



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Marcela Gomes Vianna

**Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L.
com a técnica de vitrificação em crioplaca e
avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares**

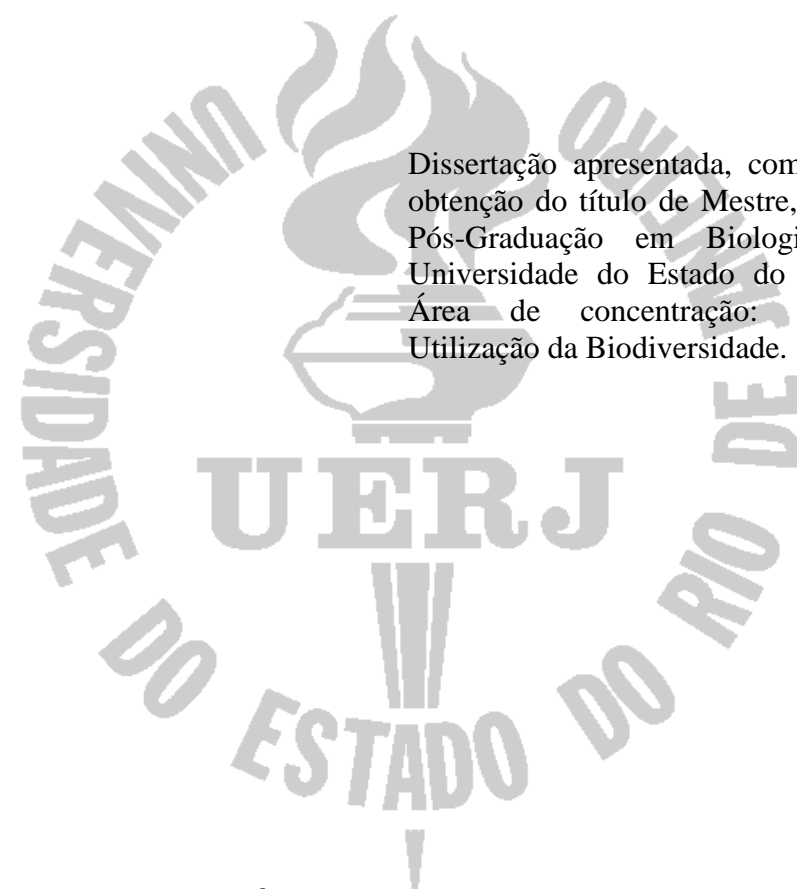
Rio de Janeiro

2016

Marcela Gomes Vianna

Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.



Orientadora: Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Coorientadora: Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Rio de Janeiro
2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

V617 Vianna, Marcela Gomes.
Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares /
Vianna, Marcela Gomes - 2016.
74f.: il.

Orientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida
Coorientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Inclui bibliografia.

1. Passiflora - Teses. 2. Maracujá - Propagação-in-vitro - Teses. 3. Criopreservação - Teses. I. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. II. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título

CDU 634.776.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcela Gomes Vianna

Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Aprovada em 28 de julho de 2016.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Norma Albarello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, todo poderoso, pelos dias, oportunidade de aprendizado diário e pelas pessoas que me cercam de cuidados. Eu reconheço que tudo vem de ti e sem ti nada pode ser feito, por isso, te agradeço pela motivação e por renovação de forças. Obrigada por acreditar em mim e ser minha esperança de recompensa futura, independentemente das situações.

À minha querida orientadora Georgia Pacheco, por toda boa vontade, profissionalismo e dedicação a este projeto. É difícil encontrar um orientador com tanta paixão e comprometimento. Você vai além dos experimentos e enxerga o lado humano por trás de um trabalho. Obrigada por todo o carinho, paciência, correções e motivações ao longo desses anos, mas, principalmente, por nunca desistir de mim e investir na minha formação.

À minha coorientadora Elisabeth Mansur, pela oportunidade de trabalhar e crescer dentro de um laboratório tão singular como o Labmit. Agradeço pelos incentivos, carinho, atenção e boa vontade em nos atender, dando valiosas sugestões refinadas por anos de experiências.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UERJ pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

A CAPES pela bolsa de auxílio financeiro.

Ao pesquisador tão querido Florent Engelmann, pelas inúmeras contribuições à área da conservação *in vitro*, especialmente pelas colaborações neste trabalho. Ter a oportunidade de te conhecer e usufruir de sua experiência foi um presente. Nunca imaginei que um colaborador de referência internacional pudesse ser tão acessível, gentil e solícito em responder nossas indagações. Obrigada de coração.

À professora Rahel Gagliardi, pelo carinho, iniciativa e empenho nos processos burocráticos da colaboração com o *Unité Mixte de Recherche: Diversité, Adaptation, Développement des Plantes, L'Institut de Recherche pour le Développement* (DIADE/IRD, Montpellier - França).

À professora Cláudia Simões Gurgel, pela gentileza, avaliação como *referee* e contribuições ao longo do trabalho.

À Mariela Simão, pela amizade, palavras de incentivo, boa vontade e constante ajuda, neste trabalho e fora dele. Obrigada pelo auxílio na edição e adaptação de imagens, pelo auxílio nos experimentos, e por tornar esse período mais prazeroso. Pode contar comigo sempre.

À Renata Garcia (Renatinha), essa figura tão ilustre do Labmit, por ter sempre um sorriso atencioso e um tato diferenciado para a resolução de problemas. Obrigada pela

oportunidade de iniciar com você, meus primeiros passos na criopreservação. Serei sempre grata por sua boa vontade e amizade, além de poder contar com sua enorme competência.

À Isabela Sousa e Ana Ferreira, minhas amigas, parceiras de laboratório e de vida. Obrigada por caminharem comigo nestes longos anos de UERJ, por permitir que eu fizesse parte da vida de vocês. É muito bom quando podemos contar com nossos amigos, mesmo que o tempo deles seja escasso. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, por rir e chorarem comigo e por me ajudarem em todo o tipo de situação.

À Jamine Pettinelli (minha companheira de criopreservação) e Bianka Soares, pela disposição em manter os galões supridos com nitrogênio, mas especialmente, pela amizade, ajuda, boas risadas e palavras de ânimos. Obrigada por tudo.

À Marina Kaiate, por todo o auxílio e boa vontade nos experimentos, na manutenção dos estoques e por escolher se aventurar no mundo da conservação *in vitro*, apesar de todas as dificuldades e desafios.

À equipe Labmit (membros atuais e passados), por tornar leves as longas horas de convivência diária. Pela ajuda, pelo companheirismo, pela paciência, generosidade em ceder materiais, lugar na câmara de fluxo; e por compartilhar o espaço de forma tão respeitosa. Obrigada à Ana Carolina Madeira, Aline, Beatriz de Souza, Camila Castanon, Tyanne Felipe, Raphaela Reis, Rafaela Caruso, Gabriel Casimiro, Gilson, Nathalia Falsia, Luis Paulo Andrade, Raquel Mattos, Thiago Saide, Liane Peixoto, e tantos outros que passaram pelo laboratório.

À equipe Labplan, por dividir os espaços do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, especialmente, pela atenção e cortesia.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Celso Lage, Rachel Gagliardi, Norma Albarellon e os suplentes Maria da Graça Justo e André Nunes, por aceitarem o convite de contribuir neste trabalho.

Agradeço às agências de fomentos CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste projeto.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelas disciplinas ministradas, que tanto acrescentaram à minha formação pessoal e profissional.

Às secretárias do PGBV Vera, Tereza e Amália que sempre me atenderam de forma carinhosa.

À minha família, Arli Vianna (pai), Sandra Paula Vianna (mãe), Hudson Vianna (irmão) e Isabelle Louise Correa (cunhada), por todo apoio, carinho, orações, suprimento emocional, amor incondicional durante toda a minha formação. Não me cansarei de agradecer a Deus pelo presente. Minhas melhores lembranças são com vocês.

Aos meus familiares, especialmente meus tios Wilson Gomes e Damiana Coelho, por sua preocupação com meu bem-estar, pelo apoio, carinho, cuidado e boas gargalhadas; aos meus tios Wanderlan e Rute Vianna, pelo auxílio nos momentos difíceis, pela preocupação e

por suas orações; aos meus tios Simone e Bernardo Bermond pelo carinho, admiração e cuidados ao longo da minha vida.

À minha querida amiga Jessica Cavalcante, por sua amizade gratuita, por sonhar comigo e sempre acreditar em mim. Que Deus te abençoe e retribua, a você e sua família, por tanto carinho.

À minha querida prima/amiga Maressa Vilas-Boas por estar presente (mesmo que distante) em todos os momentos da minha vida. E também aos meus tios Sueli e Otacílio, por todo o carinho.

Aos meus amigos Jurema e Gastão Rodriguez, pela amizade, carinho e orações.

Agradeço ao meu amigo/namorado, Paulo Almeida, por todos os dias escolher investir em nosso relacionamento. Por todo apoio, paciência, generosidade, durante este período tão intenso da formação acadêmica; e por ajudar no meu amadurecimento.

Faça do desconhecido um impulso, não um obstáculo.

Amyr Klink

RESUMO

VIANNA, Marcela Gomes. **Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares.** 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Passiflora suberosa L., conhecida como maracujá-mirim ou maracujazinho-cortiça-preto, é uma espécie nativa que ocorre desde o Nordeste até o Sul do Brasil. Embora apresente grande potencial agrônomo, ornamental e medicinal, poucos estudos biotecnológicos foram desenvolvidos para essa espécie, visando à propagação e à conservação *in vitro*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo de criopreservação para ápices caulinares de *P. suberosa* utilizando a técnica de V-Crioplaca, incluindo a avaliação da influência do tempo de cultura da fonte de explantes e do tipo e período de exposição às soluções de vitrificação PVS2 (0°C) e PVS3 (25°C). Além disso, a avaliação de danos nas membranas celulares foi também investigada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação de fosfolipídios. Para avaliar a influência do tempo de cultura da fonte de explantes na recuperação pós-resfriamento, ápices caulinares foram excisados de microestacas produzidas a partir da cultura de segmentos nodais em meio MSM ½ após 20, 30 ou 40 dias. Após esses períodos, os explantes foram pré-cultivados na presença de sacarose a 0,3 M, por 24 horas e então transferidos para placas de alumínio, onde foram expostos à solução de *loading* e às soluções de vitrificação PVS2 ou PVS3, por diferentes períodos (0, 30, 45, 60, 90, 120, 150 minutos), antes da imersão em nitrogênio líquido. As taxas de sobrevivência e a recuperação foram avaliadas 30 e 60 dias após o reaquecimento e a transferência do material para meio de recuperação, respectivamente. A recuperação de plantas a partir de ápices criopreservados ocorreu em frequências distintas, dependendo do tempo de cultura da fonte de explante e do tempo de exposição à solução crioprotetora. As maiores taxas de recuperação foram observadas a partir de ápices caulinares excisados de microestacas mantidas em cultura por 20 dias e expostos à PVS2 por 90 minutos (50 %), e a partir de explantes excisados de microestacas com 40 dias e expostos à PVS3 por 45 a 90 minutos (50 a 60 %). No entanto, a produção de brotos ocorreu de forma mais rápida nos ápices expostos a PVS3. Foi também observada a formação de calos friáveis na base dos explantes expostos a ambas soluções crioprotetoras. O conteúdo de MDA foi maior após a desidratação osmótica do material, quando comparado com o observado nas amostras controle e no material criopreservado e armazenado por 24 horas no escuro após o reaquecimento. Esses resultados demonstraram que a técnica de V-Crioplaca foi eficiente para a criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa*, tendo sido influenciada pelo tempo de cultura da fonte de explantes e pelo tempo de exposição e o tipo de solução crioprotetora utilizada. A investigação das injúrias ocorridas nas membranas celulares durante o processo de criopreservação permitiu a identificação preliminar de uma etapa crítica do protocolo. Esses resultados indicam a necessidade de uma ampla investigação das alterações morfo-fisiológicas induzidas pela criopreservação, visando à otimização do protocolo aqui estabelecido para o aumento das taxas de recuperação de plantas pós-resfriamento em NL.

Palavras-chave: Maracujá. Conservação *in vitro*. Crioproteção. V-Crioplaca. Estresse oxidativo

ABSTRACT

VIANNA, Marcela Gomes. **Cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V cryo-plate technique and evaluation of cryoinjuries in the cell membranes.** 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Passiflora suberosa L., known as *maracujá-mirim* or *maracujazinho-cortiça-preto*, is a native species, which occurs from the Northeast to the South of Brazil. In spite of its great agronomic, ornamental and medicinal potential, there are few biotechnological studies with this species, aiming at its propagation and *in vitro* conservation. Therefore, the goal of this work was the establishment of a cryopreservation protocol for shoot tips of *P. suberosa* using V-Cryo-plate, including the evaluation of the influence of the explant sources and the type and exposure time to the vitrification solutions PVS2 (0°C) and PVS3 (25°C). In addition, the evaluation of cell membrane damages was also investigated. In order to evaluate the influence of the explant source in post-freezing recovery, shoot tips were excised from microshoots produced from nodal segments cultured on MSM ½ medium for 20, 30 or 40 days. After these periods, explants were precultured in the presence of 0.3 M sucrose for 24 hours, and then transferred to aluminum plates, where they were exposed to the loading and vitrification solutions PVS2 or PVS3, for different periods (0, 30, 45, 60, 90, 120, 150 minutes), before immersion into liquid nitrogen. Survival and recovery rates were evaluated 30 and 60 days after rewarming and transference to the recovery medium, respectively. Plant recovery from cryopreserved shoot tips occurred at distinct frequencies, depending on the culture time of the source explant and exposure time to the cryoprotectant solution. Best recovery rates were observed from shoot tips excised from microshoots maintained for 20 days in culture and exposed to PVS2 for 90 minutes (50 %), and from explants excised from microshoots with 40 days and exposed to PVS3 for 45 to 90 minutes (50 to 60 %). However, shoot production occurred faster from shoot tips exposed to PVS3. The formation of friable callus was also observed at the base of the explants exposed to both cryoprotectant solutions.

MDA content was higher after osmotic dehydration of the material, when compared to the observed among the control samples and to the cryopreserved material maintained for 24 hours in the dark after rewarming. These results showed that the V-Cryo-plate technique was efficient for the cryopreservation of *P. suberosa* shoot tips, and was influenced by the age of the explants and by the exposure time and type cryoprotectant solution used. The investigation of injuries in the cell membranes during the cryopreservation process allowed the preliminary identification of a critical step of the protocol. These results emphasized the need for a wide investigation of morpho-physiological alterations induced by cryopreservation, aiming at optimizing the protocol described here for the increase of plant recovery rates.

Keywords: Passion fruit. *In vitro* conservation. Cryoprotection. V-Cryo-plate. Oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Alterações induzidas pelo processo de criopreservação.....	24
Figura 2 –	Diversidade de flores de <i>Passiflora</i>	29
Figura 3 –	Distribuição geográfica de <i>Passiflora suberosa</i>	30
Figura 4 –	<i>Passiflora suberosa</i> L.....	31
Figura 5 –	Aspectos morfológicos de <i>Passiflora suberosa</i> L.....	33
Figura 6 –	Produção de microestacas a partir de segmentos nodais de <i>P. suberosa</i>	39
Figura 7 –	Etapas da criopreservação de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> utilizando a técnica de V-crioplacas.....	41
Figura 8 –	Microestacas de <i>P. suberosa</i> obtidas após diferentes períodos de cultura.....	43
Figura 9 –	Resposta morfogênica a partir de ápices caulinares criopreservados de <i>P. suberosa</i> após 60 minutos de exposição à PVS2 ou PVS3, após 30 dias em meio de recuperação.....	46
Figura 10 –	Recuperação de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> excisados de microestacas com 20 dias de cultura, após criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca e exposição à PVS2.....	47
Figura 11 –	Recuperação de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> excisados de microestacas com 40 dias de cultura, após criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca e exposição à PVS3 por diferentes períodos.....	48
Figura 12 –	Formação de calos a partir de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca.....	49
Figura 13 –	Plantas de <i>P. suberosa</i> derivadas de ápices caulinares excisados de microestacas com 40 dias de cultura, expostos à PVS3 por 90 minutos e criopreservados por V-Crioplaca.....	50
Figura 14 –	Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) em ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> após diferentes etapas do protocolo de criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca.....	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	Principais soluções de vitrificação utilizadas para a criopreservação de espécies vegetais.	21
Quadro 2 –	Estratégias de conservação <i>in vitro</i> desenvolvidas para espécies de <i>Passiflora</i>	36
Tabela 1 –	Avaliação da influência do tempo de cultura dos explantes e das soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca e recuperados em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μM por 25 dias em ausência de luz.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
Abs	Absorbância
APX	Ascorbato peroxidase
BAP	6-benzilaminopurina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSSG	Glutathiona reduzida
GR	Glutathiona redutase
ISSR	<i>Inter- Simple Sequence Repeat</i>
MDA	malondialdeído
MDA-TBA ₂	Complexo formado pela reação entre o malondialdeído e o ácido tiobarbitúrico
MS	meio Murashige & Skoog
MSM	Meio MS modificado com base na composição mineral das folhas de maracujá (Monteiro et al., 2000b)
MSM ½	meio MSM contendo metade da concentração de sais e vitaminas
NL	Nitrogênio líquido
¹ O ₂	oxigênio singlete
O ₃	ozônio
O ₂ ^{•-}	superóxido
OH [•]	Hidroxil
OOH [•]	hidroperoxil
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
PSII	Fotossistema II
PVS1	<i>Plant Vitrification Solution 1</i>

PVS2	<i>Plant Vitrification Solution 2</i>
PVS3	<i>Plant Vitrification Solution 3</i>
PVS7	<i>Plant Vitrification Solution 7</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RO	alcoxil
ROO	peroxil
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
V-Crioplaca	vitriificação em crioplacas
VSL	Vitrification Solution

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	18
1.1	Criopreservação.....	19
1.2	Gênero <i>Passiflora</i>.....	28
1.2.1	<u><i>Passiflora suberosa</i> L.....</u>	31
1.2.2	<u>Conservação <i>in vitro</i> de espécies de <i>Passiflora</i>.....</u>	35
2	OBJETIVOS.....	38
3	METODOLOGIA.....	39
3.1	Material Vegetal e condições de cultura.....	39
3.2	Criopreservação de ápices caulinares.....	39
3.2.1	<u>Avaliação da influência da fonte de explantes na recuperação pós – resfriamento.....</u>	40
3.2.2	<u>Vitrificação em crioplacas de alumínio (V-Crioplacas).....</u>	40
3.3	Avaliação da peroxidação de lipídios pela quantificação de Malondialdeído (MDA).....	41
3.4	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Criopreservação de ápices caulinares de <i>P. suberosa</i> utilizando a técnica de V-crioplaca.....	43
4.2	Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação de MDA.....	51

5	DISCUSSÃO.....	53
	CONCLUSÕES.....	59
	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

1 CONSERVAÇÃO *IN VITRO*

As estratégias de conservação *in vitro* visam ao armazenamento de germoplasma vegetal, sob condições *in vitro*, em curto, médio e longo prazos (ENGELS; ENGELMANN, 2001). Essas estratégias têm como pré-requisito a disponibilidade de sistemas de cultura de tecidos vegetais, os quais permitem a obtenção de plantas completas por multiplicação de meristemas pré-existentes, organogênese ou embriogênese somática, e incluem ainda culturas de órgãos, calos e células em suspensão (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A produção de plantas a partir de meristemas pré-existentes reproduz o processo natural de desenvolvimento de regiões com potencial de diferenciação presentes na planta, tais como ápices caulinares ou radiculares e segmentos nodais, sem a necessidade da etapa de desdiferenciação. Como este processo reduz o risco de alterações genéticas, a regeneração de plantas via meristemas pré-existentes é a mais indicada para a conservação de germoplasma *in vitro* (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013).

