

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

**ANDRÉIA IZABEL MIKOVSKI**

**Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro e produção de  
plantas triploides de *Passiflora* spp. com potencial ornamental**

**TANGARÁ DA SERRA  
MATO GROSSO – BRASIL  
ABRIL – 2018**

**ANDRÉIA IZABEL MIKOVSKI**

**Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro e produção de plantas triploides de *Passiflora* spp. com potencial ornamental**

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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha

TANGARÁ DA SERRA  
MATO GROSSO – BRASIL  
ABRIL – 2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas  
(SIBI/UNEMAT)

Mikovski, Andréia Izabel  
Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro e produção  
de plantas triploides de *Passiflora* spp. com potencial ornamental /  
Andréia Izabel Mikovski. -- Tangará da Serra, 2018.  
79 f. : il

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho.  
Coorientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética  
e Melhoramento de Plantas - Universidade do Estado de Mato Grosso,  
2018.

1. Maracujazeiros ornamentais. 2. Organogênese. 3. Triploidia. I.  
Título

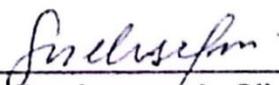
**Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro e produção de plantas triploides de *Passiflora* spp. com potencial ornamental**

**ANDRÉIA IZABEL MIKOVSKI**

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.

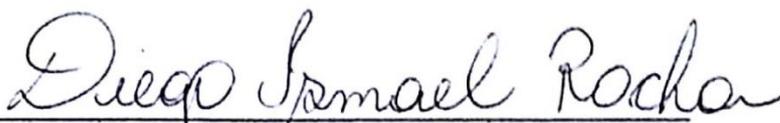
Aprovado em, 05 de abril de 2018.

Comissão Examinadora:



---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Maureciline Lomes da Silva Carvalho**  
**Orientadora - PGMP – UNEMAT**



---

**Prof.<sup>o</sup> Dr. Diego Ismael Rocha**  
**Coorientador - UFG – Universidade Federal de Goiás**



---

**Prof.<sup>o</sup> Dr. Ilio Fealho de Carvalho**  
**UNEMAT – Tangará da Serra - MT**

Aos meus pais, Antônio e Inês por todo esforço, apoio, incentivo e dedicação  
cedidos para a minha formação.  
Aos meus irmãos, Neli e André.  
À minha família.  
*Dedico.*

À minha orientadora,  
Ao Prof. Dr. Diego Ismael Rocha,  
Ao Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho,  
*Ofereço.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre foi o comandante do barco da minha vida, que nos momentos de maior dificuldade não me deixou desistir, me mostrou que eu era capaz de enfrentar todos os problemas e seguir em frente.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade.

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

À minha orientadora, professora Dra. Maurecilne Lemes da Silva, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pela formação, apoio, conselhos e o incentivo para sempre buscar mais e nunca desistir, mesmo diante das dificuldades. Agradeço pela amizade, paciência e confiança. Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador, professor Dr. Diego Ismael Rocha, pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Laboratório de Anatomia Vegetal da UFG, Jataí-GO. Obrigada professor pela orientação, apoio e suporte durante a fase final desta pesquisa.

Ao professor Dr. Ilio Fealho de Carvalho por todo apoio, companheirismo, auxílio nos experimentos e amizade.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos pela contribuição e realização da análise de citometria de fluxo na Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

Aos Professores Dra. Ana Bandini Rossi e Dr. Sérgio, UNEMAT – Alta Floresta – MT, pela disponibilidade e auxílio na coleta de material.

Ao Professor Dr. Waldo Troy pelo constante auxílio nas coletas dos maracujazeiros silvestres.

À técnica dos laboratórios da UFG, Lília Cristina, por todo apoio, companheirismo, auxílio durante a realização dos cortes histológicos e amizade.

Aos meus pais, Antônio e Inês, que sempre estiveram ao meu lado e, apesar da distância, jamais mediram esforços para ajudar a realizar meus sonhos, oferecendo todo apoio, incentivo, conselhos, amor e carinho.

Aos meus irmãos Neli e André e a toda minha família por todo carinho e apoio que sempre me deram.

Aos colegas de trabalho do LCTV, Nayara, Carla, Wolffe, Inaria, Bruno, Thayane e Marcelo pela amizade, companheirismo, auxílio, ensinamentos e todos os momentos que passamos juntos durante as pesquisas. Em especial, à Nayara pelo companheirismo e disponibilidade em auxiliar durante as análises histológicas e demais experimentos.

À Lázara Aline Simões e seus pais, Jesus e Neuza, que me acolheram em Jataí – GO, durante as pesquisas na UFG. Lázara obrigada por todo apoio, auxílio e amizade durante a pesquisa.

À Greice e toda sua família, que me acolheram em Alta Floresta, durante o período das disciplinas.

Aos meus colegas de turma pela amizade, especialmente à Keli e Talita por me amparar durante as viagens das disciplinas, pelos momentos de estudo e descontração.

Aos meus amigos Wellington (Japa), Kamila, Vera, Denise e Jairo por todo apoio, companheirismo, amizade, conselhos, conversas, risadas, em fim aos momentos bons que me proporcionaram.

Ao Helder por todo apoio e carinho durante a fase final deste estudo.

Agradeço a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

## BIOGRAFIA

ANDRÉIA IZABEL MIKOVSKI, filha de Antônio Mikovski e Inês Gaioski Mikovski, nasceu do dia 3 de agosto de 1992 em Rio Azul, Paraná.

Em fevereiro de 2011, ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade do Estado de Mato Grosso, *campus* de Tangará da Serra-MT graduando-se em fevereiro de 2016 como Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Em fevereiro de 2016 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais. Em abril de 2018, submeteu-se à defesa de sua dissertação intitulada: Estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* e produção de plantas triploides de *Passiflora* spp. silvestres com potencial ornamental.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO I - <i>Passifloras</i> spp. Ornamentais: Revisão.....	6
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. MERCADO DE FLORICULTURA BRASILEIRA.....	8
2. <i>PASSIFLORA</i> E SEU POTENCIAL ORNAMENTAL.....	9
3. HÍBRIDOS DE <i>PASSIFLORA</i> COM POTENCIAL ORNAMENTAL.....	12
4. CULTIVO IN VITRO DE <i>Passiflora</i> spp. COM POTENCIAL ORNAMENTAL.....	14
5. PERSPECTIVAS.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO II Regeneração in vitro de cinco espécies silvestres de <i>Passiflora</i> spp. com potencial ornamental a partir do cultivo de embriões zigóticos.....	233
RESUMO.....	233
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	255
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	26
2.2 Regeneração in vitro.....	27
2.3 Delineamento experimental.....	27
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	367
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO III – Produção direta de plantas triplóides de <i>Passiflora foetida</i> L. a partir do cultivo in vitro de endospermas: Aspectos estruturais, histoquímicos e avaliação da estabilidade genética.....	412
RESUMO.....	412
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	45
2.2 Caracterização estrutural e mobilização de compostos de reserva.....	45

2.3 Conversão das plantas e aclimatização.....	46
2.4 Determinação do conteúdo de DNA.....	46
2.5 Delineamento experimental.....	47
3. RESULTADOS .....	48
3.1 As citocininas (BA, TDZ, CIN) induzem a formação de brotações adventícias em explantes endospermicos de <i>P. foetida</i> .....	48
3.2 Aspectos estruturais .....	52
3.3 Identificação e mobilização de compostos de reserva .....	514
3.4 Estabilidade genética no conteúdo de DNA de plantas regeneradas a partir de tecido endospermico.....	56
4. DISCUSSÃO .....	567
5. CONCLUSÕES .....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	65

## RESUMO

MIKOVSKI, Andréia Izabel. M. Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso. Abril de 2018. **Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro e produção de plantas triploides de *Passiflora* spp. com potencial ornamental.** Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.

O objetivo geral do trabalho foi descrever o potencial ornamental, estabelecer sistema de regeneração a partir do embrião zigótico de espécies silvestres de *Passiflora* ssp., produzir plantas triploides, descrever os aspectos estruturais e histoquímicos e avaliar a estabilidade genética de plantas triplóides de *Passiflora foetida* L. O primeiro capítulo foi uma revisão bibliográfica do potencial das *Passiflora* spp. para a ornamentação e reportar o que se tem de pesquisas quanto a produção in vitro de maracujazeiros ornamentais. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar o potencial do embrião zigótico como fonte de explante para a regeneração in vitro a partir da via organogênica em cinco espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental. Os embriões zigóticos foram cultivados em meio de MS com os reguladores de crescimento: 6-Benziladenina (BA) nas concentrações de 2,21; 3,32; 4,43; 6,65 e 8,87  $\mu\text{M}$ , Tiadizuron (TDZ) 2,27; 3,48; 4,54; 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$  e Cinetina (CIN) 2,32; 3,40; 4,64; 6,97 e 9,29  $\mu\text{M}$  e o controle na ausência das citocininas. Os explantes foram cultivados em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância e temperatura de  $26 \pm 2$  °C. O delineamento experimental utilizado para os capítulos II e III foi DIC e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a ( $p \leq 0.05$ ). Foram realizadas 3 repetições com 10 explantes por placa de Petri. As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias de cultivo. O tratamento com 3,32  $\mu\text{M}$  de BA induziu as melhores respostas para a produção de brotações adventícias por explantes nas espécies *P. alata* com média de 19,5 e, em *P. nitida* 37,0 brotos por explante, respectivamente. O número médio de plantas obtidas por explante foi de 2,5 em *P. alata* cultivados em 6,65  $\mu\text{M}$  de BA e, em *P. nitida* foi de 2,0 plantas por explante cultivados em 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ. Já a regeneração dos embriões zigóticos de *P. capparidifolia* o maior número de brotações por explante foi de 10,4 na concentração de 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ e o número médio de plantas obtidas foi de 1,3 em 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ. Em *P. cristalina* o melhor tratamento foi com 8,87  $\mu\text{M}$  de BA apresentando, 35,3 brotações por explante e número médio de plantas

regeneradas por explante de 4,0 em 3,32  $\mu\text{M}$  e 8,87  $\mu\text{M}$  de BA. O maior número médio de brotações por explantes produzidos em *P. foetida* foi em 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ com 52,0 aos 60 dias de cultivo in vitro e com média de 14 plantas convertidas. O terceiro capítulo objetivou estabelecer protocolo de alta responsividade a partir do endosperma na produção de plantas triploides, a descrição dos aspectos estruturais e a identificação e mobilização dos compostos de reserva durante o desenvolvimento de brotações adventícias e a confirmação da estabilidade genética em plantas triploides de *Passiflora foetida*. Para a produção de plantas triploides de *P. foetida* utilizou-se do endosperma da semente. A maior média de brotações adventícias produzidas foi observada no tratamento suplementado com 9,08  $\mu\text{M}$  com 40,0 e 68,2 brotos por explante aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro. Na análise estrutural pode-se evidenciar o comportamento do tecido endospermico durante o desenvolvimento das brotações adventícias aos 20 dias de cultivo. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença corpos proteicos e amido em constante mobilização durante a morfogênese in vitro. A planta triploide cultivada em casa de vegetação apresentou características visuais, aparentemente, de maior vigor vegetativo, comparadas com planta germinada por via seminífera, além da triploide apresentar as brácteas maiores e com a ausência e/ou presença de frutos, entretanto, sementes não foram produzidas. Os resultados da citometria de fluxo confirmou a estabilidade genética da fonte de explante, o endosperma com 1,85 pg de DNA nuclear e as plantas regeneradas, apresentando o mesmo conteúdo de DNA. Os resultados abrem perspectivas para a produção de plantas silvestres ornamentais de *Passiflora* spp. in vitro e o melhoramento genético de características importantes para a ornamentação através da produção de plantas triploides.

**Palavras-chave:** Maracujazeiros ornamentais; Organogênese; Triploidia.

## ABSTRACT

MIKOVSKI, Andréia Izabel. M. Sc. University of the State of Mato Grosso. April 2018. **Establishment of in vitro regeneration systems and production of triploid plants of *Passiflora* spp. with ornamental potential.** Adviser: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-Adviser: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha.

The general objective of the work was to describe the ornamental potential, to establish a regeneration system from the zygote embryo of the wild species of *Passiflora* spp., to produce triploid plants, to describe the structural and histochemical aspects and to evaluate the genetic stability of the triploid plants of *Passiflora foetida* L. The first chapter was a bibliographical review of the potential of *Passiflora* spp. for ornamentation and to report what one has of research on the in vitro production of ornamental passion fruit. The second chapter aimed to evaluate the potential of the zygotic embryo as a source of explant for in vitro regeneration from the organogenic pathway in five species of *Passiflora* spp. with ornamental potential. The zygotic embryos were cultured in MS medium with the growth regulators: 6-Benzyladenine (BA) at the concentrations of 2.21; 3.32; 4.43; 6.65 and 8.87  $\mu\text{M}$  Thidiazuron (TDZ) 2.27; 3.48; 4.54; 6.81 and 9.08  $\mu\text{M}$  of e Kinetin (KIN) 2.32; 3.40; 4.64; 6.97 and 9.29  $\mu\text{M}$  and the control in the absence of cytokinins. The explants were cultivated in a culture room with photoperiod of 16 hours and 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of irradiance and temperature of  $26 \pm 2$  °C. The experimental design used for chapters II and III III was DIC and the means compared by the Scott Knott's test at ( $p \leq 0.05$ ), 3 replicates were performed with 10 explants per Petri dish. The evaluations were performed at 30 and 60 days of culture. The treatment with 3.32  $\mu\text{M}$  of BA induced the best responses to produce adventitious shoots by explants in *P. alata* species with a mean of 19.5 and, in *P. nitida*, 37.0 shoots per explant, respectively. The mean number of plants obtained per explant was 2.5 in *P. alata* cultivated in 6.65  $\mu\text{M}$  BA and in *P. nitida* it was 2,0 plants per explants cultivated in 4,54  $\mu\text{M}$  TDZ. The regeneration of the zygotic embryos of *P. capparidifolia* showed the highest number of shoots per explant was 10.4 at the concentration of 3.48  $\mu\text{M}$  TDZ and the average number of plants obtained was 1.3 in 4.54  $\mu\text{M}$  TDZ. In *P. cristalina* the best treatment was with 8.87  $\mu\text{M}$  of BA presenting, 35.3 shoots per explant and average number of regenerated plants per explant of 4.0 in 3.32  $\mu\text{M}$  and 8.87  $\mu\text{M}$  of BA. The highest

average number of buds per explants produced in *P. foetida* was 6.81  $\mu\text{M}$  TDZ with 52.0 at 60 days of culture in vitro and with an average of 14 plants converted. The third chapter aimed to establish a high responsiveness protocol from the endosperm in the production of triploid plants, a description of the structural aspects and the identification and mobilization of the reserve compounds during the development of adventitious shoots and the confirmation of the genetic stability in triploid plants of *Passiflora foetida*. To produce triploid plants of *P. foetida* the seed endosperm was used. The highest average of adventitious shoots was observed in the treatment supplemented with 9.08  $\mu\text{M}$  with 40.0 and 68.2 shoots per explant at 30 and 60 days of in vitro culture. In the structural analysis the behavior of the endospermic tissue during the development of the adventitious shoots can be evidenced at the 20 days of culture. Histochemical tests evidenced the presence of protein and starch bodies in constant mobilization during in vitro morphogenesis. The triploid plant cultivated in a greenhouse showed visual characteristics, apparently with a higher vegetative vigor, compared with a seminiferous germinated plant, besides the triploid present the larger bracts and with the absence and / or presence of fruits, however, seeds were not produced. The results of flow cytometry confirmed the genetic stability of the explant source, the endosperm with 1.85 pg nuclear DNA and the regenerated plants, exhibiting the same DNA content. The results open perspectives to produce ornamental wild plants of *Passiflora* spp. in vitro and the genetic improvement of characteristics important for ornamentation through the production of triploid plants.

**Keywords:** Ornamental passion fruit; Organogenesis; Triploidy.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O maracujá pertencente ao gênero *Passiflora* L., é cultivado e comumente utilizado na alimentação. No entanto, possui outras funcionalidades importantes, como medicinais e ornamentais. O Brasil é considerado um centro de diversidade das *Passiflora* spp., possuindo ampla variabilidade genética entre as espécies silvestres encontradas no país. Algumas dessas espécies têm características de interesse econômico tornando-as espécies potenciais para introdução no mercado para a produção de frutos comestíveis, compostos fitoterápicos e/ou como plantas ornamentais (Junqueira et al., 2007; Tommonaro et al., 2007; Viana et al. 2010).

Os maracujazeiros são apreciados por suas flores exóticas que apresentam uma grande variabilidade de tamanhos, cores e fragrâncias, além da diversidade de forma das folhas que, também, agregam valor ornamental para algumas espécies (Nóbrega et al., 2017). Por vezes espécies de *Passiflora* silvestres já são utilizadas na ornamentação. Mas, nos países europeus e norte-americanos os híbridos naturais e artificiais é que compõem grande parte do germoplasma destinado ao mercado ornamental (Melo et al., 2016).

Diversas espécies silvestres, encontradas no Brasil, se destacam pela beleza e exuberância de suas flores como; *P. alata*, com flores grandes e perfumadas de coloração vermelho-arroxeadas (Koschnitzke e Sazima, 1997), *P. capparidifolia* com flores grandes e vistosas, de coloração forte apresentando corona multiseriada com filamentos branco e violeta (Cervi, 1997), *P. cristalina* com flores vistosas e avermelhadas (Vanderplank e Zappi, 2011), *P. foetida* com flores de porte pequeno e coloração branca para lilás (Patil et al., 2013) e *P. nitida* com flores grandes de cor branca e azul-púrpura (Oliveira e Ruggiero, 2005).

Apesar do potencial ornamental dessas espécies, ainda são insipientes os trabalhos de caracterização agrônômica de germoplasmas para subsidiar o uso de novos acessos em programas de melhoramento genético, porta enxertos, diversificar os sistemas de produção in vitro (maracujá doce) e para uso como plantas ornamentais e medicinais.

A cultura de tecidos vegetais, através da técnica de micropropagação, é um importante método para multiplicar rapidamente genótipos superiores com alto

rendimento e/ou resistentes a doenças, em espaço físico e tempo reduzidos, oferecendo muitas vezes alternativas únicas aos programas de melhoramento genético (Zerbini et al., 2008). Dentre as espécies micropropagadas destacam-se os maracujazeiros, no decorrer dos anos vários trabalhos têm sido realizados visando o desenvolvimento de protocolos responsivos para o cultivo in vitro (Passos e Bernacci, 2005).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a organogênese in vitro é definida como o processo no qual células e tecidos vegetais sofrem mudanças de forma induzida, produzindo uma estrutura unipolar, denominada de primórdio vegetativo ou radicular, em que o sistema vascular apresenta-se conectado com o tecido de origem e pode ocorrer de forma direta a partir das células do explante de origem ou indireta através da formação de calos (Otoni et al., 2013; Xu e Huang, 2014). As células que adquirem competência possuem capacidade incomum para o rejuvenescimento por meio da subsequente desdiferenciação e diferenciação, formando assim novos órgãos ou plantas completas, uma vez que os explantes no cultivo in vitro sob condições adequadas expressam a capacidade da célula de ser totipotente e/ou pluripotente (Xu e Huang, 2014; Tirichine et al., 2007; Otoni et al., 2013).

