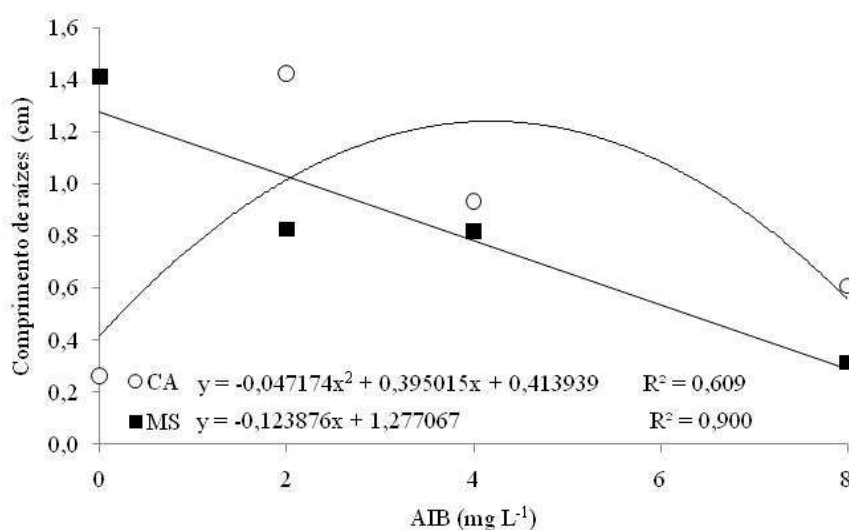


Figura 9 Média do comprimento de raízes em segmentos nodais de *P. giberti*, transferidos para meio MS (MS) ou meio MS suplementado com 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (CA), após serem tratados com diferentes concentrações de AIB.

Isutsa (2004), em um trabalho realizado com *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. edulis* var. *edulis*, relatou que o enraizamento mais eficiente para essas variedades de maracujazeiro, considerando a porcentagem de formação de raízes por explante, foi obtido em meio MS acrescido de 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Entretanto, utilizando outros explantes, como sementes (KANTHARAJAH; DODD, 1990) e discos foliares (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004) de *Passiflora edulis*,

os autores relataram que não há necessidade de suplementação do meio de cultura com auxinas para que haja formação de raízes.

Neste experimento de enraizamento também foi avaliado se as diferentes concentrações de AIB poderiam influenciar o desenvolvimento da parte aérea, entretanto, não houve diferença significativa no número de brotos por explante (1,1), mas o número de gemas diferiu significativamente, tanto em relação ao meio de cultura para o qual o segmento foi transferido ( $p=0,0206$ ), quanto para a concentração de AIB acrescida ao meio ( $p=0,0453$ ). Os explantes transferidos para meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de carvão ativado, após o tratamento com AIB, apresentaram maior média de número de gemas (5,6) (Figura 10).

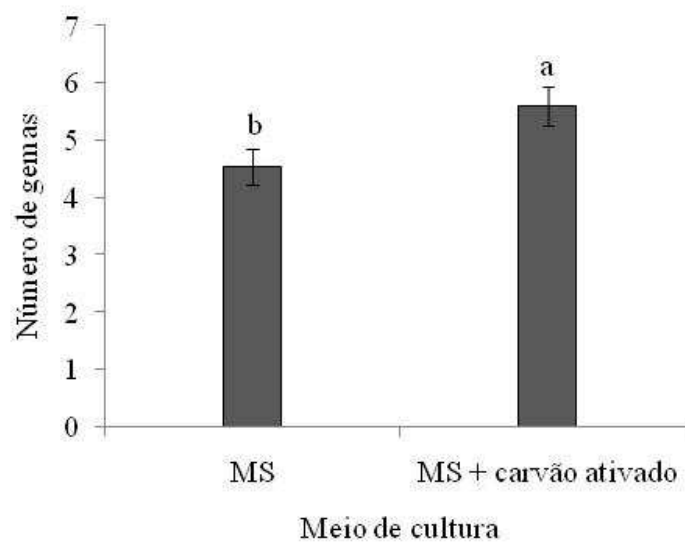


Figura 10 Média do número de gemas em segmentos nodais de *P. giberti*, transferidos para meio MS (MS) ou meio MS suplementado com 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após serem tratados com diferentes concentrações de AIB. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada concentração de BAP não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação às diferentes concentrações de AIB, na ausência deste regulador houve maior média do número de gemas (2,6). Este parâmetro seguiu um comportamento linear decrescente. Desse modo, quanto maior a quantidade de AIB, menor foi a média do número de gemas (Figura 11).

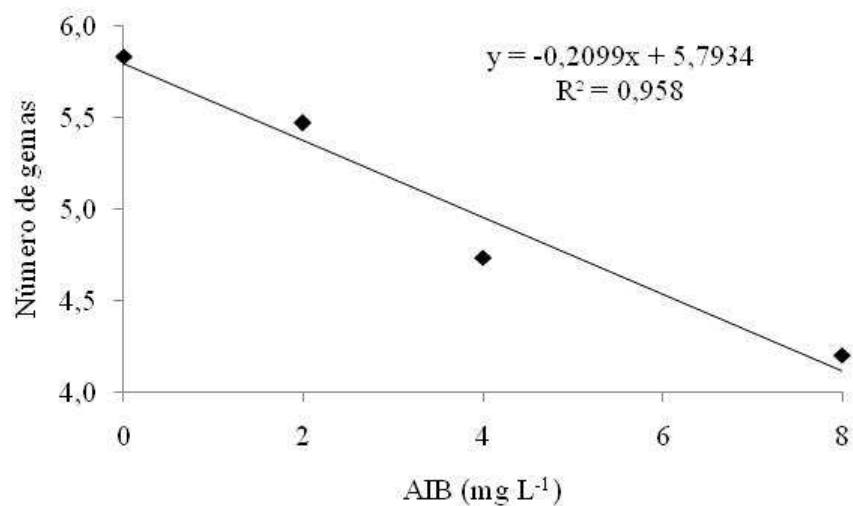


Figura 11 Média do número de gemas em segmentos nodais de *P. giberti*, após serem tratados com diferentes concentrações de AIB.

O valor médio do comprimento de brotos diferiu significativamente em relação às concentrações de AIB ( $p=0,0357$ ). A maior média estimada de número de brotos por explante (5,6) foi obtida com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, enquanto a maior média observada foi de 5,8 na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> deste regulador (Figura 12).

