

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS

NADIA BOTINI

**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA
EM *Passiflora quadrangularis* L.**

TANGARÁ DA SERRA – MT
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO – 2016

NADIA BOTINI

**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM *Passiflora
quadrangularis* L.**

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientador: Prof. Dr^o. Wagner Campos Otoni

TANGARÁ DA SERRA – MT

FEVEREIRO – 2016

**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM *Passiflora
quadrangularis* L.**

NADIA BOTINI

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

D. Sc. Elyabe Monteiro de Matos - Universidade Federal de Viçosa

Prof^a. D. Sc. Ana Aparecida Bandini Rossi - Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof^a. D. Sc. Maurecilne Lemes Silva Carvalho (Orientadora) - Universidade do Estado de Mato Grosso

DEDICATÓRIA

Dedico o título de mestre em Genética e Melhoramento de Plantas aos meus pais Anair e Edson, aos meus irmãos Auclar Felipe e Maria Heloisa, à tia Arlete, à minha prima Mariane e ao meu bem Tassiana pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

“Quando não souberes para onde ir, olha para trás e saberá pelo menos de onde vens” (Provérbio africano).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela família maravilhosa que o senhor me proporcionou.

A Universidade do Estado do Mato Grosso, pela oportunidade de realização do curso.

A Fundação de Amparo e Apoio a Pesquisa do Estado de Mato Grosso.

A minha orientadora, Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, minha eterna gratidão e admiração pelos ensinamentos e conhecimentos repassados, pelos conselhos e compreensão durante esses dois anos de mestrado; muitíssimo obrigada.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos por ter aceitado o convite para compor minha banca de defesa e contribuir com este trabalho.

A Prof.^a Dra. Ana Bandini Rossi por ter aceitado o convite para compor minha banca de defesa e contribuir com este trabalho e também pelo conhecimento repassado durante as disciplinas do mestrado.

Ao professor Dr. Wagner Campos Otoni, por ter me recebido em seu laboratório e ter permitido a realização das técnicas no LCT minha eterna gratidão

Ao professor Dr. Ílio Fealho de Carvalho, quero agradecer por todo apoio e disponibilidade para me auxiliar quando precisei.

Ao Wellington Soares, Ana Cláudia Cruz e Lays Nery que disponibilizaram tempo e atenção nas horas de Laboratório de anatomia vegetal.

Aos colegas do laboratório de Cultura de Tecidos por sempre tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso, descontraído e alegre. Agradeço também pela disponibilidade e auxílio de todos vocês durante a realização do meu trabalho.

Ao Rodrigo, grande parceiro. Agradeço por toda ajuda, dentro e fora do laboratório. Você é uma pessoa muito especial e espero ter o enorme prazer de te encontrar no futuro.

A Andréia pela amizade e por estar sempre a disposição pra me auxiliar na realização do meu trabalho.

A Kaliane Zaira, pela amizade e companheirismo de sempre.

Agradeço a minha mãe, Anair Aparecida Botini, minha heroína que me apoiou e incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai, Edson Luiz da Silva Conceição, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim é muito importante.

Aos meus irmãos e irmãs, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

A Tassiana pela amizade, amor, carinho e companheirismo, e principalmente pelo incentivo, compreensão e por acreditar em mim.

A tia Arlete e minha prima Mariane por todo carinho, amizade e ajuda.

Aos meus verdadeiros amigos que por mais distante que permaneci ainda se faziam presentes em meus pensamentos diários.

A minha família postiga de Tangará da Serra Sueide, Luiz Antônio e Gabriela, obrigado por sempre estarem presente nos bons e maus momentos.

A todos os professores do mestrado Ana, Barelli, Isane, Leonarda, Maurecilne, Willian, Petterson, quero dizer meu muito obrigada por toda dedicação, ensinamento, amizade e conselhos proporcionados.

Aos colegas da turma do PGMP de 2014 o meu muito obrigada pelo carinho.

As minhas amigas que a vieram através da turma do PGMP 2014 Jaqueline e Cíntia o meu muito obrigada por fazerem parte dessa fase tão especial para mim.

A Elisa (Magrela) que me hospedou em sua casa em viçosa, sem ao menos me conhecer e com esse período de convivência foi possível nascer uma amizade.

Se você leu esta página foi porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. “A sola do pé conhece reconhece toda a sujeira da estrada” (provérbio africano).

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

BIOGRAFIA

Nadia Botini, nascida em Paranatinga – MT, aos 08 dias do mês de Dezembro de 1986, filha de Anair Aparecida Botini e Edson Luiz da Silva Conceição se formou no ensino Médio em (2004) na Escola Estadual Gervásio dos Santos Costa em Gaúcha do Norte – MT, possui graduação em Biologia (2013) e atualmente é aluna do Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas (2014 - 2016) pela Universidade do Estado de Mato Grosso. Na graduação atuou nas áreas de Ictiologia, Botânica e Etnobotânica, no mestrado trabalha com Organogênese e Embriogênese somática em *Passiflora quadrangularis* L.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O gênero <i>Passiflora</i>	4
2.2 <i>Passiflora quadrangularis</i> L.....	6
2.3. Cultura de tecidos aplicada à cultura do maracujazeiro	6
2.4 Reguladores de crescimento	7
2.4 Embriogênese somática.....	8
2.5 Organogênese	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I Embriogênese somática em <i>Passiflora quadrangularis</i> L. a partir de embriões zigóticos	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1.INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. Indução da embriogênese somática	32
2.2. Análise citológica	33
2.3. Análise anatômica e histoquímica.....	33
2.4. Análise estatística	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4-.CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO II Organogênese em <i>Passiflora quadrangularis</i> L. a partir de cotilédones, raízes e microestacas	53
RESUMO	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57

2.1. Obtenção do material vegetal	57
2.2. Indução à organogênese <i>in vitro</i> a partir de cotilédones das sementes e raízes	57
2.3. Indução à Organogênese <i>in vitro</i> a partir de microestacas	58
2.4. Análise anatômica.....	58
2.5. Análise estatística	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	75

RESUMO

BOTINI, Nadia, M.Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, fevereiro de 2016. **Embriogênese somática e Organogênese em *Passiflora quadrangularis* L.** Orientadora: Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Wagner Campos Ottoni.

O objetivo geral do trabalho foi estabelecer um protocolo para indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros e indução da organogênese a partir de explantes cotiledonares, raízes e microestacas. O primeiro capítulo teve como objetivo induzir a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora quadrangularis* L e identificar os compostos de reservas na histodiferenciação dos embriões somáticos. A concentração de 27,14 μM de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), apresentou maior número de calos embriogênicos em meio para indução. Após transferência para o meio de histodiferenciação, após 30 dias de cultivo foi observado que 60% dos embriões permaneceram em estágio globular e 20% em embriões cotiledonares. Porém, não se observou a conversão dos embriões somáticos em plântulas. A dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Os testes histoquímicos revelaram a presença de corpos lipídicos identificados por meio da reação positiva ao reagente sudan black B. A reação xylidine Ponceau (XP), apresentou grande quantidade de corpos proteicos, o reagente de Lugol detectou grãos de amido e o reagente PAS também evidenciou grãos de amido. O objetivo do segundo capítulo foi estabelecer um protocolo para a organogênese *in vitro* de *Passiflora quadrangularis* L. a partir de cotilédones, raízes e microestacas. Após 30 e 60 dias em meio de indução evidenciou-se organogênese indireta nos explantes provenientes de cotilédones e raiz, mas nas microestacas apenas a organogênese direta foi observada. Os explantes cotiledonares cultivados em meio suplementado por 4,64 μM de Cinetina (CIN), proporcionaram maior média de brotações. Em explantes radiculares apresentaram maior número de brotações quando cultivados em meio com 3,48 μM de CIN. No cultivo das microestacas as melhores médias na produção de brotos ocorreu na presença de 4,43 μM de Benziladenina (BA), e 5,54 μM de BA. O presente trabalho representa o primeiro relato para indução de embriogênese somática e organogênese em *P. quadrangularis* onde foram relatadas a formação de embriões somáticos utilizando-

se 2,4-D e a formação de brotos, e foram descritas informações relevantes sobre aspectos anatômicos, histoquímicos da espécie.

Palavras-chave: Maracujá Amazônico, 2,4-D, Morfogênese *in vitro*, Citocininas.

ABSTRACT

BOTINI, Nadia, M.Sc., of State University Mato Grosso, February 2016. **Somatic embryogenesis, Organogenesis in *Passiflora quadrangularis* L.** Adviser: Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-adviser: Wagner Campos Ottoni.

The overall objective was to establish a protocol for induction of somatic embryogenesis from mature zygotic embryos and induction of organogenesis from cotyledons, roots and micro-stakes. The first chapter aimed to induce somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Passiflora quadrangularis* L. and identify compounds reserves in histodiferenciação of somatic embryos. The concentration of 27.14 μM of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), the greatest number of somatic embryogenesis in medium for induction. After transfer to medium histodiferenciação after 30 days of culture was observed that 60% of the embryos remained at globular stage and 20% in cotyledonary embryos. However, there was no conversion of somatic embryos into plantlets. The double color with acetic and carmine and Evans in blue confirmed the embryogenic capacity of the material. The histochemical tests revealed the presence of lipid bodies identified by a positive reaction to the reagent sudam black B. The reaction Ponceau xylidine (XP), contains a large number of protein bodies, lugol reagent and detected starch grains and PAS reagent also showed starch grains. The purpose of the second chapter was to establish a protocol for organogenesis in vitro *Passiflora quadrangularis* from cotyledons, roots and micro- stakes. After 30 and 60 days in induction medium indirect organogenesis was evident on the explants from cotyledons and root, but the micro-stakes only indirect organogenesis was observed. The cotyledon explants cultured in medium supplemented by 4.64 μM of CIN, provide higher average shoots. In root explants have a higher number of shoots when cultured in medium with 3.48 μM of CIN. In the cultivation of micro-piles the best averages in the production of shoots occurred in the presence of 4.43 μM of BA and 5.54 μM of BA where higher average number of shoots. This paper reports the first report of induction of somatic embryogenesis and organogenesis *P. quadrangularis*. Where reported relevant information was about anatomical features, kind of histochemical and there is also the need for further studies to establish a protocol which is able to convert plants.

Key-words: Passion fruit Amazônico, 2,4-D, *In vitro* morphogenesis, Cytokinin.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Passifloraceae é constituída por 17 gêneros, com 630 espécies (Vanderplank, 2000; Feuillet e MacDougal, 2007). O gênero *Passiflora* possui cerca de 400 a 530 espécies (Pérez et al., 2007; Braglia et al., 2010), das quais de 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento, muitas delas com finalidades múltiplas (Abreu et al., 2009; Pipino et al., 2010; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012).

O maracujazeiro é uma planta alógama por excelência e suas flores apresentam autoincompatibilidade, em geral a reprodução é sexuada levando a grande variabilidade genética nos pomares (Meletti, 2000).

A espécie *Passiflora quadrangularis* L. trepadeira alta, inteiramente glabra, com flores solitárias, alvas e purpúreas com potencial para o uso como planta ornamental (Souza e Meletti, 1997; Montero et al., 2013). É considerada uma espécie nativa da Amazônia e do norte da América do Sul, e é cultivada em toda a América tropical. *P. quadrangularis* é considerada uma espécie silvestre de interesse em programas de melhoramento genético do gênero *Passiflora* por apresentar tolerância ao fungo *Alternaria passiflorae* e resistência à fusariose (Stenzal e Carvalho 1992; Vieira e Carneiro, 2004).

As principais espécies do gênero *Passiflora* são diploides ($2n=2x=18$ cromossomos), porém alguns tetraploides ($2n=24$), hexaploides ($2n=36$) *P. quadrangularis* é diploide ($2n=2x=18$ cromossomos), (Melo et al., 2001).

Do ponto de vista econômico, a cultura do maracujá exerce elevada importância, pois seus frutos são utilizados para a alimentação, com o consumo *in natura*, confecção de doces, geléias e sucos. As plantas são utilizadas para a ornamentação, tanto para flores de corte como envasadas, para a indústria farmacêutica e medicina popular, devido aos seus compostos ativos como a passiflorina, maracujina e substâncias tanóides (Cunha et al., 2002).

Métodos de propagação *in vitro* são úteis em programas de melhoramento genético, possibilitando o suprimento constante e homogêneo de material vegetal com elevada qualidade sanitária, embora, requeiram também, métodos eficientes para a regeneração de plantas *in vitro* (Yang et al., 2010).

A cultura de tecidos é uma técnica baseada na totipotência celular, que consiste na capacidade da célula vegetal desenvolver uma planta inteira, desde que submetida às condições que estimulem sua divisão e diferenciação.

A morfogênese *in vitro* pode acontecer por duas vias (a embriogênese e organogênese). A embriogênese somática que é a formação de uma estrutura bipolar, no qual seus domínios (meristemas apicais caulinares e radiculares) são formados num único eixo. Na organogênese, o desenvolvimento ocorre em dois estádios, uma vez que a organização dos domínios apicais apresenta uma separação temporal (Peres, 2002).

Segundo Yang e Zhang (2010), a embriogênese somática representa uma via única de desenvolvimento que inclui uma série de eventos característicos como: desdiferenciação de células, ativação da divisão celular e reprogramação da sua fisiologia, metabolismo e padrões de expressão de genes.

De acordo com Xu e Huang (2014), as plantas superiores mostram três tipos principais de sistemas de regeneração: Regeneração tecidual, organogênese e embriogênese somática, sendo os dois últimos tipos as vias de regeneração que são mais utilizados tanto para pesquisa quanto para aplicações práticas.

A embriogênese somática se destaca como uma proeminente via de regeneração de plantas e apresenta vantagens como: oferta de linhagens celulares para a engenharia genética, regeneração de uma estrutura bipolar a partir de uma única célula ou uma população delas, produção ilimitada de clones com características de elite, pesquisa básica funcional e molecular, produção de sementes sintéticas e conservação de recursos genéticos pela criopreservação e para a produção de plantas em larga escala (Li et al., 2006; Yang e Zhang, 2010; Aslam et al., 2011; Rocha et al., 2012).

A organogênese *in vitro* é uma via de regeneração cuja célula e tecidos são induzidos a sofrer mudanças originando uma estrutura unipolar conhecida como primórdio caulinar (calogênese) ou de raiz (rizogênese), no qual o sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido parental (Thorpe, 1994).

Segundo Otoni et al., (2013) várias espécies de maracujá têm sido submetidas a sistemas de propagação *in vitro*, principalmente via organogênese, usando uma grande variedade de reguladores de crescimento e tipos de explantes.

Relatos na literatura sobre trabalhos de propagação *in vitro* com *P. quadrangularis* L. são escassos. Como a espécie possui características desejáveis para programas de melhoramento, o presente trabalho visa a regeneração pelas vias embriogênese somática e organogênese para a espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae originou-se na África, cruzando a Europa e a Ásia e chegando ao Novo Mundo por meio de pontes de terra. Os ancestrais das passifloras chegaram à América Central e se diversificaram rapidamente, com muitos eventos de dispersão de longa distância o Brasil por ter essa quantidade de espécie é considerado centro de diversidade genética do gênero (Muschner et al., 2012).

As ordens que constituem a família Passifloraceae L. são: Malpighiales que se divide em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004; Cervi, 2005). A tribo Passiflorieae é representada por 18 gêneros e 530 espécies (Feuillet e MacDougal, 2007; Paull e Duarte, 2012) onde os quatro gêneros mais reconhecidos no Brasil são: *Ancistrothysus* Harms, *Dilkea* Mast, *Mitostemma* Mast e o gênero mais importante da família o *Passiflora* L. (Bernacci et al., 2015). Possui cerca 150 espécies nativas e 87 endêmicas com elevada variabilidade fenotípica, que ainda não são cultivadas comercialmente e um de seus domínios fitogeográficos é o cerrado (Bernacci et al., 2015).

A família Passifloraceae é onde se encontra o gênero *Passiflora* sendo esse o que possui maior relevância na família, por alocar o maior número, cerca de 530 espécies, muitas dessas possuem importância econômica (Braglia et al., 2010) e apresentam ampla variabilidade genética inter e intraespecífica (Bellon et al., 2009).

O gênero *Passiflora* é constituído de plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas, raramente eretas. Em geral, possuem caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso (Vanderplank, 2000).

As espécies que compreendem de *Passiflora* possuem uma enorme variação fenotípica, em especial nas folhas. As folhas podem ser alternadas, simples, pecioladas ou compostas, inteiras ou lobadas e de 5 formas variáveis, de margem inteira ou serrilhada. É possível observar glândulas nectaríferas, no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha, o que as torna fascinante por possuírem uma ampla variedade de formatos de folhas dentro de um mesmo gênero (Feuillet e Macdougal, 2007; Abreu et al., 2009; Montero, 2013).

Existe uma grande variação tanto na forma como na coloração das flores dos maracujazeiros que podem variar do vermelho intenso ao branco e o florescimento ocorre mais de uma vez por ano (Abreu et al., 2009). As flores podem ser bissexuais ou unissexuais, actinomorfas, solitárias ou em inflorescências, normalmente com brácteas, cinco sépalas, cinco pétalas e uma ou mais séries de filamentos, formando a corona. O androceu é composto por 5 estames livres e o gineceu por 3 carpelos (Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougall, 2004).

