



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes

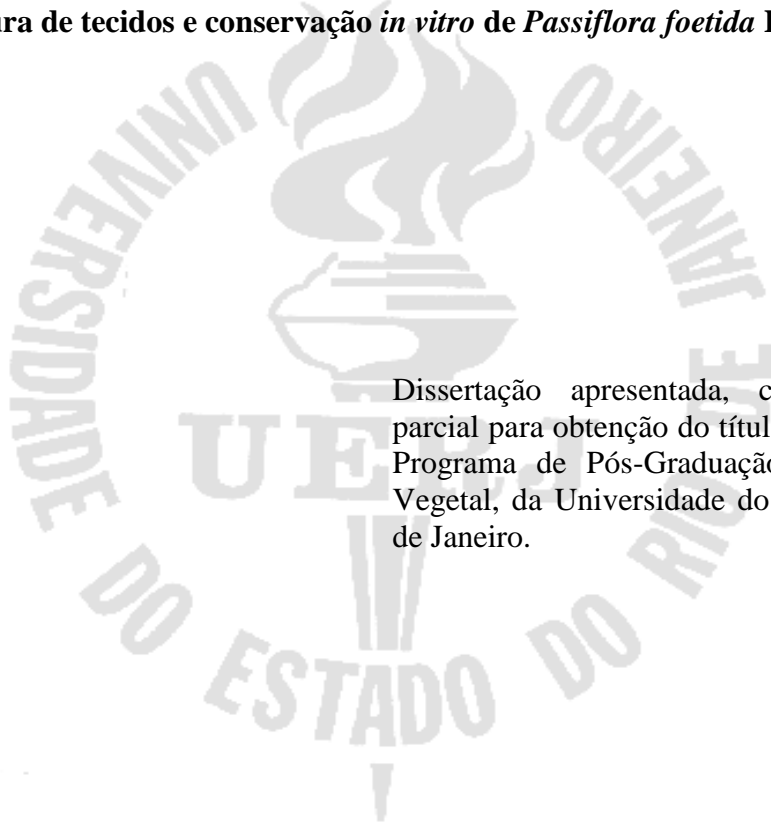
Érica Maria Falcão da Silva

Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.

Rio de Janeiro
2011

Érica Maria Falcão da Silva

Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientação: Prof^ª. Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Co-orientação: Prof^ª. Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Rio de Janeiro
2011

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

S586 Silva, Érica Maria Falcão da.
Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida*
L. / Érica Maria Falcão da Silva. - 2011.
77 f. : il.
Orientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida.
Co-orientação: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Passiflora - Teses. 2. Maracujá – Propagação *in vitro* – Teses.
I. Almeida, Geórgia Pacheco Peters de. II. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.
III. Título.

CDU 631.532:634.776.3

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

Assinatura

Data

Érica Maria Falcão da Silva

Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2011.

Banca examinadora:

Dr. Sérgio Ricardo Sodré Cardoso
Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Dr^a Claudia Simões
Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes da UERJ

Profa. Dr^a Alba Regina Pereira Rodrigues
Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca

Profa. Dr^a Rachel Fátima Gagliardi
Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes da UERJ

Dr^a Erika Spangenberg Tarré Borges
Instituto Nacional da Propriedade Individual

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo Amor Puro.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Georgia Pacheco, pela orientação, generosidade, permanente disponibilidade e apoio, que me conduziram a um manancial de informação de fundamental importância para a execução deste trabalho.

À Dr^a Elizabeth Atalla Mansur, por toda sabedoria, incentivo e, acima de tudo, exigência, parâmetros essenciais no desenvolvimento desta dissertação.

À Dr^a Renata Garcia, pelo seu conhecimento iluminador e seu entusiasmo contagiante no dia-a-dia do laboratório.

À Dr^a Rachel Gagliardi, pela participação em correções e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À Ana Rivendell por toda ajuda ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Gabriel, que me apresentou um mundo novo e mais bonito de viver.

Ao Corpo Docente e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da UERJ, que fazem com que me orgulhe de mencionar o nome da Instituição.

À equipe do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, especialmente aos amigos de turma, pela agradável convivência, tornando o passar das horas mais afável.

À Gabi, pela amizade e bom humor que amenizaram momentos difíceis e divertiram momentos “vagos”.

Aos meus grandes amigos, em especial a Andreia e Janicy, que sempre estiveram presentes valorizando meu potencial, me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Ao meu melhor amigo, parceiro e amor Marcelo, pela paciência e tolerância ao longo desta jornada. E, muito obrigada por me mostrar que existe vida durante o mestrado.

Aos meus pais, irmãos e toda minha família que sempre me deram amor e força em todas as etapas da minha vida.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me suprir em todas as necessidades.

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Érica Maria Falcão da. **Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 77 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O gênero *Passiflora* ocorre principalmente em regiões de clima tropical, sendo o Brasil um importante centro de diversidade. *Passiflora foetida* L. é uma espécie silvestre que apresenta características de interesse ornamental e medicinal. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos e criopreservação para *P. foetida*. Explantes caulinares foram excisados de culturas primárias obtidas a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro*. Para isso foram inoculados em meio MSM, suplementado com diferentes concentrações de ANA, PIC, TDZ e BAP utilizado isoladamente ou em combinação com ANA, e mantidos na presença ou ausência de luz. Foi observada a produção de brotos, calos e raízes adventícias, de acordo com o tipo e a concentração do regulador de crescimento testado e da condição de cultura utilizada. A produção de plantas ocorreu via organogênese direta e indireta em resposta a BAP, enquanto que a formação de calos não morfogênicos foi observada a partir de ambos explantes em resposta a PIC. A produção de raízes adventícias ocorreu em resposta a ANA. Tendo em vista a produção de raízes observada em meio sólido, segmentos internodais foram inoculados em meio líquido suplementado com diferentes auxinas e mantidos em imersão contínua ou sobre pontes de papel de filtro. A maior taxa de multiplicação de raízes foi observada a partir de entrenós mantidos no sistema de ponte de papel de filtro, em resposta a ANA. Segmentos radiculares excisados das culturas primárias também foram utilizados visando à produção de brotos e a multiplicação de raízes. Contudo, apenas foi observada a formação de gemas, sem posterior desenvolvimento de brotos. Além disso, a capacidade proliferativa dos segmentos radiculares inoculados em meio suplementado com ANA foi menor que a obtida a partir dos entrenós cultivados nas mesmas condições. Neste trabalho, foram também testados diferentes protocolos de criopreservação para ápices caulinares de *P. foetida* por meio de vitrificação e encapsulamento-vitrificação. A recuperação de plantas pós-congelamento foi observada unicamente a partir de ápices encapsulados e expostos à solução de vitrificação PVS2 por 120 minutos. Tendo em vista o potencial medicinal já descrito para *P. foetida*, através dos diferentes sistemas de cultura desenvolvidos neste trabalho serão obtidos materiais para a avaliação de diferentes atividades biológicas.

Palavras-chave: *Passiflora*. Micropropagação. Criopreservação.

ABSTRACT

The genus *Passiflora* occurs mainly in tropical regions, and Brazil is an important diversity center. *Passiflora foetida* L. is a wild species with ornamental and medicinal potential. The goal of this work was the establishment of tissue culture systems and cryopreservation for *P. foetida*. Stem explants were excised from primary cultures obtained from plantlets derived from *in vitro* germination. Nodal and internodal segments were inoculated on MSM medium supplemented with different concentrations of NAA, PIC, TDZ and BAP, used alone or in combination with NAA, and maintained in the presence or absence of light. The production of shoots, calluses and adventitious roots was observed, according to the type and concentration of growth regulator and the culture condition. Plant production occurred *via* direct and indirect organogenesis in response to BAP, whereas the formation of non-morphogenic calluses was observed from both explants in response to PIC. The production of adventitious roots occurred in response to NAA. In the view of root production on solid medium, internodal segments were inoculated on liquid medium supplemented with different auxins and maintained under continuous immersion or on filter-paper bridges. The highest root multiplication rate was observed from internodes maintained on filter-paper bridge in response to NAA. Root segments excised from primary cultures were also used aiming at shoot production and root multiplication. However, we only observed buds formation, without shoot development. In addition, proliferation capacity of root segments inoculated on medium supplemented with NAA was lower than the observed from internodes cultivated at the same conditions. In this work, we also tested different cryopreservation protocols for shoot tips of *P. foetida* through vitrification and encapsulation-vitrification. Post-freezing recovery was only observed from encapsulated explants which were exposed to the vitrification solution PVS2 for 120 minutes. In the view of the medicinal potential described for *P. foetida*, the different culture systems developed in this work will provide sources of material for the evaluation of distinct biological activities.

Keywords: *Passiflora*. Micropropagation. Cryopreservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Flor e fruto de <i>Passiflora foetida</i> L.....	23
Quadro 1 -	Cultura de tecidos de espécies de <i>Passiflora</i>	26
Figura 2 -	Morfogênese <i>in vitro</i> de <i>P. foetida</i> derivada da germinação <i>in vitro</i> das sementes e de ápices caulinares excisados de plântulas produzidas <i>in vitro</i>	33
Figura 3 -	Morfogênese <i>in vitro</i> de <i>P. foetida</i> a partir de explantes caulinares excisados de culturas primárias.....	38
Figura 4 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos internodais de <i>P. foetida</i> após 30 dias em diferentes sistemas de cultura.....	39
Figura 5 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos internodais de <i>P. foetida</i> cultivados por 30 dias no sistema de pontes de papel de filtro e, em seguida, transferidos para o sistema de imersão contínua por mais 30 dias de cultura.....	40
Figura 6 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos radiculares de <i>P. foetida</i> cultivados em meio MSM suplementado com BAP.....	41
Figura 7 -	Formação de raízes adventícias a partir de segmentos radiculares de <i>P. foetida</i> cultivados em meio MSM líquido suplementado com ANA.....	42
Figura 8 -	Acúmulo de biomassa a partir de segmentos radiculares de <i>P. foetida</i> inoculados em meio MSM líquido suplementado com diferentes concentrações de ANA, AIA e IBA, após 30 dias de cultura.....	43
Figura 9 -	Plantas de <i>P. foetida</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MSM ½ com sacarose a 6% e transplantadas para Plantmax®.....	44
Figura 10 -	Influência do pré-tratamento <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de sacarose no processo de aclimatização de <i>P. foetida</i>	45
Figura 11 -	Ápices caulinares de <i>P. foetida</i> submetidos a tratamentos de pré-congelamento e cultivados em meio MSM ½ por 30 dias.....	47
Figura 12 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>P. foetida</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Formação de brotos por desenvolvimento meristemático a partir de segmentos nodais de <i>P. foetida</i> inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.....	34
Tabela 2 -	Organogênese direta a partir de segmentos internodais de <i>P. foetida</i> inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.....	35
Tabela 3 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes caulinares de <i>P. foetida</i> inoculados em meio MSM suplementado com diferentes combinações de ANA com BAP, após 60 dias de cultura.....	36
Tabela 4 -	Recuperação de ápices caulinares de <i>P. foetida</i> após pré-cultura e exposição às soluções de vitrificação.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	Isopenteniladenina
ABA	Ácido Abscísico
AIA	Ácido indol 3-acético
AIB	Ácido indol-butírico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
ANOVA	Análise de variância
B ₅	Meio Gamborg
BAP	6-benzilaminopurina
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
DMSO	Dimetilsulfóxido
GA ₃	Giberilina
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
KIN	Cinetina
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Meio de Murashige e Skoog
MS ½	Meio de Murashige e Skoog com metade da concentração de sais
MSM	Meio de Murashige e Skoog modificado por Monteiro (2000)
MSM ½	Meio de Murashige e Skoog modificado por Monteiro (2000) com metade da concentração de sais
NL	Nitrogênio líquido
PF	Peso de matéria fresca
PIC	Ácido 4-amino 3,5,6 tricloropicolínico; picloram
PS	Peso de matéria seca
PVS2	<i>Plant vitrification solution 2</i>
PVS3	<i>Plant vitrification solution 3</i>
PWV	<i>Passion Fruit Woodiness Virus</i>
rpm	Rotação por minuto
TDZ	Tidiazuron
VSL	<i>Vitrification solution L</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	14
1.1	Gênero <i>Passiflora</i>.....	20
1.1.1	<u>Passiflora foetida L.....</u>	22
1.2	Cultura de tecidos de <i>Passiflora</i>.....	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	METODOLOGIA.....	28
3.1	Material vegetal e condições de cultura.....	28
3.2	Germinação <i>in vitro</i>.....	28
3.3	Estabelecimento de cultura de tecidos.....	29
3.3.1	<u>Cultura de segmentos caulinares.....</u>	29
3.3.2	<u>Cultura de raízes.....</u>	30
3.4	Aclimatização.....	30
3.5	Criopreservação de ápices caulinares.....	31
3.5.1	<u>Vitrificação.....</u>	31
3.5.2	<u>Encapsulamento-vitrificação.....</u>	32
3.6	Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos.....	33
4.1.1	<u>Estabelecimento de culturas primárias a partir de plântulas derivadas da germinação <i>in vitro</i>.....</u>	33
4.1.2	<u>Cultura de segmentos caulinares.....</u>	34
4.1.3	<u>Cultura de raízes.....</u>	41
4.2	Aclimatização.....	44
4.3	Criopreservação.....	46
4.3.1	<u>Vitrificação.....</u>	46
4.3.2	<u>Encapsulamento-vitrificação.....</u>	48

5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	59
ANEXO A	Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration on <i>Passiflora suberosa</i> L. (Passifloraceae)	69

INTRODUÇÃO

1 CONSERVAÇÃO *IN VITRO*

A crescente perda de habitats em todo o mundo como consequência da expansão das atividades agropecuárias, aumento da população humana e exploração predatória, tem provocado erosão genética e extinção de várias espécies, com redução significativa da biodiversidade (HOYT, 1992). Dessa forma, a implementação de programas de conservação é de fundamental importância para contornar esses problemas (MMA, 2000). Além disso, a conservação de recursos genéticos vegetais possibilita a manutenção de espécies que representam fontes potenciais de novos produtos para a agricultura e para as indústrias alimentícia e farmacêutica (PRACIAK, 1996; PENCE *et al.*, 2002).

As estratégias utilizadas para a conservação de germoplasma vegetal incluem métodos *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* consiste na conservação, manutenção e recuperação de espécies ou populações nos seus locais de origem, envolvendo também a proteção dos seus ecossistemas (BRASIL, 1992) e, dessa forma, permitindo a continuação do processo evolutivo e a conservação de espécies ainda desconhecidas.

Medidas conservacionistas *in situ* requerem a criação de grandes áreas para manutenção da diversidade biológica, com diferentes graus de interferência humana. No Brasil, estas áreas incluem as Reservas Biológicas e os Parques Nacionais, que possuem restrições quanto ao uso dos recursos biológicos, além das Áreas de Proteção Ambiental e as Reservas Extrativistas, que permitem a conservação associada ao uso sustentável dos recursos naturais (LEI FEDERAL Nº 9.985). No entanto, as extensas áreas requeridas exigem grandes investimentos para manutenção e fiscalização e não garantem proteção e cobertura a todas as espécies ameaçadas, principalmente àquelas com endemismo restrito.

A conservação *ex situ* é constituída pela proteção e manutenção dos recursos biológicos fora de seu ambiente natural, em ações consideradas complementares à conservação *in situ* tradicional (MMA, 2000). Esta estratégia representa uma opção para a manutenção de genótipos economicamente importantes e espécies com dificuldades de conservação *in situ*, como aquelas restritas a locais muito impactados (JACKSON & SUTHERLAND, 2000; SARASAN *et al.*, 2006).

A conservação *ex situ* pode ser realizada, principalmente, pelo armazenamento em bancos de sementes e em bancos de germoplasma *in vivo* e *in vitro*. O armazenamento de germoplasma *in vitro* constitui também uma estratégia complementar para espécies que apresentam limitações para o uso dos demais métodos de conservação *ex situ* (ENGELMANN, 1997).

As metodologias de conservação *in vitro* são baseadas nas técnicas de cultura de tecidos vegetais, por meio das quais células, tecidos ou órgãos podem dar origem a plantas completas em resposta a estímulos adequados, em período de tempo e espaço reduzidos e em condições ambientais controladas e assépticas, devido à totipotência das células vegetais (SANTOS, 2000). Uma das aplicações da cultura de tecidos é a micropropagação, que permite a multiplicação em larga escala de espécies vegetais, com diferentes finalidades (AHLOOWALIA *et al.*, 2002). A propagação vegetativa *in vitro* pode ocorrer por três diferentes vias: i) proliferação dos tecidos meristemáticos pré-existent; ii) indução de gemas adventícias por organogênese e iii) indução de embriogênese somática (GEORGE *et al.*, 2008). A escolha da estratégia depende do objetivo da cultura e das respostas de cada espécie.