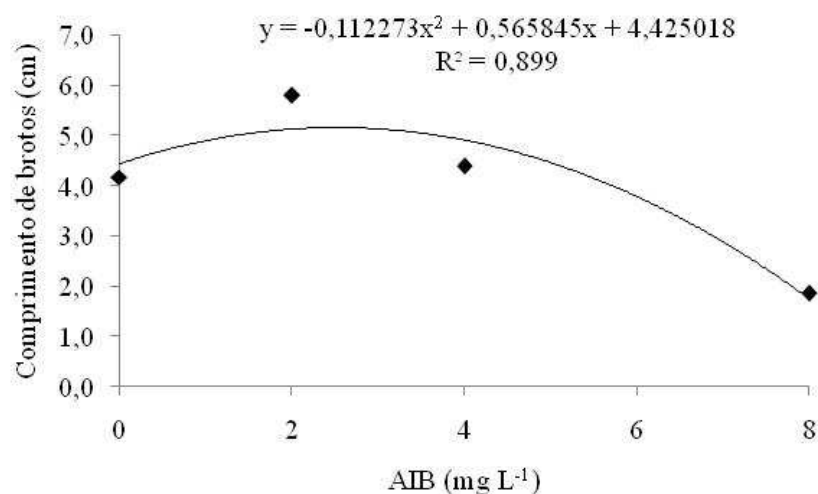


Figura 12 Média do comprimento de brotos de segmentos nodais de *P. giberti*, tratados com diferentes concentrações de AIB.

Reguladores de crescimento possuem atividade biológica igual ou que excedem às substâncias equivalentes naturais, por meio da indução desses processos, de acordo com o balanço na aplicação dos mesmos. Auxinas e citocininas são reguladores que interagem de diferentes formas durante as fases do enraizamento no controle do desenvolvimento de raízes, podendo ser antagonistas ou complementares de acordo com a etapa (BIELACH et al., 2012; KLERK, 2002).

Em um primeiro momento (desdiferenciação celular), a auxina promove a rizogênese, levando à seguinte fase (indução), em que este regulador determina certas células a formarem raízes. A partir desse momento (diferenciação), não é mais necessário este sinal e concentrações de auxinas podem se tornar inibitórias (KLERK, 2002). No presente trabalho, concentrações superiores à ótima (2 mg L<sup>-1</sup>) promoveram uma redução no número (Figura 8) e comprimento (Figura 9) das raízes.

O carvão ativado possui a capacidade de adsorver substâncias presentes no meio de cultivo, como por exemplo, os reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Como o meio de manutenção das plântulas das quais foram extraídos os explantes era suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e a citocinina, em pequenas quantidades, pode ser favorável na primeira fase de indução do enraizamento (desdiferenciação celular), este regulador de crescimento pode ter influenciado positivamente neste processo. Assim, a inoculação do segmento em meio MS sem adição de auxina foi suficiente para que neste tratamento fosse obtido o maior comprimento das raízes (Figura 9). Já para os explantes transferidos para meio com CA, o melhor resultado para o comprimento de raízes foi obtido com a adição de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Figura 9). Neste caso, a utilização do CA após o tratamento com auxina pode ter removido o restante de citocinina presente, fazendo com que, para que houvesse a indução do enraizamento, fosse necessária a presença de AIB no meio de cultivo. Na figura 13 são apresentadas plantas de *P. giberti* após 30 dias do início dos tratamentos de enraizamento.

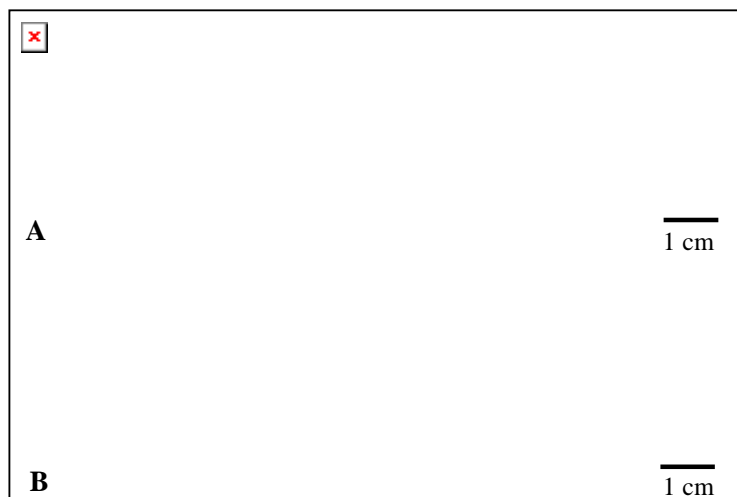


Figura 13 Plantas de *P. giberti* formadas a partir de segmentos nodais inoculadas por 30 dias em (A) meio MS (B) meio MS suplementado com CA, ambos tratados com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

Em relação à parte aérea, sabe-se que as raízes são as principais fontes de citocinina (MULLER; LEYSER, 2011), assim, houve maior comprimento dos brotos na mesma concentração de AIB em que maior número de raízes foi obtido ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB). Além disso, o crescimento das raízes aumenta a área de absorção, permitindo maior crescimento da parte aérea. Este efeito pode ser considerado positivamente cíclico, já que o alongamento do broto aumenta a capacidade de enraizamento (KLERK, 2002).

De forma geral, comparando os resultados apresentados neste trabalho com aqueles obtidos em diversos estudos realizados com espécies do gênero *Passiflora*, anteriormente mencionados, pode-se perceber que diferentes reguladores e suas concentrações atuam de forma distinta de acordo com a espécie estudada. Sendo assim, para cada espécie devem ser determinadas as



melhores formas para obtenção de brotações e indução do enraizamento, a partir de explantes, de acordo com o objetivo de cada estudo.

#### 4 CONCLUSÕES

Recomenda-se a inoculação de segmentos nodais de *P. giberti*, *P. setacea* e *P. cincinnata* em meio MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP para obtenção de maior número de brotos.

Para se obter maior comprimento de brotações, meio MS basal sem a presença de citocinina pode ser utilizado para inoculação de segmentos nodais dessas espécies.

Segmentos nodais de *P. giberti*, tratados 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB antes da transferência para meio MS com adição de carvão ativado, resultam em brotos com maior número de raízes. Na ausência deste regulador, em meio sem carvão ativado, formam-se raízes com maior comprimento.