Os frutos do maracujazeiro têm forma ovoide ou globosa, raramente fusiforme, com polpa mucilagínosa, com coloração amarela, vermelha ou roxa. A casca é coriácea, quebradiça e lisa, protegendo o mesocarpo, no interior do qual estão as sementes (Bernacci et al., 2008). As sementes são comprimidas, com arilo carnoso colorido e testa reticulada, pontuada ou alveolada (Short, 2011).

A propagação do maracujazeiro pode ser realizada sexuadamente através de sementes, ou assexuadamente por meio de estaquia, enxertia, alporquia e cultura de tecidos (Baccarin, 1988; Ferreira et al., 2001; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010).

Do ponto de vista econômico, a cultura do maracujá exerce elevada importância, pois seus frutos são utilizados para a alimentação, consumo *in natura*, confecção de doces, geleias e sucos. As plantas são utilizadas para a indústria farmacêutica e medicina popular devido aos seus compostos ativos como a passiflorina, maracujina e substâncias tanóides (Cunha et al., 2002).

Também são muito usadas na ornamentação, onde as passifloras produzem grande fascinação pela beleza das flores, que são extremamente variáveis em cor e em tamanho, além de muitas vezes apresentarem perfumes diferenciados. As flores das passifloras são consideradas exóticas e complexas, algumas de coloração forte e brilhante, outras de coloração tênue e suave devido, principalmente, à presença da corona, que caracteriza a família Passifloraceae (Abreu et al., 2009).

Segundo Otoni (1995), a ampla variabilidade relatada no gênero, na morfologia da folha, no florescimento, na resistência a pragas e doenças, na produtividade e nas características de fruto permitem encontrar, dentro do gênero, alternativas genéticas que proporcionam suporte a eficientes programas de melhoramento genético para as espécies cultivadas.

Os métodos de melhoramento mais aplicados na cultura do maracujazeiro são: a introdução de plantas, a seleção massal, a seleção com teste de progênie e a hibridação (Oliveira e Ferreira, 1991; Bruckner et al., 2002). No entanto, a existência da incompatibilidade tem limitado o sucesso do processo sexual, impossibilitando cruzamentos, algumas vezes envolvendo espécies consideradas fontes de resistência a pragas e doenças (Otoni, 1995).

Contudo, existe algumas opções promissoras como a hibridação somática e a transformação genética que são técnicas de transferências de genes em plantas com incompatibilidade sexual, mas essas aplicações requerem protocolos eficientes para a regeneração *in vitro* das espécies (Otoni, 1995; Liu et al., 2005; Silva et al., 2009; Paim-Pinto et al., 2010).

2.2 *Passiflora quadrangularis* L.

Passiflora quadrangularis L. também chamado de maracujá-açú, maracujá-gigante, maracujá Amazônico, encontra no Brasil condições favoráveis para o seu desenvolvimento e produção (São José, 1994). *P. quadrangularis* é raramente encontrado devido à baixa taxa de germinação das sementes, apresenta fruto alongado que pode pesar até 3 quilos (Lorenzi, 2006).

É uma trepadeira de grande porte, caule grosso e intenso desenvolvimento, bastante cultivada nas regiões tropicais, principalmente no Caribe. Os frutos são os maiores do gênero com até 3 kg, de sabor doce-acidulado, sendo consumido ao natural ou em compotas. As flores são solitárias, grandes, fragrantas e de coloração branca com púrpura. Comercialmente os pomares existem em escala doméstica. As plantas não suportam geadas e ventos frios, por isso, desenvolvem-se melhor em regiões quentes. Esforços na manutenção desta espécie de maracujazeiro devem ser intensificados, pois sua difícil manutenção em coleções e a perda de habitat ameaçam a sua extinção local (Meletti et al., 2010).

A espécie é tolerante ao fungo *Alternaria passiflorae*, resistente à fusariose, porém é muito sensível aos nematoides e a *Xanthomonas* sp. (Oliveira e Ferreira, 1991).

2.3. Cultura de tecidos aplicada à cultura do maracujazeiro

Os estudos de cultura de tecidos em *Passiflora* spp. iniciou-se no final da década de 60 com Nakayama com estudos em *P. caerulea* (Nakayama, 1966) e se estende até os dias atuais, onde a aplicação da biotecnologia no melhoramento de espécies frutíferas tem sido crescente e com ampla possibilidade de aplicação. Contudo, a utilização de modernas técnicas biotecnológicas no melhoramento de plantas depende da existência de protocolos eficientes para a regeneração (Otoni, 1995; Appezzato-da-Glória et al., 2005; Silva et al., 2009).

A cultura de tecidos vegetais é um importante método para multiplicar rapidamente genótipos superiores com alto rendimento e/ou resistentes às doenças (Drew, 1997).

A busca crescente de novas técnicas para cultura de tecidos aplicadas ao gênero *Passiflora* e com isso algumas técnicas baseadas na cultura de tecidos foram aplicadas à cultura do maracujá, dentre elas podemos citar a morfogênese via organogênese com (Drew, 1991; Dornelas e Vieira, 1994; Faria e Segura, 1997; Gloria et al., 1999; Biasi et al., 2000; Monteiro et al., 2000; Reis et al., 2003; Becerra et al., 2004; Nhut et al., 2007; Pipino et al., 2008; Zerbini et al., 2008; Pipino et al., 2010; Pinto et al., 2010; Prammanee et al., 2011; Garcia et al., 2011; Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Vieira et al., 2014), morfogênese via embriogênese somática (Otoni, 1995; Anthony et al., 1999; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Albino, 2013; Florido, 2013; Rosa et al., 2014; Rocha et al., 2014, Ferreira et al., 2015; Rocha et al., 2015; Silva et al., 2015), hibridação somática (Otoni et al., 1995; Davey et al., 2005), transformação genética (Reis et al., 2007; Silva, 2007;), produção de sementes sintéticas (Silva et al., 2015), ginogênese (Rêgo et al., 2011), androgênese (Silva, 2007), indução de autotetraploides (Rêgo et al., 2011), seleção *in vitro* visando resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Flores et al., 2012) e conservação *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007).

2.4 Reguladores de crescimento

Além de meios eficientes para o cultivo *in vitro* de plantas, existem compostos responsáveis pela indução de respostas fisiológicas, como: enraizamento, brotações e alongamento celular, chamados de hormônios vegetais ou reguladores de crescimento (Barrueto e Teixeira, 2010). Os reguladores de

crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos similares aos hormônios (Hinojosa, 2005).

Na cultura de tecidos, as auxinas e as citocininas, na sua forma natural ou sintética, fazem parte do grupo de hormônios que são frequentemente usados. Existem vários tipos de hormônios vegetais, as auxinas, citocininas, giberilinas e o etileno que são os mais conhecidos e os mais usados para protocolos para a indução da embriogênese somática e organogênese são o 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético), Picloram (Ácido-amino-3,5,6 - triclopicolínico), ANA (α -Ácido Naftaleno Acético), BA (Benziladenina) e TDZ (Thidiazuron), (Guo et al., 2011).

As citocininas pertencem ao grupo das substâncias que promovem a divisão celular e sua origem está relacionada com a adenina (Barrueto e Teixeira, 2010). As citocininas na cultura de tecidos, em geral, são usadas para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou para induzir multibrotações a partir de gemas axilares ou apicais (Taiz; Zeiger, 1991; Hartmann, 2010).

Segundo Fehér (2005), as auxinas são muito importantes para a indução da embriogênese somática, o 2,4-D é o principal e mais eficiente regulador sintético indutor da embriogênese somática, especificamente na desdiferenciação das células somáticas.

A cinetina (6 – furfurilaminopurina) está dentro de uma classe de hormônios vegetais as citocininas, que está relacionada com as divisões celulares. É um derivado da base purina, adenina, que é importante em ácidos nucleicos (Sampaio, 1998).

O thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia) é um composto do grupo das fenilureias, esse grupo não apresenta o anel aromático que é comum às citocininas tipo adenina, tais como, cinetina, benzilaminopurina, ou zeatina, é considerada a mais potente das difenil uréias que já foram analisadas para uso em cultura de tecidos vegetais (Mok et al., 1982; Chevreau et al., 1989). Esse hormônio possui uma maior estabilidade onde em baixas concentrações ela se torna ativa biologicamente, quando comparadas com outras citocininas sintéticas como cinetina e benzilaminopurina (Mok et al., 1982).

2.4 Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo que pode ser caracterizado quando células haplóides ou somáticas se desenvolvem por meio de diferentes estádios embriogênicos, esse processo dará origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas ou um grupo de células somáticas que dão origem a embriões (Zimmerman, 1993; Rose et al., 2010).

Ocorrem dois tipos básicos de embriogênese somática: o primeiro denominado de embriogênese direta, onde embriões somáticos se originam dos tecidos-matrizes, sem a formação de calos e a segunda a embriogênese indireta, em que os embriões se desenvolvem a partir de um calo, apresentando diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, os quais podem adquirir novas competências e originar embriões somáticos (Sharp et al., 1980; Yeung, 1995; Rizvi et al., 2013).

A embriogênese somática desempenha um papel importante na regeneração *in vitro*, se tornando uma via eficiente na regeneração de plantas e propagação em larga escala (Von Arnold, 2008), esse processo inclui uma série de eventos característicos, como a desdiferenciação de células, a ativação da divisão celular e a reprogramação de seus padrões de fisiologia, metabolismo e expressão gênica (Yang e Zhang, 2010).

É ainda uma via de regeneração relevante para as plantas e apresenta vantagens, como produção ilimitada de clones com características de elite, pesquisa básica funcional e molecular, produção de sementes sintéticas e conservação de recursos genéticos pela criopreservação (Aslam et al., 2011).

Fatores como a fonte de explantes, genótipo da planta doadora, tipo e concentrações de reguladores de crescimento têm influência na indução e na eficiência dos protocolos para embriogênese somática (Ahmadi et al., 2014).

No ano de 1995, Otoni propôs o primeiro protocolo para embriogênese somática, com a espécie *Passiflora giberti*. O autor cita a obtenção de calos embriogênicos a partir de explantes foliares utilizando meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo 2,4 ou 4,8 mg.L⁻¹ de picloram (Otoni, 1995). A partir desses calos, o autor obteve suspensões celulares, as quais desenvolveram embriões somáticos.

Com o passar do tempo surgiram novos protocolos responsivos para estudos com *Passifloras* onde vários autores como Anthony et al. (1999) Reis et al.,

(2007), Silva et al., (2009); Paim Pinto et al., (2011); Rosa et al., (2014); Ferreira et al., (2015); Silva et al., (2015), estabeleceram protocolos para embriogênese utilizando diferentes explantes e diferentes combinações de reguladores.

2.5 Organogênese

A organogênese *in vitro* é uma via de regeneração cuja célula e tecidos são induzidos a sofrer mudanças originando uma estrutura unipolar conhecida como primórdio caulinar (caulogênese) ou de raiz (rizogênese), no qual o sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido parental (Thorpe, 1994).

Segundo Otoni et al., (2013) várias espécies de maracujá têm sido submetidas a sistemas de propagação *in vitro*, principalmente via organogênese, usando uma grande variedade de reguladores de crescimento e tipos de explantes.

Muitos fatores, como a idade do explante, a utilização de reguladores de crescimento, antibióticos e outros têm sido reportados como tendo influência na regeneração das plantas (Subbaiah e Minocha 1990, Martin et al., 2003; Yu e Wei, 2008). Estudos de regeneração via organogênese têm sido reportados para várias espécies de *Passiflora* como podemos ver no (Quadro 1).

Quadro 1. Espécies de *Passiflora* que já foram alvos de estudos através da via de regeneração organogênese.

Espécie	Via de regeneração	Explante	Referência
<i>P. caerulea</i>	Organogênese	Gemas axilares e Raízes	Nakayama, 1966
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> e <i>P. molíssima</i>	Organogênese	Gemas Axilares	Moran Robles, 1979
<i>P. edulis</i>	Organogênese	Segmentos nodais	Kantharajah & Dodd, 1990

Quadro 1, Cont...

<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. caerulea</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. coccinea</i> , <i>P. herbertiana</i> , <i>P. suberosa</i>	Organogênese	Ápices caulinares, segmentos nodal folha	Drew, 1991
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Organogênese	Discos Foliares	Amugune et al., 1993
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. giberti</i> , <i>P. maliformis</i> , <i>P. amethystina</i> .	Organogênese	Folhas, cotilédones, hipocótilo, raiz e ápice caulinar.	Dornelas & Vieira, 1994
<i>P. edulis</i>	Organogênese	Segmentos foliares	Kawatta et al., 1995
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Organogênese	Hipocótilo e segmentos foliares	Faria & Segura, 1997
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e <i>P. suberosa</i>	Organogênese	Segmentos nodais e folha	Monteiro et al., 2000
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Organogênese	Segmentos internodais	Biasi et al., 2000
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e <i>P. suberosa</i>	Organogênese	Segmentos nodais e folha	Monteiro et al., 2000
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Organogênese	Segmentos internodais	Biasi et al., 2000

Quadro 1, Cont...

<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Cotilédone	Ribas et al., 2002
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Ápice caulinar Segmento nodal	Reis et al., 2003
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Folha	Becerra et al., 2004
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> ; <i>P. edulis f. edulis</i>	Organogênese	Ápice caulinar <i>Entrenó</i>	Isutsa, 2004
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Discos foliares	Trevisan & Mendes, 2005
<i>Passiflora cincinnata</i>	Organogênese	Folha e Raiz	Lombardi et al., 2007
<i>P. edulis, P. giberti, P. laurifolia</i>	Organogênese	Gema apical e axilar	Faria et al., 2007
<i>P. caerulea</i>	Organogênese	Folhas	Busilacchi et al., 2008

Quadro 1, Cont...

<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>	Organogênese	Segmento nodal botão floral e Gavinhas	Pipino et al., 2008
<i>P. alata</i>	Organogênese	Discos foliares, Hipocótilo	Pinto et al., 2010
<i>P. suberosa</i>	Organogênese	Segmentos foliares, Nodais, Internodais	Garcia et al., 2011
<i>P. cincinnata</i> e <i>P. edulis</i>	Organogênese	Raiz	Silva et al., 2011
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Embriões zigóticos	Rosa & Dornelas, 2012
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Segmentos nodais	Anand et al., 2012
<i>P. alata</i>	Organogênese	Segmentos Foliares, Nodais, Internodais	Pacheco et al., 2012
<i>P. pohlii</i>	Organogênese	Segmentos caulinares	Merhy 2014

Quadro 1, Cont...

<i>P. setácea</i>	Organogênese	Raiz e Hipocótilo	Vieira et al., 2014
<i>P. edulis</i>	Organogênese	Raiz e Hipocótilo	Rocha et al., 2016
<i>P. suberosa</i>	Organogênese	Raiz	Rosa et al., 2016

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P.P.; SOUZA, M.M.; SANTOS, E.A.; PIRES, M.V.; PIRES, M.M.; ALMEIDA, A.A.F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**. 166: 307-315, 2009.
- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M.E.; SILVA, J.A.T.da. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscísico acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 116: 343-351, 2014.
- ALBINO, B.E.S. **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2013. 74p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, p. 117-184, 2009.
- AMUGUNE, N.O.; GOPALAN, H.N.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passoin fruit. *African Crop Science Journal*, 1: 99-104, 1993.
- ANAND, S.P. et al., Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 22: 87-91, 2012.
- ANTHONY, P.; OTONI, W.C.; POWER, J.B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. (1999) Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R.D. (ed) **Plant cell culture protocols**. Wageningen: Humana Press, 1999. p. 169–181.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.387- 408.
- ASLAM, J.; KHAN, S.A.; CHERUTH, A.J.; MUJIB, A.; SHARMA, M.P.; SRIVASTAVA, P.S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis

in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18: 369-380, 2011.

BACCARIN, M.N.R.A. **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* spp.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, 1988. 101p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 147: 281-284, 1995.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas.** Embrapa Informação Tecnológica. p. 303, 2010.

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**, 79: 87-90, 2004.

BELLON, G.; FALEIRO, G.F.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N. T.V.; FONSECA, K.G.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro- doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31: 197-202, 2009.

BERNACCI, L.C., SOARES-SCOTT, M.D., JUNQUEIRA, N.T.V., PASSOS, I.R.S., MELETTI, L.M.M. (2008) Revisão *Passiflora edulis* Sims : the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors), **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30: 566–576.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agrícola**, 57: 661-665, 2000.

BUSILACCHI, H., SEVERIN, C., GATTUSO, M., AGUIRRE, A., DI SAPIRO, O., GATTUSO, S. Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. **Histological and Chemical Studies**. Bol. Latinoam. Caribe. 7, 257-263. 2008.

BRAGLIA, L.; DE BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; BIANCHINI, C.; PEPINO, L.; MERCURI, A. *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**, 855: 47–52, 2010.

BRUCKNER, C.H.; MELETTI, L.M.M.; OTONI, W.O.; ZERBINI JÚNIOR, F.M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. (ed.) **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa, UFV, 2002. p. 373-410.

CERVI, A.C. Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950-2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras. **Estudos de Biologia**, 27: 19-24, 2005.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M.; ABU-QAOU, H.A.; KORBAN, S.S.; SULLIVAN, J. G. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus sp.*) cultivars *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 7: 688-691, 1989.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (ed). **Maracujá Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2002. p. 11–14.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Isolation, culture, and plant regeneration from leaf protoplasts of *Passiflora*. In: LOYOLA-VARGAS, V.M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. (Eds.) **Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc., 2005. p. 209-215.