A organogênese *in vitro* consiste na regeneração de novos órgãos a partir de tecidos já diferenciados e com potencial morfogenético. Neste processo, as células diferenciadas retornam a um estágio similar ao meristemático, adquirindo novas competências, antes da rediferenciação, na qual ocorre a formação dos novos órgãos. A embriogênese somática consiste na indução de embriões a partir de células somáticas. Estes apresentam uma estrutura bipolar, contendo os meristemas apicais do caule e da raiz, o que possibilita a obtenção de plantas completas (JIMÉNEZ, 2005). A formação de novas gemas adventícias, assim como embriões somáticos, pode ocorrer diretamente a partir do explante, caracterizando a organogênese e embriogênese direta, ou pode ocorrer após a formação de uma massa desorganizada de células, denominada calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os sistemas de crescimento ativo, que visam ao armazenamento de germoplasma em curto prazo, são caracterizados pela manutenção do material em condições padrão de cultivo, com subculturas em intervalos curtos, que podem variar de semanas a poucos meses. No entanto, a manutenção desses sistemas pode tornar o processo dispendioso, suscetível a erros, contaminações, perda do potencial morfogenético e da integridade genética (ENGELMANN, 1991).

Os sistemas de crescimento lento, por outro lado, visam retardar o metabolismo do material, com o intuito de aumentar os intervalos entre as subculturas, permitindo seu armazenamento em médio prazo (RAO, 2004). Estes sistemas incluem modificações no meio de cultura pela redução da concentração de sais minerais, adição de reguladores de crescimento, como o ácido abscísico (ABA), ou de inibidores osmóticos, como manitol e sorbitol, além de alterações das condições de cultura, como a diminuição da temperatura e luminosidade (WITHERS, 1991). Nessas condições, os intervalos entre as subculturas podem variar de períodos de seis meses a dois anos, dependendo da espécie e da metodologia utilizada (VILLALOBOS; FERREIRA; MORA, 1991; ASHMORE, 1997). Embora esses sistemas sejam eficientes para determinadas espécies, a manutenção das plantas nas condições de crescimento lento por longos períodos pode favorecer o aparecimento de alterações genéticas (HARDING, 1994). Além disso, essas metodologias demandam um alto custo de manutenção, espaço e estrutura laboratorial, não sendo consideradas adequadas para a manutenção do material por longos períodos (WITHERS, 1991; ENGELMANN, 2011).

1.1 Criopreservação

A criopreservação, considerada a alternativa mais adequada para a conservação de germoplasma vegetal em longo prazo, baseia-se no armazenamento em temperaturas ultrabaixas, utilizando nitrogênio líquido (NL) (-196°C) ou sua fase vapor (aproximadamente -150°C). Nessas condições, as reações celulares e os processos metabólicos são interrompidos, permitindo que o material vegetal seja estocado por períodos teoricamente ilimitados, com riscos reduzidos de variações genéticas e contaminação (ENGELMANN, 2011). Adicionalmente, a permanência do material em NL reduz os custos de manutenção e o espaço necessário para a conservação (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

A criopreservação vem sendo bastante utilizada como estratégia complementar na conservação de diversas espécies vegetais, principalmente aquelas que apresentam limitações para o uso de outras metodologias de conservação, como as que produzem sementes recalcitrantes, as que apresentam propagação vegetativa ou as espécies raras e ameaçadas (DULLO et al., 1998). Além disso, é a única opção para o armazenamento em longo prazo de produtos biotecnológicos (CRUZ-CRUZ et al., 2013).

As metodologias de criopreservação foram desenvolvidas inicialmente para a conservação de células animais, utilizando glicerol e gelo seco para o armazenamento de espermatozoides de aves e bovinos (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). Os primeiros trabalhos para a criopreservação de células vegetais somente foram desenvolvidos na década de 1960 (SAKAI, 1965). Embora o armazenamento em temperaturas ultrabaixas seja realizado de forma relativamente simples para diferentes tipos de células animais, o estabelecimento de protocolos de criopreservação vegetal é um processo mais complexo e com alta especificidade devida, principalmente, à presença da parede celular (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Um dos principais aspectos que devem ser considerados na criopreservação é a formação de cristais de gelo resultante do congelamento da água intracelular, os quais podem afetar a integridade estrutural e coligativa das células, causando danos às membranas celulares e comprometendo a recuperação do material após o reaquecimento (KACZMARCZYK et al., 2012). Assim, a desidratação é considerada uma etapa crítica do processo, possuindo como objetivo a remoção parcial da água, de forma a prevenir danos ocasionados pela cristalização (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Nas primeiras técnicas de criopreservação de plantas, denominadas clássicas ou convencionais, esse objetivo é atingido durante o processo de resfriamento, enquanto que nas técnicas contemporâneas, a desidratação é obtida antes do resfriamento, pela exposição a soluções altamente concentradas ou por meio da evaporação física (ENGELMANN, 2011).

A desidratação induzida pelo resfriamento controlado baseia-se na redução gradual da temperatura, com velocidade controlada (0,5 - 2,0 °C/min) até, aproximadamente, -40 °C, antes da imersão do material em NL (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013; KULUS; ZALEWSKA, 2014). Desta forma, com a redução da temperatura, ocorre inicialmente o congelamento do meio extracelular, resultando no aumento da pressão de vapor da célula e fazendo com que ocorra a saída de água intracelular para o meio externo congelado. Consequentemente, o meio intracelular torna-se muito concentrado, restringindo a movimentação das moléculas de água residual para o arranjo na forma de cristais de gelo (ENGELMANN, 2011). Além disso, a membrana plasmática age como uma barreira, permitindo que o resfriamento no interior da célula seja mantido, porém sem formação de gelo no meio intracelular (ENGELMANN, 2011; KACZMARCZYK et al., 2012).

A técnica de desidratação induzida por resfriamento é baseada nos processos naturais observados nos vegetais. Plantas de clima temperado são naturalmente capazes de desenvolver tolerância ao resfriamento pela diminuição gradual da temperatura (MIURA;

FURUMOTO, 2013), o que induz cascatas de sinalização e reprogramação gênica que resultam em alterações metabólicas e fisiológicas (JAN; HUSSAIN; ANDRABI, 2009), incluindo o aumento da concentração de açúcares, proteínas e de aminoácidos, como exemplo, a prolina, fundamentais para o ajuste osmótico (VAN RENSBURG; KRÜGER; KRÜGER, 1993; PANIS; LOMBARDI, 2005). Plantas de clima tropical e subtropical, por outro lado, são mais sensíveis a baixas temperaturas e, em sua maioria, não possuem capacidade de aclimação ao frio (XIN; BROWSE, 2000; JAN; HUSSAIN; ANDRABI, 2009). Além disso, tecidos multicelulares complexos, com diferentes tipos celulares, demandam também condições específicas para desidratação. Portanto, a indução da tolerância ao resfriamento nestes materiais requer a utilização de substâncias com a dupla função de desidratar e proteger os sistemas celulares.

A partir da década de 1990, foram desenvolvidas técnicas de criopreservação que visam à desidratação do material antes da imersão direta em NL. Nessa situação, ocorre a vitrificação do meio intracelular, que passa da fase líquida para um estado vítreo amorfo, com propriedades físicas e mecânicas de um sólido, mas sem cristalização (TAYLOR; SONG; BROCKBANK, 2004; ENGELMANN, 2011). Nas técnicas contemporâneas, a remoção da água intracelular é alcançada por meio da exposição do material a substâncias altamente concentradas (desidratação osmótica) ou da desidratação evaporativa. Este tratamento é utilizado como substituição ao uso do pré-condicionamento em baixas temperaturas para a indução da criotolerância realizado nas técnicas clássicas.

Para a desidratação osmótica, o material vegetal é exposto a soluções constituídas por uma mistura de substâncias crioprotetoras, capazes de diminuir o ponto de congelamento, protegendo as células contra crioinjúrias (KULUS; ZALEWSKA, 2014). As substâncias crioprotetoras podem ser classificadas, de acordo com sua capacidade de atravessar as membranas celulares, como penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores do tipo não penetrantes, como açúcares complexos, álcoois, polietilenoglicol e outras substâncias de alto peso molecular, são osmoticamente ativos e induzem a desidratação pelo aumento da osmolaridade do meio extracelular. Algumas destas são capazes de atravessar somente a parede celular, protegendo a membrana da desidratação excessiva e de danos mecânicos causados pelo resfriamento (BENSON, 2008). Ao contrário, os crioprotetores penetrantes podem ser internalizados, protegendo as membranas e evitando a cristalização do citoplasma pelo aumento da viscosidade (KIM et al., 2009). Os mais comumente utilizados são dimetil sulfóxido (DMSO) e glicerol (PANIS; LOMBARDI, 2005).

A composição das soluções de vitrificação varia quanto ao tipo e à concentração dos componentes, que incluem, geralmente, substâncias penetrantes e não penetrantes (Quadro 1). Como algumas dessas substâncias são tóxicas, o tempo de exposição e a permeabilidade do material vegetal são parâmetros importantes a serem avaliados. As soluções crioprotetoras mais utilizadas atualmente são a *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) e a *Plant Vitrification Solution 3* (PVS3) (KIM et al., 2009; KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Quadro 1 – Principais soluções de vitrificação utilizadas para a criopreservação de espécies vegetais.

Solução de vitrificação	Composição	Referência
PVS1	Glicerol 22% + EG 13 % + Propileno glicol 13% + DMSO 6%	URAGAMI; SAKAI; NAGAI et al., 1990
PVS2	Glicerol 30% + EG15% + DMSO 15% + Sacarose 0,4 M	SAKAI et al., 1990
PVS3	Glicerol 50% + Sacarose 50%	NISHISZAWA; SAKAI; AMANO et al., 1993
PVS4	Glicerol 35 % + EG 20 % + Sacarose 0,6 M	SAKAI, 2000
Solução de Steponkus	EG 7M + Sorbitol 0,88 M + Soro bovino albumina 6 %	LANGIS et al., 1989
VSL	Glicerol 20% + EG 30% + Sacarose 5% + DMSO 10% + CaCl ₂ 10 mM	SUZUKI et al., 2008
PVS7	Glicerol 30 % + EG 19,5 % + Sacarose 0,6 M	YAMAMOTO et al., 2011

Nota:* DMSO = dimetil sulfóxido / EG = etilenoglicol

A avaliação do tipo de solução crioprotetora e o período de exposição do material são alguns dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de protocolos de criopreservação baseados no processo de vitrificação (VOLK; WALTERS, 2006). As soluções PVS2 e PVS3 atuam nas propriedades coligativas das células, diminuindo o ponto de congelamento, uma vez que possuem componentes solúveis, capazes de interagir com a água através de ligações de hidrogênio (TEIXEIRA et al., 2014). Além disso, os grupos hidrofílicos dos seus componentes são capazes de interagir com a porção polar dos fosfolípidios de membrana, contribuindo para sua estabilização (KACZMARCZYK et al., 2012).

No entanto, embora seja amplamente utilizada, a PVS2 apresenta componentes citotóxicos quando em altas concentrações, como o dimetil sulfoxido (DMSO) e etilenoglicol (EG), aos quais a membrana celular é altamente permeável (SAKAI; ENGELMANN, 2007; KIM et al., 2009). Por essa razão, uma estratégia bastante adotada nos protocolos de criopreservação visando à redução dessa toxicidade é realizar a exposição à temperatura de 0°C, o que diminui a velocidade de penetração dos crioprotetores (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Por outro lado, a PVS3 oferece menor risco de toxicidade às células, por ser composta apenas por sacarose e glicerol. A ação conjunta dos crioprotetores pode afetar a permeabilidade da membrana aos seus componentes, como é o caso do glicerol, que embora seja um crioprotetor comum às duas soluções, adquire maior poder de difusão na presença de DMSO e EG (KIM et al., 2009). Além disso, o grau e a intensidade da sensibilidade do material à solução crioprotetora é variável para cada espécie e tipo de material (SAKAI; ENGELMANN, 2007; KIM et al., 2009).

Diferentes técnicas baseadas no processo de vitrificação já foram desenvolvidas, incluindo a dessecação, a vitrificação, o encapsulamento-vitrificação, o encapsulamento-desidratação, a vitrificação em gota e, mais recentemente, a vitrificação ou a desidratação em crioplaca. As peculiaridades dessas técnicas visam, de forma geral, otimizar os mecanismos de desidratação e atenuar o choque osmótico, com o aumento das velocidades de resfriamento e reaquecimento, fundamentais para a recuperação do material (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Na técnica de dessecação, considerada relativamente simples, a redução do teor hídrico é efetuada por meio da exposição do material à corrente de ar da câmara de fluxo laminar ou à sílica gel, antes da imersão em NL. Esta técnica vem sendo empregada com sucesso principalmente na criopreservação sementes e de embriões somáticos de diversas espécies, incluindo *Zea mays* (WEN et al., 2010), *Livistona chinensis* (WEN et al., 2012) e orquídeas (WU et al., 2013).

Na técnica de vitrificação, por outro lado, a desidratação osmótica do material vegetal é provocada por meio de exposição a soluções altamente concentradas. Isso promove uma vitrificação completa, tanto do citosol quanto do meio externo, após a imersão em NL (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAM, 1990). Entretanto, o tempo de exposição e a permeabilidade do material vegetal aos componentes dessas substâncias podem ser considerados fatores limitantes para a recuperação de plantas pós-resfriamento, devido à toxicidade de alguns crioprotetores.

A técnica de encapsulamento, derivada da metodologia utilizada para a produção de sementes sintéticas, tem como base a proteção do material contra os efeitos da desidratação excessiva e do resfriamento, pela inclusão do explante em cápsulas de alginato de cálcio. Após o encapsulamento, os explantes são expostos à desidratação evaporativa (encapsulamento-desidratação) ou a soluções de vitrificação (encapsulamento-vitrificação), antes da imersão em NL (FABRE; DEREUDDRE, 1990; MATSUMOTO; SAKAI, 1995). Além de conferir proteção física, o encapsulamento facilita a manipulação de um grande número de explants durante os tratamentos (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Nos últimos anos, as técnicas de vitrificação em gota (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005) e vitrificação/desidratação em placas de alumínio (crioplacas) (YAMAMOTO et al., 2011; NIINO et al., 2013) vêm sendo consideradas bastante promissoras. Nestas metodologias (V-crioplaca e D-crioplaca), os explantes são aderidos em uma base de alumínio, onde são expostos à dessecação por corrente de ar (D-crioplaca) ou às soluções de vitrificação (V-crioplacas) e imersos diretamente em NL. A alta condutividade térmica do metal e quantidade mínima de solução crioprotetora envolvendo o explante aumentam a velocidade dos processos de resfriamento e reaquecimento, favorecendo a sobrevivência do material criopreservado (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Além disso, o reaquecimento do material é feito em soluções altamente concentradas, à temperatura ambiente. As crioplacas apresentam ainda uma vantagem adicional, uma vez que a adesão do material a uma superfície viabiliza a manipulação de um grande número de explantes, evitando injúrias e perdas durante as diferentes etapas do processo (YAMAMOTO et al., 2012). Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso para diferentes espécies vegetais, incluindo crisântemo (YAMAMOTO et al., 2011), cravo (SEKIZAWA et al., 2011), morango (YAMAMOTO et al., 2012), *Clinopodium odorum* (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015) e *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015).

1.1.2 Crioinjúrias

Condições sub-ótimas de tratamentos que visam à desidratação e à proteção dos tecidos podem levar à ocorrência de diversos danos celulares durante o processo de criopreservação, denominados de crioinjúrias. Esses danos podem resultar em baixas taxas de

recuperação pós-resfriamento (UCHENDU et al., 2010b; PANIS; LOMBARDI, 2005) (Figura 1).