A regeneração pela via organogênica vem sendo estabelecida em uma grande variedade de espécies de *Passiflora* spp., utilizando-se da combinação de vários reguladores de crescimento de plantas e diferentes tipos de explantes, como folhas, raiz, cotilédones, região nodal e internodal, embriões zigóticos, entre outros (Silva et al., 2011; Carvalho et al. 2017; Faria et al., 2018). Outra fonte de explante utilizado a fim de regenerar plantas triploides é o endosperma, caracteriza-se por ser um triploide natural, proveniente da fusão de três núcleos haploides (Sun et al., 2011). As plantas triploides apresentam grande importância na ornamentação devido ao aumento de tamanho das folhas e flores que se apresentam mais coloridas e com período de floração prolongado (Wang et al., 2016). Para *Passiflora* há poucos relatos do uso de endosperma na produção de plantas triploides que, geralmente, apresentam órgãos maiores e, conseqüentemente, podem ser interessantes ao mercado de plantas ornamentais e frutos.

O trabalho objetivou descrever o potencial ornamental, estabelecer um sistema de regeneração a partir do embrião zigótico de espécies silvestres de

*Passiflora* ssp., descrever os aspectos estruturais e histoquímicos e avaliar a estabilidade genética de plantas triploides de *Passiflora foetida* L.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P. P.; ANTONIAZZI, C. A.; SILVA, N. T.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; CARVALHO, M. L. S. Regeneração in vitro de *Passiflora miniata* Mast. **Ornamental Horticulture**. 23:88-95, 2017.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**. 45:1-92, 1997.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Plant Physiology**. 160: 557-564. 2003.

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 54:166-174, 2018.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. K. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 29:571-575, 2007.

KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica**. 20:119-126, 1997.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SOUZA, V. O.; CORRÊA, R. X. Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. **Scientia Horticulturae**. 212: 91–103, 2016.

NÓBREGA, D. S.; PEIXOTO, J. R.; VILELA, M. S.; FALEIRO, F. G.; GOMES, K. P. S.; SOUZA, R. M. D.; NOGUEIRA, I. Agronomic descriptors and ornamental potential of passion fruit species. **Ornamental Horticulture**. 23:357-362, 2017.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Importâncias dos maracujás (*Passiflora* L. spp.) e seu uso comercial. **Revista RG News**. 3:72-81, 2007.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá:**

**germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.143-158, 2005.

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 (*Passifloras* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression.** New Delhi; Narosa Publishing House. p.1-17, 2013.

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. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.361-383. 2005.

PATIL, A. S.; PAIKRAO, H. M.; PATIL, S. R. *Passiflora foetida* Linn: a complete morphological and phytopharmacological review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1:285-296, 2013.

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.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, O. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104:23–29, 2011.

TIRICHINE, L.; SANDAL, N.; MADSEN, L. H.; RADUTOIU, S.; ALBREKTSEN, A. S.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; TABATA, SATOSHI.; STOUGAARD, J. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. **Science**. 315: 104-107, 2007.

TOMMONARO G.; SEGURA RODRIGUEZ C. S.; SANTILLANA M.; IMMIRZI B.; PRISCO R. D.; NICOLAUS B.; POLI A. Chemical composition and biotechnological properties of polysaccharide from the peels and antioxidant content from the pulp of *Passiflora ligularis* fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55:7427–7433. 2007.

VANDERPLANK, J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**. 66:149-153, 2011.

VIANA, A. J. C.; SOUZA M. M.; ARAÚJO I. S.; CORREA R. X.; AHNERT D. Genetic diversity determined by morphological and molecular characterization in wild *Passiflora* L. species with ornamental potential. **Biologia Plantarum**. 54:535–538. 2010.

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**. 52:41–54, 2016.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**. 108: 1-33, 2014.

ZERBINI, F. M.; OTONI, W. C.; VIEIRA, M. L. C. Passionfruit. In: Kole C and Hall TC (eds.) A Compendium of Transgenic Crop Plants. **Tropical and Subtropical Fruit and Nuts**. 1sted. **John Wiley & Sons**. 213-234. 2008.

## CAPÍTULO I

---

### *Passiflora* spp. ornamentais: Revisão

#### RESUMO

O agronegócio de flores e plantas ornamentais é representado em ordem de grandeza, primeiramente pela produção de plantas para paisagismo, seguido por flores e folhagens de corte e, por último, pelas flores e plantas envasadas. Dentre as diversas plantas ornamentais, as espécies do gênero *Passiflora* vêm ganhando espaço no mercado, principalmente na Europa e nos países Norte-Americanos. O Brasil possui uma grande variabilidade de espécies de maracujazeiros com potencial ornamental por ser um dos centros de origem e diversidade genética de muitas das mais belas espécies, no entanto, ainda é praticamente inexplorado o mercado visando o uso dessas espécies na ornamentação. A inclusão da flor da paixão, na lista de plantas ornamentais está relacionada às características peculiares da flor como sua estrutura complexa, principalmente pela presença da corona, capacidade de floração durante o ano todo e também abundância e exuberância das folhas, que em muitas espécies agrega valor ornamental. No Brasil, a Embrapa Cerrados desenvolveu os três primeiros híbridos de *Passiflora* para fins ornamentais com flores de grande beleza e exuberância. Dentre as ferramentas biotecnológicas para a produção de plantas ornamentais, a cultura de tecidos destaca-se na clonagem de genótipos superiores, alta qualidade fitossanitária e produção em larga escala. Além das possibilidades de produção de novas variedades com características interessantes ao mercado de plantas ornamentais. A diversidade de espécies encontradas no Brasil abre perspectivas para o mercado e produção de *Passiflora* spp. ornamentais, em particular as espécies silvestres que possuem flores de grande beleza e com uso ornamental praticamente inexplorado.

**Palavras-chave:** Maracujazeiros ornamentais; Regeneração in vitro.

## Ornamental *Passiflora* spp.: Review

### ABSTRACT

The agribusiness of flowers and ornamental plants is represented in order of magnitude first by the production of plants for landscaping, followed by cut flowers and foliage and finally by the flowers and bottled plants. Among the various ornamental plants, species of the genus *Passiflora* have been gaining space in the market, mainly in Europe and the North American countries. Brazil has a great variability of species of passion fruit with ornamental potential because it is one of its centers of origin and genetic diversity of many of the most beautiful species, however, the market aiming the use of these species in ornamentation is still practically unexplored. The inclusion of passion flower in the list of ornamental plants is related to the peculiar characteristics of the flower as its complex structure, mainly by the presence of the crown, capacity of flowering all year long and also by the abundance and exuberance of the leaves, which in many species adds ornamental value. In Brazil, Embrapa Cerrados developed the first three *Passiflora* hybrids for ornamental purposes with flowers of great beauty and exuberance. Among the biotechnological tools for the production of ornamental plants, tissue culture has stood out in the cloning of superior genotypes, high phytosanitary quality and large-scale production. In addition, the possibilities of producing new varieties with characteristics peculiar to the market of ornamental plants. The diversity of species found in Brazil opens perspectives for the market and production of *Passiflora* spp. ornamental, in particular, the wild species that have flowers of great beauty and practically its use as ornamental is unexplored.

**Keywords:** Ornamental passion fruit, In vitro regeneration.

## 1. MERCADO DE FLORICULTURA BRASILEIRA

O Brasil possui uma grande diversidade de solos e clima, o que facilita o cultivo de diversas espécies de flores e plantas ornamentais, destacando-se as plantas nativas, exóticas, de clima temperado e/ou tropical. Aproximadamente 50,4% da área cultivada é destinada à produção de mudas de plantas ornamentais (Rodrigues et al., 2009). A floricultura brasileira é responsável pela movimentação de 750 milhões de dólares ao ano, sendo 2 a 5% da produção destinada à exportação, principalmente para países do Mercosul, EUA, Holanda, Alemanha, Japão e Itália (Corrêa e Paiva, 2009).

O agronegócio de flores e plantas ornamentais é representado, primeiramente, pela produção de plantas para paisagismo e jardinagem. Em 2013, esse setor concentrou 41,55% do Valor Bruto da Produção (VBP) (R\$ 619.049.000,00), seguido pelo setor de flores e folhagens de corte com 34,33% e pela classe de flores e plantas envasadas (24,12%) (Junqueira e Peetz, 2014). Nos últimos anos, o faturamento com o mercado da floricultura cresceu significativamente, com faturamentos de R\$ 5,7 bilhões em 2014, R\$ 6,2 bilhões em 2015, R\$ 6,65 bilhões em 2016 e R\$ 7,2 bilhões em 2017, representando um aumento de 9% em relação ao ano de 2016 (Ibraflor, 2017). O estado de São Paulo representa cerca de 90% do mercado nacional, oferecendo diversificados sistemas de comercialização, negociado em centrais de abastecimento e outros centros de comercialização. A cidade de Holambra/SP se destaca pela criação em 1999 da Cooperativa de Floricultores (Cooperflora), especializada no suprimento de flores de corte para comercialização em quase todo o país. A Cooperflora desde 2011 é composta por 48 produtores de flores de corte, localizada em cinco estados brasileiros (Silva et al., 2015).

A produção e comercialização de flores é uma alternativa de geração de lucros e empregos, tornando-se uma oportunidade de aumentar a fonte de renda familiar para produtores de pequena, média e alta escala (Costa e Chiba, 2017).

As plantas ornamentais possuem seu valor ligado à morfologia, cor e forma das suas flores, (Gaurav e Agnihotri, 2017). Dentre as diversas plantas ornamentais, as espécies do gênero *Passiflora* vem ganhando espaço no mercado, principalmente na Europa e países Norte-americanos. A utilização das passifloráceas como plantas

ornamentais deve-se à beleza e exuberância das flores que possuem diversas formas, tamanhos, cores e um perfume diferenciado, assim como pela variedade de formatos de suas folhas (Cruz et al., 2008; Montero et al., 2013).

## **2. PASSIFLORA E SEU POTENCIAL ORNAMENTAL**

A família Passifloraceae tem uma distribuição pantropical, com cerca de 630 espécies e grande diversificação quanto às características das folhas, frutas e flores (Ocampo, et al., 2007; Souza e Hopkins, 2011). O gênero *Passiflora* possui aproximadamente 530 espécies, no entanto, algumas espécies continuam a ser identificadas, das quais cerca de 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimentos, remédios e ornamento sendo muitas delas com finalidades múltiplas (Abreu et al., 2009; Pipino et al., 2010).

A inclusão da flor da paixão, na lista de plantas ornamentais está relacionada às características peculiares da flor como sua estrutura complexa, principalmente pela presença da corona, capacidade de floração durante o ano todo e também pela abundância e exuberância das folhas, que em muitas espécies agrega valor ornamental (Abreu et al., 2009).

No gênero *Passiflora* a autoincompatibilidade do tipo esporófitica é uma característica importante da biologia floral da espécie, o que determina a alogamia, fator que contribui para o aumento da variabilidade genética das espécies de maracujazeiros, uma vez que são plantas de polinização cruzada (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010).

Dentro do gênero *Passiflora*, existem quatro subgêneros: *Passiflora*, *Decaloba*, *Astrophea* e *Deidamioides*. As espécies com maior importância econômica pertencem ao subgênero *Passiflora* com 240 espécies, apresentando caule lenhoso e flores grande de coloração vibrante, *Decaloba* (DC.) Rchb é o segundo maior subgênero com aproximadamente 214 espécies, caracterizadas como trepadeiras de porte pequeno e com flores pequenas, *Astrophea* (DC.) Mast. possui cerca de 57 espécies sendo algumas de porte pequeno e o *Deidamioides* (Harms) Killip que compreende 13 espécies com algumas trepadeiras (Feuillet e MacDougal, 2003; Ulmer e Macdougall, 2004; Milward-de-Azevedo, et al., 2010;).

As *Passifloras* spp. possuem ampla variabilidade morfológica tanto vegetativa quanto reprodutiva, e uma grande diversidade genética que ainda é pouco explorada, principalmente no Brasil onde encontra-se a maior dispersão geográfica das espécies (Meletti et al., 2005). Os autores ainda destacam, que algumas espécies não cultivadas como *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. caetulea*, *P. incarnata*, *P. foetida*, *P. nitida* e *P. quadrangularis*, podem contribuir para o melhoramento genético devido a maior adaptação a condições climáticas adversas, resistência a doenças, longevidade, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes interessantes para a indústria farmacêutica e autocompatibilidade entre algumas espécies (Meletti et al., 2005).

A importância das *Passifloras* decorre da ampla e diversificada utilização pelo homem. As passifloráceas como plantas ornamentais produzem grande atratividade pela beleza e exuberância de suas flores, com grande variação de coloração forte e brilhante e algumas, outras de coloração tênue e suave (Montero et al.; 2013). As flores também são consideradas exóticas e complexas, principalmente pela presença da corona, que caracteriza esta família (Abreu et al., 2009).

A grande variabilidade genética das espécies de maracujazeiro vem despertando interesse quanto a sua utilização na ornamentação. Dentre as espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental destacam-se *Passiflora nitida* HBK, *P. cincinnata* Mast., *P. setacea* DC (Oliveira e Ruggiero, 2005), *P. amethystina* Mikan, *P. actinia* Hook, *P. triloba* Ruiz & Pav. EX DC (Peixoto, 2005), *P. alata* Curti, *P. caerulea* L. (Conceição et al., 2011), *Passiflora mucronata* Lam. (Meletti et al., 2011), *Passiflora murifolia* Mast., *Passiflora suberosa litoralis*, *Passiflora palmeri* var. *sublanceolata* (Pires, et al., 2012), *Passiflora miniata* (Carvalho et al., 2017), *Passiflora cristalina* (Faria et al., 2018).

O Brasil possui uma grande variabilidade de espécies de maracujazeiros com potencial ornamental por ser um de seus centros de origem e de diversidade genética de muitas das mais belas espécies, no entanto, o mercado visando o uso dessas espécies na ornamentação ainda é praticamente inexplorado (Pires et al., 2012; Bernancci et al., 2005; 2008; 2016; Montero et al., 2013).

A exploração do potencial ornamental das *Passifloras* vai desde sua utilização para fins decorativos em paisagismos de médias e grandes áreas, sendo

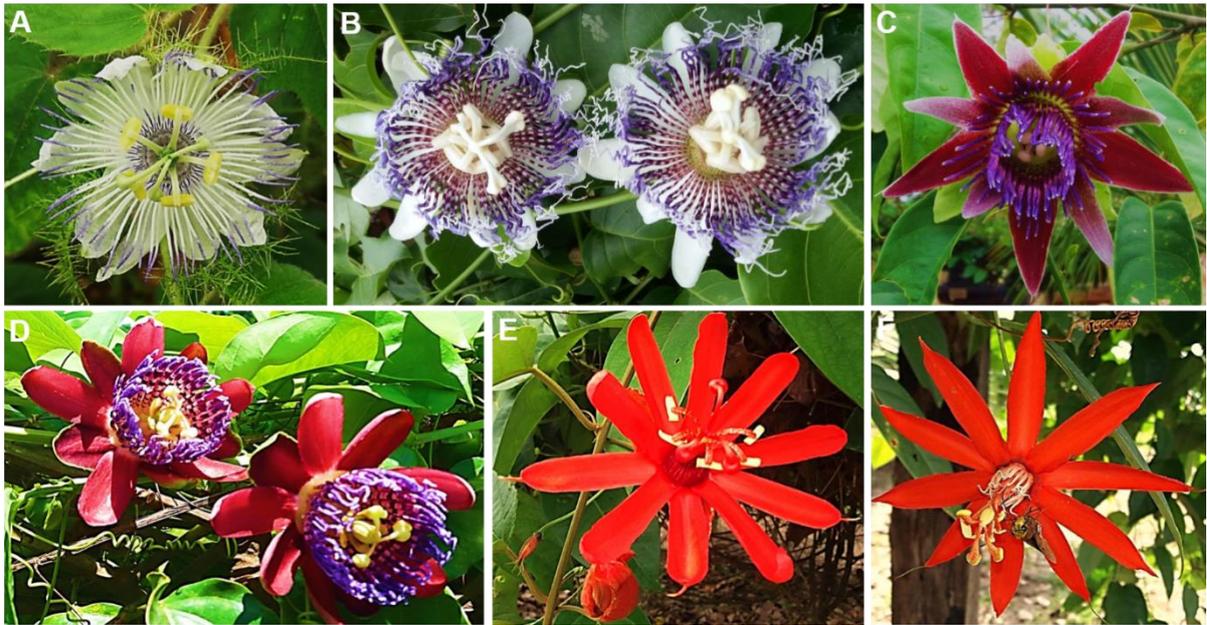
utilizado em pergolados, cercas vivas e muros ou cultivadas como plantas de vaso (Peixoto, 2005).

Essa baixa exploração do mercado de espécies de maracujazeiro ornamental, ocorre devido à falta de programas que visem à produção de híbridos ornamentais que se adaptem as diversas regiões do país, além disso, o uso dessas espécies em jardins torna-se uma forma de conservação do germoplasma, uma vez que seu habitat natural vem sendo destruído, causando erosão genética (Bernacci et al., 2005; Abreu et al., 2009).

A exploração do potencial ornamental das *Passifloras* vai desde sua utilização para fins decorativos em paisagismos de médias e grandes áreas, sendo utilizado em pergolados, cercas vivas e muros ou cultivadas como plantas de vaso (Peixoto, 2005).

A flor do maracujazeiro é conhecida como flor da paixão, e a sua utilização como planta ornamental foi a partir do século XV e continua até hoje no mercado de plantas híbridas na Europa e nos países norte-americanos, sendo registrados mais de 400 híbridos para fins ornamentais em todo o mundo (Vanderplank, 2000; Peixoto, 2005; Pires et al., 2012).

Espécies silvestres de maracujazeiro destacam-se pelo colorido das suas flores, pequeno e grande porte, florescimento ao longo de todo ano, folhas de formatos e tamanhos diferentes dentre as espécies como *P. foetida* (Figura 1A), *P. nitida* (Figura 1B), *P. capparidifolia* (Figura 1C) *P. alata* (Figura 1D), *P. miniata* (Figura 1E) e *P. cristalina* (Figura 1F). Além destas, outras espécies silvestres com valor ornamental são encontradas no Brasil, *P. capsularis* L. e *P. rubra*, que podem ser um grande alvo para o melhoramento genético com objetivo de produção de híbridos ornamentais, por possuírem flores pequenas e abundantes, folhagens e frutos de cores favoráveis à ornamentação (Amorim et al., 2011).



**Figura 1:** *Passiflora* spp. com potencial ornamental. (A) *Passiflora foetida*; (B) *Passiflora nitida*; (C) *Passiflora capparidifolia*; (D) *Passiflora alata*; (E) *Passiflora miniata*; (F) *Passiflora cristalina*.

As espécies silvestres são consideradas as mais adequadas para a produção de *Passifloras* ornamentais, por possuírem folhagem exuberante e uma grande quantidade de flores atraentes, coloridas e exóticas (Abreu et al., 2009).

O grande potencial ornamental do maracujazeiro e a vasta variedade de espécies existentes no Brasil tem despertado nos centros de pesquisa, a busca pela identificação de espécies com características morfológicas e adaptativas para uso na ornamentação, através da caracterização e da geração de híbridos ornamentais de espécies silvestres como *P. coccinea*, *P. foetida*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. palmeri*, *P. setacea* e *P. Suberosa* (Cerqueira-Silva et al., 2014).

### 3. HÍBRIDOS DE *PASSIFLORA* COM POTENCIAL ORNAMENTAL

Os principais fatores que influenciam na demanda comercial de flores e plantas ornamentais, estão à capacidade de desenvolvimento de novas variedades e híbridos, que na última década vem aumentando progressivamente, principalmente pela preferência e as necessidades dos consumidores o que leva os produtores a investirem na produção e lançamento de novas e atrativas plantas (Takane et al., 2015).