A proliferação dos tecidos meristemáticos pré-existent envolve a cultura de ápices caulinares e radiculares ou segmentos nodais, que possuem células indiferenciadas, com potencial natural de gerar novos órgãos. Esse sistema é o mais indicado para propagação clonal e conservação de germoplasma *in vitro*, uma vez que ocorre sem a necessidade de desdiferenciação prévia, o que reduz os riscos de variação somaclonal (HITMI *et al.*, 2000; BISWAS *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2009; MINANO *et al.*, 2009). Além disso, a regeneração de plantas a partir de tecidos meristemáticos pré-existent é utilizada para intercâmbio de germoplasma, produção de plantas livres de vírus e transformação genética (HUSSEY *et al.*, 1989; SAEED *et al.*, 1997; GAO *et al.*, 2000; KATOH *et al.*, 2004; TRIPATHI *et al.*, 2005).

A organogênese consiste na formação de gemas adventícias a partir de tecidos diferenciados. Esse sistema compreende duas fases distintas: a desdiferenciação, na qual as células retornam a um estágio similar ao meristemático e adquirem novas competências, e a rediferenciação, na qual as células sofrem uma reprogramação gênica para formar novos órgãos, em resposta a estímulos adequados (SUGIYAMA, 1999). Como as gemas adventícias são estruturas conectadas ao tecido de origem e não apresentam o desenvolvimento do meristema radicular, os sistemas organogênicos geralmente incluem uma fase adicional de enraizamento (AHLOOWALIA *et al.*, 2002).

O processo organogênico pode ocorrer direta ou indiretamente a partir de tecidos diferenciados. A forma direta ocorre com a formação de gemas a partir das células do explante, enquanto que na forma indireta, o explante original sofre intensa proliferação celular, com formação de uma massa desorganizada de células denominada calo, a partir da qual são formadas as gemas adventícias. Apesar de os sistemas indiretos constituírem sistemas adequados para a multiplicação em larga escala, a possibilidade de ocorrerem variações genéticas e epigenéticas constitui um fator limitante para sua aplicação em programas de conservação *in vitro*.

A embriogênese somática consiste na produção de embriões a partir de células somáticas e, assim como a organogênese, pode ocorrer de maneira direta ou indireta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os embriões somáticos possuem padrão de desenvolvimento similar ao dos embriões zigóticos e apresentam estrutura bipolar, com meristemas apicais do caule e da raiz, sem conexão vascular com o explante de origem, o que geralmente permite a obtenção de plantas completas, sem necessidade de uma fase de enraizamento. Esse sistema vem sendo amplamente utilizado para produção de plantas transgênicas (PRAKASH; VARADARAJAN, 1992; GAMA, 1993; HAO *et al.*, 2005), sementes sintéticas (SCHULTHEIS *et al.*, 1990; LV *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2009) e estudos relacionados à fisiologia do desenvolvimento de embriões (YEUNG, 1995; KOVACEVIC *et al.*, 2000; CARRA *et al.*, 2006).

Um dos mais importantes fatores associados à eficiência da morfogênese *in vitro* é o tipo de explante utilizado para iniciar as culturas. Diferentes explantes podem ser utilizados, incluindo embriões zigóticos, cotilédones, hipocótilos, ápices caulinares, segmentos caulinares, folhas e raízes. As raízes constituem uma excelente fonte de explantes para a micropropagação, uma vez que são de fácil manipulação e não requerem a eliminação da planta doadora. Além disso, podem ser utilizadas para a produção de metabólitos secundários de interesse (RAMACHANDRA *et al.*, 2002; FRANKLIN *et al.*, 2004; WADEGAONKAR *et al.*, 2006).

A transferência do material obtido *in vitro* para condições *ex vitro* constitui a última etapa do processo de propagação *in vitro*, sendo denominada aclimatização. Essa fase é considerada extremamente crítica, uma vez que a alta umidade no interior dos frascos de cultura, a baixa intensidade luminosa e a alta concentração de açúcar no meio de cultura induzem alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas que podem resultar na queda da sobrevivência das plantas após o transplante. Estas alterações incluem a pouca deposição de cera nas folhas e um

controle estomático ineficiente, gerando susceptibilidade à dessecação em condições de baixa umidade relativa e um baixo rendimento fotossintético. Dessa forma, durante o processo de aclimatização, as plantas obtidas *in vitro* precisam desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática, ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (SUTTER, 1988; VANTELGEN *et al.*, 1992; DÍAZ-PEREZ *et al.*, 1995). Em muitas espécies, o processo de aclimatização requer alterações prévias nas condições de cultura, além de cuidados específicos após o transplântio (GRIBAUDO *et al.*, 2001).

A disponibilidade de sistemas eficientes de regeneração *in vitro* e de aclimatização constitui um pré-requisito essencial para o estabelecimento de metodologias de conservação de germoplasma *in vitro*. As principais estratégias de conservação *in vitro* são o crescimento lento e a criopreservação, que permitem o armazenamento de culturas em médio e longo prazos, respectivamente (ENGELMANN, 1997).

Sistemas de crescimento lento são caracterizados por condições que reduzem o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento das plantas resultando no aumento do intervalo entre as subculturas (ASHMORE, 1997). A desaceleração do crescimento das culturas pode ser alcançada por meio de modificações na constituição do meio de cultura, incluindo a adição de reguladores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (LEMOS *et al.*, 2002), e da manipulação das condições ambientais, como redução de temperatura, luminosidade e disponibilidade de oxigênio (ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 1999; LEMOS *et al.*, 2002). As metodologias de crescimento lento vêm sendo aplicadas com sucesso para o armazenamento em médio prazo de diversas espécies (NEGASH *et al.*, 2001; GOPAL *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2004; CANTO *et al.*, 2004; SARKAR *et al.*, 2005). Entretanto, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura e o estresse provocado pelas condições de armazenamento podem potencializar a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas nas culturas (HARDING, 1994; HAO *et al.*, 2005).

A criopreservação consiste na manutenção de material biológico em nitrogênio líquido (NL, -196°C), ou em sua fase vapor (-150°C), sendo considerada a metodologia mais adequada para armazenamento em longo prazo, uma vez que, nessas condições, o material pode ser estocado por períodos indeterminados, já que os processos metabólicos e divisões celulares são

interrompidos (LI; PRITCHARD, 2009). Além disso, a criopreservação é um método rápido e seguro para conservar a integridade genética do material, em um espaço físico reduzido, baixo custo e livre de contaminação (ENGELMANN, 2004).

A formação de cristais de gelo na criopreservação como resultado do congelamento da água intracelular e/ou da recristalização durante o descongelamento pode causar injúrias ou morte celular, prejudicando a recuperação do material. Dessa forma, a remoção da água antes do congelamento é de fundamental importância para a prevenção de injúrias e manutenção da viabilidade pós-congelamento, sendo um ponto crucial para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação. Assim sendo, diversas metodologias foram desenvolvidas para diferentes espécies de plantas visando à remoção da água intracelular (UCHENDU; REED, 2008).

As técnicas clássicas ou convencionais são baseadas no resfriamento controlado e gradual até uma temperatura pré-definida, em congeladores programáveis, antes da imersão do material em NL (MAZUR, 1969; 1970), causando um congelamento lento da água extracelular. Assim, o meio intracelular super-resfriado permanece descongelado, possivelmente, porque a parede celular e a membrana plasmática agem como barreiras, gerando uma diferença de pressão de vapor que, por sua vez, provoca a saída controlada da água intracelular para o meio externo. Este fenômeno é denominado desidratação induzida por congelamento e essa ação protetora reduz a um mínimo a água disponível, evitando, assim, a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular (BENSON, 2010).

As técnicas contemporâneas são baseadas no processo de vitrificação, que consiste na transição da água da fase líquida para sólida sem a formação de cristais de gelo (FAHY *et al.*, 1984). Essa transição é decorrente do aumento da viscosidade do meio intracelular após a desidratação do material vegetal antes do congelamento, a qual pode ser induzida por dessecação física ou por exposição a soluções crioprotetoras altamente concentradas (ENGELMANN, 2000; BENSON, 2008). Diversas técnicas baseadas no processo de vitrificação já foram desenvolvidas para a criopreservação de diferentes espécies vegetais. As técnicas mais utilizadas são denominadas dessecação, vitrificação e encapsulamento, e podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação (HALMAGYI *et al.*, 2005; WILKINSON *et al.*, 1998; SANTOS, 2001; SCOCCHI *et al.*, 2004; CLAVERO-RAMÍREZ *et al.*, 2005).

A técnica de dessecação é baseada na desidratação física do material por meio de exposição à corrente de ar em câmara de fluxo laminar ou à sílica gel, antes da imersão direta em NL. É considerada relativamente simples e já foi empregada com sucesso na criopreservação de diversas espécies, incluindo mandioca (MARIN *et al.*, 1990), amendoim (GAGLIARDI *et al.*, 2002), *Citrus* (LAMBARDI *et al.*, 2004) e coentro (POPOVA *et al.*, 2010).

Na técnica de vitrificação, a desidratação do material ocorre pela exposição a substâncias altamente concentradas, também denominadas soluções de vitrificação. Essas soluções são capazes de promover a desidratação celular e a vitrificação e são compostas por substâncias penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes aumentam a viscosidade intracelular, evitando a formação de cristais de gelo, enquanto que os não penetrantes contribuem para o desequilíbrio osmótico, provocando a desidratação celular. Diferentes soluções de vitrificação foram desenvolvidas nos últimos anos, incluindo PVS2 (Sakai *et al.*, 1990), PVS3 (NISHIZAWA *et al.*, 1993), VSL (SUZUKI *et al.*, 2008), entre outras.

A determinação da tolerância das amostras à desidratação e aos efeitos tóxicos das soluções de vitrificação é considerada a etapa mais crítica desta técnica, uma vez que pode ocorrer morte celular ou modificação das respostas morfogênicas em cultura (SAKAI, 1995). De um modo geral, a tolerância à desidratação depende do estado fisiológico do material, da temperatura e de pré-tratamentos capazes de preparar o tecido para a exposição às soluções de vitrificação.

Outra técnica baseada no processo de vitrificação inclui o encapsulamento do material vegetal em cápsulas de alginato de cálcio (FABRE; DEREUDDRE, 1990), o que permite uma proteção durante a desidratação. Essa metodologia pode ser utilizada em combinação com a dessecação ou vitrificação do material. No encapsulamento-desidratação, os explantes encapsulados são expostos à desidratação física antes da imersão em nitrogênio líquido (PAULET *et al.*, 1993; PAUL *et al.*, 2000; GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2003; CLAVERO-RAMIREZ *et al.*, 2005; VERLEYSSEN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; GONZALEZ-ARNAO; ENGELAMNN, 2006; FLACHSLAND *et al.*, 2006; PAWLOWSKA; BACH, 2009). Na técnica de encapsulamento-vitrificação, os explantes encapsulados são tratados com soluções crioprotetoras e expostos a soluções de vitrificação antes do congelamento. Esta técnica já foi aplicada com sucesso para a criopreservação de menta (HIRAI; SAKAI, 1999), mandioca

(CHAROENSUB *et al.*, 2004), *Thymus moroderi* (MARCO-MEDINA *et al.*, 2010) e gengibre (SUNDARARAJ *et al.*, 2010).

Atualmente, a criopreservação de ápices caulinares é considerada uma prática acessível a uma grande variedade de espécies vegetais, incluindo aquelas produtoras de sementes recalcitrantes ou com propagação vegetativa (LI; PRITCHARD, 2009).

1.1 Gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae, encontrando-se distribuído em regiões de clima tropical e sub-tropical (FALEIRO *et al.*, 2005). Compreende aproximadamente 520 espécies, entre as quais muitas são originárias do Brasil, considerado um dos maiores centros de diversidade, principalmente a região Centro-Norte do país (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Os representantes do gênero são popularmente conhecidos como maracujá, palavra de origem indígena que significa alimento em forma de cuia. Suas flores são também conhecidas como flor da Paixão, devido à correlação da morfologia da flor com os símbolos da Paixão de Cristo (SOUZA; MELETTI, 1997). As plantas são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, perenes, vigorosas, com crescimento rápido e produção anual. Apresentam uma ampla diversidade de tipos foliares, variando entre arredondados, profundamente partidos ou com bordos serrados, além da presença de gavinhas. Possuem flores grandes e vistosas, com coloração variando entre branca, vermelha, laranja ou arroxeadas. Seus frutos têm formatos diversos, com casca espessa e de coloração variada, de acordo com a espécie (OLIVEIRA, 1987).

Apesar de o gênero *Passiflora* compreender um grande número de espécies, apenas um pequeno número ocupa espaço nos mercados fruteiros nacionais e internacionais. A espécie mais conhecida e de maior expressão comercial é o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), responsável por cerca de 95% da produção nacional, seguida do maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims) e maracujá-doce (*Passiflora alata*). O interesse por essas espécies se deve aos seus frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou processados industrialmente para a fabricação de sucos, doces, geléias, sorvetes e licores, além do seu uso ornamental e medicinal (FALEIRO *et al.*, 2005).

A utilização ornamental é crescente devido à beleza e estética das flores, com ampla diversidade de tamanhos, formas e cores (SOARES-SCOTT *et al.*, 2003). O potencial medicinal

das passifloras é bem estabelecido, baseado em um sedativo natural (passiflorina) presente em suas folhas e frutos, que confere uma propriedade calmante, de grande importância para a indústria farmacêutica. Estudos farmacológicos já demonstraram também que as espécies do gênero apresentam atividade antiespasmódica, hipotensiva, hipnótica, analgésica e antibacteriana (SOUZA; MELETTI, 1997; MOHANASUNDARI *et al.*, 2007; CHAN BASHA *et al.*, 2008).

A produção comercial do maracujá no Brasil teve início na década de 70. Atualmente, o Brasil é considerado o maior produtor mundial e um importante mercado consumidor, sendo responsável por cerca de 70% da produção (SOUZA; MELETTI, 1997). O agronegócio do maracujá emprega cerca de 250 mil pessoas, com uma produção de 450 mil toneladas, sendo 95% do cultivo representado pelo maracujá amarelo e 5% maracujá doce. A produção de maracujá ocupa uma área de, aproximadamente, 50 mil hectares, gerando de cinco a seis empregos diretos e indiretos por hectare e movimentando cerca de R\$ 500 milhões na economia nacional (AGRIANUAL, 2009).

Nos últimos anos, a produtividade do maracujazeiro tem apresentado uma redução significativa, devido à ocorrência de problemas fitossanitários que afetam a qualidade e a longevidade das culturas, como a suscetibilidade a doenças causadas por fungos, principalmente *Phytophthora* e *Fusarium*, bactérias (*Xanthomonas campestris* pv *passiflorae*), vírus (Passion Fruit Woodiness Vírus – PWV) e insetos (lagartas, percevejos, abelhas). Conseqüentemente, os produtores passam a utilizar fungicidas, antibióticos e pesticidas, aumentando o custo de produção e reduzindo o valor de mercado dos frutos. Além disso, o acúmulo de resíduos químicos coloca em risco a saúde dos trabalhadores rurais e dos consumidores, causando danos ao meio ambiente. Portanto, o desenvolvimento de cultivares com características de resistência à pragas e doenças, e produtividade é uma necessidade urgente do setor (JUNQUEIRA *et al.*, 2003).

Programas de melhoramento genético do maracujazeiro dependem, em grande parte, de cruzamentos com espécies silvestres, visando à transferência de genes para as espécies cultivadas. Estudos preliminares demonstraram que algumas espécies silvestres apresentam características de interesse, como resistência a doenças do maracujazeiro. Assim sendo, cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis e muitas apresentam potencial ornamental (FALEIRO *et al.*, 2005). Essas espécies constituem também fontes de novas biomoléculas, o que amplia as

possibilidades de exploração do seu potencial farmacológico e uso terapêutico (DHAWAN *et al.*, 2004).

Contudo, a maior parte das espécies silvestres de *Passiflora* ainda não foi caracterizada agronomicamente. E, diversas espécies silvestres e seu principal agente polinizador, a mamangava (designação comum às abelhas do gênero *Bombus*), encontram-se sob ameaça de extinção devido ao uso de grandes áreas com fins agrícolas e ao impacto de ações antrópicas, como o crescimento industrial, a construção de rodovias, indústria e hidroelétricas (BERNACCI *et al.*, 2005). Portanto, a conservação da variabilidade genética do gênero é de fundamental importância visando à utilização comercial ou aplicação em programas de melhoramento.

1.1.1 Passiflora foetida L.

Passiflora foetida, popularmente conhecida como maracujá-de-estalo, maracujá-do-mato ou maracujá-de-papoco (NUNES; QUEIROZ, 2001), apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente em regiões de clima tropical com solos arenosos ou levemente argilosos, profundos e bem drenados (BERNACCI *et al.*, 2005).

