

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE**  
**PLANTAS**  
**CAMILA APARECIDA ANTONIAZZI**

**Morfogênese in vitro e produção de triploides em populações comerciais de**  
***Passiflora edulis* Sims - (Passifloraceae)**

**TANGARÁ DA SERRA**  
**MATO GROSSO - BRASIL**  
**DEZEMBRO – 2016**

**CAMILA APARECIDA ANTONIAZZI**

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

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

**Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho**

**TANGARÁ DA SERRA  
MATO GROSSO - BRASIL  
DEZEMBRO – 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP)

A635m Antoniazzi, Camila Aparecida  
Morfogênese in vitro e produção de triploides em  
populações comerciais de *Passiflora edulis* Sims –  
(Passifloraceae). / Camila Aparecida Antoniazzi. — 2016.  
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de  
Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento de Plantas, Tangará da Serra, 2016.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva  
Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

1. Morfogênese in vitro. 2. Maracujazeiro amarelo. 3.  
Citocininas. I. Título.

CDU: 634.776.3

Bibliotecária: Áurea Regina Meira - CRB1/ 2752

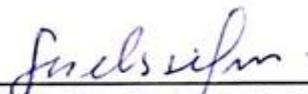
**Morfogênese in vitro e produção de triploides em populações comerciais de *Passiflora edulis* Sims – (Passifloraceae)**

**CAMILA APARECIDA ANTONIAZZI**

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 16 de dezembro de 2016.

Comissão Examinadora:



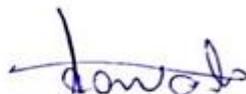
---

**Prof. Dr. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho**  
Orientadora - PGMP-Unemat



---

**Prof. Dr. Diego Ismael Rocha**  
UFG-Jataí-GO



---

**Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho**  
UNEMAT-Tangará da Serra- MT

A Deus e aos meus amados pais, Edson e Márcia que continuamente me  
apoiam e incentivam,

Aos meus irmãos, Edson Júnior e Júlia Caroline (*in memoriam*),

À minha família,

Ao Lucas,

*Ofereço,*

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Ilio Fealho de Carvalho

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado força e persistência em todos os momentos da minha caminhada.

Agradeço á todas às pessoas que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho pelo empenho, profissionalismo, incentivo, paciência e credibilidade durante a execução deste trabalho, obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho, do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia (CPEDA-UNEMAT), pela orientação desde o início do desenvolvimento deste trabalho, agregando conhecimentos valiosos e apoio.

Ao Prof. Dr. Rogério Benedito Añez, do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Anatomia Vegetal (CPEDA-UNEMAT), pelo apoio e suporte durante a execução das atividades da anatomia vegetal.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos, pela realização e contribuição deste trabalho com a análise de citometria de fluxo, na Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

À universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT) e ao programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade concedida para realização do curso.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter fomentado a bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

Ao Viveiro Flora Brasil pelo fornecimento das sementes especialmente a Eliane Ribeiro Cardoso.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV): Nayara, Carla, Rodrigo, Wolffe, Naielly e Andréia, pela agradável convivência.

Ao Rodrigo, em especial pela disponibilidade e auxílio em realizar trabalhos de anatomia.

À Nayara e Wolffe por se disponibilizarem em auxiliar para a obtenção dos resultados da anatomia.

Aos meus pais, pelo apoio e amor recíproco, e por me proporcionaram uma educação digna e aos meus irmãos.

Ao Lucas, pelo companheirismo, paciência, amizade e por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.

À minha amiga e companhia, Luana Fontes que acompanhou minha caminhada durante todo o processo até o presente momento.

À minha amiga de infância, Monyse que mesmo distante sempre se manteve presente com seu apoio, conselhos e amizade.

Aos meus colegas e amigos de turma pela convivência e experiência agradável durante os estudos. Em especial á Paula, Talita, Patrícia, Camila Filipin, Vivia e Amanda pelo amparo nas horas difíceis, momentos de descontração, mostrando que o conhecimento vai muito além dos livros e que não há conceito que supere a ética.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

Muito obrigada!!!

## **BIOGRAFIA**

Camila Aparecida Antoniazzi, filha de Edson Antoniazzi e Márcia Aparecida Bedendo, nasceu no dia 14 de novembro de 1990 na cidade de Guarantã do Norte – MT.

Em 2009 ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade do Estado do Mato Grosso, Campus de Tangará da Serra-MT, graduando-se como Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas em agosto de 2014.