Os principais tipos de danos causados nas diferentes etapas dos protocolos resultam do estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas moléculas são altamente reativas e capazes de retirar elétrons de biomoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, resultando na sua alteração estrutural e perda de função (UCHENDU et al., 2010b). As ERO podem ser constituídas por radicais livres, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil (OH^{\bullet}), hidroperóxil (OOH^{\bullet}), peróxil (ROO^{\bullet}), alcóxil (RO^{\bullet}), e também não radicais, como oxigênio singlete 1O_2 , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) (KACZMARCZYK et al., 2012).

Figura 1 – Alterações induzidas pelo processo de criopreservação



Fonte: KACZMARCZYK et al., 2012, adaptado.

Em condições fisiológicas normais, a produção de ERO ocorre principalmente em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, como resultado do metabolismo energético da célula. Destes, o 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} e o H_2O_2 são os mais comumente associados ao estresse oxidativo (DEMIDCHIK, 2015). O 1O_2 , por exemplo, pode ser formado nos cloroplastos,

quando o O_2 recebe energia suficiente para a sua ativação no fotossistema II (PSII), durante a fotossíntese. Assim, em condições de estresses luminoso, hídrico ou salino, ocorre uma super produção de 1O_2 , podendo levar à perda da atividade do PSII e à morte celular (ASADA, 2006; DEMIDCHIK, 2015).

A produção de $O_2^{\cdot-}$ por sua vez, ocorre pela redução monovalente do O_2 em diversos compartimentos celulares, como os fotossistemas I e II dos cloroplastos e os complexos I e III das mitocôndrias. Além disso, esse radical também pode ser produzido pela ação da NADPH oxidase presente na membrana plasmática e nos peroxissomos (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015). Embora o $O_2^{\cdot-}$ seja moderadamente reativo e de vida curta, é o primeiro radical formado em sistemas biológicos, a partir do qual são derivadas outras espécies mais reativas, sendo, dessa forma, considerado um fator importante para o aumento do estresse oxidativo (SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015).

O peróxido de hidrogênio é um não radical produzido pela dismutação do superóxido, que não possui um sítio específico de formação. Apesar de não apresentar alta reatividade, o H_2O_2 pode oxidar componentes biológicos e causar danos à célula. Além disso, pode ser potencialmente tóxico em grandes quantidades, pois é a única ERO com capacidade de difusão através das aquaporinas nas membranas, podendo causar alterações em diversos compartimentos celulares (GECHEV et al., 2006; SHARMA et al., 2012).

Os radicais hidroxil (OH^{\cdot}), formados pela reação entre os íons metálicos Cu^{+3} e Fe^{+2} com H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, são considerados os mais relevantes entre as ERO, especialmente em relação às membranas celulares. Isso se deve, possivelmente, à sua alta reatividade e à ausência de mecanismos enzimáticos específicos para a sua eliminação (VRANOVÁ; VAN BREUSEGEM, 2002; KACZMARCZYK et al., 2012; SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015).

Embora as ERO possam representar uma fonte potencial de danos para as células, sua produção em concentrações fisiológicas é importante para diversos processos celulares básicos. Em vegetais, atuam no crescimento e alongamento de raízes, dominância apical, maturação de elementos traqueais, desenvolvimento de tricomas e senescência (GECHEV et al., 2006; SHARMA et al., 2012). Além disso, são importantes também na transdução de sinais em resposta a estresses abióticos e bióticos, desempenhando o papel de mensageiros secundários nas vias mediadas pelo ABA, ácido jasmônico, ácido salílico, e na ativação de canais de cálcio intracelulares, induzindo mecanismos de proteção e aclimação (KWAK; NGUYEN; SHROEDER, 2006; GECHEV et al., 2006).

A manutenção das ERO em níveis basais ocorre pela ação de um sistema antioxidante que inclui enzimas, vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol) e metabólitos secundários, como os flavonoides (WANG; DENG, 2004; UCHENDU et al., 2010a). Entretanto, em condições de estresse, a formação das ERO pode exceder a capacidade antioxidante da célula, tendo como consequência diversos tipos de danos, incluindo a peroxidação de lipídios, rupturas de membranas, alterações em proteínas e ácidos nucleicos e outras desordens que podem levar à morte celular programada (BENSON, 1990; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; HALLIWELL, 2006).

Entre as injúrias causadas pelo aumento da produção de ERO, a peroxidação de lipídios é considerada a mais crítica para a recuperação do material após a criopreservação (UCHENDU et al., 2010b). Os fosfolipídios de membrana, principalmente os que contêm ácidos graxos poli-insaturados, são os principais alvos do estresse oxidativo, em especial os radicais hidroxil (FANG; WETTEN; JOHNSTON, 2008; SHARMA et al., 2012), resultando em alterações na integridade e função das membranas, além de causar uma série de lesões que podem levar à morte celular (BENZIE, 1996).

A peroxidação dos fosfolipídios pode ainda levar à formação de subprodutos, os quais também são reativos e podem causar danos a outras moléculas (ESTERBAUER; ZOLLNER, 1989). Esses subprodutos incluem os lipídios hidroxiperóxidos, hidrocarbonetos voláteis e aldeídos, que vêm sendo utilizados como indicadores de danos causados por crioinjúria (UCHENDU et al., 2010b; WEN et al., 2012). Entre estes, o malondialdeído (MDA), produto final dessa peroxidação, tem sido utilizado como um biomarcador de estresse oxidativo desde 1960 (HEALTH; PAKER, 1968; JOHNSTON et al., 2007).

O acúmulo de ERO em condições de estresse é refletido também na produção de enzimas envolvidas na resposta antioxidante da célula, como a superóxido dimutase, a catalase, a peroxidase, a glutatona redutase, entre outras (LYNCH et al., 2011). A quantificação dessas enzimas vem sendo bastante utilizada para caracterizar as etapas mais críticas dos protocolos de criopreservação (LYNCH et al., 2011; DANOVA et al., 2012; CHEN, et al., 2015), já que podem indicar a ocorrência de estresse oxidativo (GEORGIEVA et al., 2014).

É importante destacar também que as condições de estresse geradas pelos tratamentos utilizados nos protocolos de conservação *in vitro*, especialmente na criopreservação, podem contribuir para a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas, que recebem o nome de variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; CASSELS; CURRY, 2001). Essas

alterações devem ser monitoradas, principalmente, em programas de conservação de germoplasma, nos quais a manutenção da integridade genética é um requisito fundamental.

1.2 Gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* reúne aproximadamente 560 espécies, sendo o de maior representatividade da família Passifloraceae (VANDERPLANK, 2013). Os maracujás, como são conhecidas suas espécies, possuem distribuição tropical e subtropical, sendo encontradas principalmente nos continentes Americano e Africano. O Brasil é considerado um importante centro de diversidade do gênero, abrigando 142 espécies, das quais 83 são endêmicas (BERNACCI et al., 2015).

Diferentes composições infragenéricas já foram propostas para o gênero, baseadas em caracteres morfológicos e ecológicos. Inicialmente, Killip (1938) propôs a divisão em 22 subgêneros, compostos por várias seções e séries. Posteriormente, Escobar (1989) reconheceu 23 subgêneros. Em 2003, Feuillet e MacDougal agruparam as espécies em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. E *Passiflora*. Em uma revisão mais recente, Krosnick, Ford e Freudenstein (2009) propuseram a inclusão de um novo subgênero, *Tetrapathea*, aumentando o número para cinco.

O subgênero *Astrophea* possui 57 espécies de lianas e arbustos, com grande diversidade na América do Sul, enquanto que *Deidamioides* apresenta somente 14 espécies conhecidas, encontradas na América Central e América do Sul. O subgênero *Decaloba* possui cerca de 230 espécies, distribuídas por toda a América, Ásia e Oceania, enquanto que *Passiflora* inclui cerca de 250 espécies, sendo o subgênero com o maior número de espécies conhecidas e estudadas, devido à sua importância econômica. O subgênero *Tetrapathea*, mais recente, inclui apenas três espécies de lianas, distribuídas na Austrália, Papua-Nova Guiné e Nova Zelândia (ULMER; MACDOUGAL, 2004; KROSNICK et al., 2013).

As passifloras são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com rara formação arbustiva. A maior parte dos componentes apresentam gavinhas axilares, enquanto em outros foram reduzidos a espinhos (VANDERPLANK, 2013). A maioria das espécies apresenta flores grandes, actinomorfas, com formas e cores variadas. Frequentemente, apresentam nectário extrafloral, os quais atuam como um sistema de recompensa e desempenham uma ação protetora contra herbívoros. Os frutos são indeiscentes, geralmente globosos ou ovoides, com

casca espessa, de coloração e tamanho variados, abrigando sementes envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997; YOCKTENG; D'EECKENBRUGGE; SOUZA-CHIES, 2011).

O cultivo do maracujá como atividade econômica no Brasil surgiu na década de 1980, e o país é hoje considerado o maior produtor mundial de maracujá, com cerca de 777.000 toneladas produzidas em uma área de, aproximadamente, 60.000 hectares (IBGE, 2012). Embora, inicialmente, a cultura do maracujazeiro tenha sido de caráter domiciliar, ao longo do tempo tornou-se economicamente atraente pelo seu rápido retorno e pelo incentivo à agroindústria, sendo destinada não somente ao setor de frutas frescas, mas também de alimentos processados, como sucos, sorvetes e geleias (MELETTI, 2011). Além disso, a expansão da atividade para atender à demanda comercial adquiriu um caráter social, na medida em que auxiliou a fixação de mão-de-obra rural, gerando empregos diretos nos diversos segmentos da cadeia produtiva (MELETTI, 2011).

Algumas espécies do gênero apresentam frutos comestíveis, embora apenas algumas sejam comercializadas, incluindo o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), o maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) e o maracujá-doce (*P. alata* Curtis). A cultura de maracujá-amarelo é a de maior importância comercial, representando 95% dos pomares da produção nacional (BERNACCI et al., 2003), devido ao seu vigor, produtividade e qualidade dos frutos (MELETTI, 2005; ZERAIK et al., 2010). O maracujá-roxo, por outro lado, produz frutos menores, de coloração arroxeada e menor teor de acidez, sendo mais apreciado no exterior, principalmente na Austrália e África do Sul (BELLON et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009). Além disso, possui potencial de produção de até 30 - 40 toneladas por hectare, podendo ser destinado para indústria, consumo *in natura* e exportação. O cultivo do maracujá-doce, uma espécie nativa do Brasil, tem apresentado uma crescente expansão devido às características de seus frutos, grandes e ovalados, de aroma agradável, sabor doce e baixa acidez. Tais atributos representam alto potencial para o mercado, pela possibilidade de consumo *in natura*, embora esta espécie seja ainda pouco comercializada no Brasil (BERNACCI et al., 2003).

Além da utilização dos frutos na indústria e no mercado de frutas frescas, os maracujás também têm se destacado no mercado de plantas ornamentais devido à exuberância de suas flores, com cores atrativas e formas exóticas (Figura 2). No entanto, a utilização das passifloras como ornamentais no Brasil ainda é incipiente, embora venha sendo muito adotada em países europeus (PEIXOTO, 2005).

Figura 2 – Diversidade de flores de *Passiflora*

Fonte: <http://flickrhivemind.net/Tags/flores,passiflora/Recent>

As espécies de *Passiflora* também apresentam grande potencial medicinal. Suas folhas, raízes e frutos são utilizados na medicina popular desde o século XIX no preparo de chás, infusões, loções e emplastos para o tratamento de insônia, ansiedade e irritabilidade (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, et al., 2004). Além disso, em estudos farmacológicos com diversas espécies do gênero foram observadas ainda outras atividades biológicas, incluindo atividade antibacteriana, antihiperglicêmica, ansiolítica, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, entre outras (PATEL et al., 2011). Dessa forma, algumas espécies de *Passiflora* estão presentes em diversas farmacopeias (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ANVISA, 2010; GOSMANN et al., 2011).

As diferentes atividades farmacológicas observadas em espécies de *Passiflora* estão associadas à presença de diferentes substâncias, principalmente flavonoides (MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; MÜLLER et al., 2005; ZERAIK; YARIWAKE, 2010; BARBALHO et al., 2011), alcaloides (LUTOMSKI; MALEK, 1975; TSUCHIYA et al., 1999; FRYE; HAUSTEIN, 2007), saponinas (YOSHIKAWA et al., 2000; REGINATTO et al., 2004; BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005; WANG et al., 2013) e substâncias fenólicas (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004), além de glicosídeos cianogênicos, carotenoides, aminoácidos, carboidratos, óleos essenciais, vitaminas, fibras e minerais, o que possibilita a classificação dos maracujás como alimento funcional (ZERAIK et al., 2010; YOCKTENG; D'EECKENBRUGGE; SOUZA-CHIES, 2011).

Apesar do grande potencial agrônomo, ornamental e medicinal, a maior parte das espécies de *Passiflora* ainda não é conhecida ou não foi devidamente caracterizada. Dessa forma, a prospecção, a conservação e a caracterização do germoplasma de maracujá são consideradas estratégias essenciais para o seu uso em programas de melhoramento genético, em sistemas de produção de mudas por enxertia e como plantas ornamentais ou medicinais.

1.2.1 *Passiflora suberosa* L.

Passiflora suberosa L., a espécie estudada neste trabalho, é popularmente conhecida como maracujazinho, maracujá-mirim ou maracujazinho-cortiça-preto. Pertence ao subgênero *Decaloba*, tendo sido mencionada em registros de descrição de plantas da América por Charles Plumier em 1693 (PORTER-UTLEY, 2014). É uma espécie nativa das Américas, que apresenta distribuição em regiões tropicais, ocorrendo em partes do México, na América Central e do Sul (ULMER; MACDOUGAL, 2004), embora seja encontrada também na Europa (PORTER-UTLEY, 2014). No Brasil, *P. suberosa* já foi encontrada em todas as regiões, ocupando domínios fitogeográficos altamente impactados por ação antrópica, incluindo Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BERNACCI et al., 2015) (Figura3).

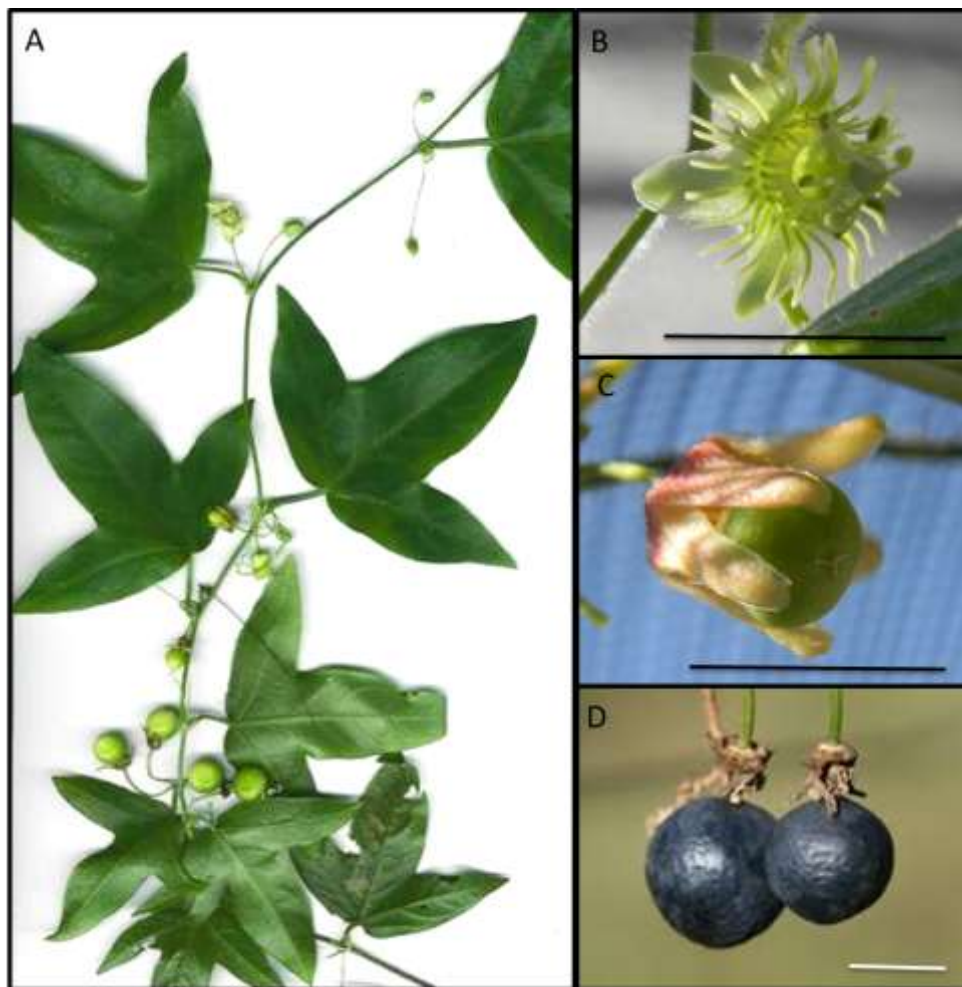
Figura 3 – Distribuição geográfica de *Passiflora suberosa* L.



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>

As plantas são trepadeiras de pequeno porte, apresentando caule cilíndrico estriado quando jovens (Figura 4 A), e exibindo uma grossa camada suberosa, quando adultas, característica que dá nome à espécie. Suas flores são pequenas (1,3 a 2,5 cm de diâmetro), com cinco sépalas de coloração verde-claro ou amarelo-esverdeado, e ausência de pétalas (Figura 4 B). Podem apresentar uma ou duas brácteas e duas séries de corona de filamentos filiformes. Os frutos são pequenos (0,6 a 1,5 cm de diâmetro), do tipo bagas, podendo ser ovoides ou globosos, com coloração verde quando imaturos, e roxo intenso, quando atingem a maturidade (Figura 4 C -D). As sementes são ovaladas, assimétricas (3,0 – 4,0 × 0,2 - 2,5 mm) e alveoladas (CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

Figura 4 – *Passiflora suberosa* L.