O primeiro híbrido em *Passiflora* para fins ornamentais foi relatado no ano de 1819 pelo inglês Thomas Milne, ao realizar o cruzamento entre *P. caerulea* e *P.*

*racemosa* obtendo o híbrido sexual denominado de *P. 'violacea'* (Vanderplank, 2000).

No Brasil, a Embrapa Cerrados desenvolveu os três primeiros híbridos de *Passiflora* para fins ornamentais. O primeiro híbrido a ser desenvolvido foi o BRS Estrela do Cerrado obtido a partir do cruzamento entre as espécies silvestres *P. coccinea* Aubl., de flores vermelhas X *P. setacea* DC. de flores brancas, o BRS Roseflora obtido a partir do retrocruzamento entre BRS Estrela do Cerrado X *P. setacea* e BRS Rubiflora obtido a partir do retrocruzamento entre BRS Estrela do Cerrado X *P. coccinea* (Faleiro et al., 2009).

Esses híbridos lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros em dezembro de 2007, possuem flores de grande beleza e exuberância e rápido sombreamento, sendo indicados para o paisagismo de grandes áreas como muros, cercas e pérgulas, uma vez que a utilização de híbridos como plantas ornamentais são bastante desejáveis por promoverem ampla variação de cores e formas das estruturas florais (Bernacci et al., 2005; Faleiro et al., 2009).

Em 2016, a Embrapa Cerrados lançou duas novas cultivares híbridas com potencial ornamental para paisagismo de grandes áreas. BRS Céu do Cerrado com flores azuladas, proveniente do cruzamento entre as espécies *P. incarnata* X *P. edulis* e BRS Rosea Púrpura com flores rosáceas, proveniente de um cruzamento triplo entre as espécies *P. incarnata* X (*P. quadrifaria* X *P. setacea*) (Fonseca et al., 2017).

Além da EMBRAPA, outras instituições também desenvolveram híbridos para fins ornamentais, como "*Passiflora alva*", "*Passiflora priscilla*" e "*Passiflora aninha*" desenvolvidos pela Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil, através do cruzamento entre *P. palmeri* e *P. foetida* (Cerqueira-Silva et al., 2014).

Espécies com potencial ornamental como *P. alata*, *P. caerulea* L., entre outras, foram utilizadas em outros países para a criação de novos híbridos, os quais são comercializados e utilizados em decorações de estufas europeias e americanas, como *Passiflora 'Albo-nigra'*, *P. 'Amethyst'*, *P. 'Star of Bristol'*, *P. 'Star of Kingston'* (Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougall, 2004; Conceição et al., 2011).

Nos países da América Latina, as *Passifloras* são espécies nativas e acabam não sendo utilizadas como plantas ornamentais, devido aos poucos programas de melhoramento genético para fins desta natureza (Santos et al., 2012).

Recentemente, Fonseca et al., (2017), realizaram a validação de descritores morfoagronômicos utilizados na proteção de cultivares no Brasil e a caracterização molecular de híbridos de maracujá ornamental desenvolvidas pela Embrapa Cerrados, a fim de diferenciar essas cultivares obtidas de cruzamentos entre espécies silvestres.

#### **4. CULTIVO IN VITRO DE *Passiflora* spp. COM POTENCIAL ORNAMENTAL**

O desenvolvimento da biotecnologia vegetal em plantas visa à utilização de processos tecnológicos e bioquímicos, através da cultura de células, tecidos e órgãos vegetais, com a finalidade de gerar produtos e serviços, proporcionando o conhecimento nas áreas de fisiologia, genética e biologia molecular vegetal (Lima et al., 2000). Uma das principais ferramentas biotecnológicas vegetal é a cultura de tecidos, utilizada na propagação em larga escala de genótipos superiores, disponibilizando para o mercado, plantas mais saudáveis e uniformes (Braglia et al., 2010; Otoni et al., 2013).

A cultura de tecidos também possibilita a produção de plantas livres de patógenos e com altas taxas de multiplicação, facilitando a conservação do germoplasma, por meio de técnicas, que nos últimos 50 anos vêm sendo desenvolvidas para espécies de maracujá, embora a maioria dos protocolos sejam direcionados ao maracujazeiro amarelo, entretanto, atualmente diferentes sistemas de cultivo in vitro estão sendo desenvolvidos para outras espécies de *Passifloras* através da organogênese e/ou embriogênese somática (Pacheco et al, 2016).

O desenvolvimento desses protocolos possibilita o estudo dos processos fisiológicos, produção de sementes sintéticas, seleção in vitro e desenvolvimento de hibridação somática, transformação genética e conservação in vitro (Otoni et al., 2013; Silva et al., 2015; Pacheco et al, 2016), permitindo a compreensão dos processos morfogênicos através dos aspectos moleculares envolvidos na caracterização da expressão gênica durante os processos de organogênese e embriogênese somática, conforme relatado por Rosa et al. (2013; 2014).

O uso de técnicas biotecnológicas em espécies de *Passiflora*, principalmente a cultura de tecidos, tem como finalidade a regeneração de plantas in vitro para a obtenção de novas variedades de interesse agrônomo, melhorando a qualidade e produtividade dessas espécies (Lima, et al., 2000).

A cultura de tecidos também vem sendo empregada em pesquisas com espécies de maracujazeiro que possuem potencial ornamental, a fim de estabelecer protocolos de regeneração, conservação de germoplasmas, bem como no auxílio para programas de melhoramento genético (Quadro 1).

**Quadro 1:** Uso da cultura de tecidos em estudos de *Passiflora* spp. com potencial ornamental

<b>Espécie</b>	<b>Fonte de Explante</b>	<b>Via morfogênica</b>	<b>Tipo e concentração dos reguladores de crescimento (µM)</b>	<b>Autores</b>
<i>P. morifolia</i>	Embrião zigótico e endosperma	Organogênese	0,93 CIN + 1,0 ANA + 1,0 GA <sub>3</sub>	Guzzo et al., 2004
<i>P. palmeri</i>	Embrião zigótico e endosperma	Organogênese	13,6 2,4-D + 9,3 CIN, 2,25 2.4-D + 1,1 BA + 1,4 AIA	Guzzo et al., 2004
<i>P. nitida</i>	Embrião zigótico e endosperma	Organogênese	13,6 24-D + 9,3 CIN, 0,93 CIN + 1,0 ANA	Guzzo et al., 2004
<i>P. coccinea</i>	Embrião zigótico e endosperma	Organogênese	13,6 2,4-D + 9,3 CIN	Guzzo et al., 2004
<i>P. "Guglielmo Betto"</i>	Gemas axilares	Organogênese	2,22 BA	Pipino et al., 2008
<i>P. "Manta"</i>	Gemas axilares	Organogênese	1,33 BA	Pipino et al., 2008
<i>P. trifasciata</i>	Gemas axilares	Organogênese	2,32 BA	Pipino et al., 2008
<i>P. foetida "Hastala"</i>	Botão floral	Organogênese	3,3 BA	Pipino et al., 2008
<i>P. cincinnata</i>	Embrião zigótico	Embriogênese somática	18,1 2,4-D + 4,5 BA	Silva et al., 2009
<i>P. alata</i>	Segmentos foliares e hipocótilo	Organogênese	2,27 TDZ, 4,43 BA + 2,27 TDZ	Pinto et al., 2010
<i>P. suberosa</i>	Segmento folia, nodal e internodal	Organogênese	22 e 44,4 BA	Garcia et al., 2011
<i>P. caerulea</i>	Segmento nodal e internodal	Organogênese	4,44 BA	Severin et al., 2011

<i>P. cincinnata</i>	Raiz	Organogênese	4,44 BA	Silva, et al., 2011.
<i>P. foetida</i>	Segmento nodal	Organogênese	8,87 BA + 4,64 CIN	Anand et al., 2012.
<i>P. alata</i>	Segmento nodal, internodal e foliar	Organogênese	13,2 e 22 BA	Pacheco et al., 2012
<i>P. foetida</i>	Embrião zigótico	Organogênese	4,5 BA + 13,6 2,4-D, 4,5 BA + 18,1 2,4-D	Rosa e Dornelas, 2012
<i>P. setacea</i>	Segmento hipocotiledonar, foliar e raiz.	Organogênese	4,43 BA, 4,43 BA + 2,27 TDZ	Vieira et al., 2014
<i>P. miniata</i>	Embrião zigótico	Embriogênese somática	18,1 2,4-D	Ferreira et al., 2015
<i>P. alata,</i> <i>P. crenata,</i> <i>P. foetida,</i> <i>P. giberti</i>	Embrião zigótico	Embriogênese somática	13,6 2,4-D	Rosa et al., 2015
<i>P. cincinnata</i>	Semente sintética de embriões zigóticos e somáticos	Germinação in vitro	alginato de sódio + endosperma artificial + ½MS;	Silva, et al.; 2015
<i>P. suberosa</i>	Segmento de raiz	Organogênese	9,0 BA	Rosa et al., 2016
<i>P. miniata</i>	Embrião zigótico	Organogênese	3,32 BA	Carvalho et al., 2017
<i>P. cristalina</i>	Segmento foliar, hipocotiledonar e de raiz, cotilédone do embrião zigótico e endosperma	Organogênese	8,87 e 4,43 BA, 2,32 CIN	Faria et al., 2018

## 5. PERSPECTIVAS

A diversidade de espécies encontradas no Brasil abre perspectivas para o mercado e produção de *Passifloras* ornamentais, desde espécies exóticas até espécies silvestres podem ser exploradas economicamente e comercializadas como plantas tropicais brasileiras.

As passifloráceas possuem flores com uma grande variedade de cores e formas, características de maior valor comercial. A produção de plantas ornamentais de maracujazeiro atende aos diversos setores da floricultura como jardinagem, paisagismo, plantas de vaso, folhas e flores de corte, servindo tanto para o cultivo em pergolados, como cercas vivas, aumentando o faturamento da economia brasileira em relação ao mercado de plantas ornamentais.

Programas que visam à inclusão de espécies com características interessantes para o atual mercado da floricultura, em parceria com empresas que estruturam a produção de plantas de maracujazeiros, a exploração das mesmas como ornamentais possibilita uma fonte de renda extra aos pequenos produtores que fazem parte da agricultura familiar. O desenvolvimento de novas cultivares de híbridos e poliplóides, com características vegetativas mais vigorosas e maior durabilidade no florescimento, também são caminhos para implantação do maracujazeiro na ornamentação.

Além disso, técnicas biotecnológicas que visam à produção de mudas em larga escala, com qualidade fitossanitária e maior vigor facilitam a oferta dessas plantas para o uso na ornamentação.

## 6. 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.

AMORIM, J. S.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. J. C.; FREITAS J. C. O. Self-, cross- and interspecific pollinations in *Passiflora capsularis* and *P. rubra*. **Revista Brasileira Botânica**. 34:537-544, 2011.

ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. 22: 87-91, 2012.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; PASSOS, I. R. S. Espécies de maracujá: Caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.559-586. 2005.

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

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. (2016). **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 10, março, 2018.

BRAGLIA, L.; DE BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; BIANCHINI, A.; PIPINO, L.; MERCURIA, A. In vitro plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**. 855:47-52, 2010.

BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REDAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**. 370:45-57, 1995.

CARVALHO, P. P.; ANTONIAZZI, C. A.; SILVA, N. T.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; CARVALHO, M. L. S. Regeneração in vitro de *Passiflora miniata* Mast. **Ornamental Horticulture**. 23:88-95, 2017.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences**. 15: 14122-14152, 2014.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, M. M.; BELO, G. O., SANTOS, S. F.; FREITAS, J. C. O. Hybridization among wild passionflower species. **Revista Brasileira Botânica**. 34:237-240, 2011.

CORRÊA, P. R.; PAIVA, P. D. O. Agronegócio da Floricultura Brasileira. **Magistra**. 21:253-261, 2009.

COSTA, A. C. M.; CHIBA, H. S. A. Caracterização das práticas de produção utilizadas por produtores de flores e plantas ornamentais na Amazônia. **Revista Espacios**. 38:21-35, 2017.

CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30: 875-879, 2008.

FALEIRO, F. G. JUNQUEIRA, N. T.N. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. S.; ARAÚJO, S. C. B.; ANDRADE, S. R. M.; COSTA, A. M.; CASTELLEN, M. S.; VAZ, A. P. A.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ANDRADE G. A. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Livros e Cultivares Apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional – DF**. Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, p.45, 2009.

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 54:166-174, 2018.

FERREIRA, T. G. T.; PENHA, H. A.; ZUCCHI, M. I.; SANTOS, A. A.; HANAI, L. R.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. F.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**. 6:727-730, 2010.

FERREIRA, D. A. T.; SATTTLER, 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.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora**. 13:34-38, 2003.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BARTH, M.; FELBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 52:849-860, 2017.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106:47–54. 2011.

GAURAV, A. K.; AGNIHOTRI, R. Strategies for the development of unique flower forms in ornamental crops: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. 6:2474-2478, 2017.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**. 61:108-113, 2004.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA – IBRAFLOR. Mercado de flores prevê crescimento médio de 9% no Brasil e faturamento de R\$ 7 bi, em 2017.** Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/site/2017/11/04/mercado-de-flores-vera-longuini/>>. Acesso em: abril de 2018.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 20:115-120, 2014.

LIMA, D. M.; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de Técnicas de Biotecnologia à Cultura e Melhoramento do Maracujazeiro. **Ciência Rural**. 30:359-363, 2000.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.55-78. 2005.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; AZEVEDO FILHO, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova

alternativa de maracujá. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 17:87-95, 2011.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; SOUZA, F. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. Palinotaxonomia de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasílica**. 24:133-145. 2010.

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

OCAMPO, J. P.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; RESTREPO, M.; JARVIS, A.; SALAZAR, M.; CAETANO, C. Diversity of colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. **Biota Colombiana**. 8:1- 45, 2007.

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

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 (*Passifloras* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi; Narosa Publishing House. p.1-17, 2013.

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

PACHECO, G.; SIMÃO, M. S.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; VIEIRA, M. L. C.; MANSUR, E. In vitro conservation of *Passiflora* - A review. **Scientia Horticulturae**. 211:305–311, 2016.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.457–463. 2005.

PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. In vitro regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**. 8:47-49, 2008.

PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. *In vitro* regeneration and multiplication of *Passiflora* hybrid “Guglielmo Betto”. In: Jain, S. M. Ochatt, S. J. (Eds.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. Estados Unidos: Humana Press, p. 153-162, 2010.

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A. A. F.; FIGUEIREDO, A. L.; GOMES, F. P.; SOUZA, M. M. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum Agronomy**. 34:67-75, 2012.

RODRIGUES, T. M.; LUZ, J. M. Q.; LINO, L. O.; RODRIGUES, C. R. G. B. Assepsia de rizomas e ápices caulinares de *Curcuma alismatifolia*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 5:36-41, 2009.

ROSA, Y. B. C. J.; DORNELAS, M. C. In vitro plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 108:91–99, 2012.

ROSA, Y. B. C. J.; AIZZA, L. C. B.; MONTE-BELLO, C. C., DORNELAS, M. C. The PmNAC1 gene is induced by auxin and expressed in differentiating vascular cells in callus cultures of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 115: 275–283, 2013.

ROSA, Y. B. C. J.; AIZZA, L. C. B.; MONTE-BELLO, C. C., DORNELAS, M. C. PmTCP1 encodes a putative TCP transcription factor and is differentially expressed during in vitro organogenesis in *Passiflora*. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**. 50:36–44, 2014.

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, 2015.

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**. 52:64-71, 2016.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; ALMEIDA, A. A. F.; FREITAS, J. C. O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**. 184:389–399, 2012.

SEVERIN, C.; BUENO, M.; SANTIN, F.; GIUBILEO, M. G. Respuesta in vitro de diferentes biotipos y explantos de *passiflora caerulea* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**. 13:73-79, 2011.

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 wild passion fruits species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99:47–54, 2009.

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, M. L.; PAIM PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; LANII, E. R. G.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. A. B.; OTONI, O. C. Produção de sementes sintéticas de maracujazeiro silvestre com potencial ornamental. **Ornamental Horticulture**. 21:331-338, 2015.

SOUZA, M. A. D.; HOPKINS, M. J. G. *Passiflora fissurosa*, uma nova espécie de Passifloraceae para o Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. 41:449-442, 2011.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; VENDRAME, W. A. **Cultivo Moderno de Orquídeas: Phalaenopsis e seus híbridos**. 2: 200, 2015.

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

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: The MIT Press, 2000.

VASCONCELLOS, M. A. S.; SILVA, A. C.; SILVA, A. C.; REIS, F. O. Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p.295-313. 2005.

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

## CAPÍTULO II

---

### Regeneração in vitro de cinco espécies silvestres de *Passiflora* spp. com potencial ornamental a partir do cultivo de embriões zigóticos

#### RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do embrião zigótico como fonte de explante para a regeneração in vitro de cinco espécies silvestres de *Passiflora* spp. com potencial ornamental. Os embriões zigóticos foram cultivados em meio de MS com os reguladores de crescimento 6-Benziladenina (BA) nas concentrações de 2,21; 3,32; 4,43; 6,65 e 8,87, Tidiazuron (TDZ) 2,27; 3,48; 4,54; 6,81 e 9,08 e Cinetina (CIN) 2,32; 3,40; 4,64; 6,97 e 9,29  $\mu\text{M}$  e o controle na ausência das citocininas. Os explantes foram cultivados em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância e temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . O delineamento experimental utilizado foi DIC e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a ( $p \leq 0.05$ ), com 3 repetições e 10 explantes por placa de Petri. As avaliações foram realizadas aos 60 dias de cultivo. O tratamento com 3,32  $\mu\text{M}$  de BA induziu uma maior produção de brotações por explantes nas espécies *P. alata* e *P. nitida*, com médias de 19,5 e 37,0, respectivamente. O número médio de plantas por explante foi de 2,5 em *P. alata* cultivados em 6,65  $\mu\text{M}$  de BA e, em *P. nitida* foi de 2,0 plantas por explante cultivados em 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ. Para *P. capparidifolia* o maior número de brotações por explante foi de 10,4 no meio suplementado com 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ. O maior número médio de plantas foi obtida na presença de 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ. Em *P. cristalina* o melhor tratamento ocorreu com 8,87  $\mu\text{M}$  de BA 35,3 brotações por explante e maior número médio de plantas. Para *P. foetida*, o maior número médio de brotações por explantes ocorreu na presença de 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ com 52,0 brotos. Os reguladores BA e TDZ foram os que induziram as melhores respostas organogênicas, evidenciando o potencial de regeneração a partir de embriões zigóticos das cinco espécies de maracujazeiros ornamentais.