Essa espécie é a que apresenta maior variação no gênero *Passiflora*, devido à morfologia de suas folhas, flores e frutos (DEGINANI, 2001; ULMER; MACDOUGAL, 2004). É uma trepadeira herbácea, de caule fino, coberto por pêlos amarelados e viscosos. Apresenta folhas 3-5-lobadas, com o lobo central mais desenvolvido, além de brácteas e estípulas, frequentemente pilosas, com tricomas glandulares responsáveis pelo odor característico. Suas flores, que também liberam um forte odor, são predominantemente brancas com regiões arroxeadas, de 5-6 cm de diâmetro (Figura 1 - A) (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Os frutos, do tipo globoso, são comestíveis e apresentam de 2-3 cm de diâmetro, com coloração que varia do amarelo-alaranjado ao vermelho (Figura 1 - B).

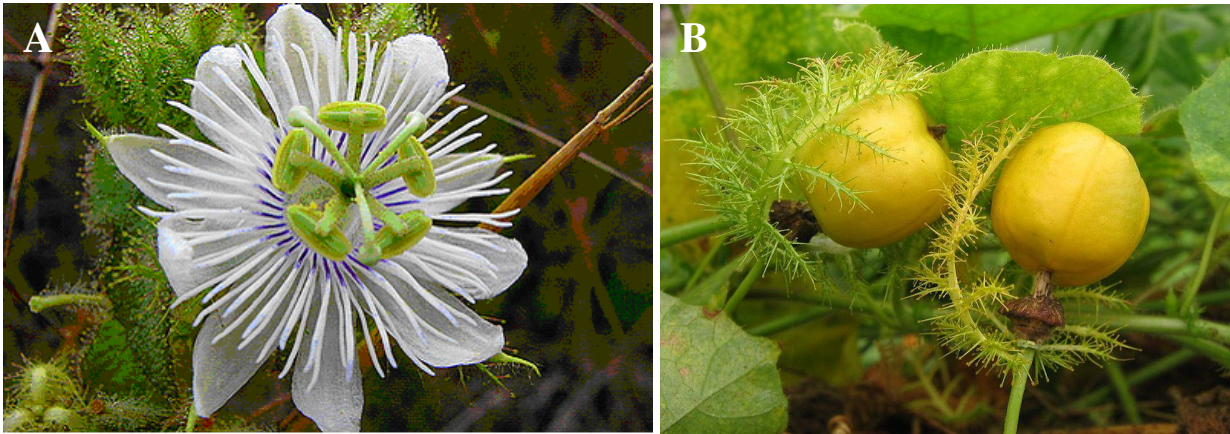


Figura 1. *Passiflora foetida* L. A) Flor. B) Fruto. <<http://www.plantsofperfection.com>> e http://en.wikipedia.org/wiki/Passiflora_foetida

Passiflora foetida é bastante utilizada na medicina popular e tem sido objeto de análises fitoquímicas e farmacológicas. Na medicina tradicional é utilizada no tratamento de insônia, ansiedade, doenças de pele e infecções em geral (NUNES; QUEIROZ, 2001). Seus principais fitoconstituintes são alcalóides, fenóis, flavonóides e glicosídeos (DHAWAN *et al.*, 2004). Além disso, estudos farmacológicos recentes descreveram atividade analgésica (CHAN BASHA *et al.*, 2008) e antibacteriana em extratos de folhas, frutos e raízes, confirmando seu uso popular no tratamento de diferentes tipos de infecção (MOHANASUNDARI *et al.*, 2007; CHAN BASHA *et al.*, 2008; BABY *et al.*, 2010).

Plantas de *P. foetida* apresentam ainda resistência ao desenvolvimento de pragas, como as lagartas da espécie *Dione juno juno* (BOIÇA JUNIOR *et al.*, 2008). Essa característica pode estar relacionada à presença de enzimas digestivas e substâncias como a ermanina, um flavonóide presente no líquido viscoso liberado pelos tricomas glandulares, que possui alto efeito repelente contra larvas de *D. juno*, conferindo defesa química e redução da predação de flores e frutos (ECHEVERRI *et al.*, 1991).

1.2 Cultura de tecidos de *Passiflora*

Os estudos de cultura de tecidos de *Passiflora* tiveram início nos anos 70, com a avaliação de diferentes composições de meio de cultura, visando ao estabelecimento de sistemas de regeneração e enraizamento para as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) e *P. mollissima* (MORAN ROBLES, 1978). Posteriormente, diversos protocolos foram desenvolvidos para o gênero, principalmente para as espécies cultivadas, por meio de diferentes vias de regeneração, em especial por organogênese.

Diferentes tipos de explantes foram utilizados, incluindo folhas (TREVISAN; MENDES, 2005; DORNELAS; VIEIRA, 1994; GLORIA *et al.*, 1999), hipocótilos (DORNELAS; VIEIRA, 1994; FARIA; SEGURA, 1997a), entrenós (BIASI *et al.*, 2000), ápices caulinares e segmentos nodais (DREW, 1991; FARIA; SEGURA, 1997b; MONTEIRO *et al.*, 2000a,b; REIS *et al.*, 2003), gavinhas e botões florais (PIPINO *et al.*, 2008), raízes (LOMBARDI *et al.*, 2007; DORNELAS; VIEIRA, 1994) e embriões zigóticos (GUERRA *et al.*, 2009).

A indução de organogênese em espécies de *Passiflora* é obtida preferencialmente em resposta às citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), isopenteniladenina (2ip), cinetina (KIN) e tidiazuron (TDZ), utilizadas isoladamente ou em combinação com as auxinas ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido indol-butírico (AIB) e ácido indol 3-acético (AIA) (MORAN ROBLES, 1978; DORNELAS; VIEIRA, 1994; FARIA; SEGURA, 1997b; MONTEIRO *et al.*, 2000a,b; RIBAS *et al.*, 2002; BECERRA *et al.*, 2004; TREVISAN; MENDES, 2005; PIPINO *et al.*, 2008). Por outro lado, a regeneração *in vitro* por meio de embriogênese somática somente foi descrita recentemente, a partir de embriões zigóticos de *P. cincinnata* cultivados em meio com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) e BAP (GUERRA *et al.*, 2009).

A modificação do meio de cultura também foi descrita para algumas espécies de *Passiflora*, visando à otimização da eficiência de regeneração. Com o objetivo de reduzir a ocorrência de clorose, um problema bastante comum, Monteiro *et al.* (2000a) propuseram alterações na composição salina do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com base na quantificação dos minerais em folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa* mantidas no campo. A adoção do meio MS modificado (MSM), que apresenta redução das concentrações de nitrogênio, potássio,

boro, zinco e aumento das concentrações de cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês, cobre, sódio e EDTA, além da eliminação de cloro e iodo, resultou na obtenção de plantas saudáveis e livres de clorose. Faria e Segura (1997b) também avaliaram o efeito da alteração da fonte de nitrogênio na produção de brotos adventícios a partir de folhas e hipocótilos de maracujá amarelo. Além disso, a adição de água de coco ao meio de cultura e a utilização do complexo vitamínico do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) resultaram em aumentos de 40 e 50%, respectivamente, na taxa de regeneração de brotos de *P. edulis* var. *flavicarpa* (DORNELAS; VIEIRA, 1994; RIBAS *et al.*, 2002; TREVISAN; MENDES, 2005).

Outro importante problema observado nas culturas *in vitro* de espécies de *Passiflora* é a oxidação causada pela produção de etileno. Reis *et al.* (2003), Trevisan & Mendes (2005) e Dias *et al.* (2009) propuseram diferentes alternativas para reduzir a produção e minimizar a ação do etileno, incluindo a realização de subculturas mais freqüentes, a utilização de frascos ventilados e a adição de inibidores da ação do etileno ao meio de cultura, como nitrato de prata.

O enraizamento dos brotos de maracujá obtidos *in vitro* é geralmente realizado em meio sem adição de reguladores de crescimento, com ou sem a redução da composição de sais minerais e vitaminas (DORNELAS; VIEIRA, 1994; MONTEIRO *et al.*, 2000a,b). A adaptação dos brotos às condições *ex vitro* é realizada utilizando-se como substrato areia ou vermiculita, não sendo obrigatória a produção de raízes *in vitro* para a eficácia do processo de aclimatização (DORNELAS; VIEIRA, 1994; FARIA; SEGURA, 1997b; RIBAS *et al.*, 2002).

Os principais trabalhos sobre cultura de tecidos de espécies de *Passiflora* encontram-se relacionados no Quadro 1.

Quadro 1 - Cultura de tecidos de espécies de *Passiflora*

Espécie	Explante	Reguladores de crescimento	Sistema de regeneração	Referência
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	ápice caulinar	Kin + AIA	amplificação meristemática	Drew, 1991
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	segmento nodal folha	2iP + AIA	organogênese direta e indireta	Drew, 1991
<i>P. alata</i> ; <i>P. caerulea</i> ; <i>P. mollissima</i> ; <i>P. coccinea</i> ; <i>P. herbertiana</i> ; <i>P. suberosa</i>	tecidos jovens de plantas germinadas <i>ex vitro</i>	Kin + AIA Kin + BAP + AIA 2iP + AIA	organogênese direta	Drew, 1991
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> <i>P. mollissima</i> ; <i>P. giberti</i> ; <i>P. maliformis</i> ; <i>P. amenthystina</i>	folha cotilédone hipocótilo raiz	BAP	organogênese direta	Dornellas & Vieira, 1994
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	ápice caulinar	BAP BAP + AIA	organogênese direta	Faria & Segura, 1997a
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	hipocótilo folha	BAP + AIA	organogênese direta	Faria & Segura, 1997b
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	folha	BAP	organogênese direta	Gloria <i>et al.</i> , 1999
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	entrenó	BAP	organogênese indireta	Biasi <i>et al.</i> , 2000
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	segmento nodal	BAP	organogênese direta	Monteiro <i>et al.</i> , 2000a
<i>P. suberosa</i>	folha	BAP	organogênese indireta	Monteiro <i>et al.</i> , 2000b
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	cotilédone	BAP	organogênese direta	Ribas <i>et al.</i> , 2002
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	ápice caulinar segmento nodal	Inibidores e precursores de etileno	organogênese	Reis <i>et al.</i> , 2003
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ; <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	ápice caulinar entrenó	BAP BAP + GA ₃	amplificação meristemática; organogênese	Isutsa, 2004
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	folha	BAP + Kin	organogênese	Becerra <i>et al.</i> , 2004
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	folha	TDZ BAP	organogênese direta	Trevisan & Mendes, 2005
<i>P. cincinnata</i>	folha raiz	BAP	Organogênese direta e indireta	Lombardi <i>et al.</i> , 2007
<i>P. coerulea</i> ; <i>P. costaricensis</i> ; <i>P. foetida</i> ; <i>P. quadrangularis</i> <i>P. trifasciata</i> ; <i>P. vitifolia</i> <i>P. watsoniana</i> ; <i>P. allardii</i>	segmento nodal botão floral gavinhas	BAP + AIA	organogênese direta e indireta	Pipino <i>et al.</i> , 2008
<i>P. cincinnata</i> Mast.	embriões zigóticos	2,4-D + BAP	embriogênese somática	Guerra <i>et al.</i> , 2009
<i>P. cincinnata</i> Mast. <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	hipocótilo	Inibidores e precursores de etileno	organogênese	Dias <i>et al.</i> , 2009
<i>P. alata</i>	hipocótilo	KIN + AgNO ₃	organogênese	Pinto <i>et al.</i> , 2010
<i>P. suberosa</i>	segmento nodal entrenó folha	BAP BAP + ANA	organogênese direta e indireta	Garcia <i>et al.</i> , 2010

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver sistemas de cultura de tecidos e conservação *in vitro* para *P. foetida* L.. Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer culturas primárias a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro*;
- Desenvolver sistemas de cultura *in vitro* a partir de explantes caulinares e radiculares excisados de plantas *in vitro*;
- Estabelecer protocolo de aclimatização para as plantas obtidas *in vitro*;
- Desenvolver protocolos de criopreservação por meio de vitrificação e encapsulamento-vitrificação.

3 METODOLOGIA

3.1 Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *P. foetida* foram fornecidas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e em Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro.

Foram utilizados os meios basais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MSM (MONTEIRO *et al.*, 2000a), contendo sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados, em diferentes concentrações, antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm).

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

3.2 Germinação *in vitro*

Para a germinação *in vitro*, 50 sementes de *P. foetida* foram lavadas com tween® 80% e água corrente, e descontaminadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,0% por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada estéril e distribuídas em placas de Petri entre duas camadas de três folhas de papel de filtro Whatman® n°1 umedecidas com solução de GA₃ a 2,5%, na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato, mantidas por cinco dias em câmara de crescimento (FERREIRA, 2005). Após esse período, as sementes foram escarificadas mecanicamente com o auxílio de bisturi, inoculadas em meio MS com metade da concentração de sais e vitaminas (MS ½) e transferidas para estufa B.O.D., onde foram mantidas sob regime de temperaturas alternadas (30°C por 8 horas e 20°C por 16 horas) e fotoperíodo de 16 horas (OSIPI; NAKAGAWA, 2005).

3.3 Estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos

Ápices caulinares e segmentos nodais foram excisados de plântulas axênicas com 30 dias obtidas a partir da germinação *in vitro* e inoculados em meio MSM ½ solidificado, para obtenção de culturas primárias. Plantas obtidas 60 dias após o início da cultura foram utilizadas como fontes de explantes para estabelecimento de diferentes sistemas *in vitro*.

3.3.1 Cultura de segmentos caulinares

Segmentos nodais (0,5 cm) e internodais (1,0 cm) foram inoculados em meio MSM sólido suplementado com diferentes concentrações ANA (5,4; 16,2; 26,9; 37,8; 54 μM), picloram (PIC) (4,14; 12,4; 20,7; 28,9; 41,4 μM) e TDZ (4,54; 13,2; 22,7; 31,8; 45,4 μM), além da utilização de BAP (4,4; 8,8; 13,2; 17,6; 22 μM) isoladamente ou em combinação com ANA (2,7; 5,4 μM). Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo que para cada tratamento foram inoculados quatro explantes por frasco (10 x 6 cm), em um total de cinco frascos. Os explantes foram mantidos na presença ou ausência de luz, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 dias. As frequências de regeneração e calogênese e o número médio de brotos por explante foram avaliados ao longo de 60 dias. Somente brotos $\geq 0,5$ cm foram considerados para a análise estatística.

Com base nas primeiras observações, a resposta de explantes internodais foi também estudada em meio MSM líquido suplementado com ANA (0; 0,5; 2,7; 5,4 μM) utilizando dois sistemas: i) imersão contínua sob agitação em mesa giratória orbital a 100 rpm, em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura; ii) pontes de papel de filtro, constituídas de discos de papel Whatman® nº1 (6 cm de diâmetro) apoiados sobre esferas de vidros (2 cm de diâmetro), em frascos (10 x 6 cm) contendo 30 mL de meio de cultura (SIMÕES, *et al.*, 2009). Em ambos os sistemas foram inoculados quatro explantes por frasco, totalizando cinco frascos por tratamento, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata. As frequências de regeneração de brotos, raízes e calogênese foram avaliadas após 30 dias do início da cultura. Os explantes utilizados no sistema de pontes de papel de filtro foram transferidos, após 30 dias de cultura, para o sistema de imersão contínua sob agitação, em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio MSM suplementado com a mesma concentração de ANA do tratamento anterior, onde permaneceram por mais 30 dias. Somente brotos $\geq 0,5$ cm foram considerados para a análise estatística.

3.3.2 Cultura de raízes

Regeneração a partir de explantes radiculares

Explantes radiculares (1,5 cm) contendo o ápice foram excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MSM líquido ou sólido suplementado com BAP (0; 0,4; 2,2; 4,4; 13,2; 22; 31; 44,4 μM) ou KIN (0; 0,4; 2,3; 4,6 μM). As gemas formadas foram transferidas para meio MSM sólido suplementado com BAP (0,4; 2,2; 4,4; 13,2; 22; 31; 44,4 μM), após 30 dias de cultivo. Foram utilizados cinco frascos, contendo quatro explantes por tratamento, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata. Os frascos com meio líquido foram mantidos sob agitação em uma mesa giratória orbital a 100 rpm, sob fotoperíodo de 16 horas. A frequência de regeneração foi avaliada 30 dias após início das culturas.

Multiplicação de raízes

Para avaliar a capacidade de multiplicação de raízes *in vitro*, foram utilizados segmentos radiculares (1,5 cm) excisados de plantas *in vitro* (regiões contendo ápice radicular, sem as raízes laterais). Os segmentos foram cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio MSM líquido suplementado com ANA (0; 0,54; 2,7; 5,4 μM), AIA (0; 0,57; 2,85; 5,7 μM) ou AIB (0; 0,5; 2,5; 5,0 μM). Os frascos foram vedados com dupla camada de papel alumínio e mantidos na presença ou ausência de luz, sob agitação em mesa giratória orbital a 100 rpm. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo inoculados seis explantes por frasco, em um total de seis repetições para cada tratamento. Após 30 dias de cultura, a produção de biomassa foi avaliada pela aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). A massa seca das raízes foi obtida após secagem a 45°C até o peso constante (SIMÕES *et al.*, 2009).