Os brotos de *P. giberti* podem ser inoculados em meio MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB com posterior transferência para meio com carvão ativado para que atinjam maiores comprimentos.

## REFERÊNCIAS

ANAND, S. P. et al. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 22, n. 1, p. 87-91, 2012.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 87-90, Feb. 2004.

BERNACCI, L. C. et al. *Passifloraceae*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2013.

Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

BERNACCI, L. C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a new species from Southern Bahia, Brazil. **A Journal for Botanical Nomenclature**, Washington, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2012.

BIASI, L. A. et al. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 240-249, Oct./Dec. 2000.

BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, June 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 731-738, Jan./Feb. 2012.

EDWIN, S. et al. Wound healing and antioxidant activity of *Achyranthes aspera*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 46, n. 12, p. 824-828, Jan. 2008.

GARCIA, R. O. et al. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 47-54, July 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. The Background: Springer, 2008. v. 1, 709 p.  
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**: culturas temporária e permanentes. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 8 jul. 2013.

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

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passion fruit). **Annals of Botany**, London, v. 63, n. 3, p. 337-339, Mar. 1990.

KELLER, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KIILL, L. H. P. et al. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina, Pernambuco, Brasil. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 115-127, maio 2010.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, n. 5, p. 415-422, Sept./Oct. 2002.

KOMATHI, S. et al. *In vitro* regeneration of *Passiflora foetida*. **Journal of Research in Biology**, Tirunelveli, v. 8, n. 8, p. 653-659, Dec. 2011.

LIMA, A. A. et al. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPMPF, 2013. (Boletim, 29). Disponível em:  
<[http://www.cnpmpf.embrapa.br/publicacoes/produto\\_em\\_foco/maracuja\\_29.pdf](http://www.cnpmpf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/maracuja_29.pdf)>. Acesso em: 3 jul. 2013.

MARUKI-UCHIDA, H. et al. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 5, p. 845-849, 2013.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011.

MELO, K. T.; MANICA, I.; JUNQUEIRA, N. T. V. Produtividade de seis cultivares de maracujazeiro-azedo durante três anos em Vargem Bonita, DF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 9, p. 1117-1125, set. 2001.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 7, p. 1203-1212, Apr. 2011.

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

PACHECO, G. et al. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 42-47, Sept. 2012.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741-757, Apr. 2013.

SANTOS, F. C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.)**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SANTOS, F. C. et al. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Wageningen: Academic, 1996. 224 p.

### **CAPÍTULO 3**

#### **Conservação *in vitro* de maracujazeiro nativo**

## RESUMO

*Passiflora setacea*, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora giberti* são espécies de maracujazeiro nativas do Brasil, presentes no cerrado, bioma que sofre crescente degradação, estando sujeitas à erosão genética. De forma geral, possuem características ornamental, alimentícia e medicinal, e são resistentes às doenças que acometem os maracujazeiros. A criopreservação, conservação de material biológico em nitrogênio líquido (NL) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pode ser uma alternativa viável para preservar essas espécies. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a criopreservação das três espécies de maracujazeiro utilizando a técnica da *droplet vitrification*. Para determinar o meio para o cultivo, ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP. A fim de definir o tempo de imersão em solução de vitrificação (PVS2) a ser utilizado na criopreservação, ápices caulinares das três espécies foram expostos à PVS2 a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15, 30, 45 ou 60 minutos antes da imersão em NL. Para otimização da retomada de crescimento dos explantes após a criopreservação, dois experimentos foram realizados com a espécie *P. cincinnata*. Em ambos foram utilizados ápices caulinares criopreservados pela técnica da *droplet vitrification*. No primeiro experimento, após o descongelamento, os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de  $\text{GA}_3$  e, após 30 dias, foram transferidos para tubos de ensaio com meio MS acrescido de  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de BAP por mais 20 dias. No experimento 2, os ápices caulinares foram inoculados em meio MS com  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de BAP por 15 dias e transferidos para meio MS com diferentes concentrações de  $\text{GA}_3$  por mais 15 dias. Os dados qualitativos tiveram as médias comparadas por Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) e os dados quantitativos foram avaliados por regressão. Para cultivo de ápices caulinares e gemas laterais, houve diferença significativa entre as concentrações de BAP com a maior sobrevivência (62,2%) obtida com  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Para o tempo de imersão em PVS2, houve diferença significativa entre as espécies, sendo as maiores médias observadas para *P. cincinnata* (96,8%) e *P. giberti* (90,8%). Apenas em *P. cincinnata* houve formação de múltiplos brotos maiores do que 0,5 cm, sendo que o número de brotos apresentou diferença significativa com maior média (2,2) após 60 minutos de exposição a PVS2. Em relação à otimização da retomada de crescimento, não houve diferença significativa na utilização do  $\text{GA}_3$  para nenhum parâmetro.

**Palavras-chave:** Criopreservação. Planta Medicinal. Espécies nativas. Armazenamento em longo prazo. *Passiflora*.



## ABSTRACT

*Passiflora setacea*, *Passiflora cincinnata* and *Passiflora giberti* are native passion fruit species from Brazil, found in cerrado, biome that suffers increasing degradation, which makes them subject to genetic erosion. In general, they present ornamental and medicinal characteristics, the species produce edible fruits and they are resistant to the diseases that affect passion fruit. Cryopreservation, the conservation of biological material in liquid nitrogen (LN) at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and can become a viable alternative to preserve these species. Therefore, the aim of this work was to study the cryopreservation for them, using the droplet vitrification technique. To determine the growing medium, *P. setacea* shoot tips and lateral buds were inoculated on MS medium with different BAP concentrations. To determine the PVS2 exposure period to be used in the cryopreservation, shoot tips from the three species were exposed to PVS2 at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15, 30, 45 or 60 minutes before plunge into LN. To optimize the recovery of explants after cryopreservation, two experiments were performed with *P. cincinnata* species. In both experiments, were used cryopreserved shoot tips by droplet vitrification technique. In the first experiment, after thawing, the shoot tips were cultured on MS medium supplemented with different  $\text{GA}_3$  concentrations, and after 30 days, the explants were transferred to tubes containing MS medium supplemented with  $0.5\text{ mg L}^{-1}$  BAP for more 20 days. In experiment 2, the shoot tips were cultured on MS medium with  $0.5\text{ mg L}^{-1}$  BAP for 15 days before transfer to MS medium containing different  $\text{GA}_3$  concentrations, for 15 days. Qualitative data were compared by Scott-Knott and quantitative data were assessed by regression ( $P \leq 0.05$ ). In relation to growing medium for shoot tips and lateral buds of *P. setacea*, there was significant difference between the different BAP concentrations and the highest survival (62.2%) was obtained using  $1.0\text{ mg L}^{-1}$  BAP. For the immersion period in PVS2, there was a significant difference among the species with the highest averages observed for *P. cincinnata* (96.8%) and *P. giberti* (90.8%). Only for *P. cincinnata* were observed multiple shoots larger than 0.5 cm, and the number of shoots showed a significant difference with the highest average (2.2) after 60 minutes of exposure to PVS2. Regarding the optimization of the shoot tips regrowth, there was no significant difference in using  $\text{GA}_3$  to any parameters.