Legenda: (A) aspecto morfológico *P. suberosa*; (B) flor de *P. suberosa*; (C) flor com fruto imaturo; (D) frutos maduros.

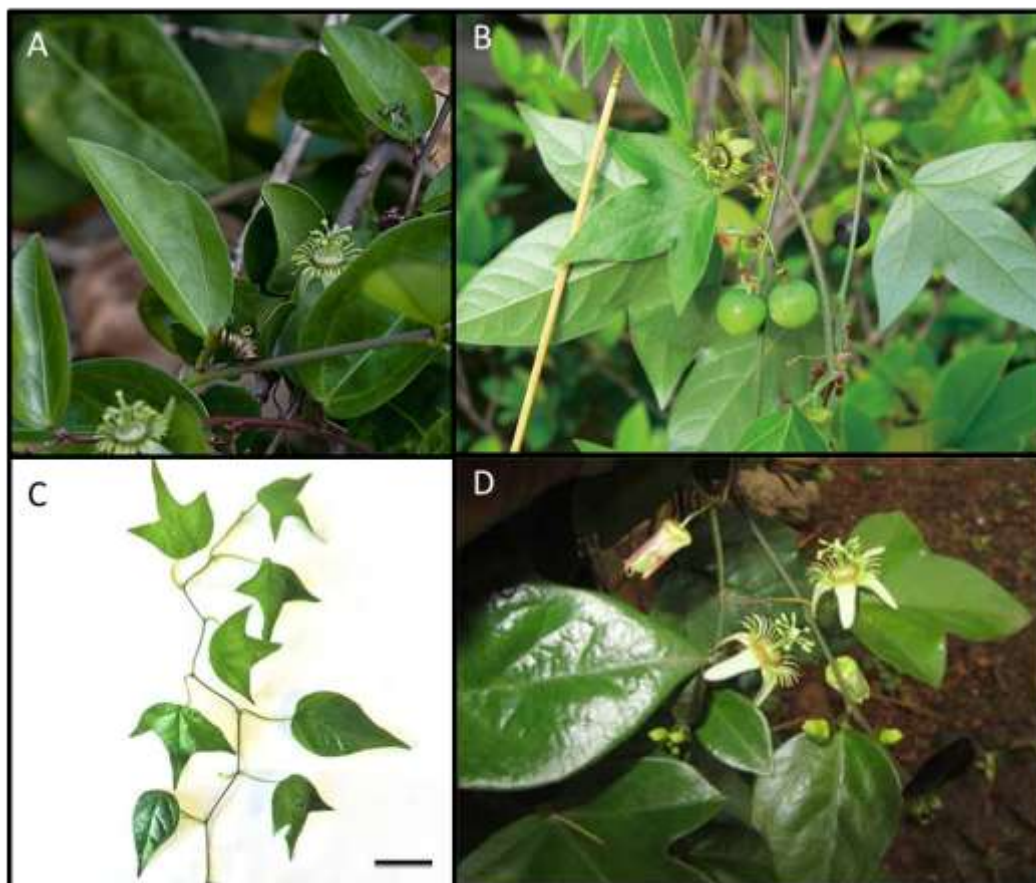
Fonte: (A) http://www.wikiwand.com/nl/Passiflora_suberosa; (B - C) Ana Lúcia Ferreira; (D) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Passiflora_suberosa_Fruits.jpg

A floração de *P. suberosa* ocorre ao longo de todo o ano, com o pico entre os meses de setembro e janeiro, com antese no início das manhãs. A frutificação acontece principalmente entre os meses de janeiro e maio (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). A espécie é classificada como autocompatível, ao contrário da maioria das passifloras (CRUZ et al., 2008). Sua reprodução cruzada é dependente de polinizadores, como aves, borboletas e abelhas, os quais se beneficiam de uma câmara nectarífera rasa e de fácil acesso. Os polinizadores mais comuns são vespas (*Mischocyttarus interjectus*) e abelhas (*Plebeia droryana* e *Augochlorella Michaelis*) (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). Além disso, as flores de *P. suberosa* também são visitadas por outros insetos, como as borboletas *Heliconius charitonia*, que embora não estejam associadas ao processo de polinização, apresentam uma estreita relação evolutiva, visto que utilizam pólen e néctar como fonte nutritiva, e folhas para a postura de ovos (ULMER; MACDOUGAL, 2004; CRUZ et al., 2008).

Passiflora suberosa possui grande potencial ornamental devido às suas flores exóticas, aos frutos pequenos e roxos e à plasticidade morfológica de suas folhas, que podem ser polimórficas, variando de inteiras (Figura 5 A) a profundamente trilobadas (Figura 5 B) em um mesmo indivíduo (Figuras 5 C-D), com glândulas nos pecíolos (ULMER; MACDOUGAL, 2004; CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014). Além disso, as folhas podem adquirir uma coloração arroxeadada quando expostas à radiação solar intensa por longos períodos, em virtude do acúmulo de antocianinas e derivados fenólicos (BARP et al., 2006). Estas variações fenotípicas resultam em uma vasta sinonímia para diversos representantes da espécie, gerando dificuldades para a sua classificação taxonômica (CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

A variabilidade de *P. suberosa* também é observada em nível de ploidia, com espécimes diploides ($2n=12$) e poliploides ($2n=24$ e 36 cromossomos) (OTONI et al., 1996). Esta característica, assim como sua resistência a patógenos, tem despertado interesse agrônomo para o uso desta espécie como fonte de variabilidade para melhoramento (JUNQUEIRA et al., 2005). Estudos já realizados demonstraram que *P. suberosa* apresenta resistência ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV) (OTONI et al., 1996) e ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* e, por isso, vem sendo utilizada como porta-enxerto na cultura do maracujá-amarelo (GARDNER, 1989).

Figura 5 – Aspectos morfológicos de *Passiflora suberosa* L.



Legenda: (A) Indivíduo de *P. suberosa* com folhas inteiras; (B) Indivíduo de *P. suberosa* com folhas trilobadas; (C e D) Indivíduo de *P. suberosa* com osdois tipos foliares.

Fonte: (A) <https://treasurecoastnatives.wordpress.com/category/passion-flower/>; (B) <http://taibif.tw/flower/detail.php?sc=Passiflora+suberosa&locale=tw>; (C) Marcela Vianna; (D) http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/apg_passiflor.htm.

Embora diversas espécies de *Passiflora* tenham reconhecido potencial medicinal, atividades farmacológicas ainda não foram descritas em *P. suberosa*. Entretanto, em alguns estudos fitoquímicos foram detectados dois glicosídeos cianogênicos ciclopentenoides, denominados de passisuberosina e epapissuberosina (SPENCER; SEGLER, 1987). Além disso, a análise de extratos de frutos revelou a presença de oito tipos diferentes de antocianinas (KIDOY et al., 1997) que, além de apresentarem importância ecológica na atração de insetos e animais, podem ser utilizadas na indústria como corantes naturais (STINTZING; CARLE, 2004).

1.2.2 Conservação *in vitro* de espécies de *Passiflora* L.

Nos últimos 50 anos, diferentes sistemas *in vitro* foram desenvolvidos para espécies de *Passiflora*, embora a maioria tenha sido direcionada para o maracujá amarelo, com o objetivo de fornecer material vegetal para outras técnicas biotecnológicas, como transformação genética, hibridização somática e conservação *in vitro* (BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004). A principal via morfogênica observada no gênero é a organogênese, a partir de diferentes tipos de explantes derivados de plantas de campo ou de plantas obtidas *in vitro* (MONTEIRO et al., 2000; LOMBARDI et al., 2007; GARCIA et al., 2011a; PACHECO et al., 2012). Por outro lado, a capacidade embriogênica vem sendo mais estudada nos últimos anos, com ênfase na elucidação dos fatores envolvidos na aquisição de competência e determinação de células e/ou tecidos envolvidos neste processo (REIS et al., 2007; SILVA et al., 2009; PINTO et al., 2011; ROCHA et al., 2012; ROSA; BELLO; DORNELAS, 2015).

Apesar do número de trabalhos sobre cultura de tecidos já existentes, poucos são os que utilizam estas abordagens como base para o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* para *Passiflora*. Protocolos visando ao armazenamento em médio prazo, por períodos de quatro a 12 meses, já foram estabelecidos com sucesso para algumas espécies, incluindo *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. ligularis*, *P. mollissima*, *P. giberti*, *P. suberosa* e *P. pohlii*, por meio de modificações na composição dos meios de cultura e da redução da intensidade luminosa e da temperatura (GÓNGORA et al., 1994; FARIA et al., 2006; GARCIA et al., 2011b; MERHY, 2014).

A criopreservação também vem sendo aplicada para sementes e propágulos vegetativos de *Passiflora*. Os principais objetivos dos estudos realizados sobre a criopreservação de sementes, considerada uma importante estratégia complementar aos bancos de sementes convencionais, visaram à determinação da tolerância à dessecação e dos teores hídricos adequados para a criopreservação. A tolerância à dessecação e ao resfriamento foi avaliada por Meletti e colaboradores (2007), González-Benito, Aguilar e Avilla (2009) e Veiga-Barbosa e colaboradores (2013). Embora muitas espécies sejam capazes de manter elevadas taxas de germinação após a dessecação e o resfriamento, algumas são significativamente afetadas pelo armazenamento em NL, resultando em baixas taxas de germinação após o reaquecimento.

Para a criopreservação de propágulos vegetativos, as técnicas baseadas no processo de vitrificação, principalmente vitrificação e encapsulamento-vitrificação, são as mais utilizadas.

Diferentes explantes (ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos) e parâmetros que afetam a recuperação após o resfriamento, incluindo a pré-cultura em meio com altas concentrações de sacarose, períodos de exposição às soluções de vitrificação PVS2 e PVS3, e condições de recuperação, já foram avaliados (GARCIA et al., 2011b; FALCÃO, 2011; MERHY et al., 2014; NADARAJAN et al., 2014), com taxas variáveis de recuperação.

Apesar da importância do monitoramento dos danos celulares provocadas pelas condições *in vitro*, incluindo injúrias oxidativas e alterações genéticas e epigenéticas, existem apenas poucos estudos em materiais de *Passiflora* obtidos ou conservados *in vitro*, observando apenas a ocorrência de variação somaclonal. A ploidia de plantas de *P. cincinnata* e *P. setacea* obtidas *in vitro* por embriogênese somática e organogênese, respectivamente, foram avaliadas por citometria de fluxo (SILVA; CARVALHO, 2014; VIEIRA et al., 2014), enquanto que a estabilidade genética de plantas de *P. pohlii* regeneradas a partir de segmentos nodais submetidos à criopreservação foi avaliada por meio de marcadores RAPD e ISSR, não tendo sido evidenciadas bandas polimórficas (MERHY et al., 2014).

Embora *P. suberosa* apresente grande potencial ornamental, agrônômico e medicinal, poucos estudos biotecnológicos foram desenvolvidos para a espécie, visando à propagação (MONTEIRO et al., 2000; GARCIA et al., 2011a; ROSA; BELLO; DORNELAS, 2015) e conservação *in vitro* em médio e longo prazos (GARCIA et al., 2011b). Neste último trabalho, a criopreservação de ápices caulinares foi estabelecida utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação, tendo sido obtida uma taxa moderada de recuperação pós-resfriamento (28%). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo otimizar as taxas de recuperação de ápices caulinares dessa espécie, utilizando a técnica de V-crioplaca, além de avaliar os danos induzidos nas diferentes etapas do protocolo de criopreservação.

Quadro 2 – Estratégias de conservação *in vitro* desenvolvidas para espécies de *Passiflora*.

Espécies	Estratégia de conservação <i>in vitro</i>	Material vegetal	Referência
<i>Passiflora</i> spp	Crescimento lento	Ápices caulinares	Góngora; Jaramilli; Constantino, 1994
<i>P. giberti</i>	Crescimento lento	Gemas axilares	Faria et al., 2006
<i>P. nitida</i> e <i>P. serrato-digitata</i>	Criopreservação	Sementes	Meletti et al., 2007
<i>P. pinnatistipula</i> , <i>P. tarminiana</i> and <i>P. mollissima</i>	Criopreservação	Sementes	González-Benito; Aguilar; Avilla, 2009
<i>P. foetida</i>	Criopreservação	Ápices caulinares	Falcão, 2011
<i>P. suberosa</i>	Crescimento lento/Criopreservação	Ápices caulinares	Garcia et al., 2011b
<i>Passiflora</i> spp	Criopreservação	Sementes	Veiga-Barbosa et al., 2013
<i>P. pohlii</i>	Crescimento lento	Ápices caulinares	Merhy, 2014
<i>P. pohlii</i>	Criopreservação	Segmentos nodais	Merhy et al., 2014

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a otimização da criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* utilizando a técnica de V-Crioplaca, incluindo a avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares.

Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a influência do tempo de cultura da fonte de explantes na sobrevivência e recuperação após a criopreservação;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição às soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 na sobrevivência e recuperação dos materiais criopreservados;
- Analisar injúrias nas membranas celulares ocorridas durante o processo de criopreservação por meio da determinação da taxa de peroxidação de lipídios.

3 METODOLOGIA

3.1 Material vegetal e condições de cultura

Plantas de *P. suberosa* obtidas a partir da germinação *in vitro* e mantidas no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ) por sucessivos subcultivos foram utilizadas como fontes de explantes para este trabalho (GARCIA, 2011a). Um exemplar representativo da planta cultivada em condições naturais encontra-se depositado no herbário da UERJ, sob o registro HRJ12783.

Foi utilizado o meio basal MSM (MONTEIRO et al., 2000b), contendo vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sacarose a 3%, solidificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm). A manutenção das plantas *in vitro* foi realizada por meio de subcultivos mensais de segmentos caulinares (2 - 3 cm), contendo de 2 a 4 nós, em meio MSM contendo metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose (MSM ½) (GARCIA et al., 2011a).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C ±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa média de 46 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

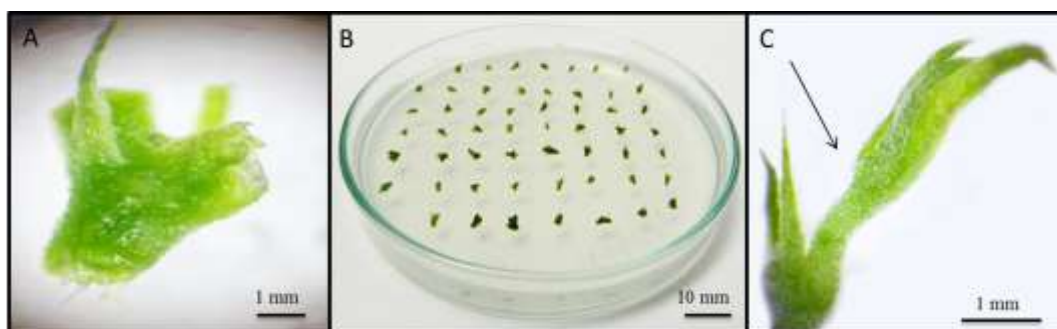
3.2 Criopreservação de ápices caulinares

A criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* foi realizada utilizando a técnica de V-Crioplaca (YAMAMOTO et al., 2011). Foram avaliadas a influência da fonte de explantes e a exposição a duas soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3). Esses ensaios foram realizados em colaboração com o pesquisador Dr. Florent Engelmann, do *Unité Mixte de Recherche: Diversité, Adaptation, Développement des Plantes, L'Institut de Recherche pour le Développement* (DIADE/IRD, Montpellier - França).

3.2.1 Avaliação da influência da fonte de explantes na recuperação pós-resfriamento

Para a produção de microestacas, segmentos nodais (0,5 cm), contendo apenas uma gema axilar, foram excisados de plantas mantidas *in vitro* e inoculados em placas de Petri (90x15 mm) contendo 30 ml de meio MSM $\frac{1}{2}$ sólido (50 explantes por placa) (Figura 6). Visando à avaliação da influência da fonte de explantes na eficiência de recuperação pós-resfriamento, ápices caulinares (0,3 cm) foram excisados das microestacas após diferentes períodos de cultura (20, 30 ou 40 dias), e utilizados nos ensaios de criopreservação.

Figura 6 – Produção de microestacas a partir de segmentos nodais de *P. suberosa*



Legenda: (A) Segmento nodal individualizado; (B) Segmentos nodais cultivados em meio MSM $\frac{1}{2}$ para a produção de microestacas; (C) Ápice caulinar de microestaca (seta: região de excisão do ápice caulinar).

3.2.2 Vitrificação em placas de alumínio (V-Crioplaca)

Ápices caulinares excisados das microestacas foram pré-cultivados em meio MSM $\frac{1}{2}$ sólido suplementado com sacarose a 0,3 M por 24 horas, conforme descrito por Garcia e colaboradores (2011b). Os explantes foram inoculados em placas de Petri (90x15 mm) contendo 30 mL de meio (aproximadamente 70 explantes por placa) e mantidos nas condições padrão de cultivo.

Após a pré-cultura, os ápices caulinares foram transferidos para placas de alumínio (7 mm largura × 37mm comprimento × 0,5 mm espessura), cada uma contendo 10 poços (1,5 mm largura × 2,5 mm comprimento × 0,75 mm profundidade). As crioplaças foram gentilmente cedidas pelos pesquisadores Dr. Florent Engelmann (IRD/Montpellier-França) e Dr. Takao Nino (NIAS/Tsukuba-Japão).

A adesão dos explantes nas placas (10 ápices/placa) foi realizada utilizando-se as soluções de alginato de sódio a 3% e a solução de CaCl₂ a 100mM. Primeiramente, cada poço da placa foi parcialmente preenchido com 2,5 µL de solução de alginato de sódio. Os explantes foram colocados nos poços e cobertos com solução de alginato de sódio, até completar o volume. Em seguida, foi incubado em solução de CaCl₂ a 100 mM, gotejado ao longo da superfície das placas, por 20 minutos, para a reação de polimerização. Após este período, o excesso de solução de CaCl₂ foi retirado com o auxílio de pipeta e as placas foram secas em papel de filtro (Whatman® nº1).