3.4 **Aclimatização**

Plantas completas com 60 dias de cultivo *in vitro* foram subcultivadas em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 1,5; 3 e 6%). Após 30 dias, as plantas foram retiradas dos frascos e submetidas à lavagem do sistema radicular para retirada do meio de cultura. Antes da transferência para condições *ex vitro*, foram realizadas medições das alturas das plantas, além do número de nós e de folhas. Em seguida, dez plantas de cada tratamento foram transferidas para bandejas de isopor contendo o substrato Plantmax® e mantidas por 60 dias em

câmara de vidro coberta com tampa de vidro (80 cm x 40 cm x 40 cm) a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa inicial entre 90 e 95%. Visando à redução da umidade relativa dentro das câmaras, a tampa foi gradualmente aberta após a segunda semana e completamente removida 30 dias após o transplante. Para a avaliação da eficiência do processo de aclimatização, foram avaliados a taxa de sobrevivência, a altura (cm), o número de nós e o número de folhas, durante um período total de 60 dias *ex vitro*.

3.5 Criopreservação de ápices caulinares

Plantas de *P. foetida* obtidas *in vitro* a partir de culturas primárias ou segmentos nodais foram utilizadas como fontes de explantes de ápices caulinares (0,1 a 0,3 cm) para o desenvolvimento de um protocolo de armazenamento em longo prazo por meio de criopreservação, utilizando as técnicas de vitrificação (SAKAI *et al.*, 1990) e encapsulamento-vitrificação (FABRE; DEREUDDRE, 1990).

3.5.1 Vitrificação

Ápices caulinares foram pré-cultivados em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com sacarose a 0,3 M por 24 horas, seguido por MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com sacarose a 0,75 M por 24 horas. Em seguida, os explantes foram expostos ou não à solução de *loading* (glicerol 2 M + sacarose a 0,4 M) por 20 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi transferido para as soluções crioprotetoras PVS2 (glicerol 30% + sacarose a 0,4 M + DMSO 15% + etilenoglicol 15%) ou PVS3 (glicerol 50% + sacarose 50%) e incubado por diferentes períodos (0, 30, 60, 120 ou 180 minutos), a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, visando à determinação da tolerância dos explantes à desidratação. Em seguida, cinco explantes submetidos a cada tratamento foram colocados em criotubos (2 mL) contendo 1 mL de PVS2 ou PVS3 e imersos em NL. Após o congelamento por 72 horas, os criotubos contendo os ápices caulinares foram descongelados em banho-maria a 40°C por 2 minutos. Imediatamente após o descongelamento, a solução crioprotetora foi substituída por meio MSM $\frac{1}{2}$ líquido contendo sacarose a 1,2 M. Após 20 minutos, a solução foi substituída gradualmente por meio MSM $\frac{1}{2}$ líquido. Os ápices caulinares foram então transferidos para o meio de recuperação (MSM $\frac{1}{2}$ sem suplementação hormonal ou com adição de BAP a $0,44 \mu\text{M}$) e incubados no escuro por 30 dias. Após este período, as culturas foram transferidas para a presença de luz.

As taxas de sobrevivência e recuperação de plantas, antes e após o congelamento em NL, foram avaliadas 30 dias após a transferência para a luz. Em todos os experimentos, foram utilizados dez ápices por tratamento e cada experimento foi repetido duas vezes.

3.5.2 Encapsulamento-vitrificação

Ápices caulinares (0,1 a 0,3 cm) foram pré-cultivados em meio MSM ½ suplementado com sacarose a 0,3 M por 24 horas. Em seguida, os explantes foram imersos em meio MS ausente de Ca^{2+} suplementado com alginato de sódio a 3%. Os ápices suspensos nessa solução foram gotejados em meio MS suplementado com cloreto de cálcio a 1,0 M, onde foram mantidos por 20 minutos. Após este período, as cápsulas já polimerizadas foram transferidas para meio MSM ½ líquido contendo 0,75 M de sacarose por 24 horas sob agitação (100 rpm) e incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, amostras de dez cápsulas foram colocadas em criotubos (2 mL) e expostas às soluções crioprotetoras (PVS2 ou PVS3) por 30, 60, 120 ou 180 minutos. Após o tempo determinado, a solução foi removida, seguindo-se a adição de 1 mL da mesma solução crioprotetora. Em seguida, os criotubos foram diretamente imersos em NL. Após o congelamento por 72 horas, os criotubos contendo os ápices caulinares foram descongelados em banho-maria a 40°C por 2 minutos. Após o descongelamento, as cápsulas foram retiradas dos criotubos, transferidas para o meio de recuperação (MSM ½ sem suplementação hormonal ou com adição de BAP a $0,44 \mu\text{M}$) e mantidas no escuro por 30 dias. Após este período, as culturas foram transferidas para condições padrão de cultura.

As taxas de sobrevivência e recuperação de plantas, antes e após o congelamento em NL, foram avaliadas 30 dias após a transferência para a luz. Em todos os experimentos, foram utilizados dez ápices por tratamento e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes.

3.6 **Análise estatística**

A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação Tukey-Kramer, utilizando o programa *Graphpad InStat*. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos

4.1.1 Estabelecimento de culturas primárias a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro*

O processo germinativo *in vitro* de *P. foetida* ocorreu com porcentagem de 53,3%, com formação de plântulas normais após 30 dias de cultura em meio MS ½. A emissão da radícula e o desenvolvimento da parte aérea foram observados entre o 7º e 21º dias após a sementeadura, respectivamente. As plântulas apresentaram o desenvolvimento de longos hipocótilos, com a formação de poucos segmentos nodais (Figura 2 - A).

Ápices caulinares e segmentos nodais excisados das plantas obtidas foram inoculados em meio MSM ½ para o estabelecimento de culturas primárias, 30 dias após a sementeadura (Figura 2 - B). Os explantes apresentaram freqüências de regeneração de 100%, com a produção de $1,51 \pm 0,3$ e $1,3 \pm 0,1$ brotos, respectivamente, após 60 dias de cultura.

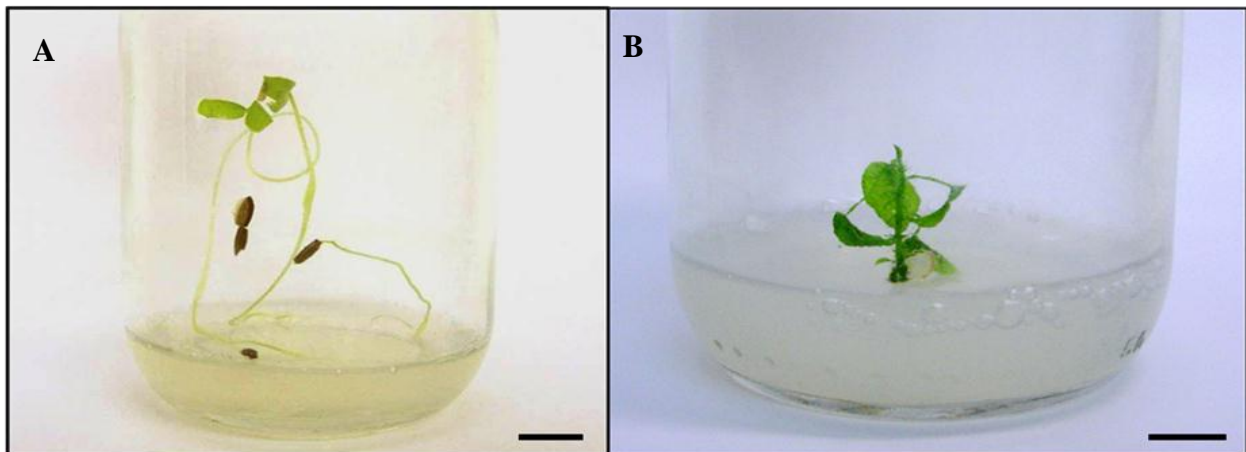


Figura 2. Morfogênese *in vitro* de *P. foetida*. A) Plântulas normais derivadas da germinação *in vitro* de sementes de *P. foetida* em meio MS ½, 30 dias após a sementeadura; B) Regeneração *in vitro* a partir de ápice caulinar excisado de plântula derivada da germinação *in vitro*, após 60 dias de cultura em meio MSM ½. Barra = 1cm.

4.1.2 Cultura de segmentos caulinares

Segmentos nodais e internodais excisados das culturas primárias e cultivados em meio MSM sólido suplementado com diferentes concentrações de BAP, ANA, PIC ou TDZ, além de diferentes combinações de BAP e ANA apresentaram a produção de brotos e raízes, como também indução de calogênese, de acordo com o tipo e a concentração do regulador de crescimento testado e da condição de cultura utilizada.

A formação de brotos a partir de explantes caulinares ocorreu em resposta a baixas concentrações de BAP, por diferentes vias de regeneração. Segmentos nodais cultivados em meio MSM suplementado com BAP a 4,4 e a 13,2 μM , na presença de luz, apresentaram a produção de brotos por desenvolvimento meristemático ($1,0 \pm 0,4$ e $1,2 \pm 0,9$ brotos por explante, respectivamente) após 15 dias de cultura, com a posterior formação de calos na base dos explantes (Tabela 1). Após o 45º dia de cultura, foi obtida a produção de gemas na superfície dos calos, com o desenvolvimento de brotos por organogênese indireta ($1,5 \pm 0,3$ e $2,25 \pm 0,5$ brotos por explante, respectivamente). Segmentos nodais cultivados na ausência de luz deram origem a brotos estiolados por amplificação meristemática, em resposta a todas as concentrações de BAP testadas.

Tabela 1. Formação de brotos por desenvolvimento meristemático a partir de segmentos nodais de *P. foetida* inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

Concentração de BAP (μM)	Claro		Escuro	
	Formação de brotos (%)	Brotos / explante *	Formação de brotos (%)	Brotos / explante *
4,4	70	$1,0 \pm 0,4^a$	91,6	$1,4 \pm 0,2^a$
13,2	50	$1,2 \pm 0,9^a$	25	$1,2 \pm 0,2^a$
22	0	0	8,3	$1,0 \pm 0,1^a$
31	0	0	33,3	$1,1 \pm 0,4^a$
44,4	0	0	41,7	$1,0 \pm 0,3^a$

* Os valores correspondem à média \pm erro padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Segmentos internodais cultivados em meio suplementado com BAP a 4,4 e a 13,2 μM , na presença de luz, apresentaram a formação de gemas, com posterior desenvolvimento de brotos por organogênese direta ($2,4 \pm 0,5$ e $1,2 \pm 0,3$ brotos por explante), em porcentagens de 100 e 60%, respectivamente, após 60 dias de cultura (Tabela 2). Na presença de BAP a 4,4 μM foi também observada a formação de calos nas extremidades dos explantes, com produção de brotos por organogênese indireta ($3,33 \pm 1,2$ brotos por explante) após 60 dias de cultura (Figura 3 - A). Por outro lado, entrenós cultivados na ausência de luz, na presença de BAP a 4,4 e a 13,2 μM apresentaram o desenvolvimento de calos mistos, com interior compacto e superfície friável, e posterior formação de brotos estiolados por organogênese indireta ($1,3 \pm 0,8$ e $1,0 \pm 0,3$ brotos por explante, respectivamente).

Tabela 2. Organogênese direta a partir de segmentos internodais de *P. foetida* inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultura.

Concentração de BAP (μM)	Claro		Escuro	
	Formação de brotos (%)	Brotos / explante *	Formação de brotos (%)	Brotos / explante *
4,4	100	$2,4 \pm 0,5^a$	50	$1,2 \pm 0,5^a$
13,2	60	$1,2 \pm 0,3^a$	16,7	$1,0 \pm 0,2^a$
22	0	0	0	0
31	0	0	0	0
44,4	0	0	0	0

* Os valores correspondem à média \pm erro padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Explantos caulinares cultivados na presença de ANA utilizado isoladamente apresentaram morfogênese apenas em resposta às concentrações mais baixas (5,4 e 16,2 μM), independente da presença de luz (Tabela 3). A formação de raízes a partir desses explantes ocorreu após o 15º dia de cultura, com posterior formação de calos mistos, após 30 dias de cultura (Figura 3 - B). Por outro lado, em meio suplementado com diferentes concentrações de ANA e BAP, a formação de raízes ocorreu em frequências distintas (80 a 16%), de acordo com a condição de cultura e a combinação de reguladores de crescimento testada (Tabela 3). A calogênese, no entanto, ocorreu em resposta a todas as combinações de BAP e ANA e condições de cultura testadas (Tabela 3, Figura 3 - D).

Tabela 3. Morfogênese *in vitro* a partir de explantes caulinares de *P. foetida* inoculados em meio MSM suplementado com diferentes combinações de ANA com BAP, após 60 dias de cultura.

ANA (μM)	BAP (μM)	Segmentos nodais				Segmentos internodais			
		Claro		Escuro		Claro		Escuro	
		Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)
5,4	0	90	100	30	100	70	100	50	100
16,2		10	100	10	100	20	100	40	100
26,9		0	0	0	0	0	0	0	0
37,9		0	0	0	0	0	0	0	0
54		0	0	0	0	0	0	0	0
	4,4	16	100	0	100	80	100	0	100
	13,2	50	100	0	100	30	100	0	100
2,7	22	40	100	0	100	20	100	0	100
	31	0	100	0	100	40	100	0	100
	44,4	0	100	0	100	30	100	0	100
	4,4	20	50	50	50	0	100	10	100
	13,2	0	100	0	100	40	100	60	100
5,4	22	0	100	0	100	20	100	80	100
	31	0	100	0	100	0	100	80	100
	44,4	0	100	0	100	0	100	30	100

Explantos caulinares cultivados na presença de TDZ apresentaram a formação de calos mistos, esverdeados, em um percentual entre 80 e 100%, em ambas as condições de incubação utilizadas. Na presença de luz foi observada ainda a formação de gemas na superfície desses calos, após 30 dias de cultura, com o início do desenvolvimento de brotos (Figura 3 - C). No entanto, esses brotos não apresentaram desenvolvimento posterior. Na presença de PIC, os explantes apresentaram a formação de calos friáveis esbranquiçados, não-morfogênicos, em frequências de 100%, em resposta a todas as concentrações testadas e às condições de incubação utilizadas (Figura 3 - E).

Segmentos internodais cultivados sobre pontes de papel de filtro (Figura 4 - A, B, C) ou em imersão contínua (Figura 4 - D, E, F) apresentaram formação de raízes adventícias a partir do 10º dia de cultura em meio MSM líquido suplementado com ANA. Entretanto, a maior capacidade proliferativa foi observada a partir de explantes cultivados no sistema de pontes de papel de filtro.

A multiplicação de raízes obtidas a partir dos segmentos internodais cultivados em ambos os sistemas testados aumentou proporcionalmente à concentração de ANA utilizada, uma vez que a maior capacidade proliferativa foi observada em resposta à concentração 5,4 µM (Figura 4 - C, F). Foi observada ainda a produção de brotos por organogênese direta ($1,25 \pm 0,28$ brotos por explante) a partir de segmentos internodais cultivados no sistema de pontes de papel de filtro, em frequências de 100%, após 30 dias de cultura em meio suplementado com ANA a 0,54 µM (Figura 4 - A). A transferência das raízes adventícias produzidas no sistema de pontes de papel de filtro para o sistema de imersão contínua induziu um aumento na capacidade proliferativa na presença de ANA a 5,4 µM, além da produção de brotos ($2,31 \pm 0,32$ brotos por explante) via organogênese direta, na presença de ANA a 0,54 µM (Figura 5 - A, B, C).