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**, 99: 199-208, 2009.

DORNELAS, M.C. E VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36: 211-217, 1994.

DREW, R.A. Micropropagation of *Passiflora* species (Passion fruit). In: BAJAJ, Y.P. S. (ed.) **Hightech and Micropropagation**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 135-149.

DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 26: 23-27, 1991.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187–209.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M.A.P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, 66: 535-543, 2007.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow Passionfruit by axillary bud proliferation. **Hort Science**, 32: 1276-1277, 1997.

- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib, A. e Šamaj, J. (eds.) **Somatic Embryogenesis**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 85-101.
- FERREIRA, D.A.T.; SATTler, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for *in vitro* propagation without plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 122: 629-638, 2015.
- FERREIRA, G.; FOGAÇA, L.A.; MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23: 160-163, 2001.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. Passifloraceae. In: KUBITZI, K. (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. v. 9. Berlin: Springer, 2007. p. 270-281.
- FLORES, P.S.; OTONI, W.C.; DHINGRA, O.D.; DINIZ, S.P.S.S.; SANTOS, T.M.; BRUCKNER, C.H. In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 108: 37-45, 2012.
- FLORIDO, L.Y.D. **Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss. e influência da irradiância no desenvolvimento e metabolismo secundário in vitro de *P. mollissima* Bailey H.B.K.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 64 p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, 106: 47–54, 2011.
- GLORIA, B.A.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELLAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived in leaf explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 24: 2007-2013, 1999.
- GUO, B.; ABBASI, B.H.; ZEB, A.; XU, L.L.; WEI, Y.H. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **Journal of Biotechnology**, 10: 8984-9000, 2011.
- HARTMANN, H.T. Plant propagation: principles and practices. New Jersey: **Prentice Hall**, 915 p, 2010.

HINOJOSA, G. F. Auxina em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.) **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 15-57.

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

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, 118: 153-166, 2001.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). *Annals of Botany*, Oxford, V.65, n.3, p.337-339, 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 147: 281-284, 1995.

LI, Z.T.; DHEKENY, S.; DUTT, M.; VAN ANAN, M.; TATTERSLL, J.; KELLEY, K.T.; GRAY, J. Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 42: 220–227, 2006.

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hybridisation and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82:19–44, 2005.

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**, 50: 239-247, 2007.

LORENZI, H. 2006. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

MARTIN, K.P. et al., Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* hort. **In vitro Cell Development Biology Plant**, 39: 500–504, 2003.

MELETTI, L.M.M. Maracujá ‘Jóia’ (IAC-277), ‘Maracujá-Maçã’, ‘Maracujá Maravilha’ (IAC-275), ‘Maracujá Monte Alegre’ (IAC-273). In: DONADIO, L. C. (Ed.). **Novas variedades brasileiras de Frutas**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 152-159.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; RUGGIERO, C. **Maracujá. Série Frutas Nativas** (6). Jaboticabal, SP: Funep. 2010, 55 p.

MELLO, M.O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 44: 197- 203, 2001.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, 55: 17-54, 2004.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N- phenyl-N"-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, 21: 1509-1511, 1982.

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**, 57: 571-573, 2000.

MONTERO, V.D.A.; MELETTI M.L.M.; MARQUES, O.M.M.; Fenologia do florescimento e características do perfume das flores de *Passiflora quadrangularis* L. (maracujá-melão), **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 19: 99-106, 2013.

MORAN ROBLES MJ.; Morphogenetic potential of the internodes of *Passiflora edulis* var. 531 flavicarpa Degener and *P. molissima* Bailey in *in vitro* cultures. **Turrialba** 29: 224-228, 1979.

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

MUSCHNER, V.C., ZAMBERLAN, P.M., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**. 35: 1036–1043.

NAKAYAMA, F. *In vitro* tissue culture of *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agricultura Nacional de La Plata**, 42: 63-74, 1966.

NHUT, D.T.; KHIET, B.L.T.; THI, N.N.; THUY, D.T.T.; DUY, N.; HAI, N.T.; HUYEN, P. X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) via thin cell layer (TCL) technology. In: JAIN, S.M.; HÄGGMAN, H. (Eds) **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 17–426.

OLIVEIRA J.C.; FERREIRA F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; Vaz, R. L. (Eds.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 211-239.

OLIVEIRA, J.C. de.; RUGGIERO, C. **Recursos Genéticos de Passiflora**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 6, p. 143-158, 2005.

OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento).

OTONI, W.C.; PAIM PINTO, D.L.; ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; DIAS, L.L.C.; SILVA, M.L.; SILVA, C.V.; LANI, E.R.G.; SILVA, L.C.; TANAKA, F.A.O. Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora sps.*). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 1-17.

PÁDUA, J.G. **Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 2004. 120p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

PAIM PINTO, D.L.; ALMEIDA, A.M.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 107: 521-530, 2011.

PAIM PINTO, D.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; SILVA, M.L.; OTONI, W.C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 103: 71-79, 2010.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulture**. 144, 42-47, 2012.

PALOMBI, M.A.; LOMBARDO, B.; CABONI, E. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. **Plant Cell Reports**, 26: 489– 496 2007.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora spp.*). In: FALEIROS, F.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 361-383.

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

PÉREZ, J.O.; d'EECKENBRUGGE, G.C.; RETREPO, M.; JARVIS, A.; SALAZAR, M.; CAETANO, C. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. **Biota Colombiana**, 8: 1-45, 2007.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 25:44-48, 2002.

PINTO, A.P.C.; MONTEIRO-HARA, A.C.B.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 46:28-33, 2010.

PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**, 8: 45-49, 2008.

PRAMMANEE, S. THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, 30: 1425-1429, 2011.

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C.; PEDROZA, C.M. Variation of gynogenic ability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. **Plant Breeding**, 130: 86-91, 2011.

REIS, L.B.; SILVA, M.L.; LIMA, A.B.P.; OLIVEIRA, M.L.P.; PAIM PINTO, D.L.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passion fruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, 738: 425- 431, 2007.

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**, 39: 618–622, 2003.

RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUIORIN, M.; AYUB, .A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* F. flavicarpa Deg.) **Ciência Rural**, 32: 237-241, 2002.

- RIZVI, M.Z.; DAS, S.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P.S. Somatic Embryogenesis in Monocots. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (Eds.). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 18-34.
- ROCHA, D.I.; PINTO, D.L.P.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DORNELAS, M.C.; OTONI, W.C.; Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, 252: 249-257, 2014.
- ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249: 747-758, 2012.
- ROCHA, D.I.; MONTE-BELLO, C.C.; DORNELAS, M.C.; Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 120: 1087-1098, 2015.
- ROCHA, D.I.; PINTO, D.L.P.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W.C.; Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of *SERK* gene expression. **Protoplasma**, 252: 249-257, 2015.
- ROCHA, D.I.; MONTE-BELLO C.C.; DORNELAS, M.C.; AIZZA, L.C.B. A passion fruit putative ortholog of the somatic embryogenesis Receptor Kinase1 gene is expressed throughout the in vitro de novo shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, x: 1-11, 2016.
- ROSA, Y.B.C.J.; DORNELAS, M.C. In vitro plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 108:91-99, 2012.
- ROSA, Y.B.C.J.; BELLO, C.C.M.; DORNELAS, M.C.; Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 120: 69-77, 2014.

ROSA, Y.B.C.J; MONTE-BELLO C.C; DORNELAS, M.C. In vitro organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, x: 1-8, nd-nd, 2016.

ROSE, R.J.; MANTIRI, F.R.; KURDYUKOV, S. CHEN, S.K.; WANG, X.D.; NOLAN, K.E.; SHEAHAN, M.B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E. C.; DAVEY, M.R. (Eds) **Plant developmental biology—biotechnological perspectives**, 2: 3–26, 2010.

SAMPAIO, E. **Fisiologia Vegetal: Teoria e Experimentos**. Ponta Grossa, PR: UEPG, 1998, 190 p. ALTMAN, A. The role of auxin in root initiation in cutting. **Proceedings of international Plant Propagation Society**, London, 22: 280, 1972.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, 2: 268-310, 1980.

SÃO JOSÉ, A.R.; **Maracujá: Produção e Mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994, 255 p.

SHORT, P.S. Passifloraceae. In: SHORT, P. S; COWIE, I. D. (Eds.) **Flora of the Darwin Region**. Palmerston: Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport, 2011. p. 1–5.

SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 407-416, 2011.

SILVA, G.M.; CRUZ A.C.F.; OTONI, W.C; PEREIRA,T.N.S; ROCHA,D.I; SILVA, M.L.; Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cell. Developmental Biology – Plant**, 51: 539-545, 2015.

SILVA, M.L. **Embriogênese somática, produção de sementes sintéticas e transformação genética de maracujá (*Passiflora cincinnata* Masters) mediada pela técnica de SAAT**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 117p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento).

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora*

cincinnata Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos.

Plant Cell, Tissue Organ Culture, 99: 47–54, 2009.

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; LANI, E.R.G.; CARVALHO, I.F.; OTONI, W. C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**, 21: 231-338, 2015.

SOUSA, L.B.; MELO, L.F.; FREITAS, R.C.A.; SETUBAL, J.W.; REZENDE, D.F. Germinação e emergência de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 5: 190 – 94, 2010.

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

STENZEL, N.M.C.; CARVALHO, S.L.C. Comportamento do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) enxertados sobre diferentes porta- enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 14:183-186, 1992.

SUBBIAH, M.M.; MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, 9: 370-373, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, 1991.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, K.I.; THORPE, T.A.(Eds.) *Plant cell and tissue culture*. **Kluwer Academic: Netherlands**, pp.17-36, 1994.

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

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora - Passionflowers of the world**. 1 ed. Portland: Timber Press, 2004. 430 p.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3ª ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.

VIEIRA, L.M.; ROCHA, D.I.; TAQUETTI, M.F.; DA SILVA, L.C.; DE CAMPOS, J. M.S.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C.; In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 50: 738-745, 2014.

- VIEIRA, M.L.C; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp., passion fruit. In: LITZ, R. E. (Ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Cambridge: CABI Publishing, 2004.p. 435-453.
- VON ARNOLD, S.; ALSTERBORG, E.; WLLS, N. Micromorphological studies of adventitious bud formation on *Picea abies* embryos treated with cytokinin. **Physiologia Plantarum**, 72: 248-256, 1998.
- YANG, J.L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI, C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 100:49-58, 2010.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, 29: 36-57, 2010.
- YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1995. p. 205- 247.
- YU, Y.; WEI, Z. M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biology Plantarum**, 52: 553–556, 2008.
- XU L, HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Curr Top Dev Biol** 108:1–33, 2014.
- ZERBINI, F.M.; OTONI, W.C.; VIEIRA, M.L.C. Passion fruit. In: Kole, C.; Hall, T. C. (Eds.) **A compendium of transgenic crop plants**, v.5, tropical and subtropical fruit and nuts. 1^a ed. Berlin: John Wiley & Sons, 2008. p. 213-234.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **Plant Cell**, 5: 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO I

Embriogênese somática em *Passiflora quadrangularis* L. a partir de embriões zigóticos

RESUMO

O objetivo do trabalho foi induzir embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora quadrangularis* L. e identificar os compostos de reservas no processo de histodiferenciação. Embriões somáticos isolados foram cultivados na ausência de irradiância em meio de MS com a adição de diferentes concentrações de 2,4-D. Após 60 dias de cultivo foram coletadas amostras dos explantes, após foram fixados e inclusos em historesina, logo o material foi seccionado e submetido a colorações com azul de toluidina e aos testes histoquímicos sudan slack B, PAS, xylydine Ponceu e lugol. Após 30 dias o tratamento acrescido de 27,14 μM de 2,4-D, obteve o maior número de calos embriogênicos em meio para indução. Após transferência para o meio de histodiferenciação após 30 dias de cultivo foi observado que 60% dos embriões permaneceram em estágio globular e 20% em embriões cotiledonares. Os embriões somáticos em estágio cotiledonar não se converteram em plantas, demonstrando que as células não estavam completamente determinadas para seguir a rota embriogênica. Para devida comprovação do processo embriogênico foi realizado anatomia e a histoquímica para identificar as substâncias de reservas presentes no evento morfogênico. Os estudos anatômicos revelaram a ocorrência de embriogênese somática indireta, a partir de células protodérmicas e subepidérmicas do embrião zigótico, ao 60º dia de cultivo *in vitro*. Através dos testes histoquímicos foi possível verificar grande quantidade de compostos de reserva como amido, proteínas e lipídios nas células do parênquima.

Palavras-chave: Maracujá Amazônico, 2,4-D, Morfogênese *in vitro*.

Somatic embryogenesis in *Passiflora quadrangularis* L. from zygotic embryos

ABSTRACT

The objective was to induce somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Passiflora quadrangularis* L. and identify compounds reserves in the process histodiferenciação. Isolated somatic embryos were cultured in the absence of irradiance on MS medium with the addition 2.4-D. Samples were collected from the explants after 60 days of cultivation. Following fixation and embedded in historesin material was cut and subjected to staining with toluidine blue and histochemical tests sudam black B, PAS, xylidine Pounceu and lugol. After 30 days treatment plus 27.14 μM of 2,4-D, had the highest number of somatic embryogenesis in medium for induction. After transfer to medium "histodiferenciação" after 30 days of culture was observed that 60% of the embryos remained at globular stage and 20% in cotyledonary embryos. Somatic embryos at the cotyledonary stage were not converted in plants, indicating that the cells were not completely certain embryogenic route to follow. Due to evidence of embryological process was carried anatomy and immunohistochemistry to identify the substances present in reserves morphogenic event. The anatomical studies revealed the occurrence of indirect somatic embryogenesis from protodermal cells and subepidermal of zygotic embryo, the 60th day of in vitro culture. Through histochemical tests was verified lot reservation compounds like starch, protein and lipid in parenchyma cells.

Keywords: Passion fruit Amazônico, 2,4-D, *in vitro* morphogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Passiflora quadrangularis L. conhecido como maracujá-açú, maracujá-gigante, maracujá Amazônico é uma trepadeira de grande porte, caule grosso e intenso desenvolvimento, bastante cultivada nas regiões tropicais. Os frutos são os maiores do gênero chegando a pesar até 3 kg, possui sabor doce-acidulado, sendo consumido ao natural ou em compotas. As flores são solitárias, grandes, fragrantas e de coloração branca com púrpura (São José, 1994; Lorenzi, 2006).

Embora *P. quadrangularis* não seja uma espécie comercial tem sua importância no melhoramento genético do gênero, por apresentarem plantas rústicas e vigorosas. Além de possuir tolerância ao fungo *Alternaria passiflorae* e resistência à fusariose, porém é muito sensível aos nematóides e a *Xanthomonas* sp. (Oliveira e Ferreira, 1991).

A propagação do maracujazeiro pode ser realizada sexualmente ou assexualmente por meio de estaquia, enxertia, alporquia e cultura de tecidos *in vitro* (Baccarin, 1988; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010).

Várias técnicas baseadas na cultura de tecidos foram aplicadas à cultura do maracujá, sendo a micropropagação (Dornelas e Vieira, 1994; Nhut et al., 2007), estudos fisiológicos (Desai e Mehta, 1985; Dias et al., 2010), protoplastos e hibridação somática (Otoni et al., 1995; Davey et al., 2005), transformação genética (Manders et al., 1994, Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010, 2011), sementes sintéticas (Silva, 2015), conservação *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007), ginogênese (Rêgo et al., 2011), (seleção *in vitro* para resistência a doenças (Flores et al., 2012) e embriogênese somática (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011, Rosa et al., 2014; Rocha et al., 2014, Ferreira et al., 2015; Silva et al., 2015).

O processo da embriogênese somática inclui uma série de eventos característicos para o seu desenvolvimento, como a diferenciação das células, a ativação da divisão celular e a reprogramação de seus padrões fisiológicos, metabolismo e expressão gênica que resultam na formação do embrião ou a geração de uma nova planta (Komamine et al., 2005; Yang e Zhang, 2010; Rose et al., 2010). A embriogênese somática envolve uma única célula ou grupos de células somáticas que desenvolvem e diferenciam-se em embriões sob condições de cultivo

adequadas (Zimmerman, 1993; Rocha et al., 2015). A diferença marcante entre os embriões somáticos e zigóticos é o fato dos embriões somáticos se desenvolverem livres de correlações físicas com o tecido maternal (Zimmerman, 1993).

Ainda há poucos protocolos para embriogênese somática em *Passiflora* (Otoni et al., 2013). Protocolos responsivos de embriogênese somática possuem um grande potencial de aplicação na propagação de maracujazeiros (Silva et al., 2009; Otoni et al., 2013). O primeiro protocolo para embriogênese somática foi proposto por Otoni, (1995), onde a regeneração dos embriões somáticos ocorreu a partir de suspensões celulares provenientes de calos embriogênicos, que foram obtidos a partir de explantes foliares e calos embriogênicos provenientes do cultivo de protoplastos.

O protocolo de embriogênese somática de *P. cincinnata* estabelecido por Silva et al. (2009) utilizando-se de embriões zigóticos como fonte de explante e da combinação de 2,4-D e BA, tem sido aplicado para a obtenção de embriões somáticos em várias espécies de *Passiflora* (Paim-Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012; Rosa et al., 2015; Ferreira et al., 2015).