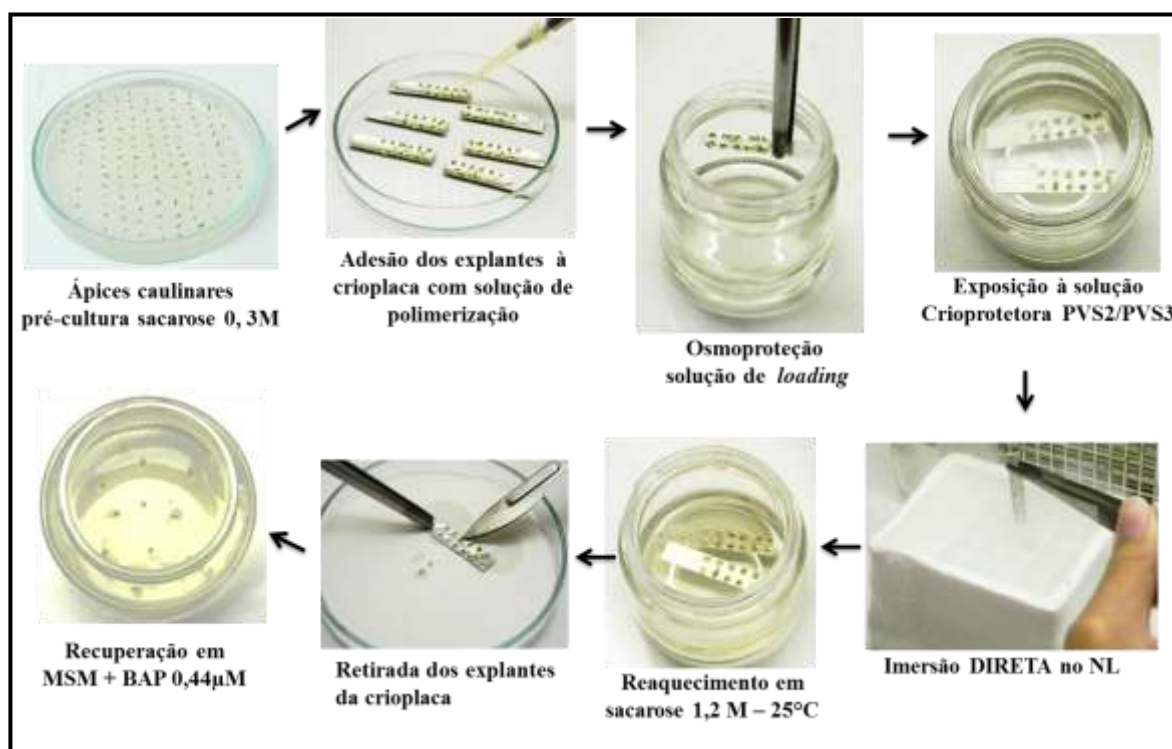
As placas contendo os explantes aderidos foram expostas à solução de *loading* (sais do meio MS + glicerol a 2 M + sacarose a 0,4 M) durante 20 minutos, a 25 °C. Em seguida, foram transferidas para as soluções de vitrificação PVS2 (0 °C) ou PVS3 (25°C) (SAKAI; ENGELMANN, 2007) por diferentes períodos (0, 30, 45, 60, 90, 120 ou 150 minutos). O resfriamento do material vegetal ocorreu por imersão direta das placas contendo os ápices caulinares em criotubos preenchidos com NL, por 5 minutos.

Para o reaquecimento do material, as placas foram transferidas para uma solução de *unloading* (sais do meio MS + sacarose a 1,2 M), a 25 °C, por 20 minutos. Após este período, os explantes foram delicadamente removidos das placas com o auxílio de um bisturi, secos em discos de papel de filtro (Whatman® nº1) e inoculados em frascos de cultura (6 cm x 6 cm) contendo 30 mL de meio de recuperação (MSM suplementado com BAP a 0,44 µM) (GARCIA et al., 2011b). Os ápices criopreservados foram mantidos em ausência de luz até o início do desenvolvimento de novos folíolos, antes da transferência para as condições padrão de cultura, em meio MSM ½ (Figura 7).

A avaliação da eficiência do processo de criopreservação foi realizada pela aferição das porcentagens de sobrevivência e recuperação do material vegetal 30 e 60 dias após o reaquecimento, respectivamente. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência, foram considerados os explantes não oxidados, com coloração verde e início do desenvolvimento dos folíolos. Para medida da recuperação, foram considerados aqueles que deram origem a brotos maiores que 1 cm, com posterior enraizamento após 90 dias de cultura. Foram utilizados pelo menos 10 explantes por tratamento.

As plantas obtidas foram aclimatizadas em casa de vegetação, em substrato Plantmax®, de acordo com Garcia e colaboradores (2011a).

Figura 7 – Etapas da criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* utilizando a técnica de V- Crioplaca



3.3 Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação de Malondialdeído (MDA)

A avaliação de injúrias induzidas pelo processo de criopreservação foi realizada por meio da quantificação da peroxidação de lipídios nas membranas celulares dos seguintes materiais:

- i) ápices caulinares mantidos em condições padrão de cultura *in vitro*;
- ii) ápices caulinares excisados de microestacas, submetidos à pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M e expostos às soluções de *loading* e vitrificação, mas não imersos em NL;
- iii) ápices caulinares excisados de microestacas, submetidos à pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M, expostos às soluções de *loading* e vitrificação antes da imersão em NL e mantidos por 24 horas no escuro após o reaquecimento.

A determinação da peroxidação de lipídios foi realizada pela quantificação espectrofotométrica do MDA, de acordo com o método descrito por Zhang e colaboradores (2015). Aproximadamente 50mg de material vegetal fresco foi triturado e homogeneizado em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (p/v). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Uma alíquota de 1 mL desse extrato foi adicionada a 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,65% (p/v), diluído em TCA a 10 % (p/v). As amostras foram misturadas vigorosamente, incubadas a 95 °C por 30 minutos e resfriadas em banho de gelo. Em seguida, a absorbância do sobrenadante medida a 532, 450 e 600 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV- B382). O conteúdo de MDA foi expresso na forma de equivalentes de MDA ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) e determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{Equivalentes de MDA } (\mu\text{mol.ml}^{-1}) = 6,45 (\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) - 0,56 \text{ Abs}_{450}$$

Onde A_{532} = máxima absorbância do complexo MDA-TBA₂;

A_{600} = correção de interferentes não-específicos;

A_{450} = correção de interferentes gerados pelo complexo TBA-açúcares;

3.4 Análise estatística

Os experimentos de criopreservação e os ensaios para determinação do conteúdo de MDA foram realizados em triplicata.

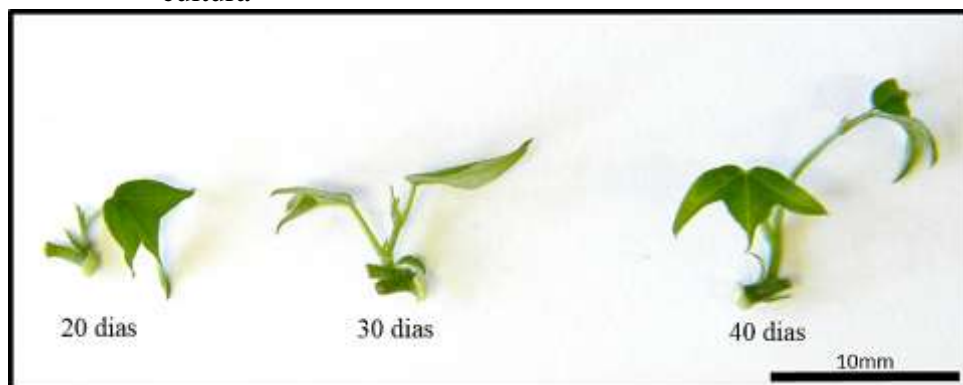
A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, com o auxílio do programa *Gapad Instat*, sendo consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* utilizando a técnica de V-Crioplaca

Os ápices caulinares foram excisados de microestacas produzidas a partir da cultura de segmentos nodais após 20, 30 ou 40 dias de cultura, visando uniformizar as fontes de explantes e avaliar a influência do tempo de cultura da fonte de explantes na recuperação pós-resfriamento. Após 20 dias de cultura, as microestacas apresentavam o desenvolvimento dos folíolos, com o ápice caulinar evidente, sem o alongamento do caule, enquanto que aos 30 dias, já era possível observar o desenvolvimento de folhas e do caule, com aparecimento dos primeiros nós. Após 40 dias de culturas, as microestacas apresentavam alongamento da parte aérea, com desenvolvimento de dois a três nós (Figura 8).

Figura 8 – Microestacas de *P. suberosa* obtidas, após diferentes períodos de cultura



Foram observadas diferentes frequências de sobrevivência e recuperação de plantas dependendo da idade do explante, do tipo e período de exposição à solução crioprotetora (Tabela 1). Ápices caulinares excisados de microestacas de diferentes idades submetidos aos tratamentos de pré-cultura e *loading*, mas não expostos às soluções crioprotetoras PVS2 ou PVS3, não foram capazes de sobreviver após a criopreservação. Por outro lado, esses mesmos materiais apresentaram 100 % de sobrevivência e recuperação quando não imersos em NL

(Tabela 1), demonstrando tolerância aos pré-tratamentos utilizados. A recuperação de plantas a partir desses explantes foi observada 60 dias após transferência para meio de recuperação.

De um modo geral, explantes excisados de microestacas de diferentes idades e submetidos a todas as etapas do protocolo, mas não imersos em NL, apresentaram redução nas taxas de sobrevivência e recuperação conforme o aumento do tempo de exposição às duas soluções crioprotetoras testadas. Frequências de sobrevivência de até 70 % foram observadas nos materiais não criopreservados expostos por até 90 minutos à PVS2, com exceção dos ápices excisados de microestacas com 30 dias de cultura, que apresentaram altas taxas de sobrevivência (70 a 100 %), quando tratados por até 120 minutos com PVS2 (Tabela 1). Quando os materiais foram expostos à PVS3, altas taxas de sobrevivência foram observadas (até 75 %), independentemente do tempo de exposição à solução crioprotetora, com exceção dos explantes excisados de microestacas com 30 dias de cultura, os quais apresentaram taxas mais baixas de sobrevivência (45 a 65 %), quando tratados por períodos maiores que 90 minutos (Tabela 1).

Nos materiais não criopreservados, altas taxas de recuperação de plantas (70 a 100 %) foram observadas a partir dos ápices tratados por até 60 minutos com PVS2. Não houve recuperação de plantas a partir dos ápices excisados de microestacas com 30 dias de cultura e expostos a PVS2 por 120 ou 150 minutos. Para os explantes tratados com PVS3, a eficiência na recuperação de plantas foi dependente do tempo de cultivo da fonte dos explantes. Ápices excisados de microestacas com 20 dias de cultura apresentaram até 70 % de recuperação quando tratados por até 90 minutos com PVS3, enquanto que explantes excisados de microestacas com 30 ou 40 dias apresentaram altas taxas de recuperação quando expostos por até 45 ou 60 minutos a essa solução crioprotetora (Tabela 1).

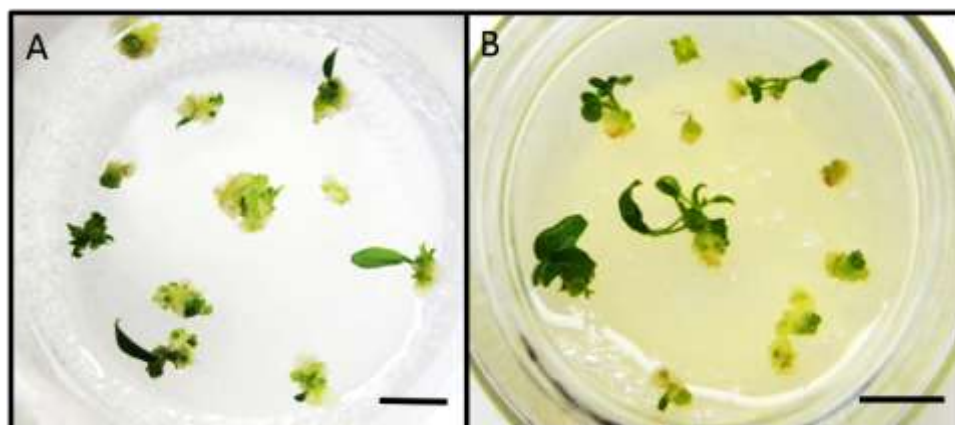
Tabela 1– Avaliação da influência do tempo de cultura da fonte dos explantes e das soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares de *P. suberosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca e recuperados em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μ M por 25 dias em ausência de luz

Idade da planta doadora	Tempo de exposição (min)	PVS2 (0 °C)				PVS3 (25 °C)			
		Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		NL-	NL+	NL-	NL+	NL-	NL+	NL-	NL+
20 dias	0	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-
	30	85 \pm 6,7 ^{ab}	25 \pm 6,7 ^c	80 \pm 3,3 ^b	10 \pm 0,0 ^c	100 \pm 0,0 ^a	75 \pm 11,2 ^{ab}	100 \pm 0,0 ^a	-
	45	85 \pm 6,7 ^{ab}	70 \pm 13,4 ^{ab}	75 \pm 1,7 ^{bc}	10 \pm 0,0 ^c	95 \pm 2,2 ^a	75 \pm 11,2 ^{ab}	95 \pm 2,2 ^a	-
	60	85 \pm 6,7 ^{ab}	60 \pm 17,9 ^{bc}	70 \pm 0,0 ^{bc}	25 \pm 2,2 ^b	85 \pm 6,7 ^{ab}	100 \pm 0,0 ^a	85 \pm 6,7 ^{ab}	-
	90	85 \pm 6,7 ^{ab}	50 \pm 4,5 ^{bc}	55 \pm 5,0 ^{cd}	50 \pm 4,7 ^a	80 \pm 8,9 ^{ab}	85 \pm 6,7 ^{ab}	80 \pm 8,9 ^{ab}	10 \pm 0,0 ^c
	120	40 \pm 0,0 ^{cd}	40 \pm 0,0 ^{bc}	40 \pm 0,0 ^d	25 \pm 6,7 ^b	75 \pm 11,2 ^b	80 \pm 0,0 ^{ab}	50 \pm 0,0 ^b	20 \pm 0,0 ^c
	150	20 \pm 0,0 ^d	30 \pm 0,0 ^c	20 \pm 0,0 ^e	30 \pm 0,0 ^b	75 \pm 11,2 ^b	90 \pm 4,5 ^{ab}	50 \pm 0,0 ^b	10 \pm 0,0 ^c
30 dias	0	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-
	30	100 \pm 0,0 ^a	50 \pm 0,0 ^{bc}	100 \pm 0,0 ^a	30 \pm 0,0 ^b	100 \pm 0,0 ^a	80 \pm 6,3 ^{ab}	80 \pm 4,5 ^{ab}	36,6 \pm 4,2 ^b
	45	100 \pm 0,0 ^a	50 \pm 0,0 ^{bc}	80 \pm 0,0 ^b	30 \pm 0,0 ^b	95 \pm 2,2 ^a	80 \pm 7,3 ^{ab}	70 \pm 0,0 ^{ab}	30 \pm 7,3 ^{bc}
	60	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	90 \pm 0,0 ^{ab}	25 \pm 2,2 ^b	85 \pm 6,7 ^{ab}	90 \pm 6,3 ^{ab}	55 \pm 6,7 ^b	33,3 \pm 4,2 ^{bc}
	90	90 \pm 4,5 ^{ab}	100 \pm 0,0 ^a	65 \pm 1,7 ^c	30 \pm 4,5 ^b	65 \pm 11,2 ^b	80 \pm 8,9 ^{ab}	25 \pm 2,2 ^{bc}	35 \pm 2,2 ^b
	120	70 \pm 0,0 ^{bc}	100 \pm 0,0 ^a	-	40 \pm 0,0 ^{ab}	50 \pm 0,0 ^b	86,6 \pm 4,2 ^{ab}	25 \pm 2,2 ^{bc}	35 \pm 2,2 ^b
	150	25 \pm 2,2 ^{cd}	100 \pm 0,0 ^a	-	30 \pm 4,5 ^b	45 \pm 11,8 ^b	56,6 \pm 2,1 ^b	20 \pm 4,5 ^c	26,6 \pm 5,6 ^{bc}
40 dias	0	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-	100 \pm 0,0 ^a	-
	30	93,3 \pm 4,2 ^{ab}	40 \pm 4,5 ^{bc}	90 \pm 3,3 ^{ab}	35 \pm 2,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	35 \pm 16,4 ^b	83,3 \pm 4,2 ^{ab}	10 \pm 0,0 ^c
	45	86,6 \pm 5,6 ^{ab}	40 \pm 0,0 ^{bc}	80 \pm 3,3 ^b	35 \pm 2,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	90 \pm 4,6 ^{ab}	80 \pm 4,5 ^{ab}	63,3 \pm 9,1 ^a
	60	83,3 \pm 5,6 ^{ab}	55 \pm 11,2 ^b	75 \pm 1,7 ^{bc}	45 \pm 2,2 ^{ab}	93,3 \pm 4,2 ^a	80 \pm 7,1 ^{ab}	86,6 \pm 5,6 ^{ab}	50 \pm 3,6 ^{ab}
	90	73,3 \pm 11,1 ^b	85 \pm 6,7 ^{ab}	60 \pm 6,7 ^{cd}	40 \pm 4,5 ^{ab}	93,3 \pm 4,2 ^a	90 \pm 3,0 ^{ab}	50 \pm 4,5 ^{bc}	60 \pm 9,7 ^{ab}
	120	48 \pm 4,0 ^c	65 \pm 2,2 ^b	50 \pm 3,3 ^d	30 \pm 0,0 ^b	100 \pm 0,0 ^a	80 \pm 5,6 ^{ab}	40 \pm 13,4 ^{bc}	30 \pm 3,6 ^{bc}
	150	46,6 \pm 4,2 ^c	55 \pm 2,2 ^{bc}	50 \pm 3,3 ^d	35 \pm 2,2 ^b	86,6 \pm 8,4 ^b	45 \pm 11,2 ^b	20 \pm 6,3 ^c	3,3 \pm 2,1 ^c

Nota: Os resultados expressam média \pm erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Para os explantes criopreservados, a sobrevivência, evidenciada pelo desenvolvimento dos primeiros folíolos e, ocasionalmente, pela produção de calos (Figura 9), foi observada em resposta todos os tratamentos, em frequências variadas. Nos ápices expostos à PVS2, as maiores taxas de sobrevivência (100 %) foram observadas a partir de explantes derivados de microestacas com 30 dias de cultura e tratados por períodos superiores a 60 minutos (Tabela 1). Os explantes expostos à PVS3 apresentaram altas frequências (75 a 100 %), independentemente do tempo de cultura da microestaca e do tempo de exposição à solução crioprotetora, com exceção dos ápices excisados de microestacas de 40 dias tratados com PVS3 por 30 ou 150 minutos (Tabela 1).