**Key words:** Cryopreservation. Medicinal plant. Native species. Long-term storage. *Passiflora*.

## 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma das formas de conservação da biodiversidade, na qual material biológico é armazenado em nitrogênio a  $-196^{\circ}\text{C}$  em sua fase líquida, ou a  $-150^{\circ}\text{C}$ , em sua fase de vapor. Sob estas temperaturas, o metabolismo celular é praticamente paralisado, diminuindo significativamente a degradação do material (REED, 2008). Este método tem se mostrado prático e eficiente, devido aos pequenos volumes dos materiais armazenados e da baixa exigência de manutenção, além de permitir a repetibilidade do processo após a determinação de um protocolo apropriado para a espécie em questão. Outra vantagem refere-se ao fato do armazenamento poder ser realizado por tempo, teoricamente, ilimitado (KACZMARCZYK et al., 2011).

Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre uma delas é dependente da espécie e de qual explante deseja-se criopreservar. Além disso, o sucesso do procedimento também será determinado pela elaboração de um meio eficiente de regeneração do explante, no qual ele é inoculado após o descongelamento. Reguladores de crescimento exercem uma função importante nessa etapa, e a concentração e combinação entre eles é muito variável de acordo com a espécie (MUKHERJEE et al., 2009). Sendo assim, o ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), capaz de induzir o alongamento do caule (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), pode ser utilizado em meio de regeneração pós-criopreservação, a fim de incrementar o crescimento dos brotos formados (MUKHERJEE et al., 2009).

De forma geral, os explantes mais comumente utilizados para criopreservação de material vegetal, quando não as sementes ortodoxas, são os ápices caulinares e gemas laterais de plântulas estabelecidas *in vitro* (PANIS; LAMBARDI, 2005). Segundo Sahijram, Soneji e Bollamma (2003), o uso de tecidos meristemáticos reduz a possibilidade de variação somaclonal. Além disso, células meristemáticas são compactas, de tamanho reduzido, núcleo

grande e, conseqüentemente, apresentam menor quantidade de água em seu interior (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Estas características favorecem o uso desse tipo de explante para criopreservação, pela possibilidade de diminuir a formação de cristais de gelo no interior celular durante o congelamento em NL e o descongelamento, o que causa danos à célula (ENGELMANN, 2011).

Uma das técnicas de criopreservação, denominada *droplet vitrification*, é uma das mais recentes desenvolvidas e consiste no pré-tratamento dos explantes com solução de vitrificação, antes de serem dispostos em tiras de papel alumínio contendo uma gota dessa solução e congelados em nitrogênio líquido (NL) (ENGELMANN, 2011). Soluções de vitrificação são utilizadas para que o material a ser criopreservado assumira um estado vítreo, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, prejudiciais à célula. Entretanto, estas soluções possuem níveis de toxicidade que devem ser identificados de acordo com a espécie em questão (REED, 2008).

A *droplet vitrification*, por ser uma técnica que utiliza menor volume da solução de vitrificação e por permitir taxas de congelamento e descongelamento ultra-rápidas, é utilizada com sucesso para muitas espécies e é considerada uma forma viável de complementar os esforços para conservação da biodiversidade (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008), principalmente para espécies que se encontram em biomas que sofrem processos de crescente degradação, como o cerrado (PILATTI et al., 2011).

O cerrado é um dos seis maiores biomas do Brasil, ocupando uma área de 24% do total do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). É um bioma considerado ameaçado e, no ano de 2005, o Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN, Embrapa, publicou um trabalho que indica o fim do cerrado até 2030. Até aquele ano, 57% de toda sua área já haviam sido destruídas e a taxa de desmatamento anual chegava a 1,5% (3 milhões de hectares/ano). A expansão da fronteira agrícola,

as queimadas e o crescimento não planejado das áreas urbanas constituem as principais pressões sobre o cerrado (CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN, 2005).

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e várias espécies nativas estão presentes no bioma cerrado. O gênero *Passiflora* é o maior dentro desta família e, de forma geral, possui características medicinal, ornamental e alimentícia (MARUKI-UCHIDA et al., 2013), o que lhe confere ótimo potencial econômico. No Brasil, o centro de distribuição geográfica deste gênero localiza-se no Centro-Norte, possuindo cerca de 140 espécies nativas, sendo 83 endêmicas (BERNACCI et al., 2013).

Dentro do gênero *Passiflora*, as espécies *Passiflora cincinnata* Mast., conhecida popularmente como maracujá-do-mato, *Passiflora giberti* N.E. Brown, cujo nome popular é maracujá-do-campo, e *Passiflora setacea* DC, de nome popular maracujá-do-sono, são nativas do cerrado (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; KIILL et al., 2010). As três espécies são, de forma geral, resistentes a doenças às quais os maracujazeiros comerciais são mais suscetíveis, característica esta favorável à utilização em programas de melhoramento genético e como porta-enxerto de *Passiflora edulis* (maracujá-azedo), espécie mais produzida e comercializada (AGUIAR et al., 2010; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI et al., 2005).