Em fevereiro de 2015, iniciou no programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado, concentrando suas atividades na linha de pesquisa em Biotecnologia e Recursos Genéticos na Universidade do Estado do Mato Grosso, submetendo-se á defesa de dissertação em dezembro de 2016.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O gênero <i>Passiflora</i> .....	3
2.2. A espécie <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	4
2.3. Cultura de tecidos aplicado à cultura do maracujazeiro .....	5
2.4. Embriogênese Somática .....	6
2.5. Organogênese.....	9
2.6. Cultura de explantes endospérmicos .....	10
2.7. Citometria de fluxo .....	11
2.8. Reguladores de crescimento e a morfogênese in vitro em <i>Passiflora</i> sp. ....	11
2.9. Fatores que influenciam na morfogênese in vitro.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO I - Avaliação das respostas morfogênicas durante o cultivo de embriões zigóticos sob irradiância em populações comerciais (FB200 e FB300) de <i>P. edulis</i> Sims.....	29
RESUMO .....	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Material vegetal e indução da embriogênese somática.....	33
2.2. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos .....	34
2.3. Caracterização anatômica.....	34
2.4. Análise estatística .....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Indução da embriogênese somática em <i>P. edulis</i> população ‘FB-200’ na presença de irradiância.....	35
3.2. Indução da embriogênese somática em <i>P. edulis</i> população ‘FB-300’ na presença de irradiância.....	39
3.3. Caracterização Anatômica .....	42
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

CAPÍTULO II - Produção de plantas diploides e triploides em <i>Passiflora edulis</i> Sims., População FB-300. ....	55
RESUMO .....	55
ABSTRACT .....	56
1. INTRODUÇÃO .....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Material vegetal e indução da organogênese.....	58
2.2. Histodiferenciação e maturação .....	59
2.3. Alongamento das plantas e aclimatização .....	59
2.4. Caracterização anatômica.....	60
2.5. Análise estatística .....	60
2.6. Análise do nível de ploidia.....	60
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Caracterização anatômica.....	69
3.2. Análise de estabilidade genética .....	70
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
7. CONCLUSÕES GERAIS .....	80

## RESUMO

ANTONIAZZI, Camila Aparecida, Universidade do Estado de Mato Grosso, Dezembro de 2016. **Morfogênese in vitro e produção de triploides em populações comerciais de *Passiflora edulis* Sims - (Passifloraceae).** Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

O presente estudo teve como objetivo analisar as respostas morfogênicas através da embriogênese somática na presença de irradiância a partir de embriões zigóticos maduros em populações comerciais e estabelecer sistema de regeneração *de novo* na produção de plantas diploides e triploides para a espécie *Passiflora edulis* Sims. O primeiro capítulo descreve as respostas morfogênicas durante a embriogênese somática para as populações de *P. edulis* ('FB-200 Yellow Master e FB-300 Araguay'). Assim, embriões zigóticos foram cultivados em meio de indução compostos por sais básicos de MS acrescidos de 2,4-D (13,57; 18,10; 22,62; 27,15; 31,67; 36,20; 40,72 e 45,25  $\mu\text{M}$ ) combinados com 4,5  $\mu\text{M}$  de BA. O delineamento utilizado foi o (DIC), com cinco repetições e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% ( $p \leq 0.05$ ). As avaliações foram realizadas aos 40 dias em meio de indução e aos 60 dias de histodiferenciação. Para as variedades FB-200 e FB300 em meio de indução foi obtido respostas morfogênicas pelas vias embriogênica e organogênica. Para a variedade FB200 aos 40 dias o maior número de embriões somáticos produzidos ocorreu por via indireta na concentração de 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA, enquanto que por via direta em 40,72  $\mu\text{M}$  2,4-D. A organogênese direta foi observada no tratamento na ausência de PGRs e por via indireta na concentração de 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D. Aos 60 dias de cultivo o maior número de embriões produzidos via indireta foi no na presença de 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D e para organogênese, a maior média ocorreu por via direta no tratamento com 27,15  $\mu\text{M}$  2,4-D e indireta em 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D. A caracterização anatômica confirmou a morfogênese in vitro pelas vias embriogênica e organogênica. Os resultados descrevem as duas rotas morfogênicas no cultivo de embriões somáticos como fonte de explante mantidos na presença de irradiância para a espécie *P. edulis* (FB200 e 300). O segundo capítulo teve como objetivo a regeneração *de novo* por organogênese para a produção de