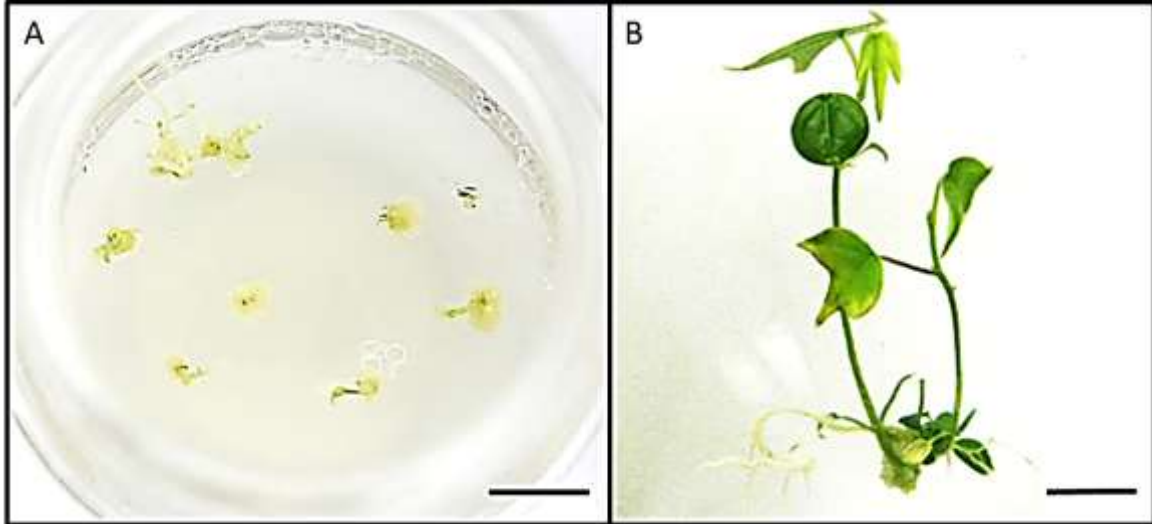
Figura 9 – Resposta morfogênica a partir de ápices caulinares criopreservados de *P. suberosa* após 60 minutos de exposição à PVS2 ou PVS3, após 30 dias em meio de recuperação



Legenda: (A) ápices excisados de microestacas com 40 dias de cultura, expostos à PVS2 antes da imersão em NL; (B) ápices excisados de microestacas com 30 dias de cultivo, expostos à PVS3 antes da imersão em NL. Barra = 1cm.

A recuperação de plantas pós-resfriamento também ocorreu em frequências distintas, dependendo da idade da microestaca e do tempo de exposição à solução crioprotetora. As maiores taxas foram observadas a partir de ápices caulinares excisados de microestacas mantidas em cultura por 20 dias e expostos à PVS2 por 90 minutos (50 %), assim como daqueles obtidos de microestacas com 40 dias e expostos à PVS3 por 45 a 90 minutos (50 a 60%) (Tabela 1, Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Recuperação de ápices caulinares de *P. suberosa* excisados de microestacas com 20 dias de cultura, após criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca e exposição à PVS2



Legenda: (A) Ápices expostos a PVS2 por 90 minutos antes da imersão em NL, após 30 dias em meio de recuperação; (B) Ápices expostos a PVS2 por 90 minutos antes da imersão em NL, após 60 dias em meio de recuperação. Barra = 1cm.

O início da recuperação de plantas ocorreu após, aproximadamente, 25 dias de cultura, na ausência de luz, com o desenvolvimento dos primeiros folíolos (Figura 11 A, C). Após esse período, os materiais foram então transferidos para meio MSM $\frac{1}{2}$ e mantidos na presença de luz por mais 30 dias. O desenvolvimento de brotos a partir dos ápices caulinares ocorreu a partir de meristema pré-existente, com a formação de apenas um broto por explante (Figura 11 B, D).

Figura 11 – Recuperação de ápices caulinares de *P. suberosa* excisados de microestacas com 40 dias de cultura, após criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca e exposição à PVS3 por diferentes períodos

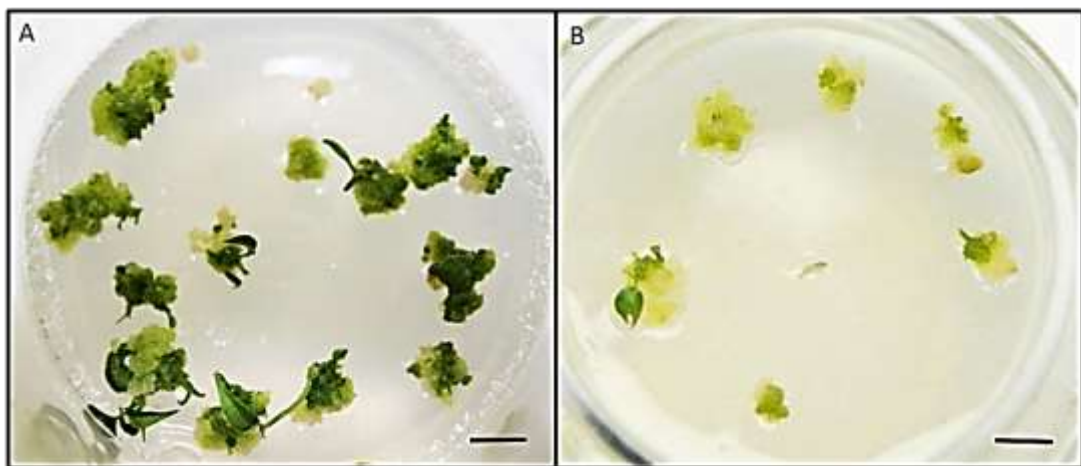


Legenda: Ápices expostos a PVS3 por 45 minutos antes da imersão em NL, (A) após 30 dias e (B) após 60 dias, em meio de recuperação; Ápices expostos a PVS3 por 90 minutos antes da imersão em NL, (C) após 30 dias e (D) após 60 dias em meio de recuperação. Barra = 1cm.

Ápices caulinares tratados com a solução de PVS2 apresentaram o desenvolvimento de brotos de forma mais lenta, após 40 a 60 dias do reaquecimento, quando comparados àqueles expostos à PVS3, que deram origem a brotos 30 dias após o reaquecimento. Essa diferença na velocidade de recuperação de plantas também foi observada nos ápices excisados de microestacas de diferentes idades. Ápices derivados de microestacas com 40 dias apresentaram desenvolvimento mais rápido, dando origem a plantas mais vigorosas (Figura 11 D).

Foi também observada a formação de calos de consistência friável na base dos brotos, com maior incidência em explantes tratados com PVS2 (dados não mostrado). Esses calos apresentavam coloração esverdeada nos materiais expostos ao PVS2 (Figura 12 A), e amarelada naqueles tratados com PVS3 (Figura 12 B), apresentando por vezes gemas e microbrotos em sua superfície, os quais não se desenvolveram em plantas.

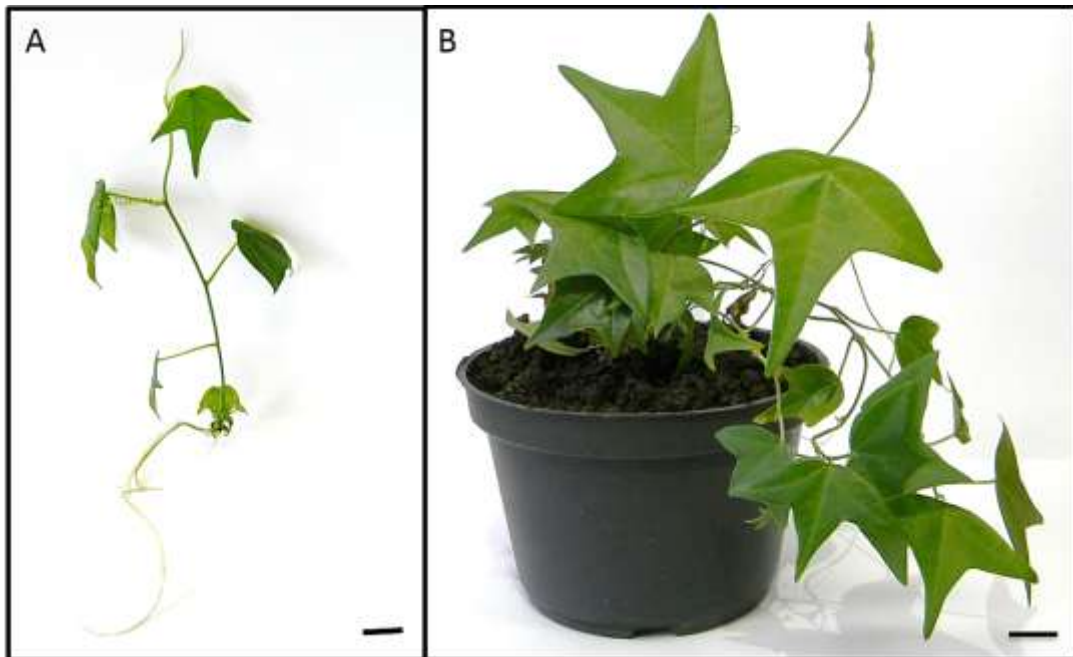
Figura 12 – Formação de calos a partir de ápices caulinares de *P. suberosa* criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca



Legenda: (A) Ápices expostos a PVS2 por 45 minutos antes da imersão em NL, e mantidos por 30 dias em meio de recuperação; (B) Ápices expostos a PVS3 por 30 minutos antes da imersão em NL, e mantidos por 30 dias em meio de recuperação. Barra = 1 cm.

As plantas recuperadas a partir dos ápices criopreservados após tratamento com PVS2 ou PVS3 apresentaram aspecto fenotípico normal (Figura 13 A), com exceção daquelas obtidas após exposição prolongada ao PVS3 (120 minutos), que apresentaram sinais de hiperidricidade. O material recuperado foi mantido *in vitro* em regime de subculturas a cada 30 dias, sendo aclimatizado após, aproximadamente, 120 dias de cultura (Figura 13 B).

Figura 13 – Plantas de *P. suberosa* derivadas de ápices caulinares excisado de microestacas com 40 dias de cultura, expostos à PVS3 por 90 minutos e criopreservados por V-Crioplaca



Legenda: (A) Planta *in vitro* após 120 dias de cultura em meio MSM ½; (B) Planta Aclimatizada 60 dias após a transferência para condições *ex vitro*. Barra = 1 cm.

Em resumo, as plantas derivadas dos ápices caulinares com 40 dias de cultura e expostos à PVS3 por 90 minutos antes da imersão em NL eram visualmente mais vigorosas (Figura 13) e sua recuperação ocorreu mais rapidamente após o reaquecimento, alcançando altas taxas de produção de plantas. Considerando estes fatores, este protocolo foi selecionado para a continuidade do trabalho visando à detecção de injúrias induzidas pela criopreservação.

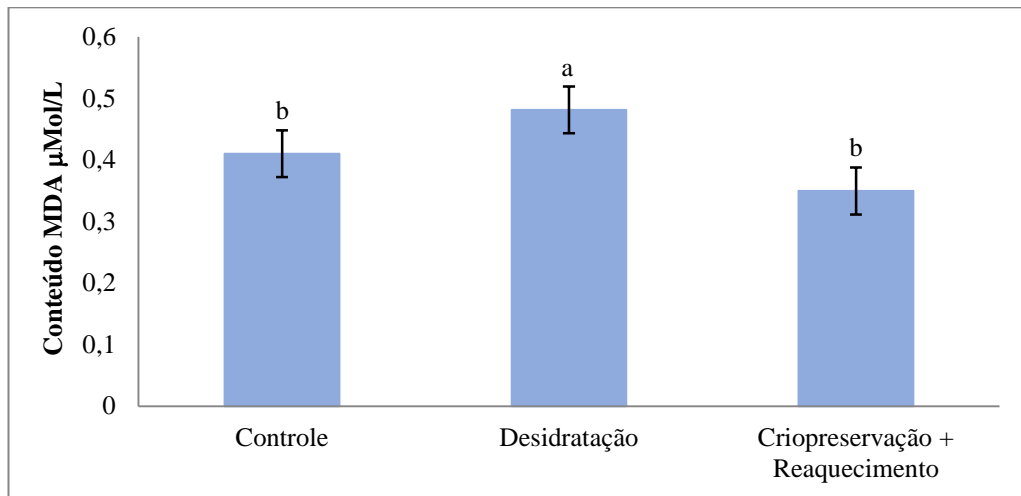
4.2. Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação do MDA

Visando à detecção das injúrias nas membranas celulares decorrentes do processo de criopreservação foram realizadas a quantificação da peroxidação de lipídios nos seguintes materiais:

- 1) ápices caulinares mantidos em condições padrão de cultura *in vitro*;
- 2) ápices caulinares excisados de microestacas com 40 dias de cultura, pré-cultivados em meio com sacarose a 0,3 M e expostos às soluções de *loading* e PVS3 (90 minutos), mas não imersos em NL;
- 3) ápices caulinares excisados de microestacas com 40 dias de cultura, pré-cultivados em meio com sacarose a 0,3 M, expostos às soluções de *loading* e PVS3 (90 minutos) antes da imersão em NL e mantidos por 24 horas no escuro após o reaquecimento.

Ápices caulinares pré-cultivados em meio com sacarose a 0,3 M e expostos às soluções de *loading* e PVS3 apresentaram teores de MDA significativamente superiores aos observados nas amostras controle (Figura 14). Entretanto, nos explantes criopreservados e mantidos no escuro por 24 horas após o reaquecimento, na produção de MDA ($0,356 \mu\text{mol.mL}^{-1}$), atingiu níveis similares aos observados nas amostras controle (Figura 14).

Figura 14 – Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) em ápices caulinares de *P. suberosa* após diferentes etapas do protocolo de criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca



Legenda: Controle - ápices caulinares mantidos em condições padrão de cultura *in vitro*; Desidratação - ápices caulinares excisados de microestacas com 40 dias de cultura, pré-cultivados em meio com sacarose a 0,3 M e expostos às soluções de *loading* e PVS3 (90 minutos), mas não imersos em NL; Criopreservação + Reaquecimento - ápices caulinares excisados de microestacas com 40 dias de cultura, pré-cultivados em meio com sacarose a 0,3 M, expostos às soluções de *loading* e PVS3 (90 minutos) antes da imersão em NL e mantidos por 24 horas na ausência de luz após o reaquecimento, em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μM.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, ápices caulinares de *P. suberosa* foram criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca. Além disso, aspectos bioquímicos da crioinjúria foram avaliados pela primeira vez no gênero.

Em estudos prévios de criopreservação de passifloras foram estabelecidos protocolos utilizando técnicas baseadas no processo de vitrificação. Ápices caulinares de *P. suberosa* foram criopreservados pela técnica de encapsulamento-vitrificação, tendo sido obtida uma taxa moderada de recuperação pós-resfriamento (28%), alcançada após pré-cultivo por 24 horas em meio contendo sacarose a 0,3M, exposição à solução de PVS2 por 60 minutos e recuperação em meio suplementado com BAP a 0,44 μ M, por 30 dias, na ausência de luz e 30 dias em intensidade luminosa reduzida, antes da transferência para condições padrão de luminosidade (GARCIA et al., 2011b). Resultados similares foram observados para ápices caulinares de *P. foetida* criopreservados pela mesma técnica, embora tenham apresentado taxas de recuperação mais elevadas (60%) (FALCÃO, 2011).

Mais recentemente, um protocolo eficiente de criopreservação para segmentos nodais de plantas *in vitro* de *P. pohlii* foi desenvolvido por Merhy e colaboradores (2014), utilizando a técnica de vitrificação. Embora segmentos nodais não sejam utilizados com frequência para a criopreservação devido ao seu tamanho e nível de diferenciação, o que pode influenciar na eficiência de penetração das soluções crioprotetoras nas camadas celulares mais internas (RAY; BHATTACHARYA, 2008), uma alta taxa de recuperação (65%) foi observada após o pré-cultivo em meio MSM suplementado com sacarose a 0,7 M e exposição a PVS3 por 30 a 120 minutos. A recuperação dos segmentos nodais foi realizada em meio MSM suplementado com BAP a 30,8 μ M e manutenção no escuro por 30 dias, antes da transferência para a presença de luz.