Apesar desses fatores, ainda não é expressiva a preocupação em preservar as espécies desse gênero, uma vez que as coleções abrangem uma pequena parte da biodiversidade do gênero *Passiflora* (SOUZA; MELETTI, 1997). Além disso, sendo nativas do cerrado, *P. giberti*, *P. setacea* e *P. cincinnata* estão sujeitas às pressões sofridas por esse bioma, o que poderia levar à extinção das espécies, caso não sejam concentrados esforços na sua conservação (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

Diante desse quadro, a criopreservação é uma alternativa viável para preservação da variabilidade genética do maracujazeiro. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a criopreservação das espécies *P. setacea*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, utilizando a técnica da *droplet vitrification*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas brotações pré-estabelecidas *in vitro* das espécies *P. setacea*, *P. cincinnata* e *P. giberti*, oriundas de sementes germinadas *in vitro*, mantidas em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. As brotações foram subcultivadas a cada 30 dias e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e irradiância de fótons de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### 2.2 Cultivo de ápices caulinares e gemas laterais

Ápices caulinares (aproximadamente 0,5 mm) e gemas laterais (aproximadamente 1 mm) de plântulas pré-estabelecidas da espécie *P. setacea* foram excisados com auxílio de microscópio estereoscópico. Os explantes foram cultivados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; ou 2,0 mg L<sup>-1</sup>) de BAP ou sem este regulador, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos no escuro por uma semana e, em seguida, transferidos para um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 25±2 °C. Após 30 dias foram avaliadas a sobrevivência, formação de cluster de gemas e a presença de calo.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Para cada tratamento foram realizadas três repetições, cada repetição consistiu de uma placa de Petri com cinco ápices caulinares ou gemas laterais.

### **2.3 Droplet vitrification**

A técnica de *droplet vitrification* foi realizada de acordo com Panis, Piette e Swennen (2005). A partir de plântulas de maracujazeiro mantidas *in vitro*, ápices caulinares das três espécies (0,5 – 1 mm) foram excisados sob microscópio estereoscópico binocular e mantidos em meio MS acrescido de 0,3 M de sacarose até que todos os explantes fossem extraídos. Estes foram imersos em solução de carregamento (2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose) por 20 minutos, sendo posteriormente tratados com PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) a 0° C por diferentes tempos (15, 30, 45 ou 60 minutos). A PVS2 é composta de 3,26 M de glicerol + 2,42 M de etileno glicol + 1,9M de dimetilsulfóxido + 0,4 M de sacarose, todos dissolvidos em meio MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Após esses períodos, os ápices caulinares foram dispostos em tiras de papel de alumínio (0,5 x 2,0 cm), contendo uma gota de PVS2, antes do congelamento em nitrogênio líquido (NL), à temperatura de -196° C. Os explantes foram mantidos em NL por no mínimo 30 minutos, sendo então descongelados por 15 minutos em uma solução de descarregamento composta de 0,4 M de sacarose. Todas as soluções foram dissolvidas em meio MS, tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram filtro-esterilizadas.

Após o descongelamento, os ápices caulinares foram inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Foram mantidos no escuro por uma semana e, em seguida, transferidos para um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de 25 $\pm$ 2 °C. Para cada tratamento (espécies de maracujazeiro x tempo de PVS2) foram inoculados 30 ápices caulinares, divididos em três repetições com 10

explantes em cada, sendo sete criopreservados e três não criopreservados (grupo controle). Foram avaliados após 30 dias: a porcentagem de sobrevivência, formação de brotos, cluster de gemas e calo.

#### **2.4 Otimização da retomada de crescimento de ápices criopreservados**

Estes experimentos foram realizados com a espécie *P. cincinnata*. Os ápices caulinares foram tratados em solução de carregamento, a temperatura ambiente, por 20 minutos, seguido do tratamento com PVS2 a 0 °C por 15 minutos antes da imersão em NL. Após 30 minutos, os ápices foram descongelados em solução de descarregamento a temperatura ambiente durante 15 minutos e então inoculados em diferentes meios de regeneração.

##### **2.4.1 Inoculação de ápices caulinares em meio com GA<sub>3</sub> por 30 dias (experimento 1)**

Após o descongelamento, os ápices caulinares foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e diferentes concentrações (0,05; 0,25 ou 1,25 mg L<sup>-1</sup>) de GA<sub>3</sub> ou em meio ausente deste regulador. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Antes de serem transferidos para ambiente com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, os ápices caulinares foram mantidos no escuro por sete dias e temperatura de 25±2 °C. Foram utilizados 30 explantes por tratamento, divididos em três repetições com 10 ápices caulinares em cada, sendo sete criopreservados e três não criopreservados.



Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e os explantes foram transferidos para tubos de ensaio com meio MS acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Depois de permanecerem em sala de crescimento a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, foram analisados após 20 dias: número de brotos, formação de calo e cluster de gemas e número de gemas, de acordo com a concentração de GA<sub>3</sub> a que cada explante foi submetida anteriormente.

#### **2.4.2 Inoculação de ápices caulinares em meio com GA<sub>3</sub> por 15 dias (experimento 2)**

Após a criopreservação, ápices caulinares foram inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, geleificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Permaneceram no escuro por sete dias, antes de serem transferidos para sala de crescimento, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2 °C. Após 15 dias, todos os explantes foram transferidos para meio MS acrescido de diferentes concentrações (0,05; 0,25 ou 1,25 mg L<sup>-1</sup>) de GA<sub>3</sub> ou para meio MS sem este regulador, e mantidos em sala de crescimento. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições, cada uma com 10 ápices caulinares, sendo sete criopreservados e três não criopreservados.

Depois de 15 dias da transferência, foram analisados: sobrevivência, formação de brotos, cluster de gemas e calo.

#### **2.5 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados qualitativos tiveram as médias comparadas por Scott-Knott e os dados quantitativos foram avaliados por regressão ( $P \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença significativa em relação à sobrevivência de ápices caulinares ou gemas laterais de *P. setacea* com média de 55%. Porém, às concentrações de BAP apresentaram diferenças significativas ( $p=0,0014$ ), onde o maior valor estimado foi de 63,7% de sobrevivência para a concentração de 1,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP. A maior média observada foi de 62,2% de sobrevivência com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 1).