Rosa et al., (2014) cultivando embriões zigóticos em diversas espécies de *Passifloras* (*P. alata* Curtis, *P. crenata* Feuillet & Cremers, *P. edulis* Sims FB-100, *P. foetida* L. e *P. gibertii* N.E. Brown) conseguiram que os embriões somáticos se diferenciasssem em plântulas que foram aclimatizados em casa de vegetação. Paim-Pinto et al., (2011) e Silva et.al., (2015) cultivando embriões zigóticos de *Passiflora edulis* Sims, obtiveram um protocolo responsivo e reproduzível para indução de embriogênese somática em *P. edulis* até o estágio globular, contudo não ocorreu a maturação dos embriões somáticos e sua posterior conversão em plântulas.

O 2,4-D isolado ou combinado com outros reguladores de crescimento, principalmente as citocininas, tem sido comumente usado para a indução de embriogênese somática através da cultura de tecidos. A maioria dos sistemas de indução da embriogênese somática *in vitro* requerem uma reprogramação celular para a sua iniciação (Fehér 2005). Com isso ocorre mudanças morfológicas e bioquímicas que resultam na formação do embrião somático e geração de uma nova planta (Schmidt et al., 1997; Komamine et al., 2005).

Estudos com métodos histoquímicos podem auxiliar na otimização dos protocolos na indução da embriogênese somática e aumentar a eficiência do

sistema de regeneração (Almeida et al., 2006; Otoni et al., 2013). Segundo Cangahuala-Inocente et al., (2009) estudos envolvendo métodos histoquímicos permitem analisar a mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico, possibilitando reconhecer regiões e/ou tecidos que requerem alta demanda energética.

Durante a embriogênese zigótica, essas reservas acumulam-se no embrião, normalmente nos cotilédones, ou no endosperma e têm a função de fornecer compostos que serão utilizados durante a germinação do embrião até ao início da autotrofia (Rocha et al., 2012). Nos embriões somáticos, esse processo de acumulação de reservas é muito importante, pois o embrião não tem um endosperma associado, a falta do endosperma leva a deficiência na conversão dos embriões somáticos em plantas, o que limita o sucesso da embriogênese somática (Brownfield et al., 2007).

Estudos envolvendo métodos histoquímicos durante a embriogênese somática no gênero *Passiflora* são escassos, Rocha et al., (2012), avaliaram o padrão de mobilização de reservas durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*. Silva et al., (2015) descreveram o acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em *P. edulis* a partir de embriões zigóticos.

O objetivo do trabalho foi induzir embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora quadrangularis* e identificar o acúmulo dos compostos de reservas no processo de histodiferenciação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução da embriogênese somática

Sementes de *P. quadrangularis* foram obtidas de um pomar particular no município de Tangará da Serra, MT, os tegumentos das sementes foram removidos para a retirada dos embriões zigóticos, com auxílio de mini-morsa.

As sementes foram desinfestadas em capela de fluxo laminar, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por 3 minutos, em seguida em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) por 25 minutos, acrescido de duas gotas do agente dispersante Tween-20 a 0,1% (v/v) a cada 100 mL de solução.

Após foram submetidas a 4 enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada e mantidas overnight em água destilada estéril para reidratar e facilitar a remoção dos embriões zigóticos.

A retirada dos embriões zigóticos do endosperma das sementes foi realizada em capela de fluxo laminar (Figura 1A). Os embriões foram inoculados em meio de cultura constituído de sais MS (Murashigue e Skoog, 1962), complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), como agente gelificante, acrescido de diferentes concentrações do regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sendo: T1) 9,04 µM; T2) 13,57 µM; T3) 18,09 µM; T4) 22,62 µM; T5) 27,14 µM; T6) 31,66 µM; T7) 36,19 µM D; T8) 40,71 µM; T9) 45,24 µM; T10) MS0.

O pH foi ajustado em 5,7 ± e autoclavado durante 15 minutos (121°C e 1,1 atm de pressão). Os embriões zigóticos foram cultivados em placas de Petri 90 x 15 mm contendo alíquotas de 30 mL de meio e vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®) e mantidas em sala de cultivo por 30 dias, na ausência de luz, à temperatura de 27 ± 2°C de acordo com Silva et al., (2009).

Após 30 dias os calos com respostas embriogênicas foram transferidos para histodiferenciação em meio cultura constituído de sais MS (Murashigue e Skoog, 1962), complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), como agente gelificante. Na fase de histodiferenciação dos pró-embriões avaliou-se

calos com potencial embriogênico e os não embriogênicos, número de embriões somáticos globulares, cotiledonares.

2.2 Análise citológica

Massas pró-embriogênicas foram maceradas e coradas em lâmina histológica com azul de Evans (0,5%) por 3 minutos, em seguida com carmim acético (1%) por 3 minutos (Durzan, 1998) e cobertas com lamínula para a visualização e distinção entre células pró-embriogênicas e não embriogênicas.

As observações e os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (Carl Zeiss Primo Star 8mp CARL ZEISS, Alemanha) com câmera digital acoplada (Axiocam 105 cor) localizada no Laboratório de Microscopia da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT).

2.3 Análise anatômica e Histoquímica

Para as análises anatômicas os embriões zigóticos de *P. quadrangularis* que apresentaram resposta foram coletados. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, (1965) está é composta por [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5 mM].

As amostras fixadas foram desidratadas em série com concentração crescente de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) em intervalos de trinta minutos entre uma concentração e outra esse processo retira a água presente no material garantindo uma boa infiltração quando o material for incluso na historesina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha).

Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e foram corados com azul de toluidina (O' Brien e McCully, 1981), Xylidine Ponceau (Vidal, 1970) para a detecção de proteínas totais, ácido periódico-reagente de Schiff (O'Brien e McCully, 1981) para polissacarídeos neutros, sudan black B (Pearse, 1972) para detecção de lipídios, reagente de lugol (Johansen, 1940) para detecção de amido (O'Brien et al., 1964).

A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmara digital acoplada (Spot Insightcolour

3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados seguindo o Delineamento Inteiramente Casualizado. O experimento de indução da embriogênese somática foi composto por 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo 10 embriões zigóticos. Na fase de indução da embriogênese somática foram avaliadas a frequência de formação de calos e a frequência de calos com potencial embriogênico. Na fase de histodiferenciação dos pró-embriões avaliou-se calos com potencial embriogênico e não embriogênico, número de embriões somáticos globulares e cotiledonares.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott e Knott a 5% com o programa estatístico SISVAR@ (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o quinto dia de cultivo dos embriões zigóticos em meio indução, observou o intumescimento do eixo embrionário e após 10 dias de cultivo a formação de massas pró-embriogênicas localizadas na região do eixo embrionário e nos cotilédones do embrião zigótico (Figura 1B). Os embriões zigóticos que foram inoculados no tratamento controle MS na ausência de reguladores de crescimento iniciaram a germinação após 10 dias de cultivo *in vitro*.

Após 30 dias de cultivo as células pró-embriogênicas coraram de vermelho através do teste de dupla coloração. Apresentaram-se arredondadas, com conteúdo citoplasmático denso e parede celular fina enquanto as células não embriogênicas coraram de azul (Figura 1C).

Essas células que coraram de azul são normalmente vacuoladas, essa vacuolização é um dos primeiros sinais de morte celular, que vem acompanhado de rupturas na membrana (Filonova et al., 2000) e o corante Azul-de-Evans consegue penetrar nessas células através de rupturas da membrana, colorindo o interior dessas células em azul (Bhargava et al., 2007).

A reação positiva ao carmim acético é uma característica associada com a competência celular para a formação de embriões somáticos (Durzan, 1998). As células embriogênicas são pequenas e morfológicamente constituídas de núcleo volumoso e conteúdo citoplasmático denso e parede celular fina devido a alta atividade metabólica, ao passo que não embriogênicas se distinguem pela coloração azul, núcleos pequenos, citoplasma menos denso, sendo mais alongadas em função do maior grau de vacuolização (Apezato-da-Glória et al., 2005).

A técnica de dupla coloração também tem sido usada com sucesso para diferenciar populações de células embriogênicas das não embriogênicas em *Araucaria angustifolia* (Durzan, 1998), *P. cincinnata* (Silva et al., 2009), *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011) e *P. edulis* (Silva et al., 2015).

Os calos não embriogênicos (Figura 1D), se apresentaram friáveis, translúcidos e com coloração esbranquiçada. Os explantes que apresentaram potencial embriogênico quando transferidos para o meio de histodiferenciação responderam com o desenvolvimento de embriões globulares (Figura 1E).

No meio para histodiferenciação após 30 dias de cultivo foi possível observar

embriões em estágios globular e cotiledonar (Figuras 1 F-G-H).

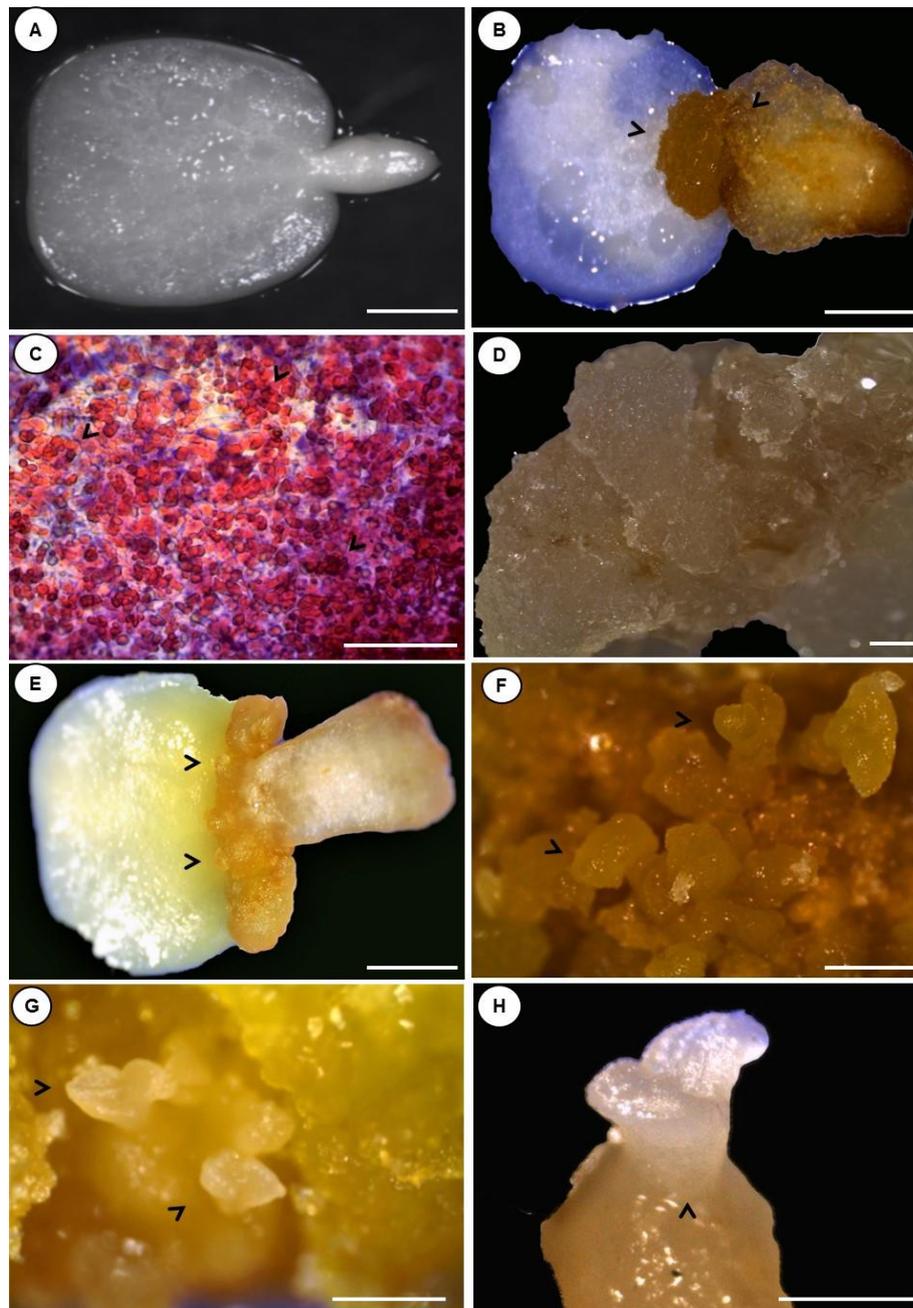


Figura 1- Embriogênese somática em *P. quadrangularis* induzida a partir de embriões zigóticos maduros. **A-** Embrião zigótico; **B-** Formação de massas pro-embriogênicas localizadas na região do eixo embrionário; **C-** Células coradas com carmim acético confirmando a competência celular das células para embriogênese somática; **D-** Calos não embriogênicos; **E-** Embriões no estágio de desenvolvimento globular; **F-** Formação de embriões em pré cotiledonares; **G-H-** Embriões no estágio de desenvolvimento cotiledonar. Barras: **A, B, D, E, F=** 0,3 mm; **C, G=** 0,5 mm, **H=** 0,7 mm.

Após 30 dias de cultivo os embriões zigóticos cultivados em meio suplementado com 27,14 μM de 2,4-D, resultaram no maior número médio de calos embriogênicos (Figura 2), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, os calos embriogênicos possuíam aspecto semi-compactos, coloração creme ou amarelado e de consistência viscosa.

Já para os calos não embriogênicos não houve diferença significativa entre si, porém os tratamentos acrescidos de 18,09, 22,62, e 40,71 μM de 2,4-D esses apresentaram o maior número médio de oito calos respectivamente (Figura 2).

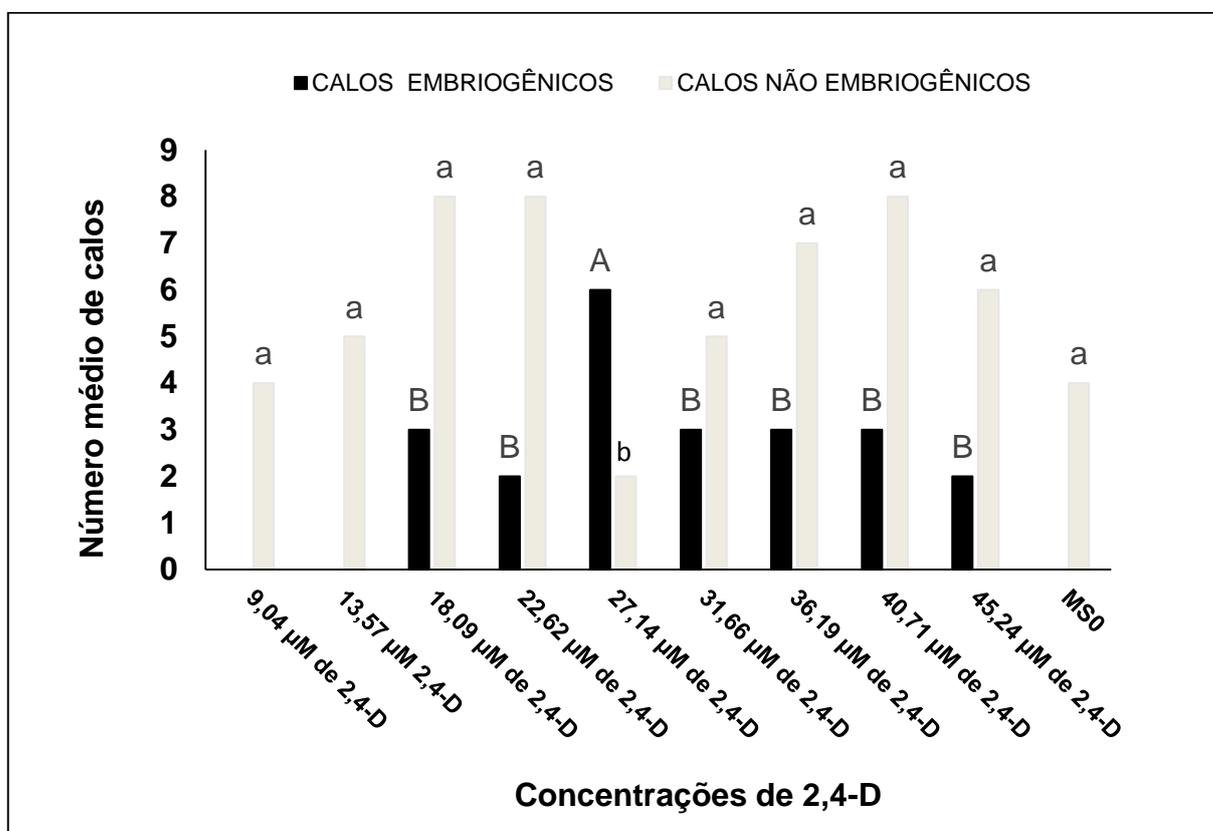


Figura 2. Número médio de calos embriogênicos e não embriogênicos produzidos a partir de embriões zigóticos, após 30 dias de cultivo em meio de indução. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott e Knott a 5% de probabilidade.

O número de explantes que responderam ao meio de histodiferenciação não diferiram estatisticamente entre si, tendo como melhor resposta morfogênica os calos cultivados com 27,14 μM de 2,4-D onde converteram 60% em embriões globulares e 20% em embriões cotiledonares (Figura 3).