Uma metodologia inovadora de criopreservação foi também recentemente desenvolvida por Nadarajan e colaboradores (2014) para embriões zigóticos de *P. edulis*, na qual a solução de vitrificação PVS2 foi infiltrada a vácuo. Dessa forma, a remoção da água intracelular ocorreu de forma mais rápida e eficiente, resultando em uma taxa de recuperação, pós-resfriamento, maior do que 63%, após apenas 2,5 minutos de exposição ao PVS2.

Um dos aspectos considerados durante os processos de morfogênese *in vitro* é a influência da planta matriz. Na criopreservação, o *status* fisiológico dos explantes é considerado fundamental para o sucesso dos tratamentos de condicionamento às baixas

temperaturas e desidratação, tendo consequências nas taxas de sobrevivência e recuperação pós-resfriamento (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Confirmando essa ideia, em um trabalho de criopreservação de batata foi observado que a qualidade dos explantes é fortemente influenciada pela idade da planta doadora (HARDING, JOHNSTON; BENSON, 2009). Considerando esses fatos, alguns autores têm utilizado a cultura de microestacas para obtenção de explantes mais uniformes fisiologicamente (SEKIZAWA et al., 2011; YAMAMOTO, 2011; WANG et al., 2014; SYLVESTRE-ENGELMANN; ENGELMANN, 2015). A adoção desta estratégia permite também a produção de um grande número de ápices, de tamanhos similares. Em *P. suberosa*, a idade dos explantes influenciou a recuperação de plantas após a criopreservação. De um modo geral, ápices excisados de microestacas com maior tempo de cultivo (40 dias) apresentaram taxas de recuperação mais elevadas, principalmente após exposição à PVS3. Da mesma forma, Wang e colaboradores (2014) observaram diferenças na recuperação de plantas a partir de ápices caulinares de *Chrysanthemum morifolium* excisados de segmentos nodais cultivados por diferentes períodos, utilizando a técnica de vitrificação em gotas. Ápices com seis semanas apresentaram maior taxa de recuperação pós-resfriamento (76,4%) quando comparados aos de quatro semanas (46,1%). Diferentes taxas de recuperação (37,8 – 82%) também foram observadas em ápices caulinares de mandioca excisados de plantas com diferentes idades (7 a 28 dias) (CHAROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004). Marković e colaboradores também avaliaram a influência do tempo de cultivo das microestacas de *Vitis vinifera* (4 a 16 semanas), e verificaram que a utilização de ápices mais novos resultou em maiores taxas de recuperação pós-criopreservação. Para ápices de *Colocasia esculenta* a sobrevivência dos explantes aumentou conforme a idade das plantas doadoras, de 46% para plantas com sete dias para 75% para plantas com 21 dias de cultura (TAKAGI et al., 1997).

Neste trabalho, a utilização da técnica de V-Crioplaca resultou em maiores taxas de recuperação de plantas a partir de ápices caulinares de *P. suberosa* após a imersão em NL, independente da solução de vitrificação (PVS2 – 50 % e PVS3 – 60 %), quando comparadas com as obtidas no trabalho de Garcia e colaboradores (2011b), no qual foram obtidas taxas de recuperação de 8 e 28%, com a utilização das técnicas de vitrificação e encapsulamento-vitrificação, respectivamente. A técnica de V-Crioplaca tem permitido a obtenção de altos percentuais de recuperação de plantas após a criopreservação de explantes de diferentes espécies, incluindo *Tanacetum cinerariifolium* (YAMAMOTO et al., 2011), *Dianthus caryophyllus* (SEKIZAWA et al., 2011), morango (YAMAMOTO et al., 2012), *Perilla frutescens* (MATSUMOTO et al., 2014), palmeira (SALMA et al., 2014), *Clinopodium*

odorum (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015), *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015), batata (YAMAMOTO et al., 2015) e cana-de-açúcar (RAFIQUE et al., 2015). Esses resultados estão associados à diminuição da quantidade de solução crioprotetora e à velocidade de troca de temperatura devido à base de alumínio, o que permite a eliminação da necessidade do uso de banho-maria a 40 °C na etapa de reaquecimento dos explantes (NIINO et al., 2013).

A comparação da eficiência das soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 utilizando a técnica de V-Crioplaca também foi realizada por alguns autores. Sekizawa e colaboradores (2011) observaram que, para atingir as mesmas taxas de recuperação, ápices caulinares de cravo necessitaram de maiores tempos de exposição à PVS3, quando comparados ao tratamento com PVS2. Por outro lado, a exposição à PVS2 reduziu significativamente a sobrevivência de ápices caulinares de crisântemo criopreservados pela mesma técnica (YAMAMOTO et al., 2011). Da mesma forma, Kim e colaboradores (2009) também verificaram altas taxas de recuperação de ápices caulinares de alho utilizando PVS3, quando comparadas com as obtidas após exposição à PVS2.

Neste trabalho, a utilização de PVS3 permitiu a obtenção das maiores taxas de recuperação (até 60 %), possivelmente por ter propiciado níveis adequados de desidratação para aquisição de criotolerância. Em relação à PVS2, foi observado que o aumento da criotolerância foi progressivo, resultando em taxas de recuperação com diferenças mais tênues ao longo dos tempos de exposição avaliados. Independentemente da idade dos explantes, maiores taxas de recuperação foram alcançadas após os maiores tempos de exposição à essa solução crioprotetora (60, 90 e 120 minutos). Esse mesmo padrão de resposta foi observado por Charoensub e colaboradores (2004) para ápices caulinares de mandioca.

Além de ter possibilitado o aumento na taxa de recuperação pós-resfriamento de ápices caulinares de *P. suberosa*, a utilização da técnica de V-Crioplaca acelerou o processo de recuperação dos explantes após o reaquecimento. Enquanto no protocolo anterior, utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação, o início da regeneração ocorria apenas após incubação de 30 dias na ausência de luz, seguido por 30 dias em intensidade luminosa reduzida, antes da transferência para condições padrão de cultura (GARCIA et al., 2011b), no protocolo estabelecido neste trabalho, a recuperação ocorreu apenas após 25 dias de cultura no escuro, antes da transferência para a presença de luz.

A incubação dos explantes na ausência de luz ou em sistemas de luminosidade reduzida após o reaquecimento é uma estratégia bastante utilizada em protocolos de criopreservação (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; GONZALEZ-ARNAO et al., 2009;

ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015). Esta etapa é importante para atenuar os riscos de produção de ERO por processos fotooxidativos, visto que, após a retirada do NL, o material vegetal encontra-se em situação de estresse, reiniciando seu metabolismo (KACZMARCZYK et al., 2012). Como visto anteriormente, esse estresse pode levar à produção de $O_2^{\cdot-}$, radical capaz de interagir com diversas moléculas biológicas, podendo oxidar diretamente proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e ácidos nucleicos (ASADA 2006; TRIANTAPHYLIDÈS; HAVAUX, 2009; SHARMA et al., 2012).

Outra estratégia usualmente adotada em protocolos de criopreservação vegetal é o uso de reguladores de crescimento nos meios de recuperação, visando à reativação dos processos metabólicos interrompidos durante o armazenamento em NL, e à estimulação do desenvolvimento celular (LOMBARDI; FABBRI; CACCAVALE, 2000; SEN-RONG; MING-HUA, 2013; KULUS; ZALEWSKA, 2014). No trabalho anterior com ápices caulinares de *P. suberosa*, a adição de BAP a 0,44 μ M foi essencial para a recuperação de plantas após a criopreservação (GARCIA et al., 2011b). Entretanto, no presente estudo, a presença desta citocinina durante a etapa inicial de recuperação induziu a formação de calos na base dos explantes, em frequências distintas. Dessa forma, os explantes foram transferidos para meio de cultura sem suplementação hormonal, na etapa de recuperação na presença de luz.

A formação de calos em protocolos de criopreservação de segmentos caulinares não é desejada, visto que as altas taxas de multiplicação celular podem aumentar o risco de variação somaclonal (PENNYCOOKE; TOWILL, 2000; SAKAI; ENGELMANN, 2007). Embora poucos trabalhos relatem a produção de calos durante a recuperação pós-resfriamento, esta resposta pode ser observada em algumas espécies, quando os explantes são incubados na presença de reguladores de crescimento. Pennycooke e Towill (2000) observaram a formação de calos em ápices caulinares criopreservados utilizando a técnica de vitrificação e recuperação em meio suplementado com baixas concentrações de reguladores de crescimento. Entretanto, os brotos obtidos apresentaram desenvolvimento sem formação de calos, ao serem transferidos para meios sem a adição dessas substâncias. Esse mesmo padrão foi observado neste trabalho com brotos de *P. suberosa* derivados de ápices caulinares submetidos à criopreservação pela técnica de V-Crioplaca.

Um importante problema a ser considerado no uso da criopreservação para armazenamento de material vegetal é a possibilidade de danos celulares decorrentes das condições de estresse estabelecidas nas diferentes etapas do protocolo. Entretanto, como a crioinjúria é um fenômeno múltiplo e complexo, com ação direta e indireta nas taxas de

recuperação pós-resfriamento, seus mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados (WEN et al., 2012).

As principais injúrias observadas durante a criopreservação estão associadas a danos oxidativos nas células. Dessa forma, a avaliação do estresse oxidativo é de grande importância para a determinação das etapas mais críticas do processo. Contudo, a quantificação desses danos nos materiais derivados de sistemas *in vitro* é dificultada, principalmente, pelo tamanho reduzido dos explantes. Além disso, os tecidos vegetais possuem um elevado conteúdo de carboidratos e metabólitos secundários, que podem dificultar ainda mais a detecção de danos oxidativos (FANG et al., 2008).

De acordo com vários autores, a membrana celular é o principal sítio de ação das injúrias oxidativas promovidas pelo resfriamento (STEPONKUS, 1984 *apud* KACZMARCZYK et al., 2012). Danos nas membranas celulares podem ser ocasionados não só pela formação de cristais de gelo, como também pela peroxidação de fosfolipídios (FUNNEKOTTER et al., 2013). Essas lesões, de um modo geral, aumentam a permeabilidade, afetando os processos de osmose e difusão, alterando as trocas iônicas, e comprometendo sua função (GEORGIEVA et al., 2014).

O MDA, subproduto da peroxidação dos fosfolipídios das membranas celulares, tem sido utilizado como biomarcador de danos oxidativos em materiais derivados da cultura e conservação *in vitro*. A quantificação do MDA pode ser realizada por meio de uma reação com o ácido tiobarbitúrico, o que gera uma coloração rosa-avermelhada com absorvância máxima a 532 nm (HODGES et al., 1999). Vários trabalhos têm adotado este ensaio por ser simples, rápido e de baixo custo (LYNCH et al. 2011; DANOVA et al., 2012; WANG et al., 2014). Contudo, embora seja bastante sensível, este teste pode superestimar o conteúdo de MDA, devido à alta reatividade dessa substância com carboidratos e alguns metabólitos secundários, como as antocianinas (HODGES et al., 1999; WANG et al., 2014). Dessa forma, é necessário eliminar essas interferências para uma estimativa mais adequada da taxa de peroxidação de lipídios nos tecidos vegetais. Para isso, Hodges e colaboradores (1999) propuseram ajustes na metodologia, incluindo a leitura em outros comprimentos de onda (440 e 600 nm), para eliminar a detecção de açúcares e de outras moléculas reativas. Como biomarcador de danos oxidativos associados à crioinjúria, o teor de MDA já foi avaliado em ápices caulinares de *Rubus* e *Hypericum rumeliacum* (UCHENDU et al., 2010b; DANOVA et al., 2012), embriões de milho e palmeira (WEN et al., 2010; 2012) e plântulas de *Arabidopsis thaliana* (REN, et al., 2013), após criopreservação por diferentes técnicas.

Wen e colaboradores (2010) observaram variação no conteúdo de MDA em embriões de milho dessecados por diferentes períodos em sílica gel, tendo sido observados maiores valores em materiais imersos em NL após a dessecação. Para embriões de palmeira criopreservados pela mesma técnica, foram obtidos valores maiores no material criopreservado (1,5 - 2,0 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) do que os encontrados para os controles (1-1,5 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), e (WEN et al., 2012). De modo semelhante, Georgieva e colaboradores (2014) observaram um aumento significativo no conteúdo de MDA em ápices caulinares de *Hypericum rumeliacum* após a criopreservação, sugerindo um aumento de injúrias oxidativas nas membranas celulares. Por outro lado, Skyba e colaboradores (2010) não observaram diferenças significativas no conteúdo de MDA de ápices criopreservados de diferentes genótipos de *Hypericum perforatum*.

Neste trabalho, o conteúdo de MDA de ápices caulinares de *P. suberosa* foi maior após a desidratação osmótica do material, quando comparado com o observado nas amostras controle e no material criopreservado armazenado por 24 horas no escuro após o reaquecimento. Resultados similares foram observados por Chen e colaboradores (2015) em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, que apresentaram aumento da produção de MDA nas diferentes etapas da criopreservação e uma significativa redução desses valores 24 horas após o reaquecimento. Os resultados obtidos com *P. suberosa* sugerem que, embora ocorra peroxidação lipídica durante o processo de criopreservação, principalmente durante as etapas de desidratação anteriores à imersão em NL, a manutenção do material vegetal em ausência de luminosidade após o reaquecimento pode favorecer a ação de mecanismos antioxidantes das células e, conseqüentemente, a redução dos danos às membranas celulares.

O presente estudo demonstrou que a técnica de V-Crioplaca levou a um aumento das taxas de recuperação pós-resfriamento de ápices caulinares de *P. suberosa* e que o sucesso da técnica foi influenciado pela idade dos explantes e pela solução crioprotetora utilizada. A investigação de injúrias ocorridas nas membranas celulares durante o processo de criopreservação, com base na produção de MDA, também permitiu apontar as etapas mais críticas do protocolo. Esses resultados, os primeiros descritos para avaliação de crioinjúrias no gênero *Passiflora*, enfatizam a necessidade de uma ampla investigação das alterações morfo-fisiológicas induzidas pela criopreservação, visando à otimização dos protocolos para o aumento das taxas de recuperação de plantas pós-resfriamento.

CONCLUSÕES

- O tempo de cultura da fonte dos explantes exerceu uma influência significativa na recuperação de plantas após a criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa*, sendo as melhores respostas observadas quando utilizados ápices excisados de microestacas mantidas por 40 dias em cultura;
- A utilização da solução PVS3 foi mais eficaz para a recuperação de plantas, a partir dos ápices caulinares criopreservados, quando comparada ao tratamento com PVS2.
- A maior taxa de recuperação pós-resfriamento foi observada após exposição à solução de PVS3 por 90 minutos a 25°C;
- A Técnica de V-Crioplaca proposta neste trabalho permitiu o aumento das taxas de recuperação, quando comparadas a resultados anteriores obtidos com a mesma espécie;
- O conteúdo de MDA foi maior após a desidratação osmótica do material, o que indica estresse oxidativo no período de desidratação prévia ao super- resfriamento.

PERSPECTIVAS

- Monitorar as alterações anatômicas, as injúrias nas membranas celulares e o estresse oxidativo nos materiais após cada uma das etapas de desidratação osmótica, anteriores à imersão em NL e imediatamente após o reaquecimento;
- Utilizar substâncias com ação antioxidante nas etapas identificadas como as mais críticas;
- Monitorar a estabilidade genética e metabólica das plantas recuperadas dos materiais criopreservados.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, T. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira, volume 2.** 5ª edição, Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em julho de 2015.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- ASHMORE, S. E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, 1997.
- BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, v. 165, p. 1221-1227, 2003.
- BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Production of reactive oxygen species by freezing stress and protective roles of antioxidant enzymes in plant. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 1, n. 1, p. 34-40, 2012.
- BARBALHO, S.M.; DAMASCENO, D.C.; SPADA, A.P.M.; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A.C.; GUIGER, E. L.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA, M.; MENDES, C.G. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rat offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n. 12, p. 1490-1495, 2011.
- BARP, E. A.; SOARES, G. L. G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A. M.; VECCHI, C.; MOREIRA, G. R. P. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 3, p. 853-862, 2006.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- 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**, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.
- BENSON, E. E. Cryopreserved Germoplasm: The biochemical basis of freezing injury *In*: BENSON, E. E. **Free radical damage in stored plant germoplasm**. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p. 75-86, 1990.
- BENSON, E. Cryopreservation Theory. in: Reed, B. M. (Ed.) **Cryopreservation plant: A practical Guide**. New York, USA: Springer, p. 15-32, 2008.

- BENZIE, I. F.F. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12564>>. Acesso: 30 de julho de 2015.
- BIRK, C.D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2285-2291, 2005.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASSELS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 2, p. 145-157, 2001.
- CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v.45, p. 1-92, 1997.
- CERVIL, A. C.; LINSINGEN, L. Sinopse taxonômica das Passifloraceae no complexo de cerrado (savana) no estado do Paraná – Brasil. **Iheringia - Série Botânica**, v. 63, n. 1, p. 145-157, 2008.
- CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. **CryoLetters**, v. 25, p. 51-58, 2004.
- CHEN, G.; REN, L.; ZHANG, J.; REED, B. M.; ZHANG, D.; SHEN, X. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, p. 38-47, 2015.
- CONVENÇÃO SOBRE A DIVERSIDADE BIOLÓGICA (CDB) – 1992. Ministério do Meio Ambiente. Brasília - DF, 2000. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf>Acesso: agosto de 2015).
- CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 668-695, 2015.
- CRUZ, T.V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C., BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 875-879, 2008.
- CRUZ-CRUZ, C. A., GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. Review. **Resources**, v. 2, p. 73-95, 2013.
- DANOVA, K.; NIKOLOVA-DAMIANOVA, B.; DENEV, R.; MARKOVSKA, Y. Impact of pre-culture on short- and long-term *in vitro* recovery of the biosynthetic potential and

enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense of *Hypericum rumeliacum* Boiss. after cryostorage. **Plant Growth Regulation**, v. 68, p. 447-457, 2012.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.