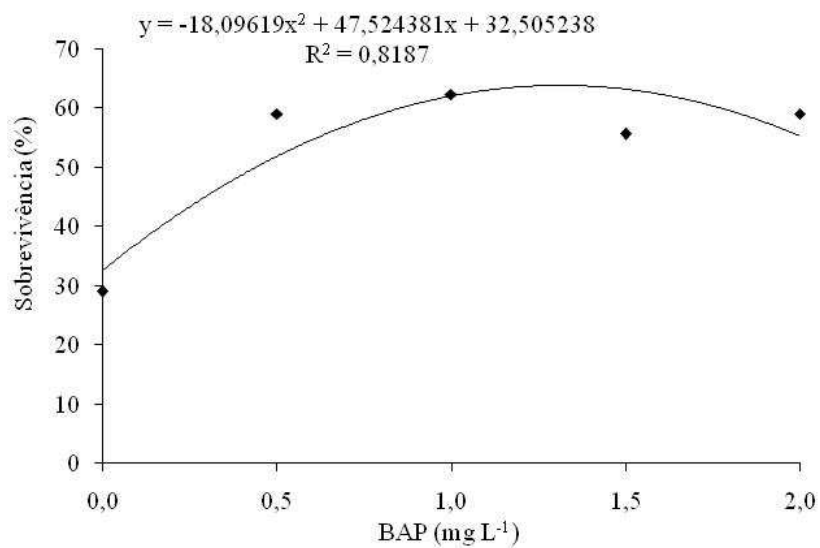


Figura 1 Média da porcentagem de sobrevivência em ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* em diferentes concentrações de BAP.

Foi observada diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) para a formação de cluster de gemas em ápices caulinares e gemas laterais tratados com diferentes concentrações de BAP (Figura 2). De acordo com a equação, o maior valor estimado para porcentagem de formação de cluster (59,9%) foi obtido em uma concentração de  $0,62 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, enquanto a maior média observada foi também de 59,9% em  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

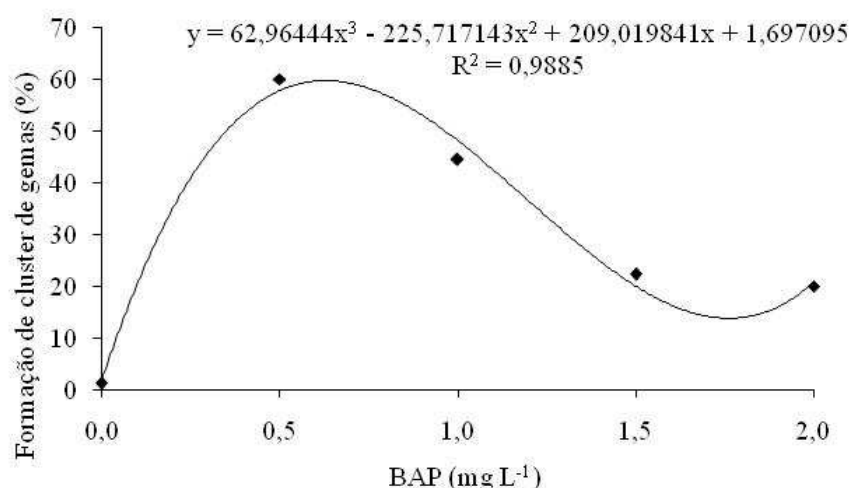


Figura 2 Média de formação de cluster de gemas em ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* tratados com diferentes concentrações de BAP.

Para formação de calo, foi observada diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre as diferentes concentrações de BAP. O maior valor estimado segundo a equação foi de 27,5% de formação de calo por explante em uma concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. O maior valor observado (31,1%) foi obtido com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  do regulador de crescimento (Figura 3).

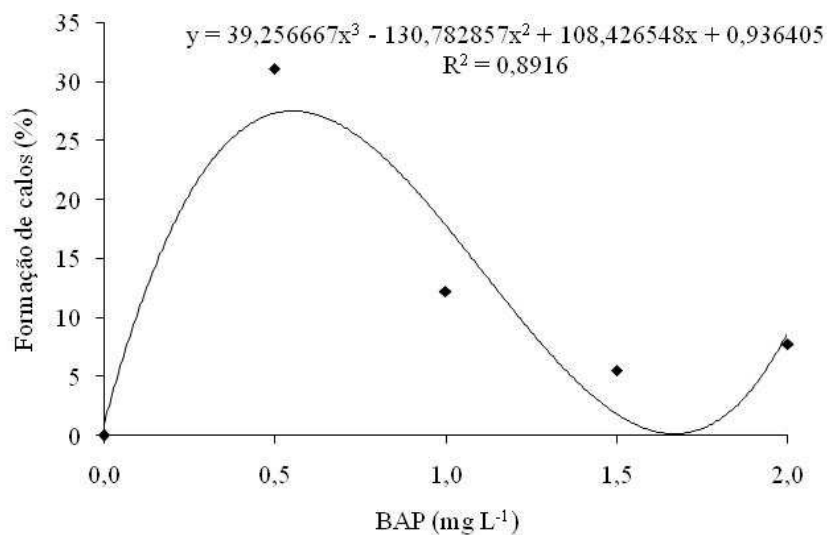


Figura 3 Média de formação de calo em ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* tratados com diferentes concentrações de BAP.

Para a espécie *P. foetida*, em um trabalho realizado por Ragavendran et al. (2012), ápices caulinares inoculados em meio MS, com acréscimo de 1,5 mg L<sup>-1</sup> da citocinina BA, apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência (95%). Em um experimento com *P. edulis*, houve formação de calos em ápices caulinares inoculados em meio MS suplementado com 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BA (FARIA; SEGURA, 1997).

A formação de calo e cluster de gemas *in vitro* pode ser estimulada ou inibida por meio da adição e equilíbrio de reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Desse modo, no presente trabalho, a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP influenciou positivamente o crescimento de calo e cluster de gemas, enquanto outras concentrações desequilibraram esse balanço, fazendo

com que a formação desses fatores fosse afetada de forma negativa. A figura 4 ilustra ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* inoculados em meio MS suplementado com BAP (A) e detalhe de ápice caulinar de *P. setacea* inoculado em meio MS + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, após 30 dias, evidenciando a formação de cluster de gemas e calo (B) .