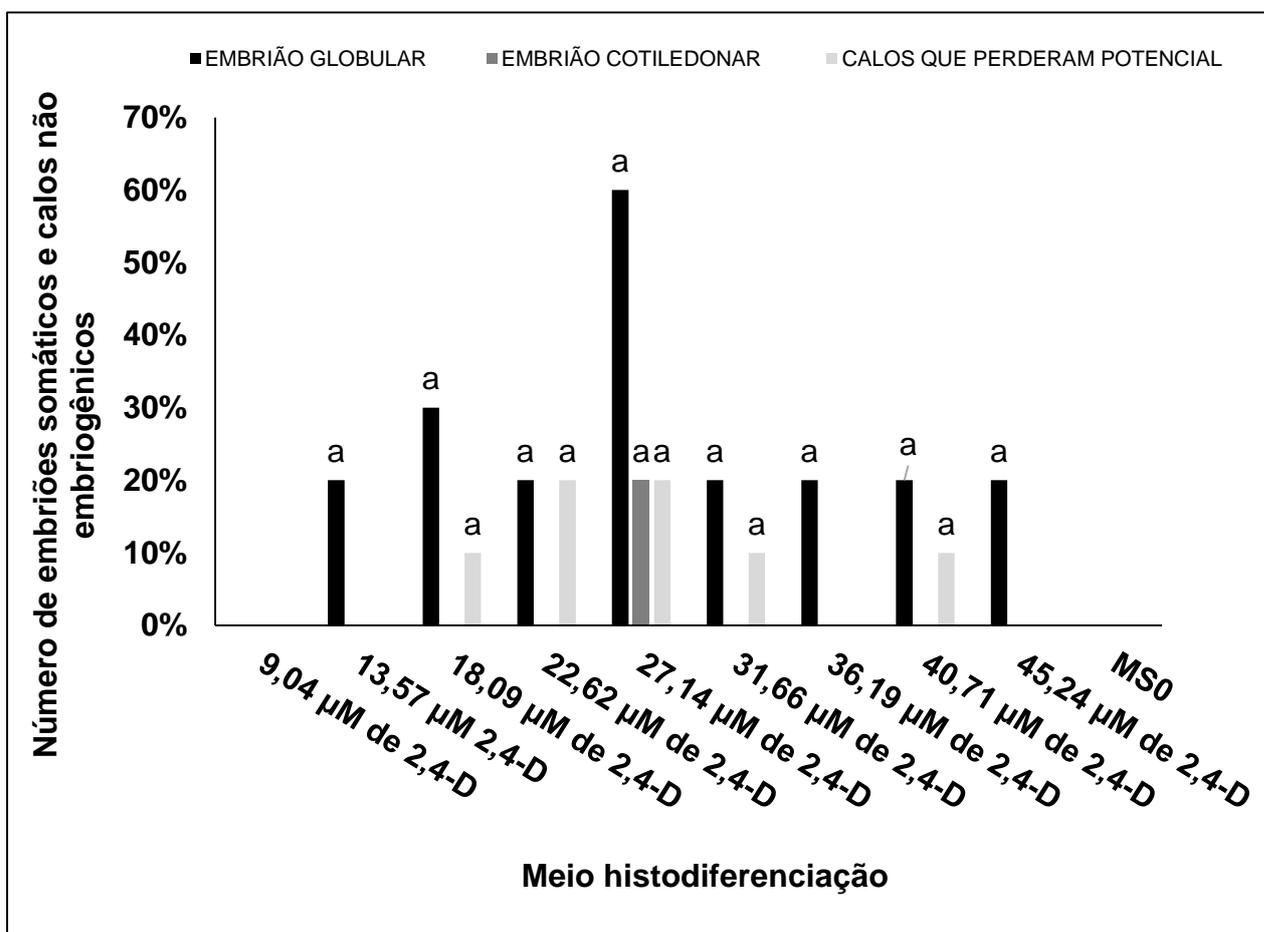


Figura 3. Número médio de embriões globulares, cotiledonares, e calos que perderam o potencial embriogênico em meio para histodiferenciação. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott a 5% de probabilidade.

Os embriões somáticos em estágio globular e cotiledonar não se converteram em plantas, permaneceram em seus estágios e observou-se necrose. A perda do potencial embriogênico pode ser porque as células não estavam totalmente determinadas para seguir a rota embriogênica até a formação completa da planta.

Paim Pinto et al., (2011) e Silva et al., (2015) também não obtiveram sucesso na diferenciação dos embriões somáticos em plântulas quando induziram embriogênese somática com embriões zigóticos de *P. edulis* com meio suplementado com 2,4-D e BA. Os autores relatam que vários fatores podem estar relacionados com a perda do potencial embriogênico, como os estímulos externos que não foram suficientes para manter ativo a expressão gênica necessária para a

maturação dos embriões somáticos ou a atividade do gene responsável pode ter cessado.

O gene SERK está diretamente ligado com a reprogramação celular na rota embriogênica, indicando o início de um novo programa molecular em células que já possuíam função anterior diferente (Hecht et al., 2001) e a perda desta expressão inibe a diferenciação e/ou desdiferenciação de células potencialmente embriogênicas.

Segundo Otoni et al., (2013), a maturação dos embriões somáticos e a subsequente conversão em plântulas, ainda são consideradas etapas limitantes para a ampla utilização da embriogênese somática em *Passiflora*.

É nesse período que os embriões somáticos sofrem várias alterações morfológicas e químicas, as quais são evidenciadas pela deposição de materiais de armazenamento, redução da atividade metabólica e a aquisição de tolerância à dessecação (Stasolla et al., 2003).

O uso isolado ou combinado de 2,4-D com outros reguladores de crescimento, principalmente citocininas, têm gerado bons resultados para várias espécies na indução de embriogênese somática via cultura embriões zigóticos (Silva et al., 2009, Rocha, et al., (2015). Auxinas e citocininas são os principais envolvidos na diferenciação de células vegetais e a relação entre eles é crucial para a especificação da identidade das células durante as fases iniciais da morfogênese (Fehér et al., 2003; Jiménez 2005).

O presente estudo relata pela primeira vez a indução de embriogênese somática com o uso do regulador 2,4-D em embriões zigóticos de *P. quadrangularis*, confirmada através de técnicas histológicas.

Diferindo do trabalho realizado por Silva et al., (2009) que obtiveram sucesso ao utilizar embriões zigóticos de *P. cincinnata*, cultivando os embriões com meio MS acrescido de 18,1 μM de 2,4-D + 4,5 μM de BA, onde conseguiram embriogênese somática indireta primária e direta secundária.

Rosa et al., (2014) obtiveram embriões somáticos nas espécies (*P. alata* Curtis, *P. crenata* Feuillet & Cremers, *P. edulis* Sims, *P. gibertii* N.E. Brown) com meio MS suplementado com 4,5 μM BA e 13,6 μM ou 18,1 μM de 2,4-D. Ferreira et al., (2015) cultivando embriões zigóticos de *P. miniata* e *P. speciosa* obtiveram embriões somáticos com meio MS acrescido com 9,1 μM 2,4-D e esses se

diferenciaram em plântulas e foram aclimatizados em casa de vegetação.

Silva et. al., (2015) cultivando embriões zigóticos de *Passiflora edulis* Sims FB-300, obtiveram um protocolo responsivo e reproduzível para indução de embriogênese somática em *P. edulis* até o estágio globular com meio MS acrescido de 31,06 μ M de picloram + 2,22 μ M de BA + 2,27 μ M de TDZ.

O uso de embriões zigóticos para indução de culturas embriogênicas apresenta algumas vantagens em relação às demais fontes de explantes. Uma delas está na rápida obtenção de resposta porque as células dos embriões zigóticos possuem um potencial embriogênico, pois detém muitos dos genes necessários para o processo de indução já expressos (Paim-Pinto et al., 2011; Elhiti e Stasolla, 2011).

Através dos histológicos foi evidenciado o início do desenvolvimento dos embriões somáticos. As massas pró-embrionárias originaram-se de divisões celulares nos planos anticlinais e periclinais nas células do parênquima e do meristema fundamental (Figura 4A). Nessa região observaram-se aglomerados de células com os núcleos proeminentes e pouco vacuolizados, apresentando intensa proliferação celular com repetidas divisões mitóticas (Figura. 4B).

Embriões somáticos desenvolveram-se a partir da protoderme diferenciada e ocupavam as faces abaxial e adaxial dos cotilédones. Onde foi possível observar o início do processo de vacuolização das células, o qual ocorreu de forma gradual partindo das camadas periféricas para as camadas internas do explante. Os embriões no estágio globular já se apresentavam isolados dos tecidos de origem e na região da protoderme começam a se diferenciar (Figura 4 C).

Aos 40 dias de cultivo observou um grande número de divisões celulares levando a formação de embriões em estágio globular (Figura 4 D-E) e o início do alongamento para a fase de torpedo com intensa atividade celular (Figura F).

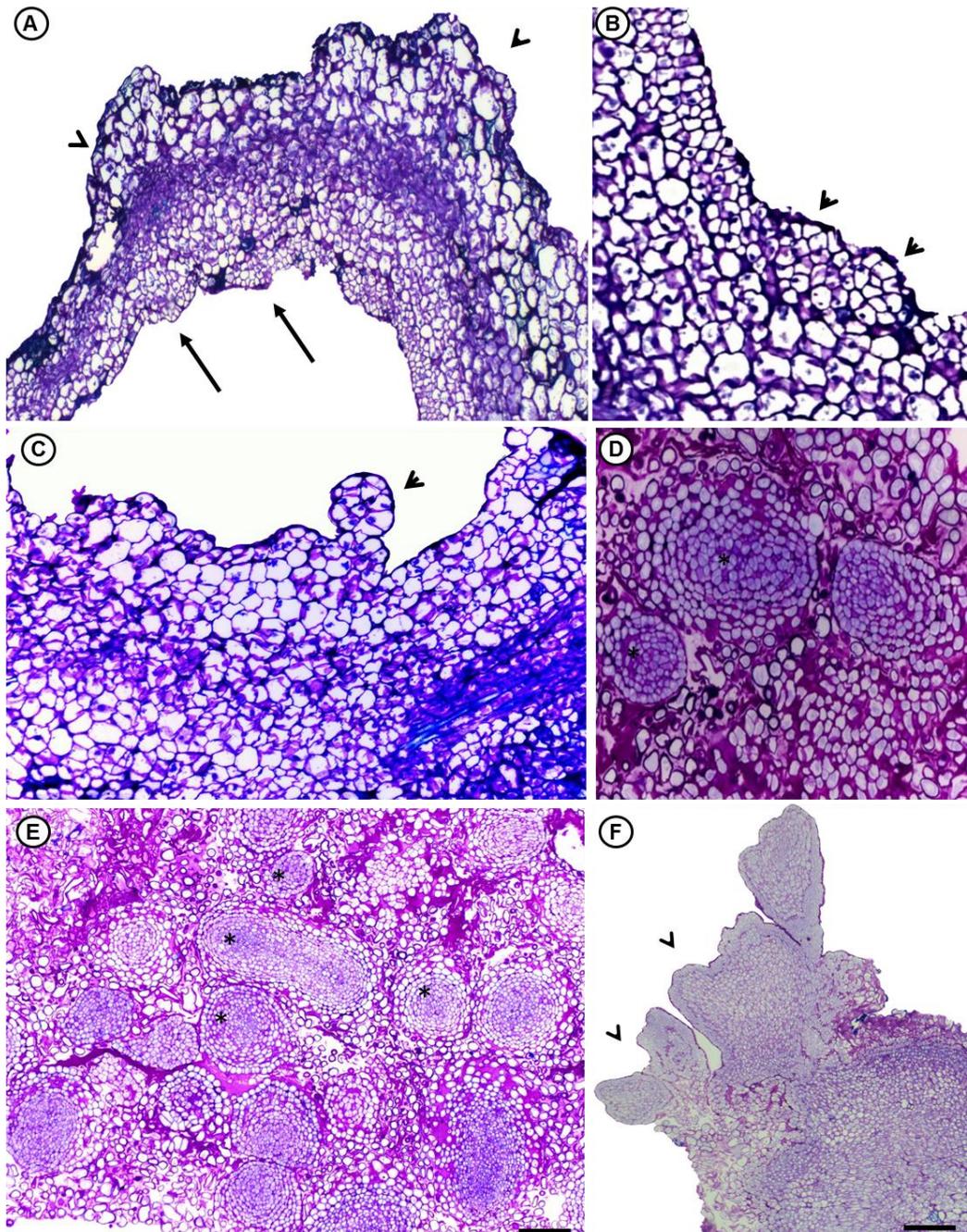


Figura 4. Padrões de regeneração via indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. quadrangularis*; **A-B-** Cortes histológicos transversal mostrando a organização das divisões celulares periclinais e anticlinais (setas indicam as divisões celulares); **C-** A Embrião globular (seta indicando o embrião globular sem conexão vascular com o tecido de origem); **D-E-** Embriões somáticos em fase globular (* indicando fase globular); **F-** Embriões somáticos em fase pré-cotiledonar (seta indicando o embrião se alongando para a fase cotiledonar. Barras: **A, E, F**= 0,2 mm; **B, C, D**= 0,5 mm.

A realização de análises histológicas é importante para a caracterização da via regenerativa, uma vez que se pode estabelecer melhores condições de cultivo e, assim, favorecer o estabelecimento de protocolos responsivos para a indução e obtenção de plantas, permitindo caracterizar alterações celulares durante o processo embriogênico (Apezato-da-Glória et al., 2005).

Segundo Silva et al. (2009), a utilização de técnicas anatômicas auxiliam o entendimento da embriogênese somática em *Passiflora* spp. e permite desvendar os processos envolvidos na transição embriogênica, bem como a dinâmica das expressões dos genes envolvidos no processo embriogênico durante os estádios de desenvolvimento dos embriões (Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012).

No quadro 1 é possível identificar que através dos teste histoquímicos foi possível identificar a presença ou ausência dos compostos de reserva presentes no embrião zigótico após 60 dias em meio para histodiferenciação.

Quadro 1. Identificação da presença e ausência de compostos de reserva através de testes histoquímicos em embriões zigóticos de *Passiflora quadrangularis* após 60 dias em meio para histodiferenciação.

Teste	Composto	Presença	Ausência
Sudam Black B.	Corpos lipídicos	x	
Reação Xylidine Ponceau (XP)	Corpos protéicos	x	
Lugol	Grãos de amido	x	
Ácido periódico-reagente Schiff (PAS)	Grãos de amido	x	

O embrião zigótico apresentou a presença de corpos lipídicos (Figura 5A), identificados por meio da reação positiva ao reagente sudam black B.

Silva et al. (2015), cultivando embriões zigóticos de *P. edulis* para indução de embriogênese somática não observaram a presença de corpos lipídicos, isso pode ter ocorrido devido a biossíntese de lipídios pois eles exercem papel fundamental na composição das membranas celulares.

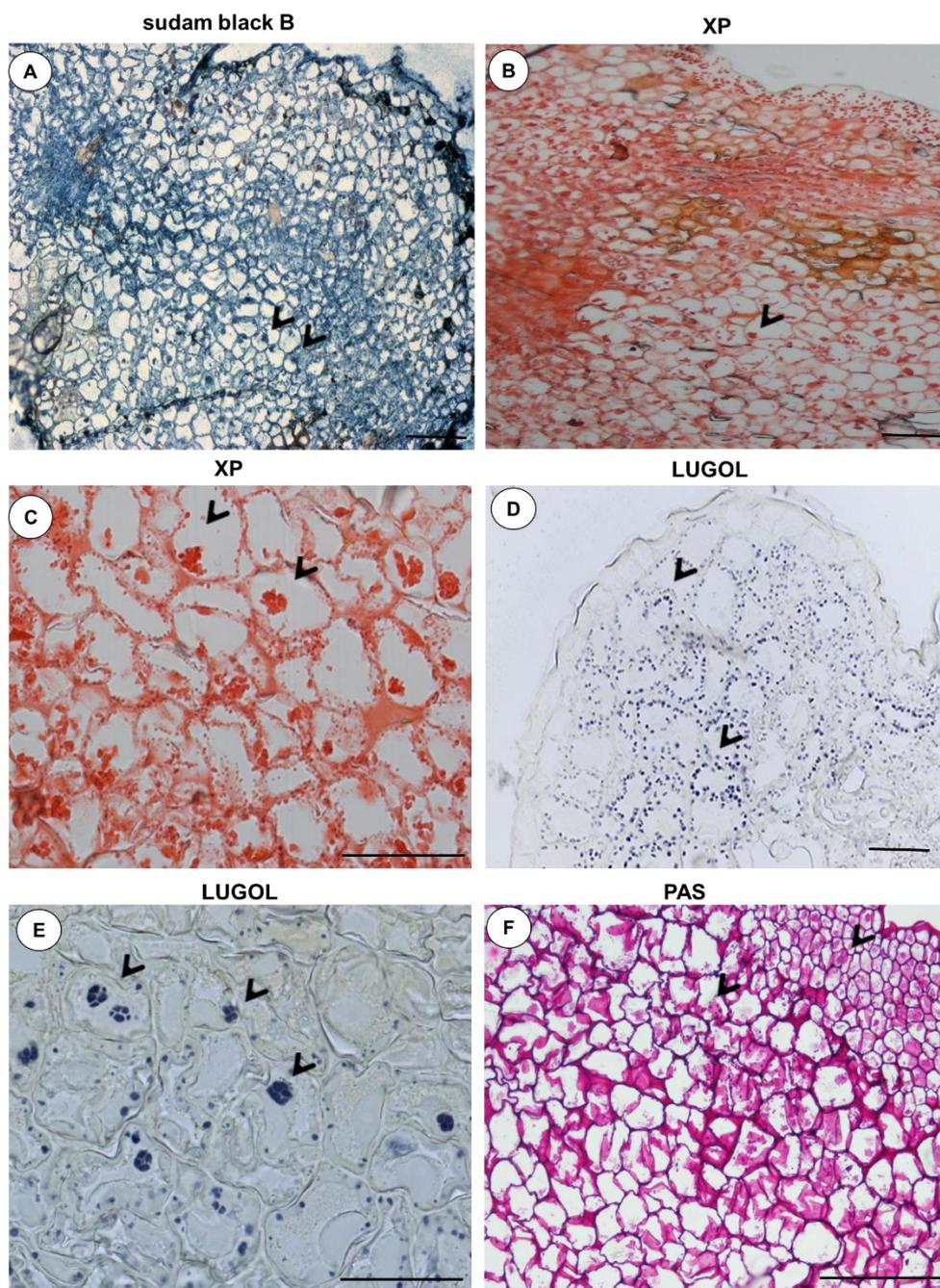


Figura 5. Análise histoquímica da embriogênese somática em *P. quadrangularis* a partir de embriões zigóticos maduros em meio de histodiferenciação. **A)** Reação positiva de corpos lipídicos (setas) ao sudam black. **B-C)** Corpos protéicos (setas) evidenciados pela coloração vermelha evidenciado pelo Xylidine Ponceau – XP. **D-E)** Grãos de amido (setas) identificados pela reação positiva evidenciado pelo LUGOL. **F)** Grãos de amido (setas) em células do embrião zigótico evidenciados pelo PAS. Barras: **A, B, D,** = 0,2 mm; **C, E, F** = 0,5 mm.