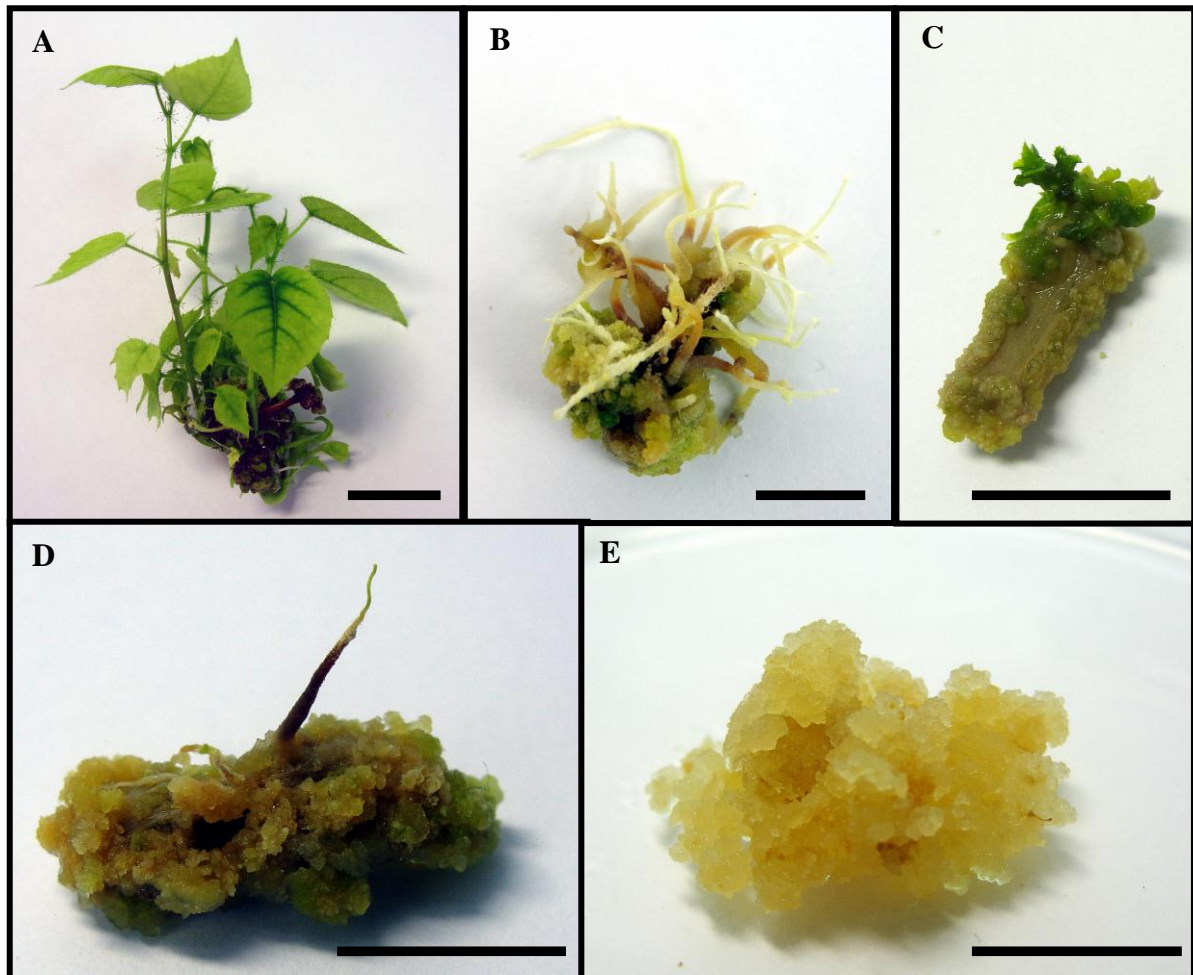


Figura 3. Morfogênese *in vitro* de *P. foetida* a partir de explantes caulinares excisados de culturas primárias. A) Organogênese direta e indireta obtida a partir de entrenó cultivado em meio MSM suplementado com BAP 4,4 μM , na presença de luz, após 60 dias de cultura; B) Formação de raízes a partir de entrenó cultivado em meio MSM suplementado com ANA 5,4 μM , na presença de luz, após 60 dias de cultura; C) Formação de gemas e brotos a partir de entrenó cultivado em meio MSM suplementado com TDZ 4,54 μM , na presença de luz, após 30 dias de cultura; D) Calo misto, com formação de raízes adventícias a partir de entrenó cultivado em meio MSM suplementado com ANA 5,4 μM em combinação com BAP 22 μM , na presença de luz, após 60 dias de cultura; E) Calo friável formado a partir de segmento nodal cultivado em meio MSM suplementado com PIC 41,4 μM , na ausência de luz, após 30 dias de cultura. Barra = 1cm.

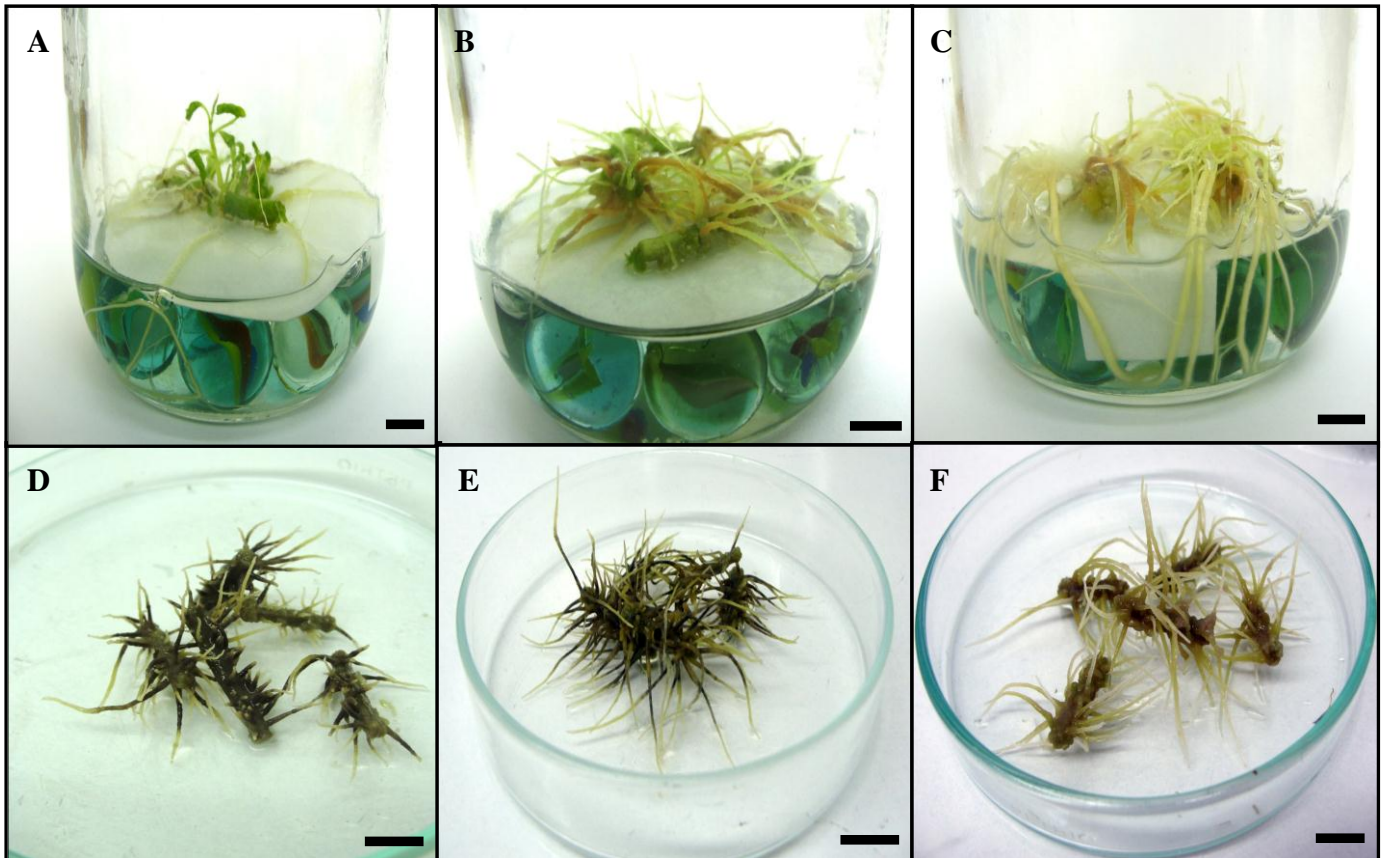


Figura 4. Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos internodais de *P. foetida* após 30 dias em diferentes sistemas de cultura. A) Explantes mantidos sobre pontes de papel de filtro em meio MSM líquido suplementado com ANA a $0,54 \mu\text{M}$; B) Explantes mantidos sobre pontes de papel de filtro em meio MSM líquido suplementado com ANA a $2,7 \mu\text{M}$; C) Explantes mantidos sobre pontes de papel de filtro em meio MSM líquido suplementado com ANA a $5,4 \mu\text{M}$; D) Explantes mantidos em imersão contínua, sob agitação, em meio MSM líquido suplementado com ANA a $0,54 \mu\text{M}$; E) Explantes mantidos em imersão contínua, sob agitação, em meio MSM líquido suplementado com ANA a $2,7 \mu\text{M}$; F) Explantes mantidos em imersão contínua, sob agitação, em meio MSM líquido suplementado com ANA a $5,4 \mu\text{M}$. Barra = 1 cm.

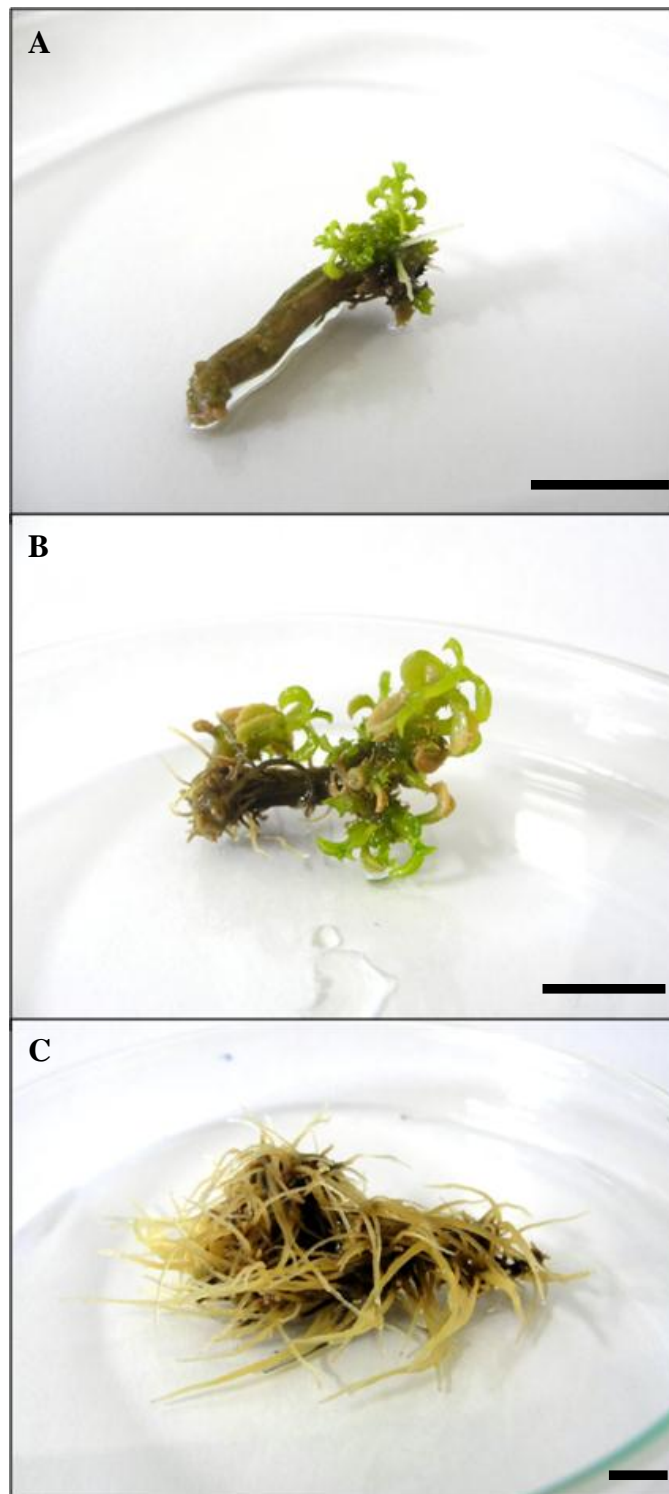


Figura 5. Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos internodais de *P. foetida* cultivados por 30 dias no sistema de pontes de papel de filtro e, em seguida, transferidos para o sistema de imersão contínua por mais 30 dias de cultura. A) Meio MSM suplementado com ANA a $0,54 \mu\text{M}$; B) Meio MSM suplementado com ANA a $2,7 \mu\text{M}$; C) Meio MSM suplementado com ANA a $5,4 \mu\text{M}$. Barra = 1 cm.

4.1.3 Cultura de raízes

Regeneração a partir de explantes radiculares

Segmentos radiculares cultivados em meio MSM sólido suplementado com diferentes concentrações de KIN apresentaram intensa oxidação e necrose após o 15º dia de cultura. Por outro lado, explantes cultivados em meio MSM sólido suplementado com diferentes concentrações de BAP apresentaram a formação de gemas na superfície dos explantes após 15 dias de cultura (Figura 6 - A). No entanto, mesmo com a transferência das gemas para diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultura, não foi observado o desenvolvimento das gemas em brotos (Figura 6 - B).

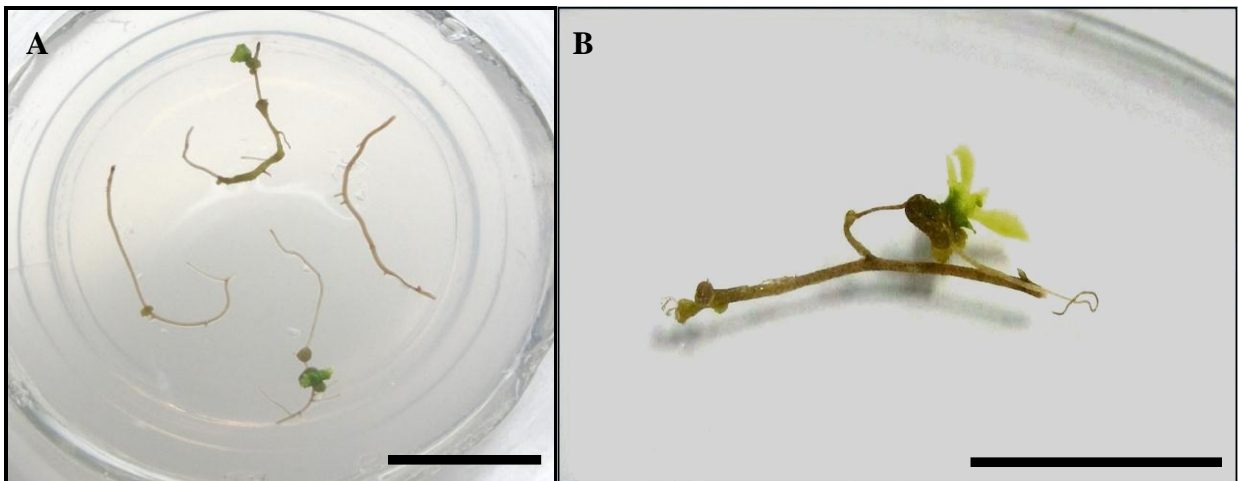


Figura 6. Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos radiculares de *P. foetida* cultivados em meio MSM suplementado com BAP a 4,4 μ M. A) Formação de gemas após 15 dias de cultura; B) Mesmos explantes após 30 dias de cultura. Barra = 1cm.

Multiplicação de raízes

Segmentos radiculares obtidos a partir de raízes de plantas *in vitro* e cultivados em meio MSM líquido suplementado com diferentes concentrações de ANA, AIA e IBA e mantidos sob agitação, na presença ou ausência de luz apresentaram multiplicação de raízes após 30 dias de cultura. A formação das raízes adventícias teve início após sete dias de cultura, com intensa proliferação após o 15º dia de cultura. As raízes neoformadas eram curtas e apresentavam diâmetro aumentado (Figuras 7 - A, B). Explantes cultivados na presença de ANA apresentaram um aumento significativo de biomassa, principalmente na presença de luz (Figura 8 - A). A maior produção de biomassa foi observada em resposta a ANA a 5,4 μM (Figura 8 - A). Por outro lado, não foi observada uma proliferação significativa a partir de explantes radiculares cultivados na presença dos outros reguladores de crescimento testados (Figura 8 - B, C).

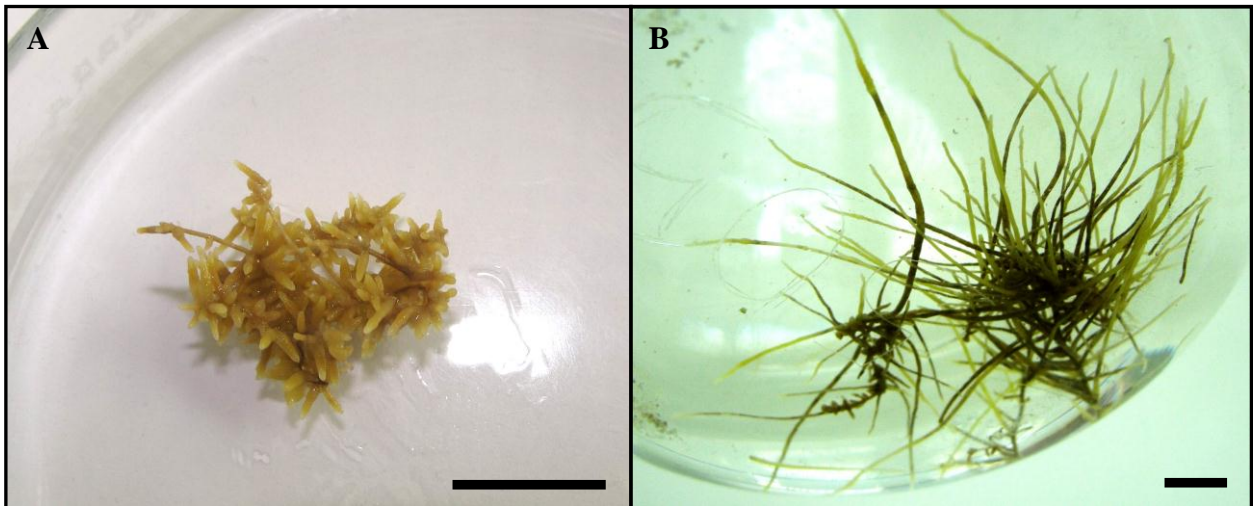


Figura 7. Formação de raízes adventícias a partir de segmentos radiculares de *P. foetida* cultivados em meio MSM líquido suplementado com ANA 5,4 μM , após 30 dias de cultura de incubação na presença (A) ou ausência (B) de luz. Barra = 1 cm.