**Palavras-chave:** Brotações adventícias; Cultivo in vitro; Maracujazeiros ornamentais.

## **In vitro regeneration of five wild species of *Passiflora* spp. with ornamental potency from the cultivation of zygotic embryos**

### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the potential of the zygotic embryos as an explant source for in vitro regeneration by the organogenic pathway in five species of *Passiflora* spp. with ornamental potential. The zygotic embryos were cultured in MS medium with the growth regulators: 6-Benzyladenine (BA) at concentrations of 2.21; 3.32; 4.43; 6.65 and 8.87  $\mu\text{M}$ , Thidiazuron (TDZ) 2.27; 3.48; 4.54; 6.81 and 9.08  $\mu\text{M}$  and Kinetin (KIN) 2.32; 3.40; 4.64; 6.97 and 9.29  $\mu\text{M}$  and the control in the absence of cytokinins. The explants were cultivated in a culture room with photoperiod of 16 hours and 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of irradiance and temperature of  $26 \pm 2$  °C. The experimental design was DIC and the means compared by the Scott Knott's test ( $p \leq 0.05$ ), with 3 replicates and 10 explants per petri dish. The evaluations were performed at 60 days of culture. The treatment with 3.32  $\mu\text{M}$  of BA induced the highest shoot yield per explants in *P. alata* and *P. nitida*, with averages of 19.5 and 37.0, respectively. The mean number of plants per explant was 2.5 in *P. alata* grown in 6.65  $\mu\text{M}$  BA and in *P. nitida* it was 2,0 plants per explants cultivated in 4,54  $\mu\text{M}$  TDZ. For *P. capparidifolia* the highest number of shoots per explant was 10.4 in the medium supplemented with 3.48  $\mu\text{M}$  TDZ. The highest mean number of plants was obtained in the presence of 4.54  $\mu\text{M}$  TDZ. In *P. cristalina*, the best treatment was with 8.87  $\mu\text{M}$  BA with 35.3 shoots per explant and the highest average number of plants. For *P. foetida*, the highest average number of buds per explants was observed in the presence of 6.81  $\mu\text{M}$  TDZ with 52.0 shoots. The BA and TDZ regulators were the regulators that induced the best organogenic responses, evidencing the potential of regeneration from zygotic embryos of the five species of ornamental passion fruit.

**Key words:** Adventitious shoots; In vitro culture; Ornamental passion fruit.

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o gênero *Passiflora* possui mais de 530 espécies, podem ser encontradas na América Tropical, Colômbia, Peru, Equador, incluindo o Brasil, embora algumas espécies sejam nativas dos Estados Unidos, Argentina, Ásia, Austrália e China (Faleiro e Junqueira, 2009; Bernacci et al., 2015). O Brasil é conceituado como um centro de diversidade da família Passifloraceae, com mais de 100 espécies consideradas endêmicas (Bernacci et al., 2015).

As espécies do gênero *Passiflora* são amplamente utilizadas, e a maioria produz frutos que em geral são consumidos *in natura* e para o processamento industrial e ainda apresentam propriedades medicinais em diferentes partes da planta. Possuem características florais peculiares, incluindo várias séries de filamentos coronais brilhantes, coloridos, com estruturas florais elaboradas, e possuem perfume de aroma exuberante (Peixoto, 2005; Faleiro e Junqueira, 2009; Abreu et al., 2009, Bernacci et al., 2015).

Além das espécies comerciais, também são utilizadas na ornamentação, os maracujazeiros silvestres exibem grande potencial a ser explorado comercialmente para este fim (Peixoto, 2005). Muitas destas espécies silvestres são pouco domesticadas e a variabilidade genética é grande (Figueiredo et al., 2007). No mercado italiano da floricultura, espécies e híbridos de *Passiflora* são comercializados em vasos como plantas de jardim e, na sua maioria, são propagadas utilizando técnicas de cultivo *in vitro* (Braglia et al., 2010).

Atualmente, têm-se reportado um crescente número de trabalhos estabelecendo sistemas de regeneração *in vitro* via organogênica em muitas espécies de *Passiflora* comerciais e/ou ornamentais e, vários tipos de explantes foram utilizados como os segmentos nodais e foliares (Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Shekhawat et al., 2015), segmentos radiculares (Silva et al., 2011, Rosa et al., 2016; Faria et al., 2018), hipocotiledonares (Vieira et al., 2014, Rocha et al., 2016, Faria et al., 2018), endosperma (Mohamed et al., 1996; Faria et al., 2018; Antoniazzi et al., 2018), embriões zigóticos (Guzzo et al., 2004; Rocha et al., 2015, Carvalho et al., 2017).

Os embriões zigóticos de *Passiflora* primeiramente foram utilizados como fonte de explante para a regeneração via embriogênese somática (Silva et al., 2009). Entretanto, Rocha et al. (2015) observaram que o embrião zigótico dependendo das

concentrações da auxina 2,4-d combinadas com baixa concentração de BA induzem as duas vias de regeneração, sendo a embriogênese somática e a organogênese, isso demonstra o potencial do embrião zigótico como fonte de explante. Os embriões zigóticos são formados por células juvenis que se encontram em constantes divisões celulares, o que facilita a regeneração de novas estruturas vegetativas (Elhiti e Stasolla, 2011).

As diferentes respostas encontradas no cultivo *in vitro* de espécies de maracujazeiro, ocorrem devido aos estímulos causados pelos reguladores de crescimento exógenos e do tipo de explante utilizado (Soares et al.; 2012; Otoni et al., 2013). Dentre os reguladores a citocinina Benziladenina (BA) é a mais comumente utilizada para a regeneração de espécies de maracujazeiros (Otoni et al., 2013), embora o Thidiazuron (TDZ) também tem sido aplicado na indução de brotações em maracujazeiros (Trevisan e Mendes, 2005; Pinto et al., 2010; Garcia et al., 2011; Vieira et al., 2014; Carvalho et al., 2017; Faria et al., 2018).

Os estímulos causados pelos reguladores de crescimento podem ocasionar a reativação de células indiferenciadas ou reprogramação de células somáticas diferenciadas, uma vez que o processo de regeneração depende da plasticidade celular, responsável pela especificação do destino das células até a formação do órgão (Ikeuchi et al., 2016).

Devido à importância ornamental das *Passifloras*, principalmente, pelas características florais de interesse particular para o mercado da floricultura, o trabalho objetivou avaliar o potencial do embrião zigótico como fonte de explante para a regeneração *in vitro* via organogênica em cinco espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Frutos de *P. alata* Curtis, *P. capparidifolia* Killip, *P. cristalina* Vanderplank e Zappi, *P. foetida* Linn e *P. nitida* Kunth foram coletados na região do médio norte do estado de Mato Grosso.

Primeiramente, os frutos foram lavados com detergente e água corrente. Em seguida, realizou-se a retirada do arilo das sementes com o auxílio de uma peneira e

as mesmas foram colocadas sob papel toalha para secagem. Após, as sementes foram imersas em dióxido de cloro a 0,01%, por 5 minutos e colocadas novamente sob papel toalha. Posteriormente, o tegumento das sementes foi removido com auxílio de mini morsa (Reis et al., 2007)

Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes das cinco espécies de *Passiflora* spp. foram desinfestadas sob as mesmas condições. Primeiramente, as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v), por 3 minutos, seguido pela imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) por 30 minutos acrescido de 3 gotas de Tween-20<sup>o</sup> e submetidas em 4 enxágues em água destilada e autoclavada, sendo mantidas *overnight* em água destilada autoclavada para facilitar o isolamento dos embriões zigóticos. Após esse período, o endosperma foi longitudinalmente seccionado para o isolamento dos embriões zigóticos.

## 2.2 Regeneração in vitro

Os embriões zigóticos isolados foram cultivados em placas de Petri 90 x 15 mm em meio de indução composto por sais básicos de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Acumedia®, MI), mio inositol 0,01% (p/v), sacarose 3% (p/v) e 0,8% de ágar (p/v) como agente gelificante, acrescido de diferentes concentrações de reguladores de crescimento citocínicos (PGRs): 6-Benziladenina (BA) 2,21; 3,32; 4,43; 6,65 e 8,87  $\mu\text{M}$ ; Tiadizuron (TDZ) 2,27; 3,48; 4,54; 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$  e Cinetina (CIN) 2,32; 3,40; 4,64; 6,97 e 9,29  $\mu\text{M}$  e como controle o meio de MS na ausência dos reguladores de crescimento. O pH foi ajustado em  $\pm 5,7$  e o meio de cultura foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C a uma pressão de 1,1 atm. Os embriões zigóticos (Figura 1A, F, K, P, U) foram cultivados em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância providas de lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), com temperatura de  $26 \pm 2$  °C durante 60 dias.

## 2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), contendo 16 tratamentos entre as diferentes concentrações de BA, TDZ, CIN, o controle com 3 repetições e 10 explantes por repetição. As respostas morfogênicas avaliadas foram porcentagens de explantes com resposta, número de brotações por explante aos 30

e 60 dias de cultivo, o número de plantas regeneradas por explante aos 90 dias de cultivo in vitro.

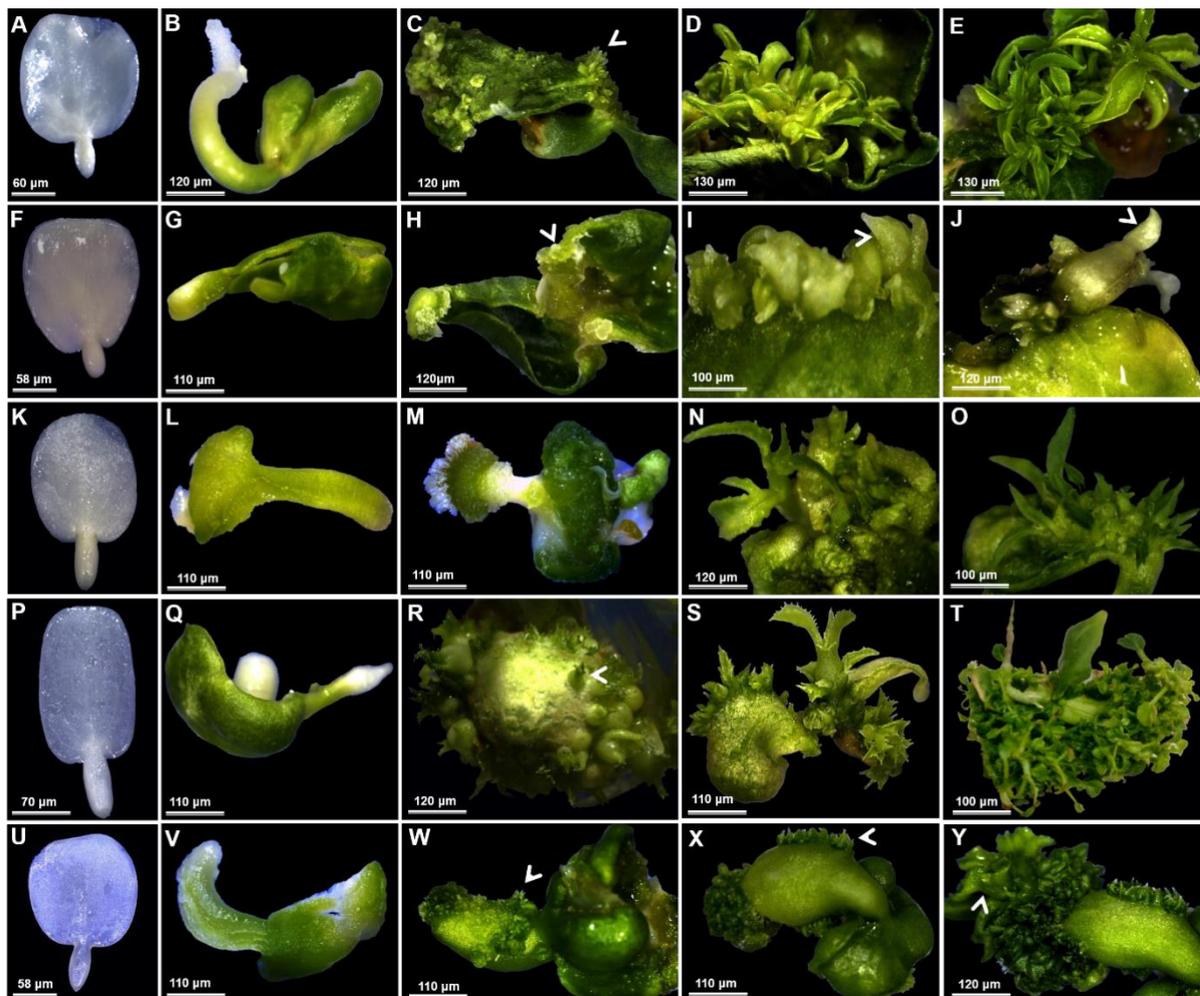
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott a ( $p \leq 0.05$ ), de probabilidade utilizando o software Sisvar®, Versão 5.6 (Ferreira, 2011). Os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

### 3. RESULTADOS

O processo de regeneração das 5 espécies foi acompanhado temporalmente, e não foram observadas diferenças significativas entre as mesmas. O alongamento do eixo embrionário e dos cotilédones foram observados após 10 dias de cultivo in vitro (Figura 1B, G, L, Q, V). Aos 20 dias de cultivo foram visualizadas estruturas organogênicas e pequenas brotações de forma direta (Figura 1C, H, M, R, W). As brotações localizaram-se nas regiões do ápice e nos cotilédones do embrião zigótico (Figura 1D, I, N, S X). Aos 60 dias de cultivo in vitro, observou-se o alongamento das brotações e pequena expansão dos primórdios foliares (Figura 1E, J, O T, Y).

Os tratamentos com BA e TDZ induziram as melhores respostas morfológicas para todas as espécies. Para *P. alata* a concentração de 8,87  $\mu\text{M}$  de BA se destacou quanto à produção de maior porcentagem de explantes com respostas, com 87%. A maior média de brotações produzidas por explante foi observada na concentração de 3,32  $\mu\text{M}$  BA com média de 19,5 brotações e para a variável número de plantas regeneradas por explante, a maior média de 2,5 plantas foi obtida na concentração de 6,65  $\mu\text{M}$  de BA, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

*P. capparidifolia* apresentou porcentagem de 67% em 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ, apresentando diferença significativa entre os demais tratamentos. A maior média de brotações por explante obtida foi observada na concentração de 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ com 10,4 brotações por explante, não diferindo significativamente de 4,65  $\mu\text{M}$  de TDZ com 10,0 brotações. Para a variável plantas regeneradas por explante, a maior média observada foi 1,3 plantas na concentração de 4,64  $\mu\text{M}$ , não diferindo significativamente da concentração de 3,48  $\mu\text{M}$  com 1,0 planta regenerada por explante (Tabela 1).



**Figura 01:** Sistema de regeneração in vitro a partir de embriões zigóticos em cinco espécies de *Passifloras* spp. com potencial ornamental. (A-E) *Passiflora alata*. (F-G) *Passiflora capparidifolia*. (K-O) *Passiflora cristalina*. (P-T) *Passiflora foetida*. (U-Y) *Passiflora nitida*. Embrião zigótico de *P. alata*; (B - Y) Alongamento do eixo embrionário e expansão dos cotilédones aos 10 dias de cultivo in vitro; (C) Formação de estruturas organogênicas (seta) e brotações aos 20 dias de cultivo; (B-Y) Desenvolvimento de multibrotações aos 30 dias de cultivo; (B-Y) Brotações adventícias aos 60 dias de cultivo com folhas desenvolvidas em *P. alata* com 3,32  $\mu\text{M}$  BA.

A maior taxa de explantes com respostas para *P. crisatlina* foi de 83% observada na concentração de 2,21  $\mu\text{M}$  de BA, não apresentando diferença significativa das concentrações de 3,32 e 8,87  $\mu\text{M}$  de BA, 9,08  $\mu\text{M}$  de TDZ e 9,29  $\mu\text{M}$  de CIN. A concentração de 8,87  $\mu\text{M}$  BA apresentou maior produção de brotações adventícias por explante com número médio de 35,3 brotos, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Para a variável número de plantas regeneradas por explante, as concentrações de 3,32 e 8,87  $\mu\text{M}$  de BA apresentaram uma média de 4,0 plantas regeneradas, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Para *P. foetida*, a maior porcentagem de explantes com respostas organogênicas foi de 93% na concentração de 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ, não diferindo significativamente das concentrações de 4,54; 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$  de TDZ. O maior percentual médio do número de brotações por explante foi observada na concentração de 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ, com média de 52,0 brotos aos 60 dias de cultivo in vitro, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Nesta concentração também foi obtido maior média de plantas regeneradas por explante, com 14,0 plantas, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Em *P. nitida*, a concentração de 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ apresentou a maior porcentagem de explantes com respostas organogênicas com 97% em 3,48  $\mu\text{M}$  de TDZ, entretanto, diferenças significativas não foram observadas entre os tratamentos suplementados com TDZ. Já a maior média de brotos por explante foi observada na concentração de 3,32  $\mu\text{M}$  de BA, com 37,0 brotos por explante aos 60 dias de cultivo in vitro, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A maior média de plantas regeneradas por explante foi de 2,0 plantas na concentração de 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ (Tabela 1).

**Tabela 1:** Regeneração in vitro pela via organogênica a partir de embriões zigóticos como fonte de explantes em cinco espécies de *Passiflora* spp com potencial ornamental.