Rocha et al., (2012) descreveram que durante o processo de embriogênese somática em *P. cincinnata* a quantidade de corpos lipídicos diminuiu gradualmente até o completo esgotamento, que ocorreu aos 18 dias de cultivo.

Segundo Buchanan et al. (2000), a biossíntese de lipídios em vegetais superiores envolve o retículo endoplasmático e os plastídios. Os ácidos graxos destinados a membranas celulares são sintetizados via plastídios, enquanto que os ácidos graxos de armazenamento são sintetizados via retículo endoplasmático.

A reação xylidine ponceau (XP) evidenciou que na embriogênese somática o embrião zigótico, apresentou grande quantidade de corpos protéicos, com formato arredondado e tamanho pouco variado (Figura 5B-C).

A utilização do reagente de lugol na histolocalização dos grãos de amido detectou a presença desse composto (Figura 5D-E). Confirmando a utilização do reagente PAS que também evidenciou os grãos de amido (Figura 5F) nos tecidos do embrião zigótico durante a indução da embriogênese somática. A ocorrência de amido se deve por ele ser fonte primária de energia e são rapidamente mobilizados para a proliferação celular continuar (Rocha et al., 2015).

A reserva do amido pode ser considerada um dos processos chave para a embriogênese somática, porque fornece a energia necessária para o desenvolvimento das primeiras fases do desenvolvimento embrionário (Cangahuala-Inocente et al., 2009).

Segundo Silva et al., (2015) e Rocha et al., (2015) o amido é considerado fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular que fornece energia para o desenvolvimento de embriões somáticos. Nos embriões somáticos, esse processo de acumulação de reservas é muito importante, pois o embrião não tem um endosperma associado. E esse fato leva à deficiência na conversão dos embriões somáticos em plantas, o que limita o sucesso da embriogênese somática (Brownfield et al., 2007).

A embriogênese somática é um processo morfogenético que requer uma quantidade elevada de energia Martin et al. (2000) e, por conseguinte, o catabolismo do amido pode resultar em compostos intermediários de glicose que forneçam o ATP necessário para o metabolismo da célula (Cangahuala-Inocente et al., 2009). Ainda é preciso otimizar o protocolo para *P. quadrangularis* para a conversão dos embriões somáticos em plantas e os estudos histoquímicos que envolvem o

acúmulo e a mobilização de reservas durante esta via podem auxiliar a desvendar esses eventos morfogênicos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é primeiro relato de indução de embriogênese somática em *P. quadrangularis* utilizando 2,4-D na concentração de 27,14 μM .

Através de testes histoquímicos foi identificado a presença de reservas como grãos de amido e corpos lipídios e corpos protéicos durante o processo embriogênico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J. M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, p. 117-184, 2009.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.W.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, 50: 321–325, 2006.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.387 - 408.
- BACCARIN, M.N.R.A. **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* spp.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, 1988. 101p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).
- BHARGAVA, A.; OSUKY, M.; FORWARD, B.S.; HANCOCK, R.E.; KAY, W.W.; MISRA, S. Expression of a polyphenylalanine variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 88: 301-312, 2007.
- BRANCA, C.; TORELLI, A.; FERMI, P.; ALTAMURA, M.M.; BASSI, M. Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma**, 182: 59–64, 1994.
- BROWNFIELD, D.L., TODD, C.D., STONE, S.L., DEYHOLOS, M.K. & GIFFORD, D.J. (2007). Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 88, 217- 223.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M.P. Differential proteomic analysis of developmental

stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31: 501-514, 2009.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Isolation, culture, and plant regeneration from leaf protoplasts of *Passiflora*. In: LOYOLA-VARGAS, V.M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. (Eds.) **Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc., 2005. p. 209-215.

DORNELAS, M.C.E.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Journal of Plant Biotechnology**, 36: 211-217, 1994.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HÄLLGREN, J.E. (ed) **Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish: University of Agricultural Sciences, 1998. p. 147-186.

ELHITI M, STASOLLA C; The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: an overview. In: Thorpe T.A, Yeung E.C (eds) **Plant embryo culture: methods and protocols**, 710: 229–255, 2011.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M.A.P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, 66: 535-543, 2007.

FEHÉR A, PASTERNAK T.P, DUDITS D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 74: 201-228.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib, A. e Šamaj, J. (eds.) **Somatic Embryogenesis**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 85-101.

FERREIRA, D.A.T.; SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R.; Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for in vitro propagation without plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 122: 629-638, 2015.

FERREIRA, D.F. **SISVAR Versão 5.0**. Departamento de Ciências Exatas. UFLA, Lavras, MG, 2011.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, 113: 4399-4411, 2000.

FLORES, P.S.; OTONI, W.C.; DHINGRA, O.D.; DINIZ, S.P.S.S.; SANTOS, T.M.; BRUCKNER, C.H. In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium vascular* wilt. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 108: 37-45, 2012.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HAROG, M.V.; SCHMIDT, E.D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The arabidopsis somatic embryogenesis Receptor Kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127: 803–816, 2001.

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

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940, 523p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, 27: 137-138, 1965.

KOMAMINE, A.; MURATA, N.; NOMURA, K. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 41: 6-10, 2005.

LORENZI, H. 2006. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; d'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J. B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, 13: 697-702, 1994.

MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenesis and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154: 143-151, 2000.

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

NHUT, D.T.; KHIET, B.L.T.; THI, N.N.; THUY, D.T.T.; DUY, N.; HAI, N.T.; HUYEN, P. X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) technology. In: JAIN, S.M.; HÄGGMAN, H. (Eds) **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 17–426.

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

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. The study of plant structure principles and selected methods. **Termacarphi**, Melbourne, 1981. 345 p.

OLIVEIRA J.C.; FERREIRA F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; Vaz, R.L. (Eds.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 211-239.

OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento).

OTONI, W.C.; PAIM PINTO, D.L.; ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; DIAS, L.L.C.; SILVA, M.L.; SILVA, C.V.; LANI, E.R.G.; SILVA, L.C.; TANAKA, F.A.O. Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 1-17.

PAIM PINTO, D.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; SILVA, M.L.; OTONI, W.C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 103: 71-79, 2010.

PAIM PINTO, D.L.; ALMEIDA, A.M.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 107: 521-530, 2011.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 361-383.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**, 3rd edition, London: Churchill-Livingstone, 1972. p. 761-1518.

RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C.; PEDROZA, C.M. Variation of gynogenic ability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. **Plant Breeding**, 130: 86-91, 2011.

REIS, L.B.; SILVA, M.L.; LIMA, A. B.P.; OLIVEIRA, M. L.P.; PAIM PINTO, D.L.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of passion fruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, 738: 425- 431, 2007.

ROCHA, D.I.; MONTE-BELLO, C.C.; DORNELAS, M.C.; Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 120: 1087-1098, 2015.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249: 747-758, 2012.

ROSA, Y.B.C.J.; BELLO, C.C.M.; DORNELAS, M.C.; Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 120: 69-77, 2014.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F.R.; KURDYUKOV, S. CHEN, S.K.; WANG, X.D.; NOLAN, K.E.; SHEAHAN, M.B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E. C.; DAVEY, M.R. (Eds.) **Plant developmental biology — biotechnological perspectives**. Heidelberg: Springer, 2010. p.3-26.

SÃO JOSÉ, A.R.; **Maracujá**: Produção e Mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1994, 255 p.

SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; de VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos. **Development**, 124: 2049-2062, 1997.

SILVA, G.M.; CRUZ A.C.F.; OTONI, W.C; PEREIRA; T.N.S; ROCHA, D.I.; SILVA. M.L.; Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 51: 1475-2689, 2015.

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 99: 47–54, 2009.

SILVA, M.L.; PAIM-PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; LANI, E.R.G.; CARVALHO, I.F.; OTONI, W.C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**, 21: 231-338, 2015.

SOUSA, L.B.; MELO, L.F.; FREITAS, R.C.A.; SETUBAL, J.W.; REZENDE, D.F. Germinação e emergência de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 5: 190-194, 2010.

STASOLLA, C.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R.R. The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. **Plant Physiology**, 131: 49–60, 2003.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, 29: 36-57, 2010.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell**, 5: 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO II

Organogênese em *Passiflora quadrangularis* L. a partir de cotilédones, raízes e micro-estacas

RESUMO

A espécie *Passiflora quadrangularis* é utilizada para consumo *in natura*, como ornamental, como porta-enxerto para espécies comerciais e tem características com potencial para programas de melhoramento genético. O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para a organogênese *in vitro* de *Passiflora quadrangularis* L. a partir de cotilédones, raízes e micro-estacas. Após 30 e 60 dias em meio de indução, foram avaliados o número de brotações nos explantes. Evidenciou-se organogênese indireta nos explantes provenientes de cotilédones e raiz, mas nas microestacas apenas a organogênese direta foi observada. Os explantes cotiledonares cultivados em meio suplementado por 4,64 μM de CIN proporcionaram maior média de brotações. Em explantes radiculares apresentaram maior número de brotações quando cultivados em meio com 3,48 μM de CIN seguido de 4,64 μM de CIN e 4,43 μM de BA. No cultivo das microestacas as melhores médias na produção de brotos ocorreram na presença de 4,43 μM de BA e 5,54 μM de BA que apresentaram o maior número médio de brotos, seguido de 3,32 μM de BA. A organogênese foi verificada através de análises anatômicas onde foi detectada a formação de meristemóides, que posteriormente se diferenciaram em gemas apicais caulinares ou primórdios foliares, em raiz foi verificada organogênese direta. Conclui-se que o tipo de explante, a adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo, tiveram influência na morfogênese *in vitro* de *P. quadrangularis*.

Palavras-chave: Regeneração, Citocininas, Passifloraceae.

Organogenesis *Passiflora quadrangularis* L. from cotyledons, roots and micropiles

ABSTRACT

The *Passiflora quadrangularis* species is used for *in natura* consumption, as an ornamental, as rootstock to commercial species and it has the potential to features for genetic improvement programs. The present study aimed to establish a protocol for the *in vitro* organogenesis of *Passiflora quadrangularis* L. from cotyledons, roots and micropiles. After 30 and 60 days in among induction, we evaluated the number of sprouts in the explants. It was evident indirect organogenesis the explants from cotyledons and root, but the micro-stakes only direct organogenesis was observed. The presence of BA was essential for sprouts formation in leaf explants, in both the incubation conditions. The cotyledon explants cultured among supplemented with 4.64 μM of CIN provided higher average sprouts. In root explants have a higher number of sprouts when cultured among with 3.48 μM of CIN followed by 4.64 μM of CIN and 4.43 μM of BA. In the cultivation of micro-stakes the best averages in the production of sprouts occurred in the presence of 4.43 μM of BA and 5.54 μM of BA who had the highest average number of sprouts, followed by 3.32 μM of BA. The organogenesis was verified by anatomical analysis where it was detected the formation of meristems, which later differentiate into sprouts apical buds or leaf primordia in the root was found direct organogenesis. It was concluded that the type of explant, the addition of growth regulators among the culture they had influence in morphogenesis *in vitro* *Passiflora quadrangularis*.

Key-words: Regeneration, Cytokinins, Passifloraceae.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Passiflora quadrangularis* L. também chamada de maracujá-açú, maracujá-gigante, maracujá Amazônico, encontrada no Brasil em condições favoráveis para o seu desenvolvimento e produção (São José, 1994).

P. quadrangularis é uma trepadeira de grande porte, caule grosso e intenso desenvolvimento, bastante cultivada nas regiões tropicais. Os frutos são os maiores do gênero chegando a pesar até 3 kg, possui sabor doce-acidulado, sendo consumido ao natural ou em compotas. As flores são solitárias, grandes, fragrantes e de coloração branca com púrpura (Lorenzi, 2006; Meletti et al. 2010).

A espécie ainda não é cultivada comercialmente, tem sua importância no melhoramento genético do gênero, por apresentarem plantas rústicas e vigorosas, a espécie é tolerante ao fungo *Alternaria passiflorae* e resistente à fusariose, porém é muito sensível aos nematóides e a *Xanthomonas* sp. (Oliveira e Ferreira, 1991).

De maneira geral, a cultura in vitro de espécies de *Passifloras* compreende a conservação de recursos genéticos e a obtenção de plantas transgênicas, visa aumento da produtividade, qualidade do fruto e resistência a doenças, aplica à seleção de plantas produtoras de folhas maiores, que possuam maior concentração de passiflorina para uso na indústria farmacêutica e de cosméticos (Vieira e Carneiro, 2004; Passos e Bernacci, 2005; Zerbini et al., 2008; Alexandre et al., 2009).

Protocolos de cultura de tecidos com espécies de *Passiflora* visam a obtenção de plantas livres de doenças, a produção em grande escala e o fornecimento de materiais para programas de melhoramento (Passos e Bernacci 2005). Entretanto, ressalte-se que o potencial propagativo depende da espécie ou da fonte de explante (Apezato-da-Glória et al., 1999). No gênero *Passiflora* há vários relatos de organogênese que é a principal via de regeneração podendo ser direta e indireta com diversos explantes não meristemáticos, Dornelas e Vieira, 1994; Apezato-da-Glória et al., 1999, Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004, Monteiro et al., 2000, Lombardi et al., 2007, Silva et al., 2011, Vieira et al., 2014, estabeleceram protocolos eficientes com diversas espécies de *Passifloras*.

Devido à importância da cultura de *Passiflora* para estudos de melhoramento genético e a falta de informações na literatura sobre a capacidade de formação de

gemas adventícias em condições *in vitro* em *P. quadrangularis*, o trabalho teve por objetivo estudar o efeito de benzil-adenina, (BA), cinetina (CIN) e tiadizuron (TDZ), na indução a organogênese tendo como explantes cotilédones, raízes e micro-estacas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas sementes maduras colhidas em propriedade particular no município de Tangará da Serra, MT. Frutos maduros de *P. quadrangularis* foram coletados para a extração das sementes, os frutos foram encaminhados ao Laboratório de Genética/Cultura de Tecidos Vegetais/LCTV/CPEDA da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, *Campus* Universitário de Tangará da Serra – MT.

Os tegumentos das sementes foram removidos com auxílio de uma mini-morsa, após as sementes foram desinfestadas sob condições assépticas com a imersão em álcool 70% (v/v) por 1 min, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) mais Tween 20° a 0,1% (v/v), por um período de 25 minutos. Após esse período foram realizados quatro enxágues com água destilada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas em meio com os sais básicos de MS na metade de sua concentração (Murashigue e Skoog, 1962) e cultivadas em frascos de cultivo de 500 mL. O meio de cultura continha sais MS (Murashigue e Skoog, 1962), complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 121°C, 1,1 atm por 15 minutos.

Os frascos foram vedados com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®), na ausência de irradiância. Após 15 dias de inoculação as plântulas foram transferidas para o ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), irradiância de 36 µmol/m²/s provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de 27 ± 2 °C, onde permaneceram por mais trinta dias.