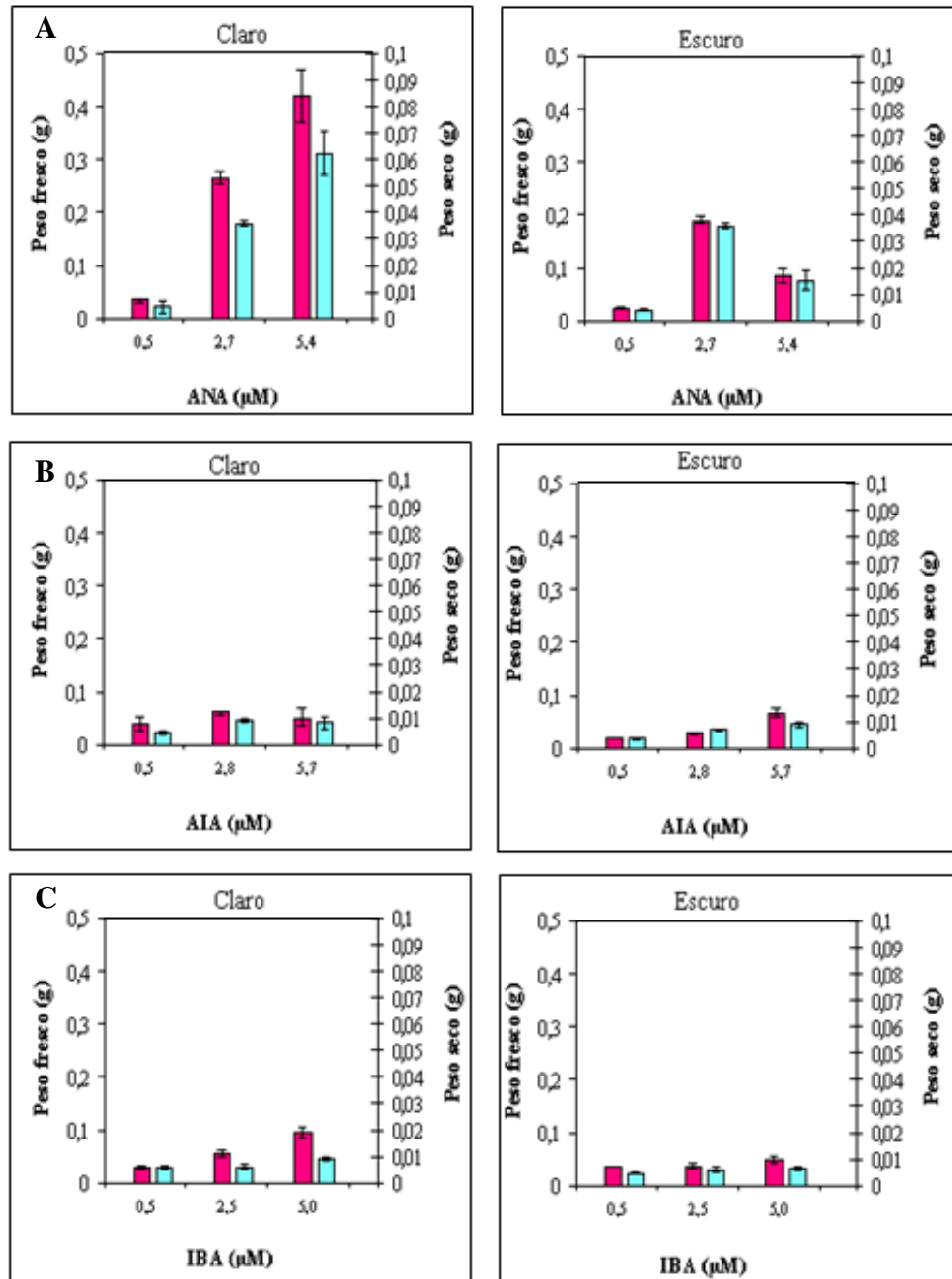


Figura 8. Acúmulo de biomassa a partir de segmentos radiculares de *P. foetida* inoculados em meio MSM líquido suplementado com diferentes concentrações de ANA, AIA e IBA, após 30 dias de cultura. A) Culturas obtidas na presença de ANA; B) Culturas obtidas na presença de AIB; C) Culturas obtidas na presença de IBA. ■ PF – peso fresco, ■ PS – peso seco.

4.2 Aclimatização

Plantas *in vitro* de *P. foetida* foram cultivadas em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 1,5; 3; 6 %) por quatro semanas antes da transferência para condições *ex vitro*. O aumento da concentração de sacarose no meio de cultura estimulou o crescimento e a formação de raízes *in vitro*. As plantas cultivadas em sacarose a 3 e 6% apresentaram maior média de altura, de número de nós e de raízes, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Além do desenvolvimento *in vitro* ter sido influenciado pela concentração de sacarose no meio de cultura, foi também observada uma diferença significativa na frequência de sobrevivência e no desenvolvimento *ex vitro* das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 10). Plantas obtidas *in vitro* em meio suplementado com sacarose a 6% apresentaram as maiores taxas de sobrevivência (75%) e desenvolvimento *ex vitro* (Figuras 9 e 10), enquanto que plantas cultivadas em meio sem sacarose apresentaram as menores frequências de sobrevivência *ex vitro* (20%) (Figuras 10).

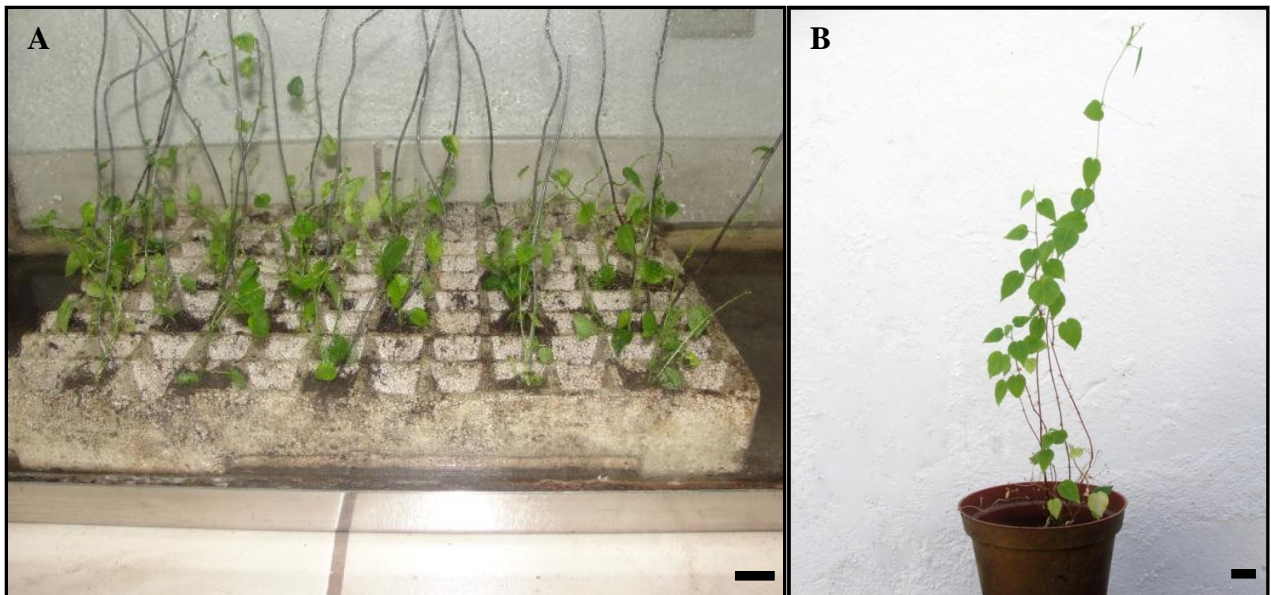


Figura 9. Plantas de *P. foetida* cultivadas *in vitro* em meio MSM $\frac{1}{2}$ com sacarose a 6% e transplantadas para Plantmax®. A) Após 15 dias em condições *ex vitro*; B) Após 60 dias em condições *ex vitro*. Barra = 1cm.

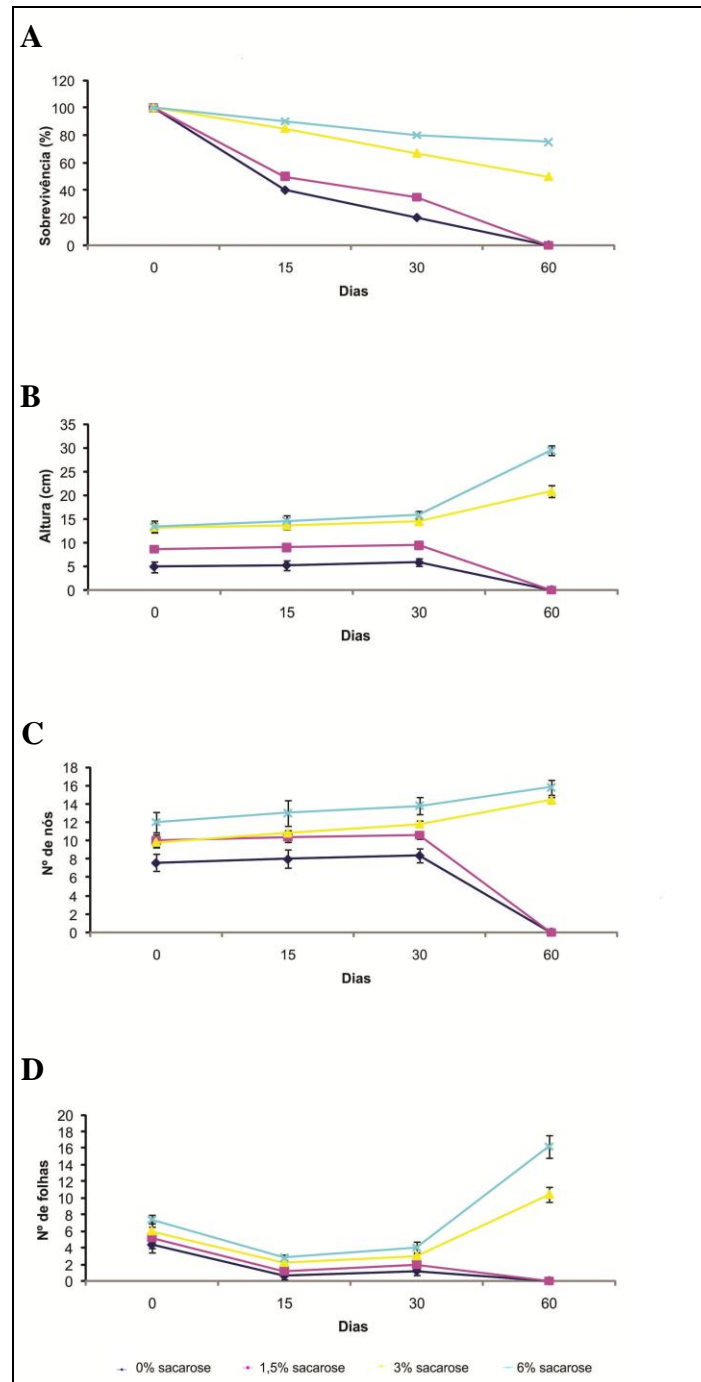


Figura 10. Influência do pré-tratamento *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose no processo de aclimatização de *P. foetida*, após 60 dias *ex vitro*. A) Sobrevivência; B) Altura; C) Número de nós; D) Número de folhas.

4.3 Criopreservação

4.3.1 Vitrificação

Ápices caulinares de *P. foetida* pré-cultivados em altas concentrações de sacarose, expostos ou não à solução de *loading* e às soluções de vitrificação PVS2 ou PVS3, por diferentes períodos, apresentaram frequências de recuperação de 100%, com o desenvolvimento de brotos normais, após 30 dias de cultura (Figura 11).

Apesar das altas taxas de recuperação observadas a partir dos controles não-criopreservados, explantes submetidos aos mesmos tratamentos não apresentaram recuperação após imersão em NL, independente do meio de recuperação testado. Como todos os explantes apresentaram oxidação após a transferência imediata para as condições padrão de cultura, os ápices descongelados e reidratados foram mantidos no escuro por um período de 30 dias, antes da transferência para condições padrão de cultura. No entanto, os explantes apresentaram intensa oxidação e necrose 15 dias após a transferência para a presença de luz (dados não mostrados).



Figura 11. Ápices caulinares de *P. foetida* submetidos a tratamentos de pré-congelamento (pré-cultura em altas concentrações de sacarose e exposição às soluções de *loading* e PVS2) e cultivados em meio MSM $\frac{1}{2}$ por 30 dias. A) Controle positivo; B) Explante pré-cultivado em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com sacarose a 0,75M; C) Explante pré-cultivado e exposto à solução de *loading* por 20 minutos; D) Explante exposto à PVS2 por 30 minutos, após pré-cultura em sacarose e incubação em solução de *loading*; E) Explante exposto à PVS2 por 60 minutos, após pré-cultura em sacarose e incubação em solução de *loading*; F) Explante exposto a PVS3 por 30 minutos, após pré-cultura em sacarose. Barra = 1cm.

4.3.2 Encapsulamento-vitrificação

Ápices caulinares de *P. foetida* pré-cultivados, encapsulados e expostos às soluções de vitrificação PVS2 ou PVS3 por diferentes períodos apresentaram freqüências de recuperação de 100%, com o desenvolvimento de brotos normais, após 30 dias de cultura (Figura 12 - A, B). Após o congelamento em NL, os explantes foram reidratados, inoculados em meios de recuperação e incubados na ausência de luz por 30 dias, antes da transferência para condições padrão de cultura.

As maiores freqüências de recuperação pós-congelamento (60% e 40%) foram observadas a partir de ápices caulinares expostos à solução de vitrificação PVS2 por 120 e 180 minutos, respectivamente, e inoculados em meio MSM ½ suplementado com BAP a 0,44 µM após o descongelamento (Tabela 4; Figura 12 - C). A cultura dos explantes criopreservados em meio MSM ½ sem suplementação hormonal resultou em menores taxas de recuperação, independente do tratamento pré-congelamento utilizado (Tabela 4). Ápices caulinares encapsulados e expostos à solução de vitrificação PVS3 não apresentaram recuperação pós imersão em NL (Tabela 4).

As plantas obtidas a partir dos ápices criopreservados apresentaram desenvolvimento normal após 60 dias de cultura (Figura 12 - D). Contudo, foi observada uma redução na velocidade de crescimento quando comparadas ao controle positivo.

Tabela 4 – Recuperação de ápices caulinares de *P. foetida* a partir da técnica de encapsulamento-vitrificação, após pré-cultura e exposição à solução PVS2, cultivados em meio MSM ½.