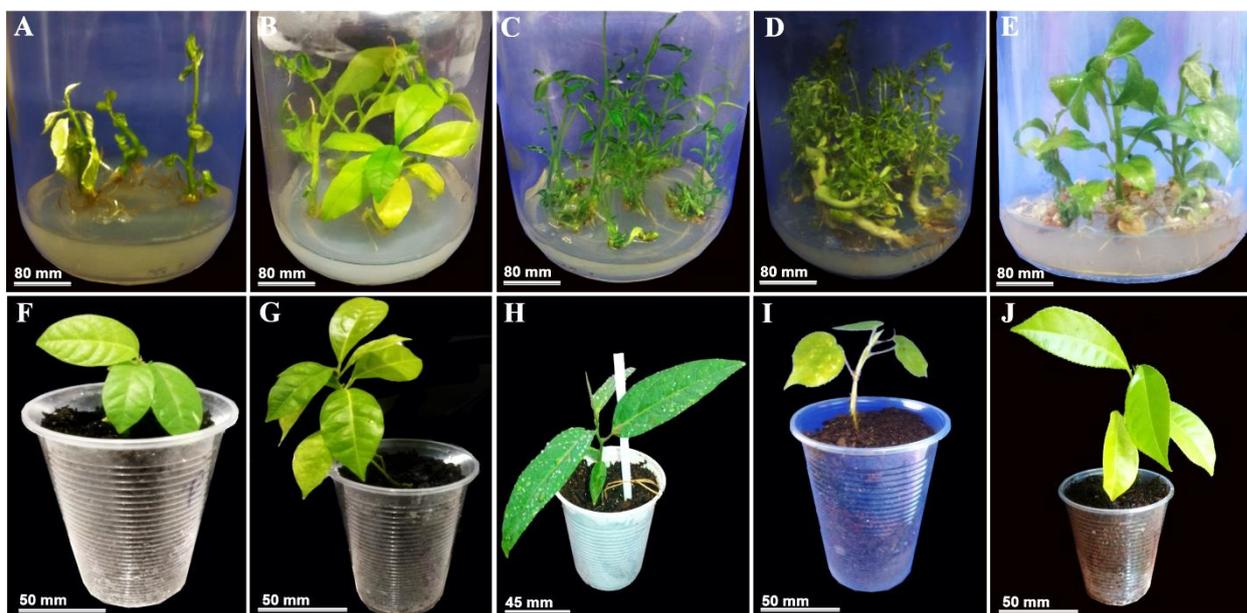
Reguladores de crescimento	$\mu\text{M}$	(%) Explantes com respostas	No. de brotações adventícias por explante	No. de plantas regeneradas por explante
<b><i>P. alata</i></b>				
CONTROLE	0,0	17c	2,0 $\pm$ 0,5g	0,0d
BA	2,21	43b	8,4 $\pm$ 1,4d	1,0 $\pm$ 0,0c
	3,32	40b	19,5 $\pm$ 0,9a	1,3 $\pm$ 0,4c
	4,43	57b	14,3 $\pm$ 0,9b	1,2 $\pm$ 0,4c
	6,65	77a	13,0 $\pm$ 1,1c	2,5 $\pm$ 0,5a
	8,87	87a	15,0 $\pm$ 1,6b	1,3 $\pm$ 0,5c
TDZ	2,27	27c	3,0 $\pm$ 0,6f	1,0 $\pm$ 0,4c
	3,48	37b	3,3 $\pm$ 0,8f	1,1 $\pm$ 0,3c
	4,54	33b	12,2 $\pm$ 1,8c	1,0 $\pm$ 0,0c

	6,81	30b	14,2 ± 1,3b	1,7 ± 0,5b
	9,08	37b	7,3 ± 1,1e	1,1 ± 0,4c
	2,32	0d	0,0h	0,0d
	3,40	0d	0,0h	0,0d
CIN	4,64	0d	0,0h	0,0d
	6,97	0d	0,0h	0,0d
	9,29	0d	0,0h	0,0d
C.V.		19,3	9,0	10,4
<b><i>P. capparidifolia</i></b>				
CONTROLE	0,0	0d	0,0f	0,0c
	2,21	50b	4,0 ± 0,7e	0,0c
	3,32	30c	4,0 ± 0,8e	2,7 ± 1,1a
BA	4,43	40c	5,0 ± 0,7d	0,0c
	6,65	30c	5,4 ± 0,5d	0,0c
	8,87	50b	5,0 ± 0,6d	0,0c
	2,27	53b	8,0 ± 0,9b	0,0c
	3,48	67a	10,4 ± 0,8a	1,0 ± 0,0b
TDZ	4,54	47b	10,0 ± 0,9a	1,3 ± 0,5b
	6,81	53b	6,1 ± 0,8c	0,0c
	9,08	43c	8,1 ± 0,8b	0,0c
	2,32	0d	0,0f	0,0c
	3,40	0d	0,0f	0,0c
CIN	4,64	0d	0,0f	0,0c
	6,97	0d	0,0f	0,0c
	9,29	0d	0,0f	0,0c
C.V.		20,5	5,3	7,2
<b><i>P. cristalina</i></b>				
CONTROLE	0,0	33b	3,0 ± 1,1h	1,0 ± 0,0d
	2,21	83a	28,0 ± 4,9c	1,8 ± 0,9c
	3,32	67a	27,0 ± 4,5c	4,0 ± 0,8a
BA	4,43	33b	4,2 ± 2,0h	1,0 ± 0,0d
	6,65	53b	12,1 ± 2,8e	1,0 ± 0,0d
	8,87	77a	35,3 ± 4,9a	4,0 ± 0,8a

	2,27	53b	7,0 ± 1,6g	2,8 ± 0,6b
	3,48	50b	8,5 ± 2,2f	1,9 ± 0,8c
TDZ	4,54	50b	10,3 ± 2,5f	1,6 ± 0,8c
	6,81	43b	21,0 ± 4,4d	1,3 ± 0,6d
	9,08	77a	30,2 ± 4,3b	1,3 ± 0,5d
	2,32	60b	11,0 ± 1,9f	3,0 ± 0,8b
	3,40	47b	13,0 ± 2,3e	2,3 ± 0,6b
CIN	4,64	53b	19,0 ± 2,6d	3,0 ± 0,7b
	6,97	33b	12,0 ± 2,4e	2,5 ± 0,7b
	9,29	70a	19,4 ± 3,3d	3,1 ± 0,7b
C.V.		14,3	9,8	11,8
<b><i>P. foetida</i></b>				
CONTROLE	0,0	33c	9,0 ± 1,2i	4,0 ± 1,1c
	2,21	33c	23,0 ± 2,0f	5,1 ± 1,2e
	3,32	43c	17,2 ± 1,7h	5,3 ± 1,6e
BA	4,43	33c	19,3 ± 1,2g	9,0 ± 0,8d
	6,65	60b	16,3 ± 1,7h	4,3 ± 1,3e
	8,87	70b	20,1 ± 1,2g	7,2 ± 1,6d
	2,27	93a	32,0 ± 1,9c	5,0 ± 1,8e
	3,48	63b	20,2 ± 1,6g	7,5 ± 1,1d
TDZ	4,54	87a	29,0 ± 2,4d	9,0 ± 1,5d
	6,81	80a	52,0 ± 2,7a	14,0 ± 1,8a
	9,08	80a	36,4 ± 1,2b	7,0 ± 1,5e
	2,32	43c	23,0 ± 1,1f	11,2 ± 1,5b
	3,40	37c	26,5 ± 1,9e	9,5 ± 1,5c
CIN	4,64	40c	20,0 ± 1,9g	7,0 ± 1,5d
	6,97	43c	19,0 ± 1,2g	8,0 ± 1,5d
	9,29	50c	19,4 ± 2,5g	7,3 ± 1,0d
C.V.		12,1	7,4	10,2
<b><i>P. nitida</i></b>				
CONTROLE	0,0	0d	0,0j	0,0b
	2,21	10c	13,0 ± 0,5f	0,0b
	3,32	63b	37,0 ± 2,0a	1,5 ± 0,7a

BA	4,43	17c	$3,0 \pm 0,0i$	0,0b
	6,65	67b	$18,2 \pm 1,6e$	0,0b
	8,87	67b	$33,0 \pm 1,7b$	$1,0 \pm 0,0a$
TDZ	2,27	90a	$14,0 \pm 2,0f$	$1,5 \pm 0,7a$
	3,48	97a	$22,0 \pm 1,1d$	0,0b
	4,54	77a	$19,4 \pm 2,0e$	$2,0 \pm 1,0a$
	6,81	80a	$25,2 \pm 2,0c$	0,0b
	9,08	83a	$18,1 \pm 2,3e$	$1,5 \pm 0,7a$
CIN	2,32	27c	$4,3 \pm 0,5i$	0,0b
	3,40	30c	$7,0 \pm 0,9h$	0,0b
	4,64	33c	$10,0 \pm 0,6g$	0,0b
	6,97	13c	$7,0 \pm 0,5h$	0,0b
	9,29	33c	$9,2 \pm 0,5g$	0,0b
C.V.		13,5	9,0	9,65

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 2:** Plantas completas regeneradas de cinco espécies de maracujazeiros com potencial ornamental de origem a partir de embriões zigóticos como fonte de explantes. (A, F) *P. alata*; (B, G) *P. capparidifolia*; (C, H) *P. cristalina*; (D, I) *P. foetida*; (E, J) *P. nitida*.

As brotações adventícias de aproximadamente 5 mm foram isoladas e cultivadas em meio de MS na ausência dos PGRs e converteram-se em plântulas completas, com exceção da espécie *P. nitida*, em que as brotações senesceram e não completaram o desenvolvimento.

Após 30 dias de cultivo in vitro as plantas que apresentaram desenvolvimento normal foram aclimatizadas em condições de laboratório, e posteriormente para casa de vegetação Figura 2 (A) *P. alata*, (B) *P. capparidifolia*, (C) *P. cristalina* e (D) *P. foetida*.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi relatado o potencial do embrião zigótico na regeneração in vitro de plantas de cinco espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental.

A organogênese *de novo* é o método de propagação in vitro predominante para a obtenção de plantas de *Passiflora* (Otoni et al., 2013). Este processo caracteriza-se pela formação de brotos e raízes de explantes cultivados in vitro, sendo influenciado pelo tipo de explante e a utilização de reguladores de crescimento (Otoni et al., 2013; Rocha et al., 2016). Vários estudos reportaram protocolos para a micropropagação de espécies de *Passiflora* a partir de diferentes fontes de explantes, meios de cultura e reguladores de crescimento (Vieira et al., 2014; Silva et al., 2011; Ozarowski e Thiem, 2013; Rocha, et al., 2015; Carvalho et al., 2017; Faria et al., 2018).

A regeneração in vitro de espécies de *Passiflora* utilizando-se de embriões zigóticos como fonte de explantes foi relatada por Rocha et al. (2015) para a espécie *P. edulis*. Os autores destacam que o embrião zigótico é uma fonte de explante com células em constante divisão celular e expressam a pluripotencialidade no desenvolvimento de órgãos e a totipotencialidade na produção do embrião somático. Além disso, a utilização do embrião zigótico no cultivo in vitro, torna-se uma ferramenta aplicável para o desenvolvimento de protocolos com a finalidade de produzir mudas com características superiores e livres de fitopatógenos, subsidiando os programas de melhoramento genético e a conservação das espécies (Ebert et al., 2014).

Na indução de brotações adventícias em embriões zigóticos de *P. miniata* Carvalho et al. (2017), utilizando dos reguladores de crescimento citocínicos BA, TDZ e CIN, observaram que a melhor resposta na produção de brotações adventícias nos embriões zigóticos ocorreu quando o meio foi suplementado com

baixas concentrações de BA. Em maracujazeiros o BA é o regulador de crescimento mais utilizado para a indução de brotações adventícias (Otoni et al., 2013). Entretanto, em estudos utilizando-se do PGR TDZ para a indução de brotações adventícias e espécies deste gênero, Pinto et al. (2010) Vieira et al., (2014) e Faria et al. (2018) demonstraram alta responsividade na produção de brotações adventícias, como também foi observado no presente trabalho.

As citocininas utilizadas, responderam de forma diferente para cada espécie estudada, sendo BA e TDZ as mais responsivas. O PGR CIN demonstrou baixa eficiência na indução e brotações adventícias para as espécies *P. cristalina*, *P. foetida* e *P. nitida*, e não induziu a formação de brotações nas espécies *P. alata* e *P. capparidifolia*.

O potencial de regeneração, por meio da organogênese in vitro depende da aplicação de fitohormônios exógenos ao meio de cultura e da capacidade do tecido em responder a alterações hormonais durante o cultivo. Quando o tecido responde aos PGRs exógenos, as células do explante adquirem competência organogênica por meio da desdiferenciação e/ou diferenciação celular, tornando-se determinadas para a formação de órgãos específicos (Sugiyama, 1999; Xu e Huang, 2014).

Contudo, um dos entraves encontrados na micropropagação das espécies de *Passiflora* é a baixa reprodutibilidade de alguns protocolos desenvolvidos para a cultura, uma vez que são específicos para a espécie e/ou cultivares (Passos e Bernarci, 2005).

O BA apresentou maior porcentagem de explantes com resposta morfogênica na concentração de  $8,87 \mu\text{M L}^{-1}$  para todas as espécies cultivadas. No entanto, a maior média de brotos nessa concentração só foi observada para *P. cristalina*. *P. alata* e *P. capparidifolia* que apresentaram a maior média de brotações na concentração de  $3,32 \mu\text{M L}^{-1}$ . *P. capparidifolia* apresentou maior média de brotos nas concentrações de 2,21; 3,32 e  $4,43 \mu\text{M L}^{-1}$  aos 30 dias de cultivo, e aos 60 dias na concentração de  $6,65 \mu\text{M L}^{-1}$ . Em *P. foetida*, a maior média observada aos 30 dias de cultivo foi nas concentrações de 4,43 e  $6,65 \mu\text{M L}^{-1}$  e aos 60 dias em  $2,21 \mu\text{M L}^{-1}$  de BA. A maior média de plantas regeneradas foi observada nas concentrações de  $3,32 \mu\text{M L}^{-1}$  em *P. capparidifolia*,  $6,65 \mu\text{M L}^{-1}$  em *P. alata* e  $8,87 \mu\text{M L}^{-1}$  em *P. cristalina* e *P. foetida*.

Em meio suplementado com TDZ, a concentração de 3,48  $\mu\text{M L}^{-1}$  apresentou maior porcentagem de explantes com resposta morfogênica para *P. alata*, *P. capparidifolia* e *P. nitida*. Em *P. cristalina* a maior porcentagem foi observada em 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  e em *P. foetida* na concentração de 2,27  $\mu\text{M L}^{-1}$ . A maior média de brotos observadas em *P. capparidifolia* 30 e 60 dias de cultivo e em *P. nitida*, foi na concentração de 3,48  $\mu\text{M L}^{-1}$ , já aos 60 dias a maior média de brotos para *P. nitida* na concentração de 6,81  $\mu\text{M L}^{-1}$ . A maior média de plantas regeneradas foi observada nas concentrações de 2,27  $\mu\text{M L}^{-1}$  para *P. cristalina*, 4,54  $\mu\text{M L}^{-1}$  para *P. capparidifolia*, 6,81  $\mu\text{M L}^{-1}$  para *P. alata* e *P. foetida*. Em *P. nitida* não foram observadas plantas regeneradas.

Brotações adventícias também foram observadas no tratamento controle das espécies *P. alata*, *P. cristalina* e *P. foetida*. Segundo Hisano et al., (2016), a formação de brotações em tratamentos sem a dição de reguladores de crescimento ocorre devido aos hormônios endógenos, que interferem de forma direta na morfogênese in vitro, no entanto, os níveis desses hormônios na sua maioria presentes nos explantes são desconhecidos.

Na literatura, há relatos de regeneração in vitro a partir de diversos tipos de explantes, para estas espécies de *Passiflora* spp. (Mohamed et al., 1996; Guzzo et al., 2004; Pinto et al., 2010; Anand et al., 2012; Pacheco et al., 2012; Ragavendran et al., 2012; Shekhawat et al., 2015; Faria et al., 2018), entretanto, este é o primeiro relato do cultivo in vitro da espécie *P. capparidifolia*. O uso do embrião zigótico como fonte de explante demonstrou responsividade na aquisição de competência e na determinação de células pluripotentes para a formação de brotações adventícias nas cinco espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental, e os PGRs BA e TDZ nas diferentes concentrações induziram o desenvolvimento e a diferenciação de maior frequência de brotações adventícias por explante.

## 5. CONCLUSÕES

A regeneração in vitro por meio de embrião zigótico ocorreu de forma direta entre as espécies e também de forma indireta para *P. capparidifolia*. Os PGRs BA e TDZ foram os reguladores de maiores respostas organogênicas, evidenciando o potencial de regeneração a partir de embriões zigóticos de *P. alata*, *P. cristalina*, *P.*

*foetida* e *P. nitida*. No entanto, faz-se necessário à otimização no protocolo de organogênese para *P. capparidifolia* devido ao baixo desenvolvimento de brotações e plantas regeneradas e para *P. nitida* devido ao reduzido número de brotações adventícias produzidas e a conversão em plantas completas. Entretanto, os embriões zigóticos nestas condições de cultivo é uma alternativa para o estabelecimento de um sistema de regeneração pela via organogênicas para as cinco espécies de *Passiflora* spp. com potencial ornamental.

## 6. 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.

ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**. 22: 87-91, 2012.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 2, abril, 2018.

BRAGLIA, L.; DE BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; BIANCHINI, A.; PIPINO, L.; MERCURIA, A. In vitro plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**. 855:47-52, 2010.

CARVALHO, P. P.; ANTONIAZZI, C. A.; SILVA, N. T.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; CARVALHO, M. L. S. Regeneração in vitro de *Passiflora miniata* Mast. **Ornamental Horticulture**. 23:88-95, 2017.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant Protoplasts: Isolation, Culture and Plant Regeneration. **Plant Cell Culture: Essential Methods**. p. 153-173, 2010.

DE KLERK, G. J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K. H. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biology Plantarum**. 39:53-66, 1997.

DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R. S. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**. 16: 597–606. 2011.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Ectopic expression of the *Brassica* SHOOT MERISTEMLESS attenuates the deleterious effects of the auxin transport inhibitor TIBA on somatic embryo number and morphology. **Plant Science**. 180: 383-390, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. **The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture**. Embrapa Technological Information: Brasília, DF. p. 101-106, 2009.

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 54:1-9, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35: 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M. A.; PAIVA, R.; SOUZA, A. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. Indução in vitro de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**. 5:288-290, 2007.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 106:47–54, 2011.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDRETTA, F.; LEVI, M. In vitro culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**. 61:108-113, 2004.

HISANO, H.; MATSUURA, T.; MORI, I. C.; YAMANE, M.; SATO, K. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley. **Plant Physiology and Biochemistry**. 99:66-72, 2016.

IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **The Company of Biologists**. 143:1442-1451, 2016.

LUDFORD, P. M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P.J. (Ed.) **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer, Academic Publishers. p. 725-750, 1995.

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T. Blakesley, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 46: 161-164, 1996.

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

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 (*Passifloras* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O.S.; SHARMA, M. P. (eds.) **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi; Narosa Publishing House. p.1-17, 2013.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23:937-947, 2013.

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.

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 genético**. p. 361-383, 2005.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.457–463. 2005.

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

RAGAVENDRAN, c.; KAMALANATHAN, D.; REENA, G.; NATARAJAN, D. In vitro propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. **Asian Journal of Plant Science and Research**. 2: 707-711, 2012.

REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI E. R. G.; OTONI, W. C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis 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.

ROSA, Y. B. C. J.; BELLO, C. C. M.; DORNELAS, M. C. In vitro organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 52:64-71, 2016.

SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C.P. In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 13:209-214, 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 and Organ Culture**. 99:47–54, 2009.

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.

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 14:138-142, 2012.

SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**. 2:61–64, 1999.

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.; SILVA, L. C.; 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.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**. 108: 1-33, 2014.

ZERBINI, F. M.; OTONI, W. C.; VIEIRA, M. L. C. Passionfruit. In: Kole C and Hall TC (eds.) A Compendium of Transgenic Crop Plants. **Tropical and Subtropical Fruit and Nuts**. 1sted. **John Wiley & Sons**. p. 213-234. 2008.

### CAPÍTULO III

---

#### **Produção direta de plantas triploides de *Passiflora foetida* L. a partir do cultivo in vitro de endospermas: Aspectos estruturais, histoquímicos e avaliação da estabilidade genética**

##### **RESUMO**

O trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo in vitro de alta responsividade a partir do endosperma para a produção de plantas triploides, descrição dos aspectos estruturais, identificação dos compostos de reserva mobilizados durante o desenvolvimento das brotações adventícias e a estabilidade genética em plantas triploides de *Passiflora foetida*. Os endospermas foram cultivados em meio de MS, suplementado com as citocininas 6-Benziladenina (BA), Thiadizuron (TDZ) e Cinetina (CIN). O delineamento experimental utilizado foi o DIC e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a ( $p \leq 0.05$ ). As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro com três repetições e 10 explantes por placa de Petri. Para a caracterização estrutural e as análises histoquímicas, os endospermas cultivados em meio de regeneração foram coletados aos 0, 3, 10 15 e 20 dias de cultivo. O conteúdo de DNA nuclear foi determinado através das análises de citometria de fluxo. A maior média de brotos adventícios produzidos foi observada na concentração de 9,08  $\mu\text{M}^{-1}$  de TDZ, com 40,0 aos 30 dias e 68,2 brotos/explante aos 60 dias de cultivo e, média de 12 plantas regeneradas por explante. Aos 20 dias de cultivo in vitro, na análise estrutural, pode-se evidenciar o comportamento do tecido endospermico no processo de desenvolvimento das brotações adventícias. Os testes histoquímicos mostram a presença de corpos proteicos em constante mobilização durante a morfogênese in vitro e grão de amido presentes após cinco dias de cultivo. A planta triploide cultivada em casa de vegetação apresentou, aparentemente, maior vigor vegetativo e folhas e flores comparadas com as da planta obtida pela via seminífera. Planta triploide de *P. foetida* apresentou o desenvolvimento das brácteas com a presença e ausência de frutos, entretanto, sementes não foram produzidas. Os resultados da citometria de fluxo confirmaram a triploidia das plantas regeneradas a partir do endosperma e a estabilidade genética da fonte de explante.