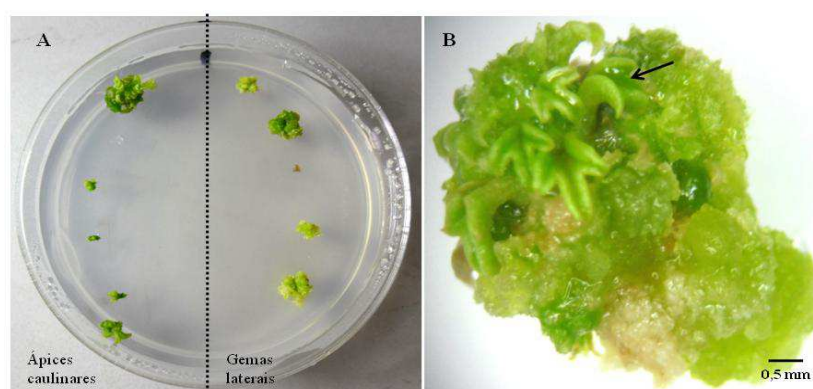


Figura 4 Ápices caulinares e gemas laterais de *P. setacea* inoculados em meio MS suplementado com BAP (A). Detalhe de ápice caulinar de *P. setacea* inoculado em meio MS + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, após 30 dias (B). A seta indica a formação de gema em cluster.

O número de espécies criopreservadas com sucesso pela técnica de *droplet vitrification* utilizando ápices caulinares é crescente (MENON et al., 2012; OZUDOGRU; KAYA, 2012; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; PANTA et al., 2006) e existem trabalhos realizados com gemas laterais em que esta técnica foi realizada com sucesso (CONDELLO et al., 2011; COSTE et al., 2012). Neste presente trabalho, a criopreservação foi realizada utilizando como explante ápices caulinares das três espécies de maracujazeiro.

Não foram observadas diferenças significativas com relação à sobrevivência dos ápices caulinares após a criopreservação nem quanto ao tempo de imersão em PVS2, seja para explantes criopreservados ou não. Entretanto, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre a média de sobrevivência das diferentes espécies, sendo as maiores médias observadas para *P. cincinnata* (96,8%) e *P. giberti* (90,8%) (Figura 5).

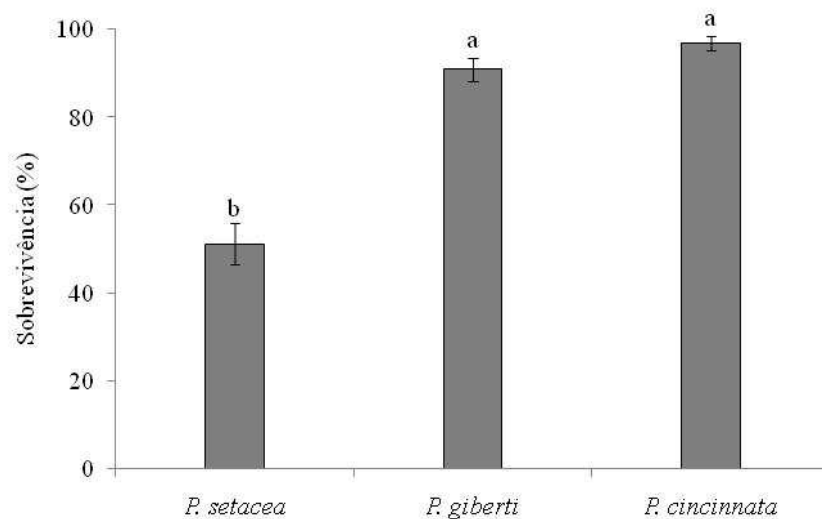


Figura 5 Média da porcentagem de sobrevivência de ápices caulinares de espécies de maracujazeiro após a criopreservação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Em um trabalho realizado por Garcia et al. (2011), apenas 11% dos ápices caulinares de *P. suberosa* sobreviveram após o tratamento com PVS2 por 30 e 60 minutos antes da criopreservação pela técnica de vitrificação, contra 100% de sobrevivência do grupo controle. Na *droplet vitrification*, tanto o

congelamento quanto o descongelamento ocorrem de forma mais rápida, o que diminui a formação e o tamanho de cristais de gelo que possam surgir durante essa etapa, além da exposição a volumes relativamente menores de solução de vitrificação (TOWILL; BONNART, 2003). Desta forma, a diferença de resultados com as três espécies deste presente trabalho e o estudo de Garcia et al. (2011) pode ter sido ocasionada devido à escolha da técnica de criopreservação.

Segundo Petijová, Skyba e Cellárová (2012), o sucesso da criopreservação é também genótipo-dependente, o que pode explicar a diferença de sobrevivência entre as espécies. Por isso, é importante que os protocolos sejam otimizados para cada espécie. Sendo assim, o fato de *P. cincinnata* ser tolerante à seca (KIILL et al., 2010), pode ter beneficiado a espécie em relação à desidratação dos explantes antes da criopreservação, fazendo com que sua média de sobrevivência fosse uma das mais altas entre as espécies deste estudo além da eficiente formação de brotos após a criopreservação (Figura 6).



Figura 6 Ápices caulinares de *P. setacea* (A), *P. cincinnata* (B) e *P. giberti* (C), 30 dias após o descongelamento. As setas (A) indicam a formação de cluster de gemas.

Não houve formação de múltiplos brotos maiores do que 1,0 cm nas espécies *P. setacea* e *P. giberti* após a criopreservação, mas estes foram observados em *P. cincinnata*. Houve diferença significativa ( $p=0,0164$ ) na média do número de brotos maiores que 1 cm em *P. cincinnata* em relação ao

tempo de imersão em PVS2, na qual o máximo valor estimado (2,3) é muito próximo ao máximo valor observado (2,2), após 60 minutos de imersão em PVS2 (Figura 7).

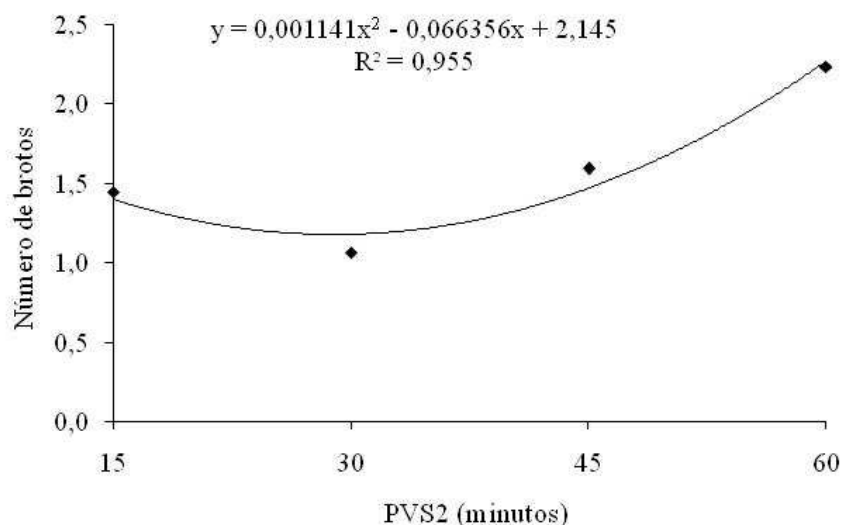


Figura 7 Média do número de brotos formados em *P. cincinnata*, após imersão de ápices caulinares em PVS2 por diferentes tempos, e criopreservação.