Solução de vitrificação	Tempo de exposição à solução de vitrificação	Meio de recuperação			
		MSM ½		MSM ½ + BAP a 0,44 µM	
		LN- (%)	LN+ (%)	LN- (%)	LN+ (%)
PVS2	0	100	0	100	0
	30	100	0	100	0
	60	100	0	100	0
	120	100	20	100	60
	180	100	20	100	40
PVS3	0	100	0	100	0
	30	100	0	100	0
	60	100	0	100	0
	120	100	0	100	0
	180	100	0	100	0

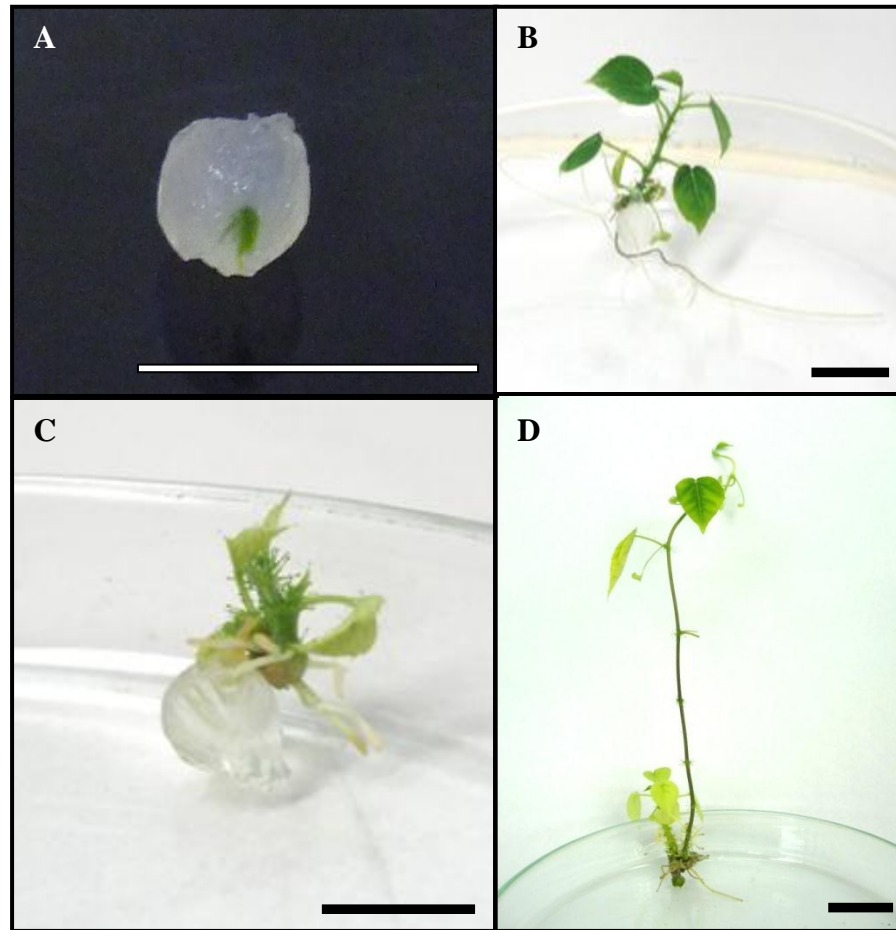


Figura 12. Criopreservação de ápices caulinares de *P. foetida*. A) Ápice caulinar em cápsula de alginato de cálcio; B) Explante encapsulado e pré-cultivado em sacarose a 0,75M, após 30 dias de cultura em meio MSM ½; C) Broto obtido a partir de ápice caulinar criopreservado e cultivado por 30 dias em meio MSM ½ suplementado com BAP a 0,44 μ M, após exposição à PVS2 por 120 minutos; D) Planta obtida a partir de ápice caulinar criopreservado e cultivado por 60 dias em meio MSM ½ suplementado com BAP a 0,44 μ M, após exposição à PVS2 por 120 minutos. Barra = 1cm.

5 DISCUSSÃO

A conservação de espécies silvestres de *Passiflora* é fundamental para o melhoramento do maracujazeiro. Entretanto, a conservação sob a forma de sementes apresenta algumas limitações, já que algumas espécies apresentam exigências muito particulares para se desenvolver, sendo extremamente difíceis de germinar em condições de laboratório (BERNACCI *et al.*, 2005). Além disso, estudos sobre o comportamento de sementes de *Passiflora* são ainda insuficientes para permitir sua conservação adequada em bancos. Muitas espécies produzem sementes com comportamento intermediário, já que toleram a desidratação, embora não suportem o armazenamento em baixas temperaturas. Outras apresentam comportamento recalcitrante, não tolerando baixos níveis de desidratação e temperatura abaixo de zero. Dessa forma, o uso de estratégias de conservação *in vitro* possui grande importância como medida complementar para a manutenção e aumento da disponibilidade do germoplasma potencialmente útil. Nesse contexto, deve ser ressaltado que o estabelecimento prévio de sistemas de cultura *in vitro* é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de metodologias de conservação de germoplasma em longo prazo (ENGELMANN, 1991). Neste trabalho, foram desenvolvidas metodologias de cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *P. foetida*, uma espécie silvestre que possui potencial ornamental e medicinal, sendo utilizada popularmente no tratamento de insônia, ansiedade, doenças de pele e infecções em geral (NUNES; QUEIROZ, 2001).

Para a determinação dos parâmetros que afetam a morfogênese *in vitro*, culturas primárias de *P. foetida* foram obtidas a partir de ápices caulinares e segmentos nodais excisados de plantas derivadas da germinação *in vitro*. A utilização de plantas *in vitro* como fonte de explantes para o estabelecimento de culturas primárias é considerada uma estratégia adequada para minimizar as injúrias causadas pelo processo de descontaminação, o que pode danificar tecidos mais sensíveis, levando à oxidação (PASSOS; BERNACCI, 2005). Além disso, o material obtido *in vitro* pode fornecer uma grande quantidade de explantes fisiologicamente uniformes.

Diferentes padrões morfogenéticos, incluindo a formação de brotos, calos e raízes adventícias, foram observados em frequências distintas, a partir dos explantes caulinares e radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. foetida*. Segmentos caulinares deram origem a brotos, calos ou raízes adventícias, de acordo com o regulador de crescimento utilizado. A

produção de plantas via organogênese direta e indireta foi observada em resposta a BAP, enquanto que a formação de calos não morfogênicos foi observada a partir de segmentos nodais e internodais em resposta a PIC e TDZ. A formação de brotos por organogênese indireta a partir de botões florais de *P. foetida* foi descrita anteriormente por Pipino *et al.* (2008). Entretanto, as taxas de formação de brotos a partir desses explantes foram significativamente mais baixas que as observadas a partir do cultivo de segmentos internodais observadas neste trabalho.

A produção de raízes adventícias foi observada a partir de segmentos caulinares de *P. foetida*, em resposta a meio suplementado com ANA. Tendo em vista a grande capacidade de proliferação de raízes observada em meio sólido, segmentos internodais foram inoculados em meio líquido suplementado com diferentes auxinas, mantidos em imersão contínua, sob agitação ou sobre pontes de papel de filtro. O protocolo mais eficiente para a multiplicação de raízes *in vitro* de *P. foetida* foi o cultivo de explantes caulinares em meio líquido suplementado com ANA, principalmente no sistema de pontes de papel de filtro. Embora, os explantes cultivados no sistema de imersão contínua também tenha produzido raízes. A transferência do material obtido em pontes de papel de filtro para o sistema de imersão contínua resultou na multiplicação das raízes e regeneração de brotos, de acordo com a concentração de regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura. Entretanto, todos os brotos e raízes neoformados apresentaram sintomas de hiperhidricidade.

A capacidade dos tecidos para formação de raízes depende de vários fatores endógenos e exógenos e suas interações. O papel das auxinas na indução e no desenvolvimento de raízes tem sido bastante estudado, em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar (LOPES *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2005). Entretanto, para muitas espécies, a proliferação de raízes *in vitro* é feita através da transformação mediada pela *Agrobacterium rhizogenes* (POTRYKUS; SPANGENBERG, 1995), a qual é usada como vetor para a transferência de genes e para a produção de raízes. As culturas de raízes transformadas geneticamente, também chamadas de *hairy roots*, representam uma das alternativas mais promissoras para a produção de compostos economicamente importantes, a regeneração de plantas transgênicas com características fenotípicas desejáveis, o incremento da biomassa radicular em plantas que apresentam dificuldade de enraizamento, a produção de enzimas comercialmente importantes e estudos do metabolismo (GEORGIEV *et al.*, 2007; VEENA; TAYLOR, 2007). No presente trabalho, um sistema de multiplicação de raízes de *P. foetida* foi obtido sem transformação. A produção de

raízes não transformadas é mais desejável, uma vez que ocorre a multiplicação celular sem que haja alteração no genoma da planta (MARTIN *et al.*, 2008).

Segmentos radiculares de *P. foetida* foram utilizados como explantes visando à regeneração de plantas. O desenvolvimento de um protocolo de regeneração de brotos a partir de explantes radiculares é uma alternativa adequada para a multiplicação *in vitro*, uma vez que esses órgãos são de fácil manipulação e não requerem a perda da planta doadora (FRANKLIN *et al.*, 2004). Entretanto, neste trabalho, a regeneração *in vitro* a partir de segmentos radiculares de *P. foetida* não foi obtida, embora tenha sido observada a formação de gemas a partir dos explantes cultivados em meio suplementado com BAP. Um importante fator para a proliferação de brotos a partir de explantes radiculares de *C. rosea* observado por Simões *et al.* (2009) foi a alta concentração de nitrato no meio de cultura. Sudha *et al.* (2000) observaram que somente as partes clorofiladas de explantes radiculares de *Holostemma anular* apresentaram capacidade de produção de brotos.

O potencial de multiplicação *in vitro* a partir de segmentos radiculares de *P. foetida* também foi avaliado. O maior acúmulo de biomassa foi observado a partir de explantes cultivados em meio MSM líquido suplementado com ANA. Contudo, a capacidade proliferativa desses explantes foi mais baixa que a observada em explantes internodais cultivados em meio líquido suplementado com ANA a 5,4 μM , em sistema de pontes de papel de filtro. Resultados semelhantes foram obtidos por Sudha & Seenii (2001) no cultivo de raízes a partir de explantes caulinares de *Decalepis arayalpathra* em meio MS contendo uma combinação de BAP, 2iP e ANA.

Brotos de *P. foetida* obtidos *in vitro* foram isolados, transferidos para meio de alongamento e enraizamento e, em seguida, transferidos para condições *ex vitro*. A aclimatização é considerada uma etapa fundamental para a micropropagação e para sistemas de conservação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Durante o processo de adaptação às condições *ex vitro*, as plantas derivadas da cultura *in vitro* passam por alterações anatômicas e fisiológicas que podem levar a baixas taxas de sobrevivência após o transplântio (DENG; DONNELLY, 1993). Dessa forma, neste trabalho foram desenvolvidas metodologias de aclimatização para plantas de *P. foetida* obtidas *in vitro*, visando à sua adaptação ao ambiente *ex vitro*.

Um dos fatores de maior importância em processos de aclimatização é o estado fisiológico das plantas imediatamente antes do transplântio, o que pode influenciar a capacidade

de sobrevivência e o desenvolvimento da planta *ex vitro*. Segundo Gribaudo *et al.* (2001), pré-tratamentos *in vitro* durante a última etapa da micropropagação são de fundamental importância para um estabelecimento eficiente *ex vitro*. Um dos pré-tratamentos *in vitro* mais utilizados é a adição de diferentes concentrações de sacarose na última subcultura. De acordo com alguns autores, a indução da nutrição autotrófica durante a cultura *in vitro* por meio da retirada completa ou parcial da sacarose do meio de cultura é de fundamental importância para um eficiente estabelecimento *ex vitro* (ANDRADE, 1998). Contudo, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a indução da nutrição autotrófica *in vitro* não foi benéfica para a aclimatização de *P. foetida*, já que as plantas cultivadas *in vitro* em meio sem sacarose não produziram raízes e apresentaram baixa taxa de sobrevivência nas condições *ex vitro*.

Por outro lado, segundo Calvete *et al.* (2002), o aumento da disponibilidade de sacarose no meio de cultura possibilita às plantas acumularem mais reservas na forma de amido, o qual seria fundamental durante os primeiros dias de adaptação ao ambiente *ex vitro*. Skrebsky *et al.* (2004) também relataram que o aumento da concentração de sacarose na última etapa *in vitro* foi essencial para estimular o crescimento e a formação de raízes *ex vitro* de *Pfaffia glomerata*, uma planta medicinal. Neste trabalho, o pré-tratamento *in vitro* com adição de sacarose a 6% durante a última subcultura possibilitou a aclimatização eficiente de *P. foetida*, resultando nas maiores taxas de sobrevivência e crescimento após 30 dias *ex vitro*.

O principal objetivo das estratégias de conservação é a manutenção em longo prazo da variabilidade genética, com a máxima integridade genética e biológica (BAJAJ, 1995). Atualmente, a criopreservação é a metodologia mais adequada para a conservação em longo prazo da diversidade genética. Embora vários tecidos e órgãos sejam utilizados como material vegetal, na maioria dos protocolos, opta-se pelo emprego de meristemas, devido à menor probabilidade de ocorrência de alterações genéticas durante o processo de recuperação. Em geral, ápices caulinares são sistemas altamente organizados, que podem dar origem a plantas completas. Além disso, possuem tamanho reduzido, o que cria condições para que a desidratação e o congelamento ocorram de forma mais uniforme e rápida (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Métodos de criopreservação para ápices caulinares já foram descritos para diversas espécies de clima tropical e temperado, através das técnicas de vitrificação e encapsulamento-vitrificação (SAKAI, 1997; TAKAGI *et al.*, 1997; CHAROENSUB *et al.*, 2004; MARCO-MEDINA *et al.*, 2010; SUNDARARAJ *et al.*, 2010). De acordo com Engelmann (2004), a

vitrificação promove a desidratação e a crioproteção dos tecidos submetidos ao congelamento de maneira mais eficaz, permitindo a sobrevivência de materiais extremamente sensíveis a esses processos, como os ápices caulinares. Neste trabalho, entretanto, não foi possível recuperar plantas a partir de ápices caulinares de *P. foetida* submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido após exposição às soluções de vitrificação PVS2 ou PVS3 por diferentes períodos. Por outro lado, a utilização da técnica de encapsulamento-vitrificação permitiu a recuperação de plantas a partir de ápices criopreservados. A maior taxa de sobrevivência pós-congelamento (60%) foi observada a partir de explantes encapsulados e expostos à PVS2 por 120 minutos. Esses resultados sugerem que as cápsulas de alginato de sódio conferem uma proteção adicional, reduzindo a toxicidade das soluções crioprotetoras.

Resultados similares foram obtidos por Kami *et al.*, (2009) na criopreservação de ápices caulinares de espinheiros silvestres. A maior taxa de sobrevivência pós-congelamento (62,5%) foi observada pela utilização da técnica de encapsulamento-vitrificação, enquanto que a sobrevivência dos mesmos explantes submetidos ao protocolo de vitrificação foi de apenas 12,5%. Gamez-Pastrana *et al.* (2004) também relataram maior eficiência na criopreservação de ápices caulinares de diferentes variedades de abacaxi utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação, quando comparada com a técnica de vitrificação.

Tokatli & Akdemir (2010) avaliaram a influência de diferentes soluções de vitrificação, incluindo PVS1, PVS2, PVS3 e VSL, na criopreservação de ápices caulinares de *Phontinia x fraseri* Dress. As maiores taxas de sobrevivência foram observadas a partir dos ápices expostos à solução PVS2 por 90 ou 120 minutos. Por outro lado, para a criopreservação de ápices caulinares de alho, a solução crioprotetora PVS3 mostrou-se mais adequada, proporcionando 100% de sobrevivência pós-congelamento, enquanto que os explantes expostos ao PVS2 apresentaram 60,7% de sobrevivência (KIM *et al.*, 2004).

Além da alta taxa de recuperação observada em ápices caulinares de *P. foetida* submetidos ao congelamento, a obtenção de plantas completas fenotipicamente normais após a criopreservação amplia o potencial de aplicação desta metodologia, respaldando seu uso para a conservação de germoplasma para espécies do gênero *Passiflora*.

As estratégias de propagação descritas neste trabalho permitiram a obtenção de plantas *in vitro* e a aclimatização eficiente do material obtido. Foram também estabelecidas as condições para indução de rizogênese e cultura de raízes dessa espécie. Além disso, foram determinadas as

condições necessárias para a criopreservação de ápices caulinares. Apesar de as características genótípicas serem consideradas um dos fatores mais importantes para o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro*, espera-se que as metodologias aqui descritas possam ser adaptadas a outras espécies do gênero. Além disso, tendo em vista o potencial medicinal já descrito para *P. foetida*, os diferentes sistemas de cultura aqui desenvolvidos produzem material para a preparação de extratos que serão submetidos à avaliação de diferentes atividades biológicas.

6 CONCLUSÕES

- O estabelecimento de culturas primárias a partir de ápices caulinares e segmentos nodais obtidos das plântulas germinadas *in vitro* ocorreu por multiplicação meristemática em meio MSM ½;
- Segmentos caulinares de *P. foetida* excisados de plantas *in vitro* deram origem a brotos via desenvolvimento meristemático, e organogênese direta e indireta, em frequências distintas, de acordo com a concentração de BAP adicionada ao meio de cultura. A maior produção de brotos foi observada a partir de segmentos internodais mantidos na presença de luz, em meio suplementado com BAP a 4,4 µM (2,4 ± 0,5 brotos por explante);
- A formação de diferentes tipos de calos foi observada a partir de segmentos nodais e internodais de *P. foetida*, em resposta a todos os reguladores de crescimento testados. Os explantes cultivados na presença de BAP formaram calos organogênicos compactos, enquanto que o cultivo na presença de PIC resultou na formação de calos friáveis. Os demais reguladores de crescimento testados, incluindo ANA, TDZ e combinações de ANA e BAP, induziram a formação de calos mistos, com interior compacto e regiões friáveis na superfície;
- A utilização de segmentos internodais inoculados em meio líquido sobre pontes de papel de filtro mostrou-se eficiente para a produção *in vitro* de raízes adventícias de *P. foetida*, apresentando a maior capacidade proliferativa na presença de ANA a 5,4 µM;
- A cultura de segmentos radiculares em meio suplementado com BAP resultou apenas na formação de gemas, sem o desenvolvimento de brotos;
- A cultura de segmentos radiculares em meio suplementado com auxinas resultou na proliferação de raízes adventícias. Os explantes cultivados na presença de ANA apresentaram um aumento significativo nos pesos fresco e seco quando comparados aos outros reguladores de crescimento testados, sendo a maior produção de biomassa observada em resposta a ANA a 5,4 µM.