DULLO, M. E.; GUARINO, L.; ENGELMANN, F.; MAXTED, N.; NEWBURY, J. H.; ATTERE, F.; FORD-LLOYD, B. V. Complementary conservation strategies for the genus *Coffea*: A case study of Mascarene *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, p. 565-579, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual de curadores de Germoplasma-Vegetal: Consevação *ex situ* (Colbase-sementes), Brasília-DF, 2010. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/currentfrontiers-in-cryobiology/current-issues-in-plant-cryopreservation>>. Acesso: novembro de 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA EM AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). QUEIRÓZ, M. A. Os recursos genéticos vegetais e os melhoristas de plantas *In: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/153831>>. Acesso: março de 2015.

ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.51, p. 185-191, 2015.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, p. 22-243, 1991.

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

ENGELS, J. M. M; ENGELMANN, F. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. *In: ENGELS, J. M. M; RAMANATHA RAO, V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M.T. Managing plant genetic diversity*. Library of Congress Cataloging-in-publication, Cap.9 p.89-100, 2001.

ESCOBAR, L. K. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 76, p. 877-885, 1989.

ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p. 197-203, 1989.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. **CryoLetters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

FALCÃO, E. **Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

FANG, J. Y.; WETTEN, A.; JOHNSTON, J. Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. **Plant Cell Report**, v. 27, p. 453-461, 2008.

- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003.
- FRYE, A.; HAUSTEIN, C. Extraction, Identification, and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of *Passiflora*. **American Journal of Undergraduate Research**, v.6, n.3, 2007.
- FUNNEKOTTER, B.; KACZMARCZYK, A.; TURNER, S. R.; BUNN, E.; ZHOU, W.; SMITH, S.; FLEMATTI, G.; MANCERA, R. L. Acclimation-induced changes in cell membrane composition and influence on cryotolerance of *in vitro* shoots of native plant species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.114, p. 83–96, 2013.
- GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; FALCAO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. 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**, v. 106, p. 47-54, 2011a.
- GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; VIANNA, M. G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L. – slow growth storage and cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 32, n. 5, p. 377-882, 2011b.
- GARDNER, D. E. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to Banana Poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, v. 73, p. 476-478, 1989.
- GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v. 28, p. 1091–1101, 2006.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. (2008). Plant propagation by tissue culture, 3 ed. **Springer**, v. 1, 501p.
- GEORGIEVA, E.; PETROVA, D.; YORDANOVA, Z.; KAPCHINA-TOTEVA, V. CELLAROVA, E.; CHANEVA, G. Influence of cryopreservation on the antioxidative activity of *in vitro* cultivated *Hypericum* species. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, p. 863-870, 2014.
- GÓNGORA, G. A.; JARAMILLO, H.; CONSTANTINO, S. Conservación genética *in vitro* de passifloras silvestres y cultivadas. **I Congreso Nacional sobre Biodiversidad.**, Cali, Colombia, 1994, p. 309-314.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 1-13, 2008.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; LAZARO-VALLEJO, C. E.; ENGELMANN, F.; GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y. M.; PASTELIN-SOLANO, M. C.; DIAZ-RAMOS, C. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* ‘Andrews’). **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 45, p. 574–582, 2009.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; AVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seed post-cryopreservation. **CryoLetters**, v. 30, p. 142-147, 2009.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: Torres et al. (ed.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p. 183-260, 1998.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacological**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HARDING, K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. **Plant Cell, Tiss and Organ Culture**, v. 37, p. 31-38, 1994.

HARDING, K.; JOHNSTON, J. W.; BENSON, E. E. Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated *in vitro* crop plant germplasm. **Agricultural and Food Science**, v.18, p. 103-116, 2009.

HEALTH, R. L.; PAKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal – culturas temporárias e permanentes**, Rio de Janeiro, v. 39, p.1-101, 2012.

JAN, N.; HUSSAIN, M.; ANDRABI, K. I. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.12, n. 3, 2009.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91–110, 2005.

JOHNSTON, J. W., HORNE, S., HARDING, K.; BENSON, E. E. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 108-112, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *In*: Empresa Brasileira de Agropecuária – EMBRAPA. **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 670 p., 2005.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P. Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R. L. (2012). **Current Issues in Plant Cryopreservation, Current Frontiers in Cryobiology**, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/currentfrontiers-in-cryobiology/current-issues-in-plant-cryopreservation>>. Acesso em: junho de 2014.

- KIDØY, L.; METTE NYGA' R. D.A.; ANDERSEN, Ø. M.; PEDERSEN, A. T.; AKSNES, D. W.; KIREMIRE, B. T. Anthocyanins in Fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, p. 49-54, 1997.
- KILLIP, E. P. 1938. The American Species of Passifloraceae. **Publication of Field Museum of Natural History, Botanical Series**, v. 19, p. 1-613, 1938.
- KIM, H. H.; LEE, Y. G.; SHIN, D. J.; KO, H. C.; GWAG, J. G.; CHO, E. G.; ENGELMANN, F. Development of alternative plant vitrification solution in droplet-vitrification procedures. **CryoLetters**, v. 30, n. 5, p. 320-334, 2009.
- KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n.2, p. 119-126, 1997.
- KROSNICK, S. E.; FORD, A. J.; FREUDENSTEIN, J. V. Taxonomic Revision of *Passiflora* Subgenus *Tetrapathea* Including the Monotypic Genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a New Species of *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 34, n. 2, p. 375-385, 2009.
- KROSNICK, S. E.; PORTER-UTLEY, K. E.; MACDOUGAL, J. M.; JØRGENSEN, P. M.; MCDADE, L. A. New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, n.3, p. 692-713, 2013.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88-107, 2014.
- KWAK, J. M.; NGUYEN, V.; SHROEDER, J. I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiology**, v. 141, p. 323-329, 2006.
- LANGIS, R. B.; SCHNEIBEL, B. S. P.; EARLE, E. D.; STEPONKUS, P. L. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. **CryoLetters**, v. 10, p. 421-428, 1989.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LOMBARDI, M.; FABBRI, A.; CACCAVALE, A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. **Plant Cell Reports**, v.19, p. 213-218, 2000.
- LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; DA GLORIA, B. A. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 239-247, 2007.
- LYNCH, P. T.; SIDDIKAA, A.; JOHNSTON, J. W.; TRIGWELLA, S. M.; MEHRA, A. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. **Plant Science**, v. 181, p. 47-56, 2011.
- LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.

- MARKOVIĆ, Z.; CHATELET, P.; SYLVESTRE, I.; KONTIĆ, J. K.; ENGELMANN, F. Duration of culture of grapevine (*Vitis vinifera*) microcuttings on medium with zeatin riboside affects shoot tip recovery after cryopreservation. Disponível em: <http://bib.irb.hr/datoteka/599551.COST_grapevine_ZMarkovic.pdf>. Acesso em: agosto de 2015.
- MATSUMOTO, T.; YOSHIMATSU, K.; KAWAHARA, N.; YAMAMOTO, N.; NIINO, T. Development of *in vitro* propagation by node culture and cryopreservation by V-Cryo-plate method for *Perilla frutescens*. **Advances in Horticultural Science**, v. 28, n. 2, p 79-83, 2014.
- MEDEIROS, A. C. S. Armazenamento de sementes de espécies florestais nativas / Antonio Carlos de S. Medeiros – Colombo: **Embrapa Florestas**, 2001. 24 p. – (Embrapa Florestas. Documentos, 66).
- MEDEIROS, S. A. F.; YAMANISHI, O.K.; PEIXOTO, J. R.; PIRES, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RIBEIRO, J. G. B. L. Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no distrito federal. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 492-499, 2009.
- MELETTI, L. M. M. Maracujá-Roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 194-348, 2005
- MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 6, n. 1-2, p. 13-20, 2007.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, E. 083-091, 2011.
- MERHY, T. S. M; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation and assessment of genetic stability and ISSR of *Passiflora pohlii*. **Cryoletters**, v. 35, n. 3, p. 204-215, 2014.
- MIURA, K.; FURUMOTO, T. Cold signaling and cold response in plants. **International Journal Molecular Sciences**, v.14, p. 5312-5337, 2013.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p.459-81, 2007.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000a.
- MONTEIRO, A. C. B. A; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000b.
- MORAES, M. L. L; VILEGAS, J. H.Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.
- MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.399-403, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

- NADARAJAN, J.; PRITCHARD, H. W. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. **Plos one**, v. 9, n.5 e96169, 2014.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p. 867-880, 1981.
- NELSON, P. D.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficient of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474-478, 1972.
- NIINO, T.; SAKAI, A. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Science**, v. 87, n. 2, p. 199-206, 1992.
- NIINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H.; NOJIRI, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 261-266, 1992.
- NIINO, T.; YAMAMOTO, S. I.; FUKUI, K.; CASTILLO MARTÍNEZ, C. R.; VALLE ARIZAGA, M. V.; MATSUMOTO, T.; ENGELMANN, F. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. **CryoLetters**, v. 34, n. 6, p. 549-560, 2013.
- NISHISZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinallis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.
- OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v. 43, n. 246, p. 157-164, 1996.
- PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**. Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005. Disponível: <www.fao.org/doc/panis.pdf>. Acesso em: abril de 2015.
- PANIS, B., PIETTE, B., SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**.v. 168, p. 45-55, 2005.
- PATEL, S. S.; SONI, H.; MISHRA, K.; SINGHAI, A. K. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v.1, n.1, p.1-16, 2011.
- PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. *In*: Empresa Brasileira de Agropecuária – (EMBRAPA). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 670 p., 2005.
- PENNYCOOKE, J. C.; TOWILL, L. E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. **Plant Cell Reports** v. 19, p. 733-737, 2000.
- PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Front Plant Science**, v. 6, n. 69, p. 1-16, 2015.

- PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 3, p. 521-530, 2011.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Retrieval of Spermatozoa After Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. **Nature**, v. 164, n. 949, p. 666-667, 1949.
- PORTER-UTLEY, K. A revision of *Passiflora* L. subgenus *Decaloba* (DC.) Rchb. supersection *Cieca* (Medik.) J. M. MacDougal & Feuillet (Passifloraceae). **PhytoKeys**, v. 43, p. 1-224, 2014.
- RAFIQUE, T.; YAMAMOTO, S.; FUKUI, K.; MAHMOOD, Z.; NIINO, T. Cryopreservation of sugarcane using the V-Cryo-plate technique. **CryoLetters**, v. 36, n. 1, p. 51-59, 2015.
- RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.
- RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rauvolfia serpentina* by PVS2 vitrification. **CryoLetters**, v.29, n. 4,321-328, 2008.
- REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, v.738 p. 425-431, 2007.
- REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E.P. Assay of Quadranguloside, the Major Saponin of Leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v. 15, p. 195-197, 2004.
- REN, L.; ZHANG, D.; JIANG, X.; GAI, Y.; WANG, W.; REED, B. M.; SHEN, X.; Peroxidation due to cryoprotectant treatment is a vital factor for cell survival in *Arabidopsis* cryopreservation. **Plant Science**, v. 212, p. 37- 47, 2013.
- RISENGA, I.; WATT, P.; MYCOCK, D. Programmed cell death and necrosis during cryopreparative drying of *in vitro* *Eucalyptus grandis* axillary buds. **CryoLetters**, v. 34, n.6, p. 583-597, 2013.
- ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p. 747-758, 2012.
- ROSA, Y. B. C. J.; BELLO, C. C. M.; DORNELAS, M. C. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 52, p. 64-71, 2016.
- SAKAI, A. Survival of plant tissue at super-low temperatures III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness. **Plant Physiology**, v. 40, p. 882-887, 1965.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucelar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Report**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. *In*: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm—Current Research Progress and Applications. Rome: **JIRCAS, Tsukuba/IPGRI**, p. 1–7, 2000.

- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SALMA, M.; FKI, L.; ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; NIINO, T.; ENGELMANN, F. Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. **Scientia Horticulturae**, v.179, p. 91-97, 2014.
- SEKIZAWA, K.; YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; FUKUI, K.; NIINO, T.; Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Biotechnology**, v. 28, p. 401-405, 2011.
- SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple cryopreservation protocol for *in vitro*-grown shoot tips of Chinese genuine red bud taro (*Colocasia esculenta* L. Schott Var. *Cormosus* CV. Hongyayu) by encapsulation-dehydration. **Scientia Horticulturae**, v. 162, p. 226-233, 2013.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKDI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>>. Acesso em: janeiro de 2015.
- SHERWIN, H. W.; FARRANT, J. M. Protection mechanisms gainst excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 203-210, 1998.
- SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 47-54, 2009.
- SILVA, T. C. R.; CARVALHO, C. R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora Cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 2, p.158-165, 2014.
- SKYBA, M.; URBANOVÁ, M.; KAPCHINA-TOTEVA, V.; ČELLÁROVÁ, E. Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips. **CryoLetters**, v. 31, n. 3, p. 249-260, 2010.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. **Piracicaba. Esalq/USP**. 179p. 1997.
- SPENCER, K. C.; SEGLER, D. S. Passisuberosin and epipassisuberosin: two cyclopentenoid cyanogenic glycosides from *Passiflora suberosa*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1665-1667, 1987.
- STEPONKUS, P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 543-584, 1984.
- STINTZING, F. C.; CARLE, R. Funtional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 19-38, 2004.
- SUZUKI, M.; TANDON, P.; ISHIKAWA, M.; TOYOMASU, T. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 123-131, 2008.

- SYLVESTRE-ENGELMANN, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v. 51, p. 185-191, 2015.
- TAKAGI, H.; THINH, N. T.; ISLAM, O. M.; SENBOKU, T. A. Sakai Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification.1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. ***Plant Cell Reports***, v. 16, p. 594-599, 1997.
- TAYLOR, M. J.; SONG Y.C.; BROCKBANK, K. G. M Vitrification in tissue preservation: New developments (2004). *In*: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) ***Life in the Frozen State***. New York: CRC Press, London, p. 603-644, 2004.
- TEIXEIRA, A. S.; FALTUS, M.; ZÁMECNÍK, J.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MOLINA-GARCÍA, A. D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. ***Thermochimica Acta***, v. 593, p. 43-49, 2014.
- TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livre de vírus. *In*: Torres et al. (ed.) ***Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas***. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p. 183-260, 1998.
- TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Quantitative analysis of all types of β -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. ***Phytochemical Analysis***, v. 10, n. 5, p. 247-253, 1999.
- TRIANANTAPHYLIDÈS, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. ***Trends in Plant Science***, v. 14, n. 4, p. 218-228, 2009.
- UCHENDU, E. E.; MUMINOVA, M.; GUPTA, S.; REED B. M. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v. 46, p.386-393, 2010a.
- UCHENDU, E. E.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G.; REED, B. M. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. ***Plant Cell Report***, v. 29, p. 25-35, 2010b.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. ***Passiflora passionflowers of the world***. Timber Press, Portland Timber Press, p. 430, 2004.
- URAGAMI, A., SAKAI, A.; NAGAI, M. 1990. Cryopreservation of dried axially buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. ***Plant Cell Reports***, v. 6, p. 328-321, 1990.
- VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. ***Journal of Plant Physiology***, v. 141, p. 188-194, 1993.
- VANDERPLANK, J. A revision of *Passiflora* SECTION DYSOSMIA Passifloraceae. ***Curtis's Botanical Magazine***, v. 30, n. 4, p. 318-387, 2013.
- VEIGA-BARBOSA, L., MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; SOUZA, M. M.; MELETTI, L. M. M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. ***Seed Science & Technology***, v. 41, 89-97, 2013.

- VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 6, p. 738-745, 2014.
- VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnological Advances**, v. 9, p. 197-215, 1991.
- VOLK, G.M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, p. 48-61, 2006.
- VRANOVÁ, E.; VAN BREUSEGEM, I. D. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227-1236, 2002
- WANG, R.; GAO, X.; CHEN, L.; HUO, L.; LI, M.; WANG, Q. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 330-339, 2014.
- WANG, Z. C.; DENG, X. X. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. **CryoLetters**, v. 25, p. 43-50, 2004.
- WANG, C.; XU, F.; SHANG, J.; XIAO, H.; FAN, W.; DONG, F.; HU, J.; ZHOU, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 812-817, 2013.
- WANG, R. R.; GAO, X. X.; CHEN, L.; HUO, L. Q.; LI, M. F.; Q. C. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 330-339, 2014.
- WEN, B.; WANG, R.; CHENG, H.; SONG, S. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 239, p. 57-67, 2010.
- WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, p. 323-335, 2012.
- WITHERS, L. A. *In-vitro* conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 43, n. 3, p. 1-42, 1991.
- WU, R.Y.; CHANG, S.Y.; HSIEH, T.F.; CHANG, Y.S. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 108-112, 2013.
- XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Review. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p. 893-902, 2000.
- YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W. S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **CryoLetters**, v. 32, v. 3, p. 256-265, 2011.
- YAMAMOTO, S.; FUNIAK, K.; RAFIQUE, T.; KHAN, N. I.; CASTILHO MARTINEZ, C. R.; SEKIZAWA, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminum cryoplates. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2012.

YAMAMOTO, S.; WUNNA; RAFIQUE, T.; ARIZAGA, M. V.; FUKUI, K.; GUTIERREZ, E. J. C.; MARTINEZ, C. R. C.; WATANABE; K.; NIINO, T. The Aluminum Cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips. **American Journal of Potato Research**, v. 92, p. 250-257, 2015.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000a

YOCKTENG, R.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; SOUZA-CHIES, T. T. **Passiflora**. In: C. KOLE (ed.), Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits, p. 129-171. DOI 10.1007/978-3-642-20447-0_7, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. M. A.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZERAIK; M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.

ZHANG, D; REN, L.; CHEN, G.; ZHANG, J.; REED, B. M.; SHEN, X. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. **Plant Cell Report**, v. 34, p. 1499-1513, 2015.