**Palavras-chave:** Endosperma; *Passiflora* ornamental; Plantas 3n.

**Direct production of triploid plants of *Passiflora foetida* L. from the in vitro culture of endosperms: Structural, histochemical aspects and evaluation of genetic stability**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to establish an in vitro protocol of high responsivity from the endosperm for the production of triploid plants, description of the structural aspects, identification of the reserve compounds mobilized during the development of adventitious shoots and genetic stability in triploid plants of *Passiflora foetida*. The endosperms were cultured in MS medium supplemented with the cytokinins 6-Benzyladenine (BA), Thiadiazuron (TDZ) and Kinetin (KIN). The experimental design was DIC and the means compared by the Scott Knott test ( $p \leq 0.05$ ). Evaluations were performed at 30 and 60 days of in vitro culture with three replicates and 10 explants per Petri dish. For structural characterization and histochemical analyzes, the endosperms cultured in regeneration medium were collected at 0, 3, 10 15 and 20 days of culture. Nuclear DNA content was determined by flow cytometric analysis. The highest average of adventitious shoots was observed at the concentration of 9.08  $\mu\text{M}$  TDZ, with 40.0 at 30 days and 68.2 shoots / explant at 60 days of cultivation and, on average, 12 plants regenerated per explant. In the structural analysis the behavior of the endospermic tissue in the process of development of the adventitious shoots can be evidenced, at the 20 days of culture in vitro. The histochemical tests evidenced the presence of protein bodies in constant mobilization during in vitro morphogenesis and starch grain present after 5 days of culture. The triploid plant cultivated in a greenhouse showed, apparently, greater vegetative vigor and larger leaves and flowers compared to those of the seminiferous germinated plant. Triploid plant of *P. foetida* presented the development of bracts with the presence and absence of fruits, however, seeds are not produced. The results of flow cytometry confirmed the triploidy of the regenerated plants from the endosperm and the genetic stability of the explant source.

**Keywords:** Endosperm; *Passiflora* ornamental; Plants 3.

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas triploides podem ser produzidas via seleção natural, hibridização sexual, fusão de protoplasto e a partir do cultivo in vitro do endosperma (Wang et al. 2016). O endosperma nas angiospermas é naturalmente triploide e a cultura in vitro de explantes endospérmicos têm sido aplicada como um método direto para produzir plantas triploides, embora para muitas espécies vegetais a regeneração a partir do endosperma ainda é desafiadora (Góraslki et al., 2005; Thomas e Chaturvedi, 2008).

O uso do endosperma como fonte de explante para a regeneração in vitro de plantas foi primeiramente descrito para *Santalum album* e *Ricinus communis*, no qual Johri e Bhojwani (1965) relataram a regeneração via organogênese. Atualmente, a produção de plantas triploides, via o cultivo in vitro, constitui uma abordagem moderna da biotecnologia em relação ao melhoramento convencional, para as culturas agronômicas com potencial econômico (Wang et al., 2016).

A vantagem de plantas poliploides em comparação com seus respectivos diploides é a produção de características agronomicamente desejáveis. Dentre estas características destacam-se a maior espessura e tamanho das folhas, conseqüentemente aumentam a produção de biomassa e a taxa fotossintética. Suas flores ou frutos são maiores, o que torna as plantas triploides viáveis para a comercialização (Góralski et al., 2005; Hoshino et al., 2011; Wang et al., 2016). Entretanto, um dos problemas para culturas que são reproduzidas estritamente a partir de sementes, é que em geral plantas triploides são estéreis (Thomas e Chaves, 2008).

Em *Passiflora* o cultivo de endosperma foi primeiramente realizado por Mohamed et al. (1996), a fim de obter plantas triploides de *P. foetida*. Os autores reportaram sucesso na regeneração de plantas triploides, através da organogênese. Porém, o protocolo estabelecido produziu reduzido número de brotações. Atualmente, Faria et al. (2018) relataram a alta responsividade no sistema de regeneração a partir da organogênese utilizando-se do endosperma como fonte de explante, este é o caso de *P. cristalina*. Antoniazzi (2018), no cultivo de endosperma da principal espécie comercializada de maracujazeiro, *P. edulis*, também estabeleceu protocolo para regeneração e obtenção de plantas completas, através

de análise de citometria de fluxo comprovaram a estabilidade do nível cromossômico  $3n$ , comparados com plantas de origem seminífera, os seus respectivos diplóides.

No presente estudo, foi reportada a alta responsividade do endosperma na regeneração pela via organogênica de plantas triploides da espécie *P. foetida*, além da descrição dos eventos estruturais envolvidos na formação de brotações adventícias neste tipo de explante. Assim, acredita-se que os resultados apresentados serão aplicáveis para a produção de plantas triploides no estabelecimento de protocolo responsivo e reproduzível de regeneração de espécies de *Passiflora* silvestres.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de *Passiflora foetida* foram obtidas de frutos coletados na região médio norte do estado de Mato Grosso, Brasil.

Após a secagem ao ar livre, as sementes foram imersas em dióxido de cloro a 1% por 5 minutos. Posteriormente, os tegumentos das sementes foram removidos com auxílio de mini morsa (Reis et al., 2007). Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em imersão em álcool 70% (v/v), por 3 minutos, seguido pela imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) durante 30 minutos e com o acréscimo de 3 gotas de Tween-20<sup>o</sup>. Em seguida, foram submetidas a quatro enxágues em água destilada e autoclavada. As sementes foram mantidas em overnighnt em água destilada e autoclavada para facilitar a remoção dos endospermas. Os embriões zigóticos foram retirados e os endospermas isolados.

Os endospermas isolados foram cultivados em placas de Petri de poliestireno 90 x 15 mm contendo 30 mL do meio de indução composto por sais básicos de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Acumedia®, MI), mio inositol 0,01% (p/v), sacarose 3% (p/v) e 0,8% de ágar (p/v) como agente gelificante, acrescido de diferentes concentrações de reguladores de crescimento citocínicos: Benziladenina (BA) 2,21; 3,32; 4,43; 6,65 e 8,87  $\mu\text{M}$ ; Tiadizuron (TDZ) 2,27; 3,48; 4,54; 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$  e Cinetina (CIN) 2,32; 3,40; 4,64; 6,97; 9,29  $\mu\text{M}$  e como controle na ausência dos reguladores de crescimento.

O pH foi ajustado em  $\pm 5,7$  e o meio de cultura foi autoclavado durante 15 minutos a 121 °C a uma pressão de 1,1 atm. Os explantes foram cultivados em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de irradiância providas de lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil), e temperatura de  $26 \pm 2$  °C durante 60 dias.

## **2.2 Caracterização estrutural e mobilização de compostos de reserva**

Endospermas de *P. foetida* cultivados em meio de indução da organogênese foram coletados aos 0, 3, 10 15 e 20 dias de cultivo para a caracterização estrutural no decorrer do desenvolvimento das brotações adventícias e para as análises histoquímicas. Os explantes foram coletados e fixados na solução de paraformaldeído (4% p/v) e pH 7,0. Após a fixação, as amostras foram desidratadas através de uma série de etanol graduada e incorporada em resina acrílica (HistoResin, Leica®, Wehrheim, Alemanha). Secções longitudinais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura, foram obtidas usando um micrótomo rotativo motorizado (Leica®, RM 2235) e corados com azul de toluidina (O'Brien et al., 1981).

Testes histoquímicos foram realizados com Xylidine Ponceau XP (Vidal, 1970) para a detecção de proteínas totais e Lugol (Johansen, 1940) para a detecção de grânulos de amido. As imagens foram capturadas sob um microscópio de luz (Leica®, DM750) equipado com uma câmera digital (Leica®, ICC50 HD).

## **2.3 Conversão das plantas e aclimatização**

Após 90 dias de cultivo em meio de indução, os brotos regenerados foram transferidos para frascos de cultura contendo meio MS $\frac{1}{2}$  na metade das concentrações de sais básicos, mio-inositol (0,01% p/v), sacarose (3% p/v) e ágar (0,8% p/v). As culturas foram mantidas sob luminosidade, temperatura e condições de crescimento anteriormente descritas.

Após o enraizamento, mudas de aproximadamente 7 cm de comprimento foram removidas dos frascos de cultura, lavadas para a retirada do excesso de meio de cultura e depois transferidas para copos de plásticos de 300 mL, contendo substrato comercial (Plantmax®, Tropstrato, Brasil). As plantas foram aclimatizadas sob condições de laboratório por 15 dias e, em seguida foram transferidas para casa

de vegetação. Após sete dias, as plantas sobreviventes foram consideradas aclimatizadas.

## 2.4 Determinação do conteúdo de DNA

Para determinar o conteúdo de DNA através da citometria de fluxo, amostras dos explantes endospermicos, plantas germinadas in vitro pela via seminífera como controle, plantas de origem a partir do endosperma de *P. foetida* e como padrão a espécie *Pisum sativum* L. cv. "Citrad" foram analisadas. Fragmentos foliares de aproximadamente 25 mg de três plantas de cada amostra foram maceradas em cadinho contendo 1 mL de tampão LB01 gelado, usando lâmina de bisturi para liberação dos núcleos na suspensão (Dolezel et al. 1989). As amostras foram maceradas juntamente com o padrão interno *Pisum sativum*, 2C DNA = 9,09 pg (Dolezel et al. 2007).

Os núcleos foram filtrados em membrana de nylon com mesh de 50 µm e corados usando 30 µL de uma solução de iodeto de propídeo (PI, Sigma, USA) preparado 1 mg mL<sup>-1</sup> em cada amostra. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCantoII™ (Becton, Dickinson and Company, USA). Os histogramas e as avaliações estatísticas foram obtidos utilizando o software Flowing, versão 2.5.1. O conteúdo 2C de DNA em picogramas (pg) foi estimado de acordo com a seguinte fórmula:

*Sample (2C DNA)*

$$\frac{G1 \text{ peak channel of sample} \times 9.09 \text{ (} P. \text{ sativum DNA content)}}{G1 \text{ peak channel of } P. \text{ sativum}}$$

De acordo com Dolezel et al. (1997), a acurácia das medições foi assegurada quando os coeficientes de variação apresentaram valores inferiores a 5%.

## 2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), contendo 16 tratamentos entre as diferentes concentrações de BA, TDZ, CIN e o controle, com 3 repetições e 10 explantes por repetição. As características avaliadas foram à porcentagem de explantes com resposta, número de brotações por explante aos 30

e 60 dias de cultivo e o número de plantas regeneradas por explante aos 90 dias de cultivo in vitro.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott a ( $p \leq 0.05$ ) de probabilidade utilizando o software Sisvar®, Versão 5.6 (Ferreira, 2011).

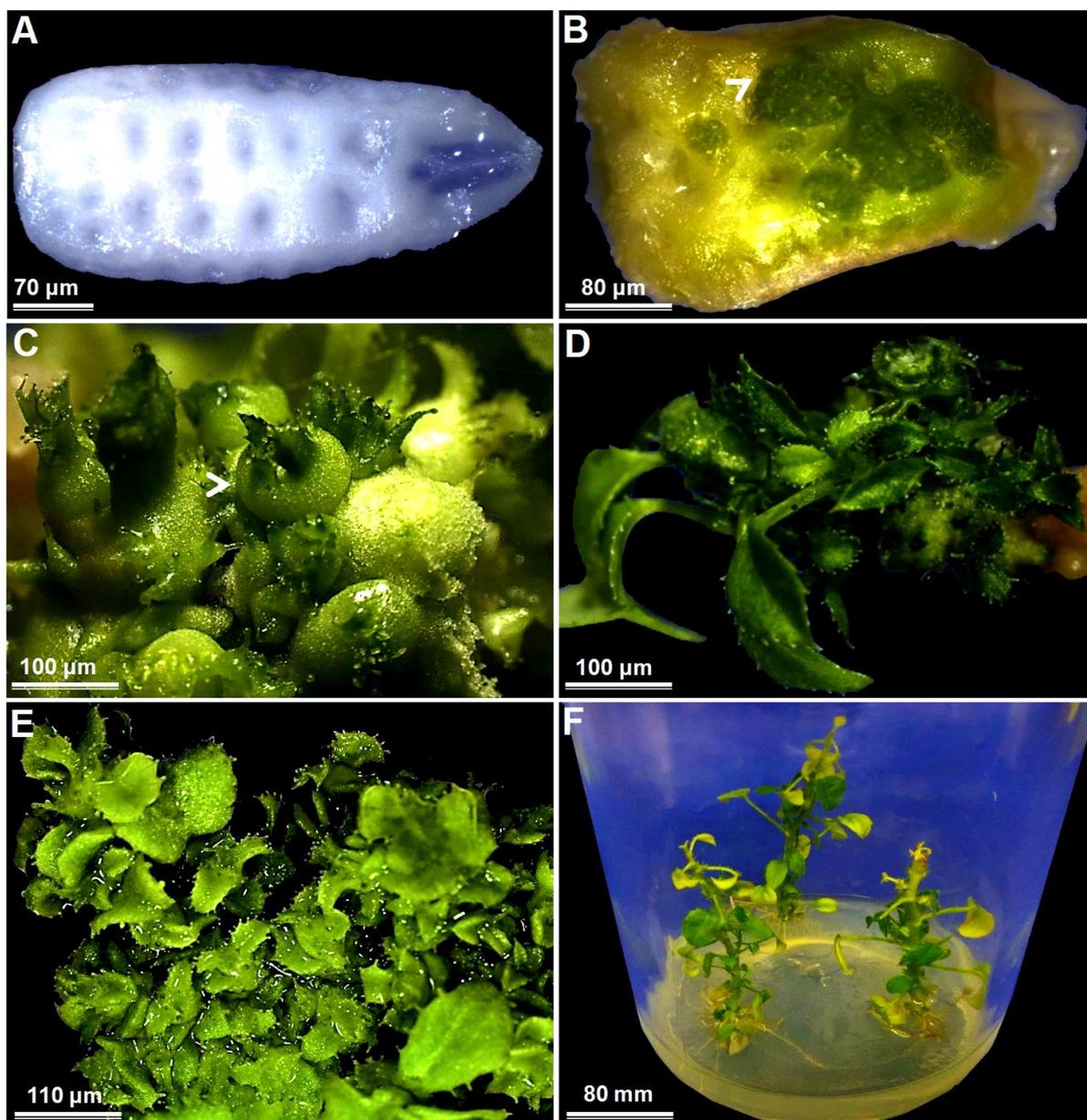
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 As citocininas (BA, TDZ, CIN) induzem a formação de brotações adventícias em explantes endospermicos de *P. foetida*

Aos 10 dias de cultivo in vitro observou-se o início do desenvolvimento de pequenas estruturas potencialmente organogênicas de coloração verde escuro (Figura 1B). Já aos 20 dias de cultivo in vitro essas estruturas diferenciaram-se em brotações adventícias em desenvolvimento distribuídas por todo o explante (Figura 1C). Aos 30 dias de cultivo ocorreu proliferação das gemas adventícias e o desenvolvimento dos primórdios foliares (Figura 1D). Aos 60 dias intensa proliferação das multibrotações foram observadas (Figura 1E).

A maior taxa de explantes com resposta foi de 27% observada na concentração de 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ, diferindo significativamente dos demais tratamentos. No entanto, a maior média de brotações foi observada no tratamento suplementado com 9,08  $\mu\text{M}$  com 40,0 e 68,2 brotos por explante aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro, respectivamente, diferindo significativamente dos demais tratamentos, como descrito na Tabela 1.

Os tratamentos suplementados com BA apresentaram respostas morfogênicas em todas as concentrações utilizadas, sendo a concentração de 6,35  $\mu\text{M}$  a que induziu o desenvolvimento de maior número médio de brotações aos 30 dias de cultivo com 12 brotos por explante, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Já aos 60 dias a maior média foi de 19 brotos por explante no tratamento suplementado com 8,87  $\mu\text{M}$ , não diferindo significativamente do tratamento suplementado com 6,97  $\mu\text{M}$  de CIN com 19,5 brotos. Os tratamentos suplementados com baixas concentrações de CIN não apresentaram respostas morfogênicas, conforme observado na (Tabela 1).



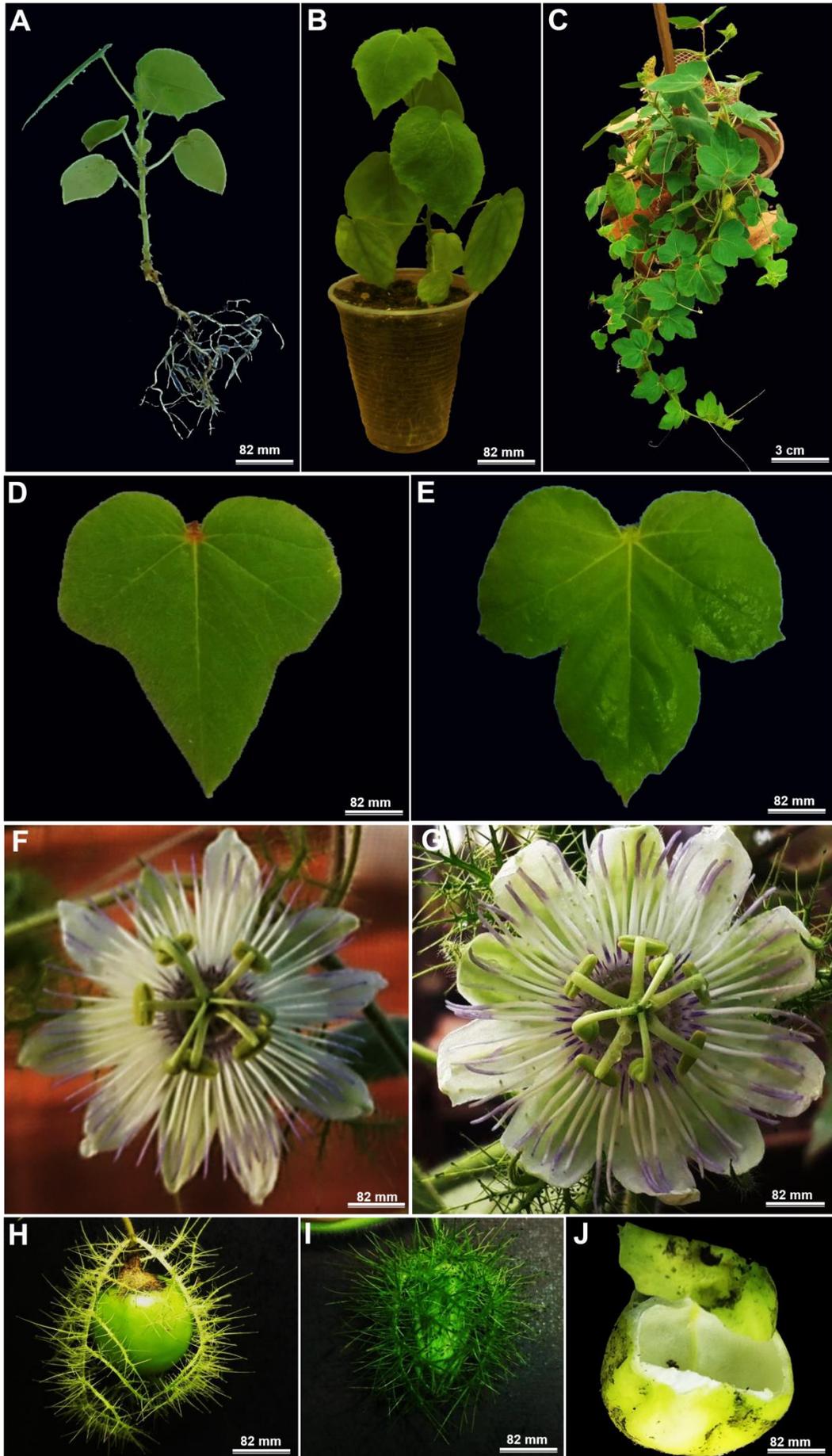
**Figura 1:** Sistema de regeneração na produção de plantas in vitro a partir da organogênese utilizando-se do endosperma como fonte de explante em *Passiflora foetida*. (A) Fonte de explante (endosperma); (B) Formação de estruturas organogênicas aos 10 dias de cultivo in vitro; (C) Explante com 20 dias de cultivo apresentando desenvolvimento de brotos em diferenciação (seta); (D) Multibrotações aos 30 dias de cultivo; (E) Alta responsividade no desenvolvimento de brotações adventícias aos 60 dias de cultivo; (F) Plântulas regeneradas e cultivadas em meio de MS $\frac{1}{2}$ .