- O aumento da concentração de sacarose no meio de cultura permitiu maior desenvolvimento das plantas *in vitro*, assim como a obtenção das maiores taxas de sobrevivência e crescimento *ex vitro*.

- A utilização da técnica de encapsulamento-vitrificação proporcionou proteção ao tecido vegetal, permitindo frequências de recuperação pós-congelamento em NL de 40% a 60%, variando de acordo com o período de exposição do material à solução de vitrificação PVS2 e com o meio de recuperação utilizado. Por outro lado, o protocolo de vitrificação de ápices caulinares de *P. foetida* não permitiu a recuperação de plantas a partir dos explantes criopreservados.

REFERÊNCIAS

- AHLOOWALIA B.S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V.A.; SAVANGIKAR, C. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. **Plant Tissue Culture**. In: International Atomic Energy Agency, eds. Vienna, Áustria, p. 3-10, 2002.
- ANUÁRIO DE AGRICULTURA BRASILEIRA. Produção de frutas no Brasil. In: _____. **Anuário...** São Paulo: FNP – Consultoria, 2009.
- 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.
- 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.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B.M. **Plant cryopreservation. A practical guide**. Chapt. 2. (ed) Springer, USA, p. 15-32, 2008.
- BENSON, E.E. Cryopreservation Theory. In: REED, B.M. **Plant cryopreservation: a practical guide**, USA: Springer Science Business Media (ed), 2010. p. 15-32
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: LIMA, Adelise de Almeida et. al. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2005. p. 676.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, v.57, p. 661-665, 2000.
- BISWAS, M.K.; DUTT, M.; ROY, U.K.; ISLAM, R.; HOSSAIN, M. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, v.122, p. 409-416, 2009.
- BOIÇA JUNIOR, A.L.; ANGELINI M.R.; DE OLIVEIRA, J.C. Biological aspects of *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera : Nymphalidae) on passion fruit genotypes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p. 101-105, 2008.
- BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z.; FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Discorea alata* germoplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p. 87-90, 2004.
- BRASIL. Decreto nº 2519 de 16 de março de 1998. Promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada no Rio de Janeiro, em 05 de junho de 1992. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 1998.

- CANTO, A.M.M.E.; SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.C.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p. 717-720, 2004.
- CARRA, A; DE PASQUALE, F; RICCI, A, CARIMI, F. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in *Citrus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p. 41-48, 2006.
- CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande, PB : Embrapa algodão. 2003.
- CHAN BASH, .S.K., BAJRANG, R.D.; SHASHIDHAR, S.B.; JAYARAM, R.M.; SHIVARAJ, G.T. Evaluation of analgesic activity of hydro alcoholic leaf extract of *Passiflora foetida*. **VI College of Pharmacy Raichur**, Índia, 2008.
- CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. **Cryo-Letters**, v.25, p. 51-58, 2004.
- CLAVERO-RAMÍREZ, I.; GÁLVEZ-FARFAN, J.; LÓPEZ-ARANDA, J.M.; GONSÁLEZ-BENITO, M.E. Apez cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation-dehydration methods. **Cryo-Letters**, v.26, p. 17-27, 2005.
- DEGINANI, N.B. Las espécies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana**, v.39, p. 43-129, 2001.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 1-23, 2004.
- DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D.M. BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p. 199-208, 2009.
- DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, p. 225-232, 1995.
- DORNELLAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p. 211-217, 1994.
- DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p. 23-27, 1991.
- ECHEVERRI, F.; CARDONA, G.; TORRES, F.; PELAEZ, C.; QUIÑONES, W.; RENTERIA, E. Ermanin: An insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* Resin. **Phytochemistry**, v.30, p. 153-155, 1991.

- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. **Biotechnology and Plant Genetic Resource**. (eds J.A. Calloows; B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury), p. 119-161, 1997.
- ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In*: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: **Current Research Progress and Application**, JIRCAS, Tsukuba/IPGRI, Rome, p. 8-20, 2000.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. ***In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.40, p. 427-433, 2004.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. **Cryo-Letters**, v.11, p. 413-426, 1990.
- FAHY, G.M.; MCFARLANE, D.R.; ANGEL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p. 407-426, 1984.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. *In*: **Maracujá – germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa, p. 676, 2005.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow Passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, p. 1276-1277, 1997a.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.33, p. 209-212, 1997b.
- FERREIRA, F.R. Recursos Genéticos de Passiflora. *In*: **Maracujá – germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa, p. 676, 2005.
- FLACHSLAND, E.; TERADA, G.; SCOCCHI, A.; REY, H.; MROGINSKI, L.; ENGELMAN, F. Cryopreservation of seeds and *in vitro* cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. **Cryo-Letters**, v.27, p. 235-242, 2006.
- FRANKLIN, G.; SHEEBA, C.J.; LAKSHMISITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v. 40, p. 188-191, 2004.
- GAGLIARDI, R. F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Cryopreservation of cultivated and wild *Arachis* species Embryogenic axes using desiccation and vitrification methods. **Cryo-Letters**, v.23, p. 61-68, 2002.
- GAMA, M. I. C. S. Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos através de *Agrobacterium tumefaciens*. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 130, 1993.

- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GAO, Y.; FERGUSON, D.O.; XIE, W.; MANIS, J.P.; SEKIGUCHI, J.; FRANK, K.M.; CHAUDHURI, J.; HORNER, J.; DEPINHO, R.A.; ALT, F.W. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. **Nature**, v.404, p. 897-900, 2000.
- GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, DOI 10.1007/s11240-010-9892-4, 2010.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK. Plant Tissue Culture Procedure – Background. *In: Plant Propagation by tissue Culture*. 3 rd ed. Springer, v.1, p. 1-23, 2008.
- _____, VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. Springer, v.1, p. 335-354, 2008.
- _____, GAHAN, P.B., GEORGE, E.F. Adventitious Regeneration. Springer, v.1, p. 355-402, 2008.
- GLORIA, B.A.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELLAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived in leaf explants pf passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p. 2007-2013, 1999.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. **Cryo-Letters**, v.27, p.155-168, 2006.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T.; JUAREZ, J.; ORTEGA, C.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of *Citrus* using the encapsulation-dehydration technique. **Cryo-Letters**, v.24, p. 85-94, 2003.
- GOPAL, J.; CHAMAIL, A.; SARKAR, D. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germoplasm at normal propagation temperature. **Potato Research**, v.45, p. 203-213, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, v.1, p.183-260, 1998.
- GRIBAUDO, I; NOVELLO, V; RESTAGNO, M. Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo*). **Vitis**, v.40, p. 137-140, 2001.
- GUERRA, M.P.; LEMES, M.S.; PINTO, D.L.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, p. 47-54, 2009.

- GUPTA, R.; MODGIL, M.; CHAKRABARTI, S.K. Assessment of genetic fidelity of micropropagated apple rootstock plants, EMLA 111, using RAPD markers. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p. 925-928, 2009.
- HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COSTE, A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. **Cryo-Letters**, v.26, p. 313-322, 2005.
- HARDING, K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.37, p. 31-38, 1994.
- HAO, Y.J.; CHENG, Y.J.; DENG, X.X. Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from in vitro conservation. **Journal of plant physiology**, v.162, p. 237-243, 2005.
- HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p. 150-155, 1999.
- HITMI, A.; COUDRET, A.; BARTHOMEUF, C. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p. 69-89, 2000.
- HOYT, E. Conservation the wild relatives of crops. Roma: IBGR/FAO. p.52, 1992.
- HUSSEY, G.; JOHNSON, RD; WARREN, S. Transformation of meristematic cells in the shoot apex of cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. **Protoplasma**, v.148, p. 101-105, 1989.
- ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v.99, p. 395-400, 2004.
- JACKSON, W.P.S.; SUTHERLAND, L.A. International agenda for botanic gardens in conservation. **Botanic Gardens Conservation International**, UK. 2000.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. Reação às doenças produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p. 1005-1010, 2003.
- KATOH, K.; MATSUDA, A.; ISHIGAMI, A.; YONEKURA, S.; ISHIWATA, H.; CHEN, C.; OBARA, Y. Suppressing effects of bisphenol A on the secretory function of ovine anterior pituitary cells. **Cell Biology International**, v.28, p. 463-9, 2004.
- KOVACEVIC, N.; SUBOTIC, A.; BUDIMIR, S.; GRUBISIC, D. Comparative study of anthraquinones from embryogenic callus tissue and zygotic embryos of *Frangula alnus* and *Rhamnus catharticus*. **Pharmaceutical Biology**, v.38, p. 321-325, 2000.
- LAMBARDI, M.; DE CARLO, A.; BIRICOLTI, S.; PUGLIA, A.M.; LOMBARDO, G.; SIRAGUSA, M.; DE PASQUALE, F. Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of *Citrus* intact seeds. **Cryo-Letters**, v.25, p. 81-90, 2004.

- LEI FEDERAL n° 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § Iº, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e da outras providências.
- LEMOS, E.E.P; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R. ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p. 1359-1364, 2002.
- LI, D.Z.; PRITCHARD, H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, p. 614-621, 2009.
- LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *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.
- LV, H.; LIN, Q.; ZHANG, K.; Yu, k.; Yao, T.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, B. Facile Fabrication of Monodisperse Polymer Hollow Spheres. **Langmuir**, v.24, p. 13736-13741, 2008.
- MARCO-MEDINA, A.; CASAS, J.L.; GONZALEZ-BENITO, M.E. Comparison of vitrification and encapsulation-dehydration for yo preservation of *Thymus moroderi* shoot tips. **Cryo-Letters**, v.31, p. 301-309, 2010.
- MARIN, M.L.; MAFLA, G.; ROCA, W.M.; WITHERS, L.A. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. **Crio-Letters**, v.11, p.257-264, 1990.
- MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, p. 419-448, 1969.
- MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v.168, p. 939-949, 1970.
- MINANO, H.S.; GONZALEZ-BENITO, M.E.; MARTIN, C. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in *Chrysanthemum cultivars* using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v.122, p. 238-243, 2009.
- MMA – **Ministério do Meio Ambiente**. Convenção sobre diversidade biológica – CDB: Conferência para adoção do texto acordado da CDB – Ato final de Nairobi. Biodiversidade, v.2, p. 60, Brasília, 2000.
- MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p. 2650-2653, 2007.
- MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GOLÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.36, p. 527-531, 2000a.

- MONTEIRO, A.C.B.A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.Z.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, v.57, p. 571-573, 2000b.
- MORAN ROBLES, M.J. *In vitro* vegetative multiplication of axillary buds of *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener and *P. mollissima* Bairley. **Fruits**, v.33, p. 701-715, 1978.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- NEGASH, A.; KRENS, F.; SCHAART, J. VISSER, B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p. 107-111, 2001.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by the vitrification method. **Plant Science**, v.88, p. 67-73, 1993.
- NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. A família Passifloracea na Chapada Diamantina. Brasil. **Sitientibus**, v.1, p. 33-46, 2001.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: Ruggiero, C. (ed.). **Cultura de maracujazeiro**, Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 218-246, 1987.
- OSIPI, E.A.F; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, 2005.
- PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p. 768-774, 2000.
- PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLASZMANN, J.C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp hybrids) using encapsulation dehydration. **Plant Cell Reports**, v.12, p. 525-529, 1993.
- PAWLOWSKA, B.; BACH, A. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot buds of rose 'New Dawn' using encapsulation-dehydration method. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.51, p. 56-56, 2009.
- PENCE, V.C.; SANDOVAL, J.A.; VILLALOBOS, A.V.M.; ENGELMAN, F. *In vitro* collecting techniques for germoplasm conservation. IPGRI Technical Bulletin No. 7. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, 2002.
- PINTO, A.P.C.; MONTEIRO-HARA, C.B.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.46, p. 28-33, 2010.

- PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p. 45-49, 2008.
- POPOVA, E.; KIM, H.H.; PAEK, K.Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose reculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, v.124, p. 522-528, 2010.
- PRACIAK, A. Seed storage of plant genetic resources. **Seed Science Research**, v.6, p. 71-75, 1996.
- PRAKASH, C.S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.11, p. 53-57, 1992.
- RAMACHANDRA, M.; ATENCIO, I.; RAHMAN, A.; VAILLANCOURT, M.; ZOU, A.H.; AVANZINI, J.; WILLS, K.; BOOKSTEIN, R.; SHABRAM, P. Restoration of transforming growth factor beta signaling by functional expression of Smad4 induces Anoikis. **Cancer Research**, v.62, p. 6045-6051, 2002.
- REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; TOLEDO PICOLI, E.A.; COSTA, M.G.C.; REGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.39, p. 618-622, 2003.
- RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v.32, p. 237-241, 2002.
- ROMANO, A.; MARTIN-LOUCAO, M.A. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.59, p. 155-7, 1999.
- SAEED, N.A.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A. A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p. 201-207, 1997.
- SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. *In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, v.32, p. 53-69, 1995.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p. 30-33, 1990.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 70-84, 2000.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p. 60-65, 2001.

- SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M.M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants – Progress in the past decade. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.42, p. 206-214, 2006.
- SARKAR, D.; PANDEY, S.K.; CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SUD, K.C. The role of calcium nutrition in potato (*solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. ***Plant cell, Tissue and Organ Culture***, v.81, p. 221-227, 2005.
- SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, p. 433, 1990.
- SCOCCHI, A.; FALOCI, M.; MEDINA, R.; OLMOS, S.; MROGINSKI, L. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. Using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. ***Euphytica***, v.135, p. 29-38, 2004.
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.98, p. 79-86, 2009.
- SINGH, S.K.; RAI, M.K.; ASTHANA, P.; PANDEY, S.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., a medicinally important and herbal pesticidal plant species. ***Acta Physiologiae Plantarum***, v.31, p. 649-653, 2009.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sucrose and duration of *in vitro* growth on *ex vitro* acclimatization of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). ***Ciência rural***, v.34, p. 1471-1477, 2004.
- SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Meiotic behaviour and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. ***Caryologia***, v.56, p. 129-137, 2003.
- SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba. Esalq/USP. p. 179, 1997.
- SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. ***Current Opinion in Plant Biology***, v.2, p. 61-64, 1999.
- SUNDARARAJ, S.G.; AGRAWAL, A.; TYAGI, R.K. Encapsulation for *in vitro* short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. ***Scientia Horticulturae***, v.125, p. 761-766, 2010.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. ***Journal of American Society for Horticultural Science***, Washington, v.113, p.234-238, 1988.

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**, v.2, p. 123-131, 2008.

WADEGAONKAR, P.A.; BHAGWAT, K.A.; RAI, M.K. Direct rhizogenesis and establishment of fast growing normal root organ culture of *Withania somnifera* Dunal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p. 223-225, 2006.

WANG, Q., LAAMANEN, J., UOSUKAINEN, M., VALKONEN, J.P.T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v.24, p. 280-288, 2005.

WILKINSON, T.; WETTEN, A.; FAY, M.F. Cryopreservation of *Cosmos atrosanguineus* shoot tips by a modified encapsulation/dehydration method. **Cryo-Letters**, v.19, p. 293-302, 1998.
YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic, p.205-247, 1995.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in Passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v.62, p. 346-350, 2005.

TRIPATHI, R.; SASTRY, K.S.; KOTA, S.K.; SRINIVAS, U.K. Cloning and characterization of mouse cullin4B/E3 ubiquitin ligase. **J.Biosci.** v.30, p. 329–337, 2005.

UCHENDU, E.E.; REED, B.M. A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of *in vitro*-grown mint (*mentha spp.*) **Cryo-Letters**, v.29, p. 181-188, 2008.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. *Passiflora passionflowers of the world*. Portland: Timber Press, p. 430, 2004.

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.41, p. 453-459, 1992.

VERLEYSSEN, H.; BOCKSTAELE, E.V.; DEBERGH, P. An encapsulation-dehydration protocol for cryopreservation of the azalea cultivar “Nordlicht” (*Rhododendron simsii* Planch.). **Scientia Horticulturae**, v.106, p. 402-414, 2005.

ANEXO A

Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae)

(Artigo publicado no periódico *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*)