2.2 Indução à organogênese *in vitro* a partir de cotilédones das sementes e raízes.

Sob condições assépticas, as sementes foram excisadas e seus cotilédones (Figura 1A) foram removidos e inoculados em meio de cultura, da mesma forma

raízes de plântulas com 45 dias foram excisadas e inoculadas em meio de cultura contendo sais MS, complexo vitamínico B5, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA) como agente gelificante, acrescido das seguintes concentrações 0,75, 1,0, 1,25 e 1,50 mg L⁻¹ que foram convertidas em µM e ficaram com as seguintes concentrações 3,32, 4,43, 5,54 e 6,65 µM de benziladenina, 3,48, 4,64, 5,80 e 6,97µM de cinetina e 3,40, 4,54, 5,67 e 6,81 µM de tiadizuron e o tratamento controle MS0 sendo o pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Em seguida autoclavado a 121°C, 1,1 atm por 15 minutos, verteu-se 30 ml de meio em cada placa de Petri 90 x 15 mm contendo alíquotas de 30 mL. Sendo vedados com filme plástico transparente do tipo policloreto de vinila, PVC (Rolopac®).

2.3 Indução à Organogênese *in vitro* a partir de microestacas

Sementes germinadas *in vitro* foram cultivadas até seu desenvolvimento completo de plântulas. Quando estas atingiram 7 cm de altura aos 60 dias, as folhas foram eliminadas e o caule dividido em segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento, formando microestacas, cada uma contendo duas gemas axilares. As microestacas foram cultivadas nas mesmas condições anteriormente descritas.

Foram inoculadas em frascos contendo 30 mL, de meio utilizado MS complexo vitamínico B5, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA) como agente gelificante, acrescido das seguintes concentrações 0,75, 1,0, 1,25 e 1,50 mg L⁻¹ que foram convertidas em µM e ficaram com as seguintes concentrações 3,32, 4,43, 5,54 e 6,65 µM de benziladenina, 3,48, 4,64, 5,80 e 6,97µM de cinetina e 3,40, 4,54, 5,67 e 6,81 µM de tiadizuron e o tratamento controle MS0 sendo o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 após autoclavado a 121°C, 1,1 atm por 15 minutos.

2.4 Análise anatômica

Para as análises anatômicas os explantes de *P. quadrangularis* foram coletados após a indução da organogênese. As amostras foram coletadas aos 60 dias e após foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965).

As amostras foram fixadas e desidratadas em série com concentração crescente de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) e infiltradas e polimerizadas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (O' Brien e McCully, 1981).

A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) do laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.5 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 2 repetições sendo cada repetição composta 10 explantes. Foi avaliado o número médio de brotos aos 30 e 60 dias e os dados foram submetidos à análise de variância sendo comparados pelo teste Snott Knott ao nível de 5% de probabilidade os dados serão analisados através do programa SISVAR, (Ferreira, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 20 dias de cultivos foi visualizado o desenvolvimento de gemas adventícias em explantes cotiledonares e a formação dos brotos aos 30 dias. O número de brotações foi significativo estatisticamente, entre os tratamentos sendo que o maior número de brotações foi observado nos explantes cotiledonares cultivados na presença de 6,97 μ M de CIN, com número médio de 18 brotos, seguido de 4,43 μ M de BA com 11 brotos, e 4,64 μ M de CIN com 7,50 brotos, nos tratamentos que continham TDZ não foi observada a ocorrência de brotos, ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos com esse regulador conforme (Tabela 1).

Tabela 1: Número médio de brotações em explantes cotiledonares de *Passiflora quadrangularis* L. em 30 e 60 dias de cultivo in vitro

Tratamentos	Número médio de brotos	
	30 dias	60 dias
MS0	0b	0b
3,32 μ M BA	2b	10ab
4,43 μ M BA	11ab	14ab
5,54 μ M BA	0b	1b
6,65 μ M BA	0b	0b
3,48 μ M CIN	3b	8ab
4,64 μ M CIN	7,50ab	31,50a
5,80 μ M CIN	3b	17ab
6,97 μ M CIN	18a	24ab
3,40 μ M TDZ	0b	0b
4,54 μ M TDZ	0b	0b
5,67 μ M TDZ	0b	0b
6,81 μ M TDZ	0b	0b

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Após 60 dias de cultivo as melhores médias na produção de brotos ocorreram nos explantes cotiledonares cultivados na presença de 4,64 μM de CIN que apresentaram uma média de 31,50 brotos, seguido de 6,97 μM de CIN com 24 brotos e 5,80 μM de CIN com 17 brotos, ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos, conforme (Tabela 1). O tratamento controle MS0 com a ausência dos reguladores não apresentou brotos.

Dentro da classe das citocininas o BA e o CIN estão entre as mais utilizadas na cultura de tecidos, por serem eficientes no processo de multiplicação das estruturas aéreas e na indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu e Wang, 1983).

Durante a organogênese alta concentração de citocininas e baixa de auxina tradicionalmente promovem a expressão de genes essenciais para a indução de novo na formação de brotações (Su et al., 2011). O BA tem sido o regulador mais utilizado para regeneração *in vitro* independente do explante utilizado, podendo ocorrer diferentes respostas isso do depende do genótipo da espécie estudada, mas para os explantes cotiledonares de *P. quadrangularis* ele foi ineficaz.

O desenvolvimento de gemas adventícias em explantes cotiledonares foi observado aos 20 dias de cultivo (Figura 1B), com formação dos brotos aos 30 dias. O maior número médio de brotações foi observado nos explantes cotiledonares cultivados na presença de 6,97 μM de CIN (Figura 1C), seguido de 4,43 μM de BA (Figura 1D), nos tratamentos que continham TDZ não foi observada a ocorrência de brotos (Figura 1E). Após 60 dias de cultivo as melhores médias na produção de brotos ocorreram nos explantes cotiledonares cultivados na presença de 4,64 μM de CIN (Figura 1 F-G), seguido de 6,97 μM de CIN (Figura 1H).

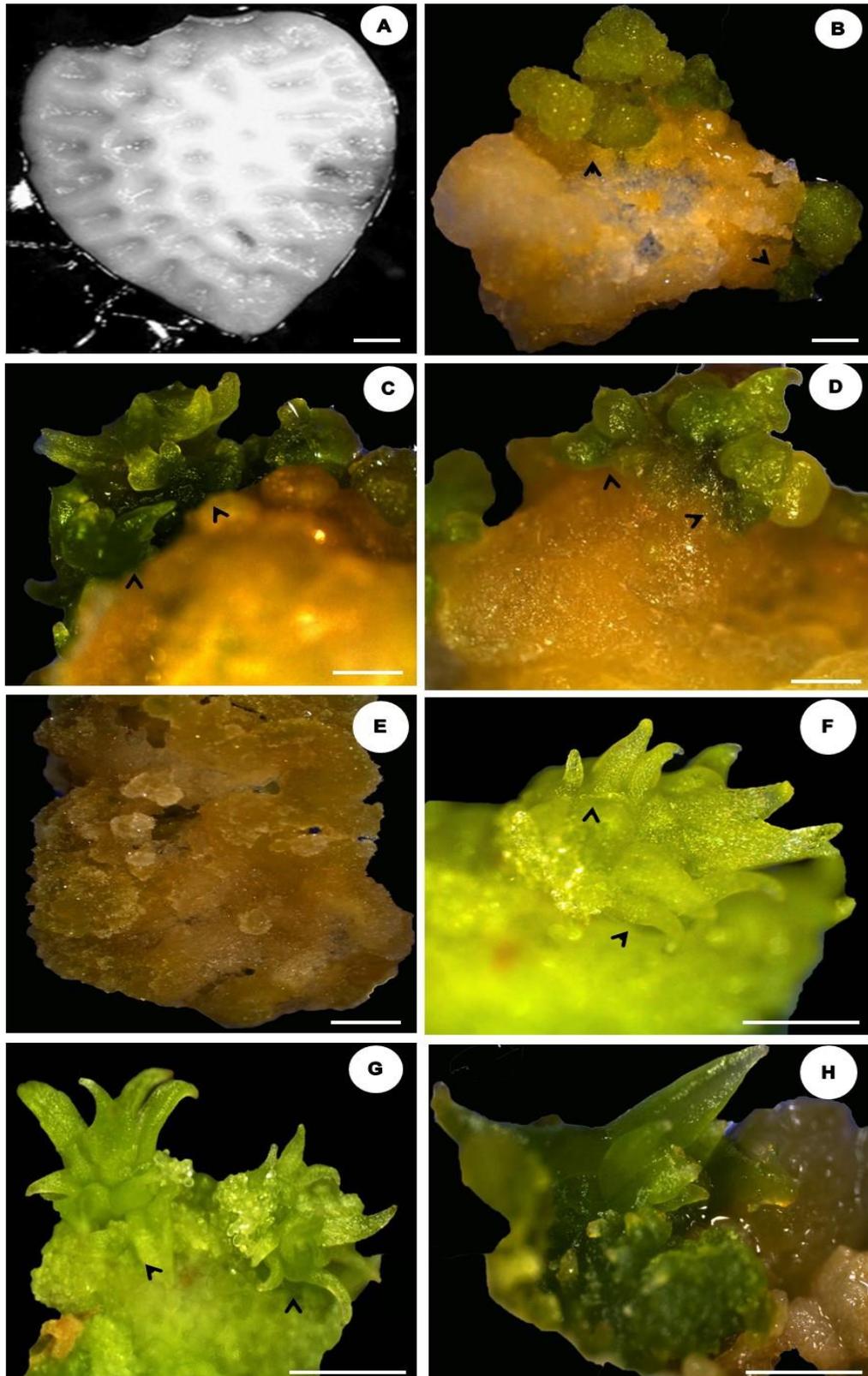


Figura 1. Organogênese em *P. quadrangularis*. **A:** Explante cotiledonar; **B:** Explante cotiledonar aos 20 dias aparecimento das gemas (setas); **C:** Cotilédone cultivado com meio MS acrescido de 4,43 μM de BA com brotos (setas) aos 30 dias; **D:** Cotilédone cultivado em meio MS acrescido de 6,97 μM de CIN com brotos

(setas) aos 30 dias; **E**: Cotilédone em meio de cultivo MS acrescido de TDZ aos 30 dias de cultivo; **F-G**: Cotilédone cultivado em meio MS acrescido de 4,64 μM de CIN com brotos (setas) aos 60 dias; **H**: Cotilédone cultivado em meio MS acrescido de 6,97 μM de CIN aos 60 dias. Barras: **A, B**= 0,3 mm; **C, D, E**= 0,4 mm; **F, G, H**= 0,6 mm.

A organogênese em explantes cotiledonares de *P. quadrangularis* ocorreu de forma indireta (Figura 2A – B -C). As brotações que ocorreram nos explantes cotiledonares de *P. quadrangularis* apresentaram muitas modificações celulares as quais originaram a formação dos brotos.

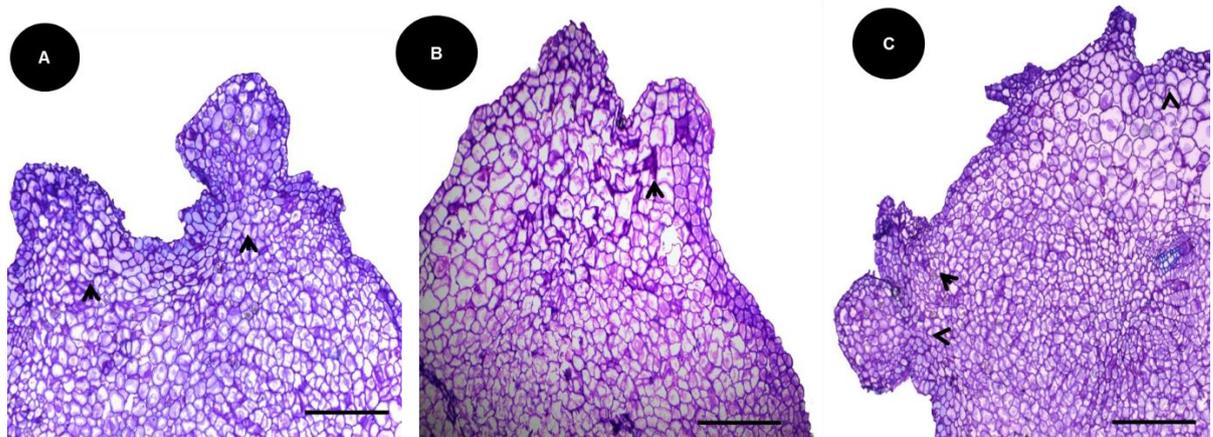


Figura 2. Organogênese indireta de explantes cotiledonares *P. quadrangularis*, **A-B-C**: Cortes longitudinais dos explantes inoculados em meio MS acrescido de 4,64 μM de CIN, modificações celulares dando origem as brotações (setas). Barras: **A, B, C**, = 0,5 mm.

Análises histológicas em estudos de organogênese são fundamentais para a confirmação da fonte das brotações que são formadas na cultura, com isso exclui a possibilidade de interpretações equivocadas de resultados pela presença de gemas pré-formadas no material original (Hervé et al., 2001 e Carvalho et al., 2004).

Segundo Biasi et al., (2000), as observações estruturais mostram que a formação desses centros meristemáticos, envolvidos no processo de regeneração, têm diferentes origens, variando de acordo o tipo de explante e estágio de desenvolvimento.

No gênero *Passiflora*, a utilização de citocininas para indução de gemas é

bem estabelecida e o balanço hormonal necessário para a diferenciação do processo depende da quantidade de auxina endógena nos diferentes tecidos (Dornelas e Vieira, 1994; Lombardi et al., 2007).

No cultivo dos explantes radiculares aos 30 dias de cultivo não foi evidenciado a presença de brotos, ocorreu somente a formação de calos. Após 60 dias de cultivo em meio de indução com diferentes concentrações de BA, CIN e TDZ foi possível constatar organogênese direta e indireta nos explantes radiculares de *Passiflora quadrangularis* L.

As melhores médias na produção de brotos ocorreram nos explantes cultivados na presença de 3,48 μM de CIN onde apresentaram o maior número médio com 78 brotos seguido de 4,64 μM de CIN com 66 brotos e 4,43 μM de BA com 42 brotos havendo diferenças significativas entre os tratamentos, conforme (Tabela 2).

Tabela 2: Número médio de brotações obtidas em explantes radiculares de *Passiflora quadrangularis* L. em 60 dias de cultivo in vitro

Tratamentos	Número médio de brotos 60 dias
MSO	0 c
3,32 μM BA	19bc
4,43 μM BA	42abc
5,54 μM BA	0c
6,65 μM BA	17c
3,48 μM CIN	78a
4,64 μM CIN	66ab
5,80 μM CIN	36abc
6,97 μM CIN	30,50abc
3,40 μM TDZ	0c
4,54 μM TDZ	0c
5,67 μM TDZ	14c
6,81 μM TDZ	0c

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O tratamento controle na ausência dos reguladores de crescimento MS0 não apresentou o desenvolvimento de brotações adventícias. A partir desses resultados ficou evidenciado que a utilização do regulador de crescimento Cinetina foi favorável na indução da organogênese em explantes radiculares de *P. quadrangularis*.

Na Figura 3 é possível ver a formação de calos aos 30 dias de cultivo isso para todos os tratamentos até o meio controle (Figura 3 A-B-C-D). Aos 45 dias de cultivo foram visualizadas as primeiras formações de brotos (Figura 3E). Aos 60 dias as melhores médias de brotos ocorreram nos explantes cultivados na presença de 3,48 μ M de CIN, (Figura3F-G).

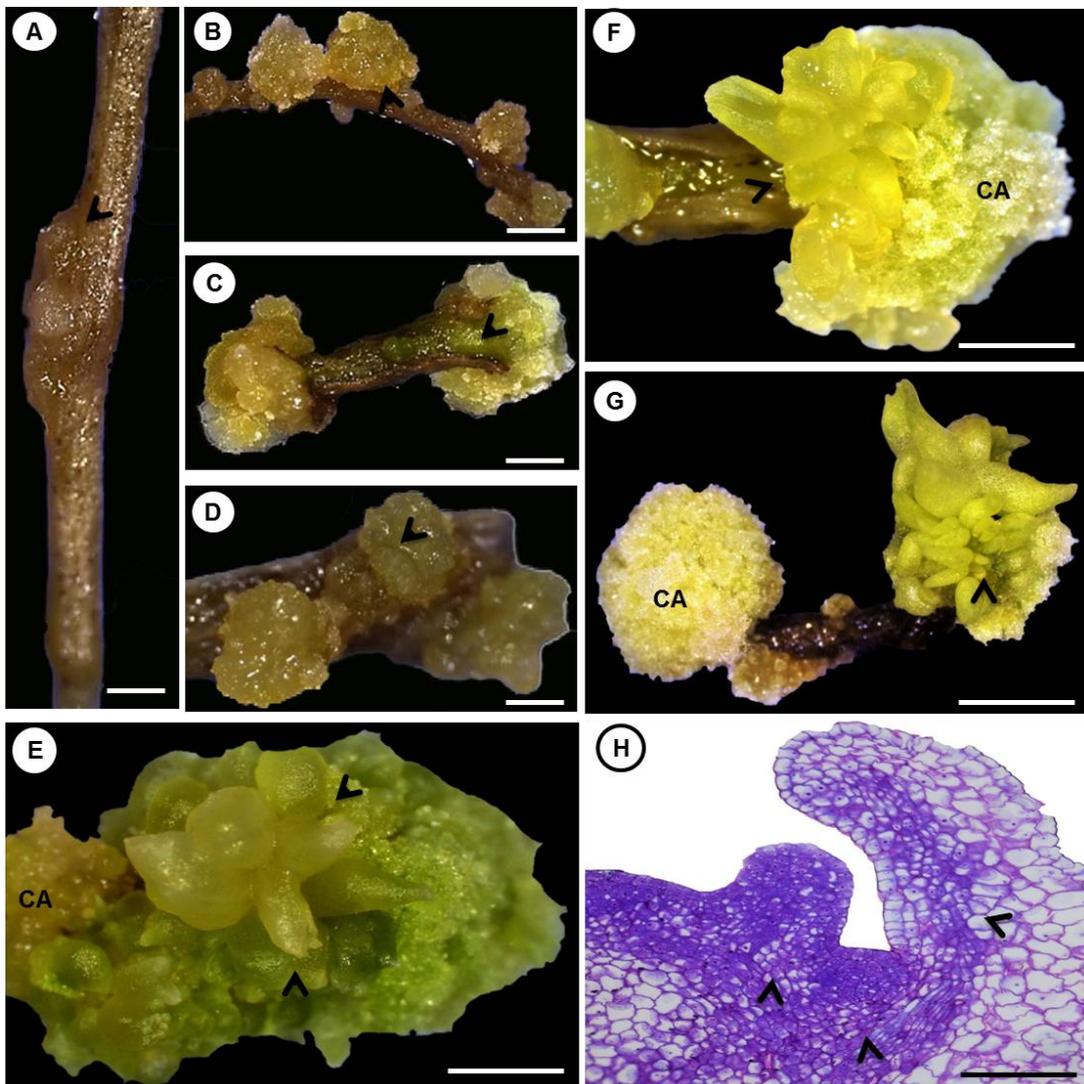


Figura 3. Organogênese a partir explantes radiculares em *P. quadrangularis* **A-B-C-D:** Explantes radiculares **A:** Cultivado em meio MS0 (controle), formação de calos (setas); **B:** Cultivado na presença de BA formação de calos (setas); **C:** Cultivado na presença de CIN formação de calos (setas); **D:** Cultivado na presença de TDZ

formação de calos (setas); **E**: Explante radicular aos 45 dias de cultivo formação de brotos (setas) e calos (CA); **F-G**: Melhor tratamento na formação de brotos (setas) e calos (CA) aos 60 dias em meio MS0 acrescido de 4,64 μM de CIN; **H**: Corte longitudinal do explante radicular cultivado em meio MS0 acrescido de 4,64 μM de CIN, (setas) indicam alterações celulares que estão dando origem a formação dos brotos. Barras: **A, B, C, D** = 0,3 mm; **E, F, G, H**=0,5 mm.