As brotações adventícias isoladas e transferidas para MS $\frac{1}{2}$  na ausência de reguladores de crescimento após 30 dias de cultivo in vitro, apresentaram desenvolvimento normal e conversão em plântulas completas, conforme a Figura 1F.

**Tabela 1:** Avaliação da regeneração in vitro pela via organogênica a partir de endospermas como fonte de explante em *Passiflora foetida*.

Tratamentos	$\mu\text{M}$	(% ) Explantes com respostas morfológicas		No. médio de brotações adventícias por explante		No. médio de plantas regeneradas por explante
		30	60	30	60	90
Controle	0,0	0,0c	0,0c	0,0i	0,0j	0,0e
BA	2,21	17,0b	17,0b	7,8 $\pm$ 0,8f	12,4 $\pm$ 0,5g	5,0 $\pm$ 0,8d
	3,32	10,0b	13,0b	9,0 $\pm$ 0,0e	12,0 $\pm$ 0,8g	8,0 $\pm$ 1,4c
	4,43	10,0b	13,0b	10,3 $\pm$ 0,5d	17,7 $\pm$ 0,9e	10,0 $\pm$ 1,1b
	6,35	7,0c	7,0c	12,0 $\pm$ 0,0c	15,5 $\pm$ 0,7f	0,0e
	8,87	7,0c	7,0c	10,5 $\pm$ 0,7d	19,0 $\pm$ 1,4d	6,6 $\pm$ 1,0c
TDZ	2,27	10,0b	17,0b	21,3 $\pm$ 0,5b	36,6 $\pm$ 1,1b	4,6 $\pm$ 0,5d
	3,48	0,0c	7,0c	0,0i	5,5 $\pm$ 0,7i	0,0e
	4,54	10,0b	17,0b	6,0 $\pm$ 1,0g	28,6 $\pm$ 1,5c	7,6 $\pm$ 1,1d
	6,81	27,0a	27,0a	12,5 $\pm$ 1,4c	17,6 $\pm$ 0,5e	10,3 $\pm$ 0,5b
	9,08	13,0b	13,0b	40,0 $\pm$ 0,8a	68,2 $\pm$ 2,0a	12,0 $\pm$ 0,8a
CIN	2,32	0,0c	0,0c	0,0i	0,0j	0,0e
	3,40	0,0c	0,0c	0,0i	0,0j	0,0e
	4,64	0,0c	7,0c	0,0i	8,0 $\pm$ 1,4h	7,0 $\pm$ 1,4c
	6,97	7,0c	7,0c	10,5 $\pm$ 0,7d	19,5 $\pm$ 0,7d	6,5 $\pm$ 0,7c
	9,29	7,0c	7,0c	2,0 $\pm$ 0,0h	6,5 $\pm$ 0,7i	0,0e
C. V. (%)		48,1	54,9	13,5	5,3	14,4

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 2:** Plantas cultivadas em casa de vegetação de origem seminífera e regeneradas a partir do endosperma de *P. foetida*. (A) Planta completa de *P. foetida* regenerada a partir de endosperma após 90 dias de cultivo in vitro; (B) Planta após 20 dias de aclimatização; (C) Planta adulta de *P. foetida* após 90 dias de cultivo em casa de vegetação; Estruturas vegetativas das plantas após 120 dias de cultivo (D, E, F, G, H, e I); (D) Folha do terceiro nó de planta regenerada pela via seminífera;; (E) Folha do terceiro nó de planta regenerada a partir de endosperma; (F) Flor da planta germinada a partir de semente; (G) Flor da planta de origem a partir do endosperma; (H) Fruto da planta germinada com a presença de bráctea em tamanho reduzido e a presença de tricomas glandulares; (I) Brácteas maiores e a presença de numerosos tricomas glandulares em plantas de origem a partir do endosperma; (J) Fruto da planta regenerada a partir do endosperma, apresentando ausência de semente.

Para a variável plantas regeneradas, a maior média foi de 12 plantas por explante, observada no tratamento suplementado com  $9,08 \mu\text{M L}^{-1}$  de TDZ, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Nos tratamentos suplementados com BA, a maior média de plantas regeneradas foi de 10,3 plantas na concentração de  $6,81 \mu\text{M L}^{-1}$  não diferindo significativamente de  $4,43 \mu\text{M L}^{-1}$  de TDZ, com média 10,0 plantas por explante.

Nos tratamentos com CIN, apenas as concentrações de  $4,64$  e  $6,97 \mu\text{M L}^{-1}$  apresentaram desenvolvimento de plantas com média de 7,0 e 6,5 plantas por explante respectivamente, não diferindo significativamente (Tabela 1).

As plantas completas regeneradas a partir de endosperma (Figura 2A), após 15 dias de aclimatização em condições de laboratório, foram cultivadas em casa de vegetação (Figura 2B, C) e após 15 dias consideradas aclimatizadas.

### 3.2 Aspectos estruturais

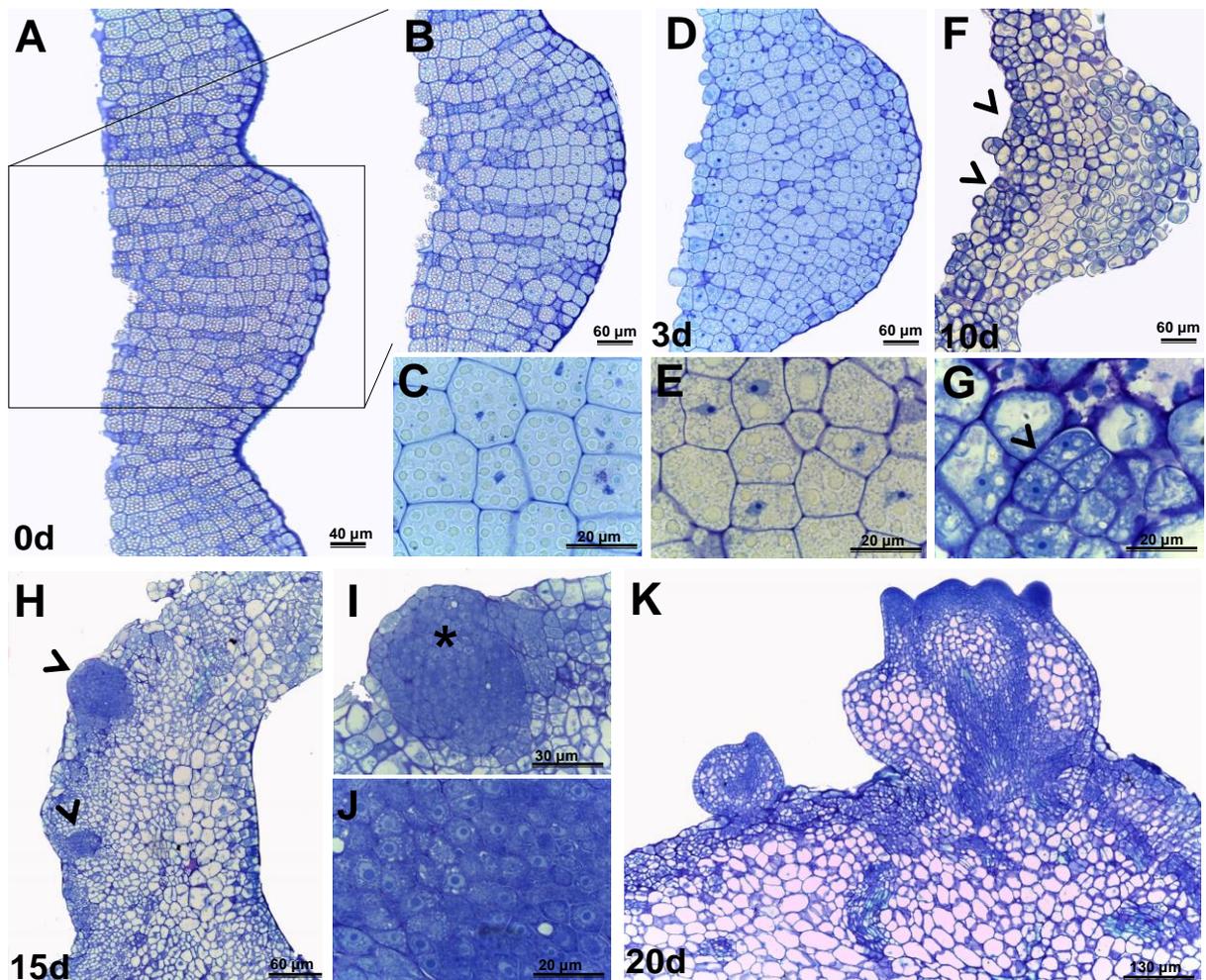
Tecidos endospermicos cultivados em  $9,08 \mu\text{M}$  de TDZ foram submetidos à análise anatômica a fim de compreender a origem e o desenvolvimento das brotações adventícias (Fig. 3).

Como fonte de explante o endosperma apresenta células uniformemente organizadas (Figura 3A), paredes finas (Figura 3B) e citoplasma denso com distribuição abundante de compostos de reserva (Figura 3C). Aos três dias de cultivo in vitro, já pode-se observar o intumescimento do explante e a proliferação celular (Figura 3D). Neste estágio de desenvolvimento, os núcleos celulares são volumosos e os nucléolos evidentes (Figura 3E).

As divisões celulares iniciaram-se na região interna do explante (Figura 3F), com divisões anticlinais e periclinais (Figura 3G). Com a intensificação das divisões celulares, foram formadas protuberâncias apresentando células mais compactadas

na região do tecido parenquimático e naquelas mais periféricas ao explante. O aglomerado celular de aspecto compacto é denominado de meristemóides, distribuídos na região interna do explante inicial (Figura 3H). Os meristemóides apresentam clusters de células meristemáticas em constante divisão mitótica (Figura 3I), suas células são de formato pequeno e isodiamétricas, núcleo proeminente e nucléolos maiores (Figura 3J).

Aos 20 dias de cultivo *in vitro*, os meristemóides diferenciaram-se em gemas adventícias, apresentando a formação do procâmbio conectado ao tecido do explante com a presença dos primórdios foliares e o domo apical evidentes (Figura 3K). A caracterização estrutural confirma o desenvolvimento direto de brotações adventícias de origem a partir do tecido endospermico de *Passiflora foetida*.



**Figura 3:** Caracterização estrutural do desenvolvimento de brotações adventícias a partir de endosperma de *P. foetida* em meio de MS suplementado com  $9,08 \mu\text{M L}^{-1}$  de TDZ. (A, B) Células organizadas com paredes finas no explante inicial; (C) Células apresentando nucléolos proeminentes; (D) Proliferação celular; (E) Presença de vacúolo no citoplasma; (F) Início das divisões celulares na região adaxial do explante; (G) Divisões celulares no plano periclinal (seta); (H) Formação dos meristemóides (setas) após 15 dias de cultivo; (I) Meristemóide com células em constante divisão

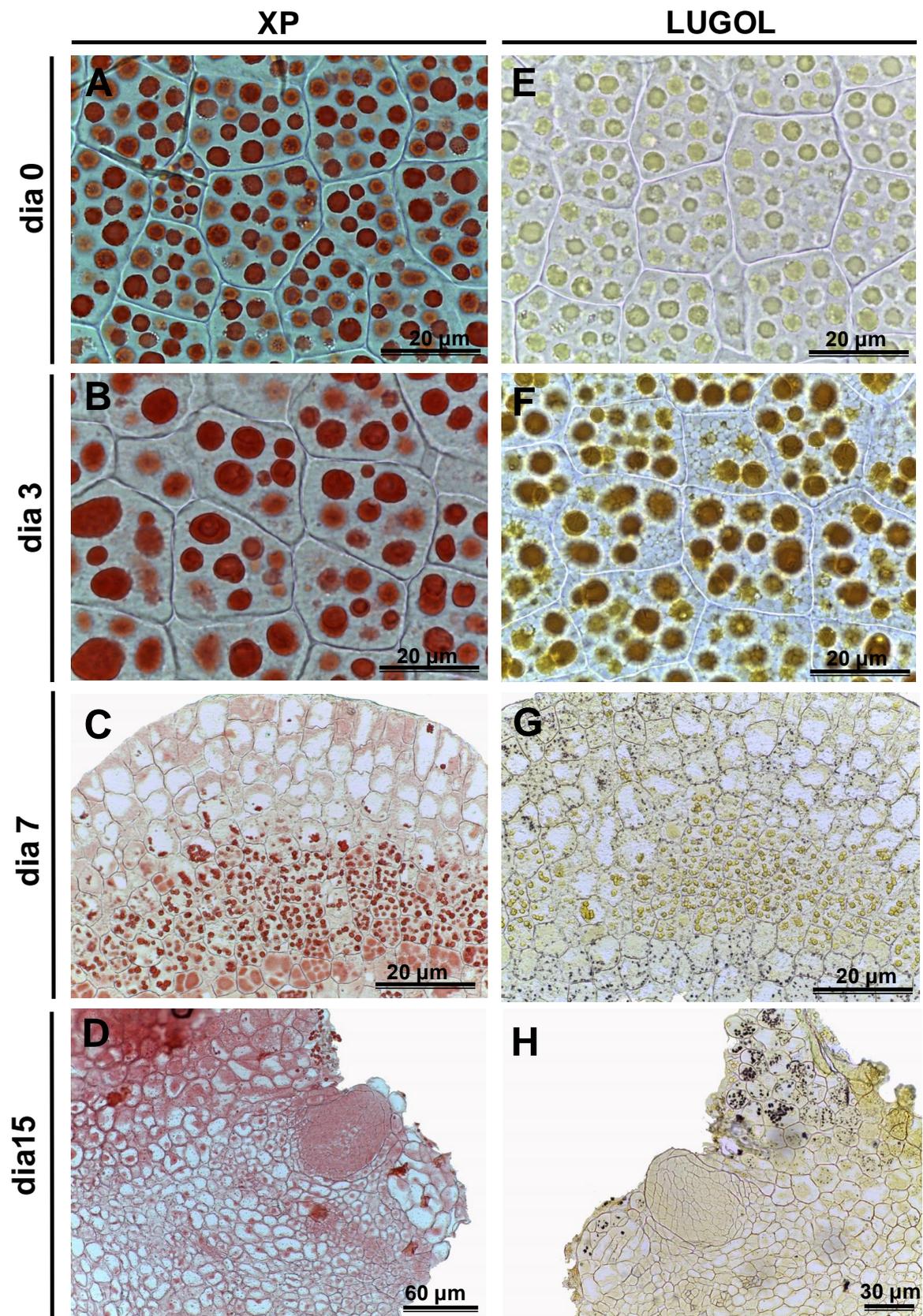
mitótica; (J) Meristemóides apresentando células isodiamétricas com núcleo evidente; (K) Diferenciação dos meristemóides em gemas adventícias após 20 dias de cultivo in vitro.

### **3.3 Identificação e mobilização de compostos de reserva**

Testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos de reserva nas células protodérmicas no tecido endospermico de *P. foetida*. A reação positiva de Xylidine Pounceau (XP) evidenciou a presença de corpos protéicos de formato arredondado e pouca variação de tamanho, abundantemente distribuídos nas células do tecido endospermico (Figura 4A). Após 3 dias de cultivo in vitro foi possível observar a redução do número de corpos proteicos, entretanto, nota-se o aumento no tamanho dos corpos (Figura 4B).

Os corpos proteicos apresentaram redução gradual durante o processo de desenvolvimento das brotações adventícias (Figura 4C), com alguns corpos na região periférica do explante aos 15 dias de cultivo, onde as células já se encontravam em diferenciação e formação dos meristemóides, o que demonstram a utilização desse composto de reserva durante a proliferação celular (Figura 4D).

Grãos de amido não foram identificados nos estágios iniciais do desenvolvimento das brotações adventícias a partir dos endospermas (Figura 4 E, F). A identificação de amido ocorreu no sétimo dia de cultivo, no entanto, os grãos não estavam distribuídos uniformemente em todas as células. Após 15 dias de cultivo observou-se a redução dos grãos de amido, permanecendo em algumas células do tecido parenquimático que não persistiram envolvidas no processo de desenvolvimento das brotações adventícias.



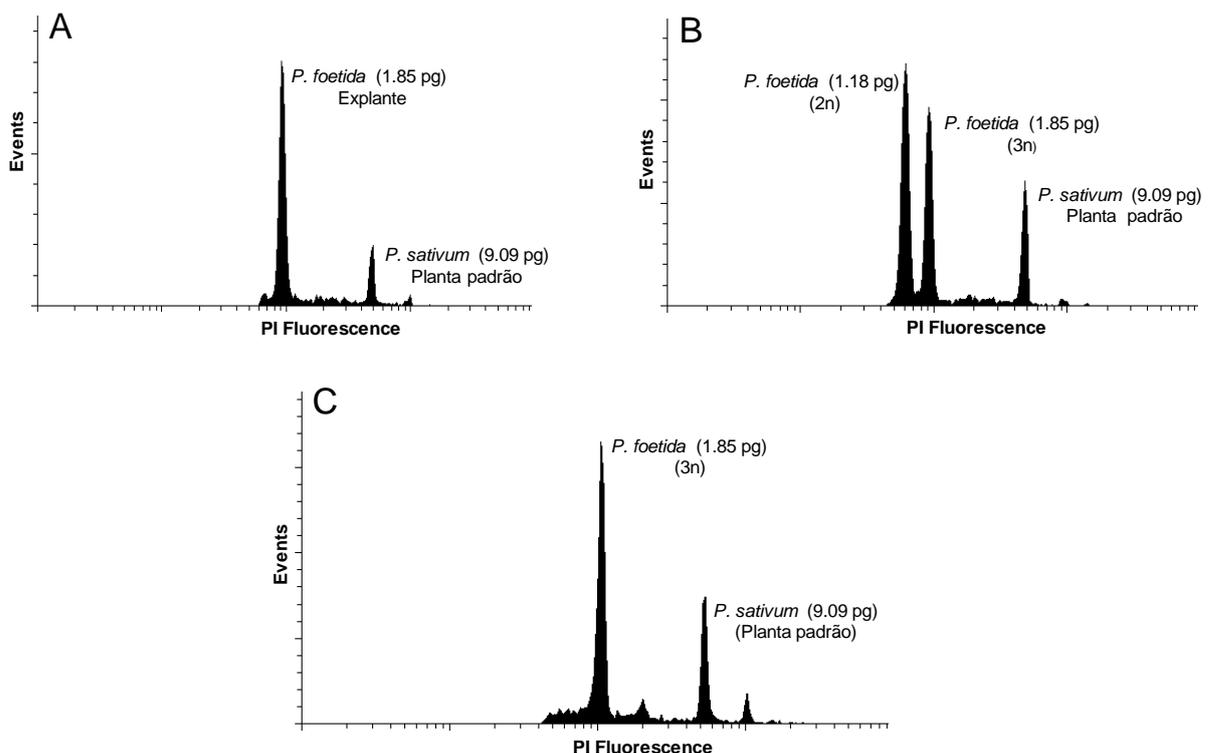
**Figura 3:** Análise histoquímica em explantes endospermico de *P. foetida* cultivados em meio MS acrescido de  $9,08 \mu\text{M L}^{-1}$  de TDZ durante a organogênese in vitro. (A, B) Reação positiva de XP, apresentando a abundância de corpos proteicos nas células parenquimáticas do endosperma; (C) Corpos proteicos apresentando gradual redução; (D) Formação do meristemóide e redução dos corpos proteicos; (E, F) Ausência de grão de amido nos estágios iniciais; (G) Grãos de

amido em explantes com sete dias de cultivo; (H) Presença de grão de amido em células não envolvidas na morfogênese in vitro.