A taxa de formação de brotos é muito variável em relação ao tempo de exposição ao PVS2 em diferentes espécies (VIDAL et al., 2005). Para caqui, o melhor tempo foi de 20 minutos, com 89% de média de formação de broto por explante (MATSUMOTO et al., 2001). Para bananas de diversos genótipos, os tempos entre 30 e 60 minutos de PVS2 apresentaram a melhor porcentagem (65%) de regeneração dos ápices caulinares (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005). Em um trabalho realizado com amora, a melhor regeneração (46,8%) foi obtida utilizando 30 minutos de PVS2 (VUJOVIC et al., 2011).

Na otimização da retomada de crescimento de ápices caulinares de *P. cincinnata* criopreservados, no experimento 1, em que o ápice caulinar foi



mantido por 30 dias em meio com GA<sub>3</sub> após a criopreservação, não houve diferença significativa entre explantes criopreservados ou não e nem entre as diferentes concentrações do regulador, em relação à sobrevivência (58,5%). Depois da transferência dos brotos regenerados para tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, também não foi obtido efeito significativo para os parâmetros comprimento dos brotos (média de 1,2 cm por explante) e número de gemas, que apresentou média de 1,3 por explante.

Quando os ápices caulinares criopreservados foram inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e após 15 dias, transferidos para esse meio acrescido de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> por mais 15 dias (experimento 2), estes não apresentaram diferença significativa em relação à sobrevivência (70%), ao número de brotos (2 por explante), formação de calo (48%) e de cluster de gemas (43%).

Não houve diferença significativa para a sobrevivência dos ápices caulinares de *P. cincinnata* quando inoculados em meio MS acrescido com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> por 30 (experimento 1) ou 15 (experimento 2) dias, após a criopreservação. A média obtida para esse parâmetro foi de 77,4%.

#### 4 CONCLUSÕES

A utilização de meio MS suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP pode ser utilizado para cultivo de meristemas de ápices caulinares ou gemas laterais de *Passiflora setacea*.

O tratamento com 15 minutos de PVS2 de ápices caulinares de *Passiflora setacea*, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora giberti* antes da imersão em nitrogênio líquido garante a alta sobrevivência após a criopreservação.

A utilização de  $\text{GA}_3$  no meio de regeneração de ápices caulinares de *P. cincinnata* após a criopreservação não afeta a otimização da retomada de crescimento para essa espécie.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. V. M. et al. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como porta-enxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Patos, v. 6, n. 4, p. 17-22, 2010.

BERNACCI, L. C. et al. *Passifloraceae*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2013.

Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS. **Cerrado pode sumir até 2030**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers.

**Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 731-738, Jan./Feb. 2012.

CONDELLO, E. et al. Cryopreservation of *in vitro* axillary buds of apple following the droplet-vitrification method. **CryoLetters**, Lewes, v. 32, n. 2, p. 175-185, 2011.

COSTE, A. et al. *In vitro* propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 213-226, Aug. 2012.

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

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. In: \_\_\_\_\_. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 187-210.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. *HortScience*, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.

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

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. The Background: Springer, 2008. v. 1, 709 p.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal: culturas temporária e permanentes**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 8 jul. 2013.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 81-107.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.

KIILL, L. H. P. et al. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina, Pernambuco, Brasil. ***Oecologia Australis***, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 115-127, mar. 2010.

MARUKI-UCHIDA, H. et al. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. ***Biological & Pharmaceutical Bulletin***, Tokyo, v. 36, n. 5, p. 845-849, 2013.

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. ***Plant Cell Reports***, Berlin, v. 20, n. 5, p. 398-402, July 2001.

MELETTI, L. M. M. et al. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. p. 55-78.

MENON, A. et al. Cryopreservation of *Lomandra sonderi* (Asparagaceae) shoot tips using droplet vitrification. ***CryoLetters***, Lewes, v. 33, n. 4, p. 259-270, 2012.

MUKHERJEE, P. et al. Cryopreservation of asian *Dioscorea bulbifera* L. and *D. alata* L. by vitrification: importance of plant growth regulators. ***CryoLetters***, Lewes, v. 30, n. 2, p. 100-111, Mar./Apr. 2009.

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

OZUDOGRU, E. A.; KAYA, E. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: comparison of three vitrification-based methods. ***CryoLetters***, Lewes, v. 33, n. 5, p. 363-375, 2012.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. In: ELECTRONIC FORUM ON BIOTECHNOLOGY IN FOOD AND AGRICULTURE, 13., 2005, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/C13doc.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

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

PANTA, A. et al. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of *Andean landraces* at CIP. In: CRYO. **Abstract book of Cryo 2006**. Hamburg, 2006. p. 201.

PETIJOVÁ, L.; SKYBA, M.; CELLÁROVÁ, E. Genotype-dependent response of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) shoot tips to cryogenic treatment: effect of pre-culture conditions on post-thaw recovery. **Plant Omics Journal**, Melbourne, v. 5, n. 3, p. 291-297, 2012.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 82-98, Feb. 2011.

RAGAVENDRAN, C. et al. *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. an exotic medicinal plant. **Asian Journal of Plant Science and Research**, Benha, v. 2, n. 6, p. 707-711, Jan. 2012.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer, 2008. 513 p.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.; BOLLAMMA, K. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 39, n. 6, p. 551-556, Nov./Dec. 2003.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis Tanaka*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, June 1990.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá**: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

TOWILL, L. E.; BONNART, R. Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. **CryoLetters**, Lewes, v. 24, n. 6, p. 341-346, Nov./Dec. 2003.

VIDAL, N. et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 41, n. 1, p. 63-68, Jan./Feb. 2005.

VUJOVIC, T. et al. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 222-228, 2011.