Becerra et al. (2004), desenvolveram um protocolo para a regeneração de brotos *in vitro* tendo como fonte de explantes discos foliares de *Passiflora edulis f. flavicarpa* e observaram a maior produção de brotos com 60 dias de cultivo, que estavam sendo cultivados em meio MS suplementado com 4,44 μM de BAP e 2,32 μM de CIN.

Resultados semelhantes foram descritos por Silva et al., (2011), onde utilizaram segmentos radiculares de *P. cincinnata* e *P. edulis f. flavicarpa* obtiveram o sucesso com a utilizando da concentração de 4,44 μM de BA conseguindo organogênese direta.

De maneira geral, CIN foi o mais eficiente na produção de brotos em *P. quadrangularis* a partir de explantes radiculares, por apresentar maior número médio de brotos, e diferiu estatisticamente dos tratamentos suplementados com a citocinina BA que apresentou um menor número médio de brotos.

A suplementação do regulador de crescimento ao meio de cultivo é indispensável para que aconteça a resposta organogênica em explantes radiculares porque as espécies respondem à regeneração em épocas diferentes, o processo torna-se assincrônico.

A organogênese a partir de explantes radiculares em *P. quadrangularis* ocorreu de forma indireta, onde o calo forma-se nas extremidades das raízes e as gemas são observadas na superfície do calo. As brotações tinham conexão vascular, que foi confirmada através de cortes histológicos, (Figura 3H).

As microestacas foram excisadas de plântulas de *P. quadrangularis* contendo dois segmentos nodais e foram inoculadas em meio com diferentes das citocininas BA (Benziladenina), CIN (Cinetina) e TDZ (Tiadizuron).

Inicialmente, no quinto dia de cultivo foi evidenciado que as microestacas apresentaram sinais visíveis de intumescimento, o que seria uma resposta ao contato com o meio ou mesmo com o regulador presente no meio de cultura.

Aos 15 dias de cultivo foi evidenciado a formação de calos e aos 30 dias as primeiras brotações foi possível constatar organogênese direta e indireta nas microestacas de *Passiflora quadrangularis*.

Aos 30 dias as melhores médias na produção de brotos ocorreram nos explantes cultivados na presença de 5,54 μM de BA e 4,54 μM de TDZ que apresentaram o maior número médio com 1,33 brotos, seguido de 6,81 μM DE TDZ com 1,11 brotos os explantes cultivados com CIN não apresentaram brotações, havendo diferenças significativas entre os tratamentos, conforme (Tabela 3).

Tabela 3: Número médio de brotações obtidas a partir de micro estacas de *Passiflora quadrangularis* em 60 dias de cultivo in vitro

Tratamentos	Número médio de brotos	
	30 dias	60 dias
MSO	0,77b	2,88b
3,32 μM BA	1,33b	9,11a
4,43 μM BA	0,77b	10,66a
5,54 μM BA	3a	10,11a
6,65 μM BA	0,66b	4,33b
3,48 μM CIN	0b	0b
4,64 μM CIN	0b	0b
5,80 μM CIN	0b	0b
6,97 μM CIN	0b	0b
3,40 μM TDZ	0,88b	0,77b
4,54 μM TDZ	1,33b	3,33b
5,67 μM TDZ	0,33b	0,22b
6,81 μM TDZ	1,11b	3,11b

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Aos 60 dias as melhores médias na produção de brotos ocorreram nos explantes cultivados na presença de 4,43 μM de BA e 5,54 μM de BA que apresentaram o número médio com 10,66 e 10,11 brotos seguido de 3,32 μM de BA com 9,11 brotos, não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos, os explantes cultivados com TDZ apresentaram baixo número de brotos e os cultivados com CIN não apresentaram brotações, conforme (Tabela 3).

O tratamento controle na ausência dos reguladores apresentou baixo número de brotos. Isso pode ter ocorrido pelo fato dos explantes já possuírem gemas pré determinadas nas regiões do nó.

A partir desses resultados ficou evidenciado que a utilização do regulador de crescimento BA foi favorável na indução da organogênese em microestacas de *P. quadrangularis*.

Aos 30 dias as melhores médias ocorreram nos explantes cultivados na presença de 3,32 μM de BA (Figura 4A) e 4,54 μM de TDZ (Figura 4B), seguido de 6,81 μM DE TDZ (Figura 4C). Aos 60 dias as melhores taxas de brotações ocorreram nos explantes cultivados na presença de 4,43 μM de BA (Figura 4D) e 5,54 μM de BA já os cultivados com TDZ apresentaram baixo número de brotos (Figura 4E) e os cultivados com CIN não apresentaram brotações (Figura 4F).

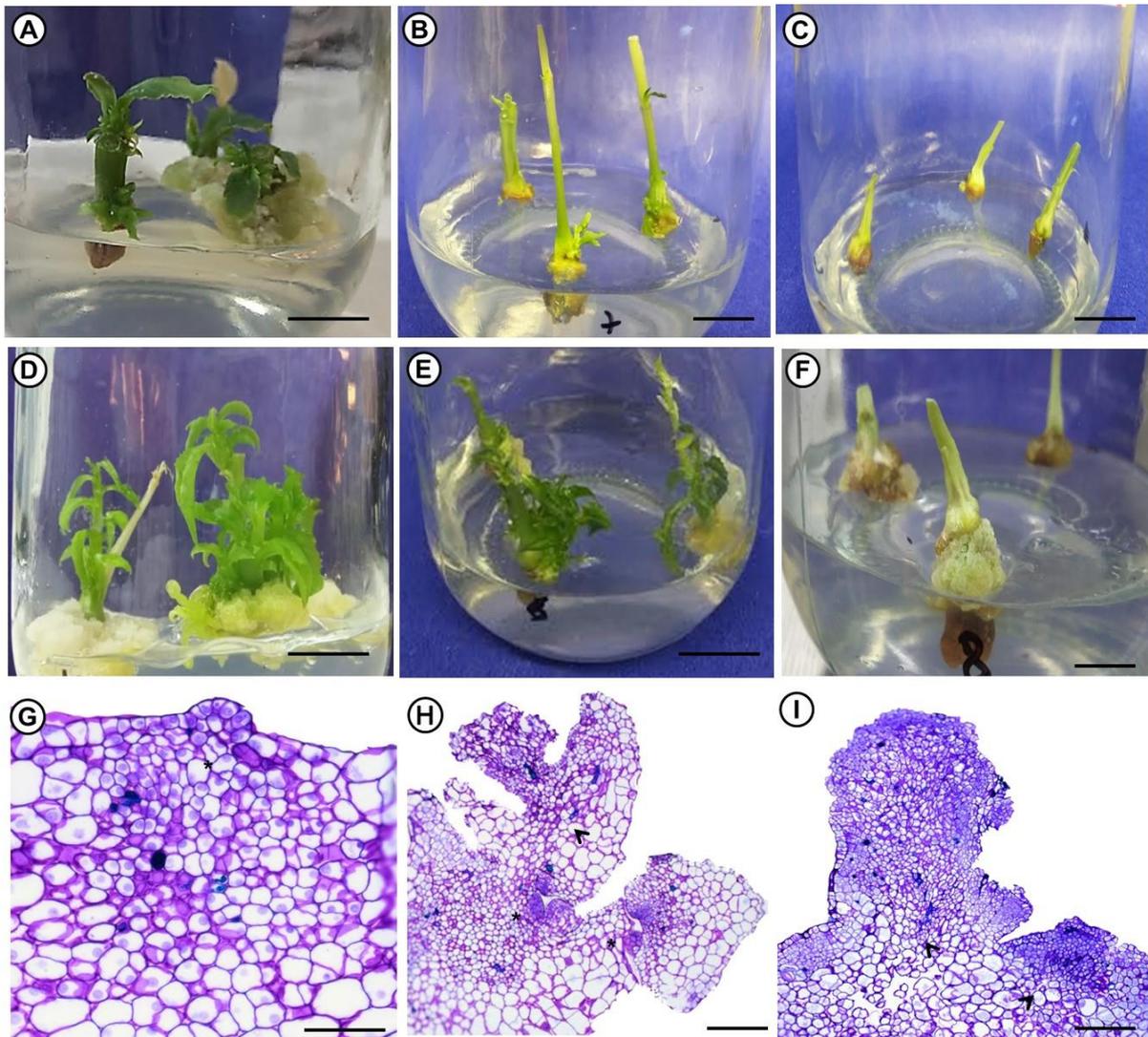


Figura 4. Organogênese de *P. quadrangularis*. **A-B-C-D-E-F:** Explante micro-estacas; **A-** Cultivada por 30 dias na presença de 5,54 μM de BA; **B:** Cultivada por 30 dias na presença de 4,54 μM de TDZ; **C:** Cultivada por 30 dias na presença de CIN; **D:** Após 60 dias melhor média de brotos explantes cultivadas na presença de 4,43 μM BA; **E:** Cultivadas por 60 dias na presença de TDZ **F:** Cultivada por 60 dias na presença de CIN. **G-H-I:** Cortes transversais em relação ao explante **G:** (*) apontando a formação do meristemóide; **H:** (*) apontando a formação do meristemóide (seta) indicando a formação de brotos; **I:** (setas) apontando a formação de brotos. Barras: **A, D, E=** 2cm; **B, C, F=**1,5 cm; **G=**0,5mm; **H, I=** 0,3 mm.

As citocininas são responsáveis pela divisão celular e estimulam a iniciação, o crescimento e o desenvolvimento de gemas adventícias, sendo a 6-Benzilaminopurina (BA), a citocinina mais utilizada para indução de brotações

(Beyl, 2000).

O emprego de citocininas como (BA) e Tidiazuron (TDZ) em *Passiflora* têm apresentado resultados favoráveis na indução da organogênese (Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007; Garcia et al., 2010).

Através das análises anatômicas da organogênese em *P. quadrangularis* foi possível constatar que as gemas adventícias surgiram a partir de meristemóides originados de divisões celulares na camada sub-epidérmica. Os explantes microestacas apresentaram meristemóides, assim esses dão origem aos primórdios foliares ou continuam dividindo formando as protuberâncias. Segundo Vieira et al., (2014), a formação desses centros meristemáticos, envolvidos no processo de regeneração têm diferentes origens, variando de acordo com tipo de explante e estágio de desenvolvimento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições em que o experimento foi desenvolvido, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões para a indução de organogênese em *P. quadrangularis*:

O meio MS acrescido de 4,64 μM de CIN proporcionou as melhores taxas de brotos em explantes cotiledonares aos 60 dias de cultivo.

O meio MS acrescido de 3,48 μM de CIN proporcionou as melhores taxas de brotos em explantes radiculares aos 60 dias de cultivo.

O meio MS acrescido de 4,43 μM de BA proporcionou as melhores taxas de brotos nas microestacas aos 60 dias de cultivo.

Pode-se concluir, que a ação dos reguladores de crescimento pode estar ligada com a sua concentração e pode variar de acordo com o explante utilizado em explantes cotiledonares e radiculares CIN foi o melhor, já para microestacas o BA foi a que proporcionou as melhores médias de brotações.

Tais fatores devem ser usados na escolha para se obter um protocolo de regeneração eficiente para a organogênese, com isso ainda há a necessidade de estudos adicionais para desvendar fatores que podem estar relacionados a organogênese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação *in vitro* do maracujazeiro**. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos. Vitória: EDUFES, p. 117-184, 2009.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* morphogenesis in leaf explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2007-2013, 1999.
- 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** 79:87-90, 2004.
- BEYL, C.J. Getting starting with tissue culture. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Eds). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, p. 21-38, 2000.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J.; Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola** 57: 661-665, 2000.
- DORNELAS, M.C. E VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 36: 211-217, 1994. FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; MACHADO, S.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 91: 37–44, 2007.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR Versão 5.0**. Departamento de Ciências Exatas. UFLA, Lavras, MG, 2011.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968.
- GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSU, R. E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and lighth on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, 106: 47–54, 2010.
- HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var.

flavicarpa) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, 48: 673–680, 2000.

HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus dunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Washington, 161: 645-653, 2001.

HU C.Y; WANG P.J; Meristem, ponteira e bud culturas. In: EVANS DA; WR SHARP; Ammirato PV; YAMADA Y. **Manual de cultura de células vegetais: técnicas de propagação e reprodução**. New York: Macmillan. p. 117-227, 1983.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, 27: 137-138, 1965.

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**, 50: 239-247, 2007.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; RUGGIERO, C. **Maracujá. Série Frutas Nativas** (6). Jaboticabal, SP: Funep. 55 p. 2010.

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**, 57: 571-573, 2000.

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

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M. E. The study of plant structure principles and selected methods. **Termacarphi**, Melbourne, 345 p. 1981.

OLIVEIRA J.C.; FERREIRA F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; Vaz, R.L. (Eds.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, p. 211-239, 1991.

PASSOS, I.R.S.; BERNACCI, L.C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção do germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora sp.*). In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. E BRAGA, M.F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.361-383, 2005.

- SÃO JOSÉ, A.R.; **Maracujá**: Produção e Mercado. Vitória da Conquista: UESB, 255 p. 1994.
- SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 107: 407-416, 2011.
- SU Y.H, LIU Y.B, ZHANG X.S (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant** 4: 616–625, 2011.
- TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, 62: 346-350, 2005.
- VIEIRA, L.M.; ROCHA, D.I.; TAQUETTI, M. F.; DA SILVA, L.C.; DE CAMPOS, J.M. S.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C.; In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 50: 738-745, 2014.
- VIEIRA, M. L. C; CARNEIRO, M. S. *Passiflora* spp., passion fruit. In: LITZ, R. E. (Ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Cambridge: CABI Publishing, p. 435-453. 2004.
- ZERBINI, F.M.; OTONI, W C.; VIEIRA, M.L.C. Transgenic passionfruit. In: KOLE, C.; HALL, T. (Eds). **A Compendium of Transgenic Crop Plants - Tropical and Subtropical Fruits and Nuts**. 1 ed. Berlin: John Wiley & Sons, p. 213-234, 2008.

6. CONCLUSÕES GERAIS

No primeiro capítulo foi proposto um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. quadrangularis* L. utilizando meio MS acrescido de 27,14 µM de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), e identificação dos compostos de reserva na histodiferenciação dos embriões somáticos.

Análises morfo - anatômicas indicaram a presença de embriogênese somática indireta, a dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Os testes histoquímicos revelaram a presença de corpos lipídicos identificados por meio da reação positiva ao reagente sudan black B. A reação xylydine Ponceau (XP), apresentou grande quantidade de corpos proteicos, o reagente de Lugol detectou grãos de amido e o reagente PAS também evidenciou grãos de amido.

Com relação aos estudos no segundo capítulo, constatou-se organogênese indireta nos explantes provenientes de cotilédones e raiz, e nos explantes microestacas apenas a organogênese direta.

O presente trabalho representa o primeiro relato para indução de embriogênese somática e organogênese em *P. quadrangularis* onde foram relatadas a formação de embriões somáticos utilizando-se 2,4-D e a formação de brotos, e foram descritas informações relevantes sobre aspectos anatômicos, histoquímicos da espécie.