### 3.4 Estabilidade genética no conteúdo de DNA de plantas regeneradas a partir de tecido endospermico

As análises de citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear confirmaram a triploidia das plantas regeneradas a partir do tecido endospermico. Os histogramas apresentam a quantidade do conteúdo DNA nuclear de 1,85 pg para o explante endospermico utilizado como fonte de explante para a regeneração in vitro de plantas de *Passiflora foetida* e o padrão interno da espécie *Pisum sativum* com conteúdo de DNA de 9,09 pg (Figura 5A).

O histograma (Figura 5B) determina o conteúdo de DNA nuclear de plantas controles de *P. foetida* germinadas in vitro via seminífera, apresentando conteúdo de DNA de 1,18 pg. No segundo pico do histograma observa-se que as plantas regeneradas a partir do tecido endospermico permanecem com o conteúdo de DNA nuclear de 1,85 pg, confirmando a estabilidade genética das plantas (3n) de acordo com o tecido de origem, ou seja, o endosperma, e no terceiro pico *P. sativum* como padrão interno. Na Figura 5C evidencia-se o conteúdo de DNA de plantas (3n) em comparação com o padrão interno.



**Figura 5:** Estimativa do nível de ploidia de plantas de *P. foetida*, por meio da análise de DNA nuclear em citometria de fluxo. (A) Histogramas que comparam o DNA nuclear do explante de endosperma de *P. foetida* e da planta padrão de *P. sativum*. (B) DNA nuclear da planta germinada por semente, das plantas regeneradas a partir de endosperma e da planta padrão. (C) Histogramas com o conteúdo de DNA nuclear das plantas regeneradas de endosperma e da planta padrão.

Os coeficientes de variação nas análises das amostras obtidos foram de 4,28% para a fonte de explante o tecido endospermico, já para as plantas de origem seminífera foi de 3,90%, plantas regeneradas do endosperma e *P. sativum* foi de 3,44%. A Tabela 2 demonstra os picos dos histogramas, os valores obtidos nos conteúdos de DNA e o coeficiente de variação das amostras analisadas por citometria de fluxo.

**Tabela 2:** Nível de ploidia por meio de análise de DNA nuclear em amostras de *P. foetida*

Picos	Amostras	Conteúdo de DNA (pg)	Coefficiente de variação
1	Endosperma	1,85	4,28%.
2	Planta de origem seminífera	1,18	3,90%
3	Planta regenerada do endosperma	1,85	3,44%
4	Planta padrão <i>P. sativum</i>	9,09	3,44%

#### 4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi registrada a regeneração de plantas a partir de endosperma de *P. foetida*, com um alto potencial regenerativo, dependendo do tipo e das concentrações das citocininas utilizadas.

A regeneração *in vitro* a partir de endosperma de sementes de *P. foetida* foi relatada por Mohamed et al. (1996). Os autores observaram o desenvolvimento das brotações pela via organogênica direta com média de 1,9 brotos por explante em meio suplementado com 2  $\mu\text{M L}^{-1}$  BA e 5  $\mu\text{M L}^{-1}$  ANA. No presente, estudo a menor concentração de BA utilizada foi 2,21  $\mu\text{M}$  apresentado taxas bem mais expressivas de 7,8 e 12,4 brotações por explante. Já em concentrações maiores, o BA apresentou maior número médio de brotações adventícias com 12,0 brotos por

explante na concentração de 6,35  $\mu\text{M L}^{-1}$  aos 30 dias de cultivo e número médio de 19,0 brotos na concentração de 8,87  $\mu\text{M L}^{-1}$  aos 60 dias de cultivo in vitro.

No cultivo in vitro de endosperma de sementes de *Passiflora cristalina*, Faria et al. (2018), relataram o alto potencial organogênico do endosperma, com média de 193 brotos observados em meio suplementado com 8,87  $\mu\text{M L}^{-1}$  BA. No presente estudo, o maior número médio de brotações adventícias obtidas em explantes endospermicos de *P. foetida* foi observada quando cultivados na concentração de 9,08  $\mu\text{M L}^{-1}$  TDZ com médias de 40,0 brotações por explante aos 30 dias de cultivo in vitro e 68,2 aos 60 dias, demonstrando alta responsividade do endosperma como fonte de explante para a produção de brotações adventícias em *P. foetida*.

A eficiência da citocinina TDZ, foi relatada em outros estudos de regeneração in vitro a partir de endosperma nas espécies *Actinidia deliciosa* (Góralski et al., 2005; Popielarska et al., 2006), *Carica papaya* (Sun et al., 2011) e *Passiflora cristalina* (Faria et al., 2018).

O TDZ é uma fenil-ureia, com resposta efetiva na morfogênese in vitro, sendo o regulador mais utilizado na regeneração de explantes de cotilédones maduros e imaturos, sementes e tecidos foliares (Huetteman e Preece, 1993). Apresenta uma grande capacidade de cumprir o papel de citocinina na formação de brotações e de auxina na formação de embriões somáticos, estando envolvido em diferentes respostas morfogenicas (Jones et al., 2007).

O PGR Cinetina também apresentou a formação de brotações adventícias em concentrações maiores, no entanto, as elevadas taxas de brotações obtidas em meio suplementado com TDZ, demonstraram que este regulador de crescimento é o mais responsivo para esta espécie de maracujazeiro silvestre. Segundo Thomas e Chaturverdi (2008) a adição de reguladores de crescimento adequados no meio de cultivo é um fator decisivo para a determinação e desenvolvimento de plantas triploides a partir do endosperma.

Plantas triploides possuem um valor mais agregado para o uso comercial, apresentando características desejáveis que resultam em maior rendimento e maior colheita, incluindo maior vigor, folhas mais largas, grossas e verde escuras, flores e frutos maiores (Wang et al., 2016). No entanto, algumas desvantagens são observadas. Segundo Chaturvedi et al. (2003), as plantas triploides podem ser estéreis de sementes. Entretanto, para a espécie *P. foetida* com o objetivo de sua

utilização como planta ornamental e a possibilidade de clonagem através da cultura de tecidos e/ou por estaquia, está característica somente agrega valor a espécie, a ausência de sementes nos frutos, tendo em vista que a espécie possui alta propagação via semente.

A utilização da cultura de endosperma tornou-se uma importante via para a regeneração de plantas triploides, principalmente para as plantas que apresentam problemas de crescimento in vivo (Chaturvedi et al., 2003). Vários estudos em diferentes espécies já foram relatados, utilizando o endosperma para a obtenção de plantas triploides como no arroz (Bajaj et al.; 1980), *Citrus* sp. (Gmitter et al., 1990), *Acacia nilótica* (Garg et al., 1996), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003), *Actinidia deliciosa* (Góralski et al., 2005), *Lonicera caerulea* (Miyashita et al., 2009), *Carica papaya* (Sun et al., 2011) e *Actinidia kolomikta* (Asakura e Hoshino, 2017).

Segundo Chaturvedi et al. (2003), a produção de plantas triploides a partir do cultivo in vitro de tecidos endospermicos torna-se uma importante abordagem moderna para o melhoramento de plantas, facilitando a produção de plantas triploides, que in vitro são difíceis de serem regeneradas.

Em explantes endospermicos de *P. foetida*, a formação das brotações adventícias ocorreu partir da proliferação de células periféricas subepidérmicas. Células meristemáticas compactadas de formato pequeno, núcleo evidente e em constante divisão mitótica, que constituem a formação dos meristemóides e posteriormente o desenvolvimento das brotações adventícias.

Faria et al. (2018), relatam em explantes de endospermicos de *P. cristalina*, a formação de meristemóides constituídos de pequenas protuberâncias de células meristemáticas, indicam o início da formação de brotações adventícias e o desenvolvimento contínuo dessas estruturas. Segundo Verdeil et al. (2007), o tamanho pequeno, citoplasma denso e a intensa divisão celular observadas nas células dos meristemóides são o marco da competência meristemática.

O desenvolvimento de plantas por meio de explantes de sementes pode estar relacionado aos componentes de reserva. Carboidratos, lipídios e proteínas, sendo principais compostos de reserva das sementes (Tozzi e Takaki, 2011). As proteínas estão envolvidas na regulação da expansão celular e na manutenção de características biofísicas necessárias para a morfogênese in vitro (Jiménez, 2001).

Os compostos de reserva observados no endosperma de *P. foetida* são similares às classes de compostos nos cotilédones de *P. cincinnata* (Tozzi e Takaki 2011; Diego et al. 2012, 2016; Silva et al. 2015). A mobilização dos corpos proteicos ficou evidente durante o desenvolvimento das gemas adventícias. Essa mobilização de corpos proteicos também foram relatadas por Rocha et al. (2012) e Silva et al. (2015), durante o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *P. edulis*.

Grãos de amido foram visíveis após sete dias de cultivo in vitro, no entanto, aos 15 dias observou-se amido apenas em células não envolvidas na morfogênese, evidenciando a degradação desse composto de reserva pelas células meristemáticas. Segundo Fortes e Pais (2000), o acúmulo de grãos de amido pode ser uma característica das células envolvidas no processo morfogênico. Os autores observaram o acúmulo de grãos de amido em células parenquimáticas, após cinco dias de cultivo de explantes internodais de *Humulus lupulus*, observaram que a mobilização desse composto de reserva ocorreu em estruturas nodulares características da organogênica, anterior a conversão das brotações adventícias. A degradação desses compostos de reserva, durante a morfogênese in vitro, confirma a utilização dos mesmos como fonte de energia durante o desenvolvimento das brotações adventícias a partir do endosperma como fonte de explante inicial em *P. foetida*.

A triploidia das plantas obtidas de endosperma foi confirmada a partir da análise de citometria de fluxo. Esta técnica de citometria de fluxo caracteriza-se por ser um método rápido e preciso para verificar a quantidade de DNA nuclear em células vegetais (Dolezel et al., 1989), contribuindo para programas de melhoramento que envolvam a hibridação interespecífica e para a seleção de genótipos (Souza et al., 2004).

Plantas obtidas da regeneração de endosperma podem apresentar variações no nível de ploidia, no entanto, há relatos da estabilidade genética a partir do cultivo de endosperma em *Morus alba* (Thomas et al., 2000) e *Actinidia kolomikta* (Asakura e Hoshino, 2017). No presente estudo, o conteúdo de DNA nuclear do endosperma, utilizado como fonte de explante, foi o mesmo encontrado nas plantas regeneradas, mantendo a estabilidade no nível de ploidia por meio do sistema de

regeneração com alta responsividade a partir de endosperma da espécie medicinal e ornamental *P. foetida*.

## 5. CONCLUSÕES

No presente estudo estabelecemos um sistema com alta responsividade na regeneração *in vitro* a partir de endosperma de *P. foetida*, uma espécie silvestre de importância ornamental e também medicinal. Também foram descritos processos histológicos e estruturais envolvidos durante a morfogênese *in vitro*.

As plantas de origem seminífera de *P. foetida*, apresentaram aparentemente menor vigor vegetativo, quanto ao tamanho da folha, flor e presença de frutos e sementes, quando comparadas às plantas regeneradas a partir do endosperma da semente ( $3n$ ). Estas características são indicativas que plantas com nível de ploidia, em *P. foetida*, possam ser interessantes, tanto para a maior produção de fitoquímicos, quanto para fins ornamentais. Entretanto, faz-se necessário trabalhos de avaliação dessas características, o que já estão sendo realizados pelo grupo de trabalho.

A regeneração *in vitro* a partir de endosperma torna-se uma importante ferramenta para o desenvolvimento rápido e produção em larga escala de plantas triploides, por apresentar características mais desejáveis e de grande importância econômica, principalmente em espécies que visam à ornamentação. Além disso, este método auxilia no melhoramento genético de plantas, otimizando a produção de plantas triploides por meio do uso da cultura de tecidos, possibilitando novas perspectivas para a obtenção de inovações cultivares de *Passiflora* spp.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIAZZI, C. A. FARIA, R. B.; CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; CARVALHO, I. F.; MATOS, E. M.; REIS, A. C.; VICCINI, L. F.; PAIM PINTO, D. L.; ROCHA, D. I.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**. 238: 408–415, 2018.

ASAKURA, I.; HOSHINO, Y. Endosperm-derived triploid plant regeneration in diploid *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. **Scientia Horticulturae**. 219:53–59, 2017.

BAJAJ, Y. P.S.; SAINI, S. S.; BIDANI, M. Production of Triploid Plants from the Immature and Mature Endosperm Cultures of Rice. **Theoretical and Applied Genetics**. 58: 17-18, 1980.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal Plant Physiology**. 160:557–564, 2003.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biology Plantarum**. 3:113-120, 1989.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for study of plants genomes. **Journal Applied Genetics**. 38:285–302, 1997.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: na overview. In: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Eds.). **Flow cytometry with plant cells**. Wiley, Weinheim. p. 41-65, 2007.

ECHEVERRI, F.; ARANGO, V.; QUINONES, W.; TERRES, F.; ESCOBAR, G.; ROSERO, Y.; ARCHBOLD, R. Passiflorocins, Polyketides and a-pyrone from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry**. 56: 881-885, 2001.

FALEIRO, F. G. JUNQUEIRA, N. T.N. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. S.; ARAÚJO, S. C. B.; ANDRADE, S. R. M.; COSTA, A. M.; CASTELLEN, M. S.; VAZ, A. P. A.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ANDRADE G. A. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Livros e Cultivares Apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional – DF**. Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, p.45, 2009.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; COSTA, A. M. **Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como portaenxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais – resultados de pesquisa**. Embrapa Cerrados. p. 1-34, 2012.

FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. B.; MATOS, E. M.; ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D. L.; OTONI, W. C.; SILVA, M. L. High responsiveness in de novo shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 54:166-174, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35: 1039-1042, 2011.

FISCHER, E. Hybrids and hybridization. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J. (eds.) **Passiflora. Passion flowers of the world**. Timber, Portland. p. 362–376, 2004.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BARTH, M.; FELBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 52:849-860, 2017.

FORTES, A. M.; PAIS, M. S. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. nugget (Cannabinaceae): histological studies and changes in the starch content. **American Journal of Botany**. 87: 971–979, 2000.

GARG, L.; BHANDANI, N. N.; RANI, V.; BHOJWANI, S. S. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. **Plant Cell Reports**. 15:855-858, 1996.

GMITTER, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical Applied Genetics**. 80: 785–790, 1990.

GÓRALSKI, G.; POPIELARSKA, M.; SLESIAK, H. A. L. I. N. A.; SIWINSKA, D.; BATYCKA, M. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured in vitro. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 47: 121-128, 2005.

HOSHINO, Y.; MIYASHITA, T.; THOMAS, T. D. *In vitro* culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. **Scientia Horticulturae**. 130: 1-8. 2011.

HUETTMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 33: 105-119, 1993.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13:196–223, 2001.

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

JOHRI, B. M.; BHOJWANI, S. S.; Growth response of mature endosperm in cultures. **Nature**. 298:1345–1347, 1965.

JONES, M. P. A.; YI, Z.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems. **Plant Cell Reports**. 26:13-19, 2007.

MIYASHITA, T.; OHASHI, T.; SHIBATA, F.; ARAKI, H.; HOSHINO, Y. Plant regeneration with maintenance of the endosperm ploidy level by endosperm culture in *Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 98: 291-301, 2009.

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T. Blakesley, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 46: 161 - 164, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15: 3:473-497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphy Pty, 1981.

PATIL, A. S.; PAIKRAO, H. M.; PATIL, S. R. *Passiflora foetida* Linn: a complete morphological and phytopharmacological review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 1: 285-296, 2013.

POPIELARSKA, M., ŚLESIAK, H., GORALSKI, G. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. hayward). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 48 97–104, 2006.

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

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DA 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 Organ Culture**. 120:1087–1098, 2015.

SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** p. 600-603. 2011.

SILVA, G. M.; CRUZ, A. C.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 51:539-454, 2015.

SOUZA, M. M.; PALOMINO, G. PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**. 141: 31-38, 2004.

SUN, D. Q.; LU, X. H.; LIANG, G. L.; GUO, Q. G.; MO, Y. W.; XIE, J. H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 104: 23-29, 2011.

THOMAS, T. D.; BHATNAGAR, A. K.; BHOJWANI, S. S. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. **Plant Cell Reporter**. 19: 395–399, 2000.

THOMAS, T. D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 93:1–14, 2008.

TOZZI, H. H.; TAKAKI, M. Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims fo. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. **Brazilian Journal of Biology**. 71:701–708, 2011.

VEERAMOHAN, R.; HARON, N. W. Macromorphological and micromorphological studies of four selected *Passiflora* species in peninsular Malaysia. **Pakistan Journal of Botany**. 47: 485-492, 2015.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**. 12:245–252, 2007.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Annales D’Histochem**. 15: 289–296, 1970.

WANG, X; CHENG, Z. M.; ZHI, S.; XU, F. Breeding Triploid Plants: A Review. **Czech Journal Genetics Plant Breeding**. 52:41–54, 2016.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

No primeiro capítulo foi evidenciado o potencial das *Passiflora* spp. para ornamentação, os sistemas já relatados para a micropropagação dessas espécies, e a produção de híbridos.

No segundo capítulo foi proposta uma avaliação do potencial do embrião zigótico como fonte de explante para a regeneração in vitro de cinco espécies de *Passiflora* com potencial ornamental, sendo elas: *P. alata*, *P. capparidifolia*, *P. cristalina*, *P. foetida* e *P. nitida*. Os reguladores de crescimento BA e TDZ foram os mais eficazes no processo de indução das respostas morfogênicas.

No terceiro capítulo reportou-se a alta responsividade de explantes endospermicos, na presença de TDZ, para a produção de plantas triploides em *P. foetida*. A concentração de 9,08 µM TDZ apresentou a maior média de brotos por explante. Os estudos anatômicos confirmaram a formação de brotos adventícias na região periférica do endosperma. A triploidia das plantas obtidas de endosperma foi confirmada por meio da análise de citometria de fluxo.

O estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro a partir de embriões zigóticos para as cinco espécies de *Passiflora* spp. e para a produção de plantas triploides a partir do endosperma de *P. foetida*, torna-se uma alternativa biotecnológica para a produção do maracujazeiro de forma rápida com plantas mais

sadias e vigorosas, contribuindo para programas de melhoramento genético de *Passiforaspp.* com potencial ornamental.