plantas diploides e triploides de *P. edulis* 'população FB-300'. Para a produção de plantas diploides embriões zigóticos foram utilizados como fonte de explante e para produção das plantas triploides explantes endospérmicos. Os explantes foram cultivados em meio de indução com sais básicos de MS com a adição de Benziladenina - BA (2,21; 4,43; 6,65 e 8,87  $\mu\text{M}$ ), Tidiazuron – TDZ (2,27; 4,54; 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$ ) e Cinetina - CIN (2,32; 4,64; 6,97 e 9,29  $\mu\text{M}$ ). O tratamento controle foi na ausência dos PGRs. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e 10 explantes por placa de Petri. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ( $p \leq 0.05$ ). As avaliações foram aos 30 dias em meio de indução e aos 60 dias de cultivo de histodiferenciação. A organogênese ocorreu de forma direta e indireta. O maior número de brotações foram obtidas no tratamento com 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ com média de 168,80 brotações aos 60 dias de cultivo a partir dos embriões zigóticos. Nos explantes endospérmicos somente foi produzida brotações na presença de 6,81  $\mu\text{M}$  TDZ com média de 39,2 brotos por explante. Os eventos morfogênicos no desenvolvimento das brotações nos explantes foram descritos utilizando-se de microscopia de luz. A análise em citometria de fluxo de tecido foliar de plântulas aclimatizadas revelou a diploidia ( $2n$ ) quando de origem a partir do embrião zigótico e triploidia ( $3n$ ) a partir de tecidos endospérmicos.

**Palavras-chave:** Maracujazeiro amarelo, 2,4-D, Morfogênese in vitro, Citocininas, Nível de ploidia.

## ABSTRACT

ANTONIAZZI, Camila Aparecida, Mato Grosso State University, December 2016. **In vitro morphogenesis and triploid production in commercial populations of *Passiflora edulis* Sims - (Passifloraceae)**. Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co Advisor Prof. Dr. Ilio Fealho de Carvalho.

The present study aimed to analyze the morphogenic responses through somatic embryogenesis in the presence of irradiance from mature zygotic embryos in commercial populations and establish a new regeneration system in the production of diploid and triploid plants for *Passiflora edulis* Sims species. The first chapter describes the morphogenic responses during somatic embryogenesis to the populations of *P. edulis* ('FB-200 Yellow Master and FB-300 Araguay'). Thus, zygotic embryos were cultured in induction medium composed of basic salts of MS and supplemented with 2,4-D (13.57; 18.10; 22.62; 27.15; 31.67; 36.20; 40.72 and 45.25  $\mu\text{M}$ ) combined with 4.5  $\mu\text{M}$  BA. A control treatment received no addition of growth regulators. A completely randomized experimental design was used, and the means were compared by the Tukey test at 5% ( $p \leq 0.05$ ). The evaluations were performed at 40 days in induction medium and 60 days of histodifferentiation. For the FB-200 and FB300 varieties in induction medium, morphogenic responses were obtained through the embryogenic and organogenic pathways. For the FB200 variety at 40 days the highest somatic embryos produced occurred indirectly at the concentration of 22.62  $\mu\text{M}$  2,4-D+4.5  $\mu\text{M}$  BA, whereas by direct route at 40.72  $\mu\text{M}$  2,4-D. Direct organogenesis was observed in the treatment in the absence of PGRs and indirectly in the concentration of 13.57  $\mu\text{M}$  2,4-D. At 60 days of culture the largest number of embryos produced indirectly was in the presence of 22.62  $\mu\text{M}$  2,4-D and for the one for organogenesis, the highest mean occurred directly in the treatment with 27.15  $\mu\text{M}$  2,4-D and indirect in 13.57  $\mu\text{M}$  2,4-D. The anatomic characterization confirmed in vitro morphogenesis by the embryogenic and organogenic pathways. The results describe the two morphogenic routes in the cultivation of somatic embryos as source of explant maintained in the presence of irradiance for *P. edulis* species (FB-200 and 300).

The second chapter aimed at the *de novo* regeneration by organogenesis for the production of diploid and triploid plants of *P. edulis* 'population FB-300'. For the production of diploid embryonic zygotic plants were used as source of explant and for the production of triploid plants endospermic explants. The explants were cultured in induction medium with basic MS salts with the addition of Benzyladenine - BA (2.21; 4.43; 6.65 and 8.87  $\mu\text{M}$ ), Tidiazuron-TDZ (2.27; 4.54; 6.81 and 9.08  $\mu\text{M}$ ) and Cinetin-CIN (2.32; 4.64; 6.97 and 9.29  $\mu\text{M}$ ). A control treatment received no addition of growth regulators. The experimental design was the (DIC), with five replicates and 10 explants per Petri dish. The averages were compared by the Tukey test at 5% ( $p \leq 0.05$ ). The evaluations were at 30 in induction medium and 60 days of histodifferentiation culture. Organogenesis occurred directly and indirectly. The highest number of shoots were obtained in the treatment with 4.54  $\mu\text{M}$  TDZ with a mean of 168,80 shoots at 60 days of cultivation from the zygotic embryos. In the endospermic explants shoots were only produced in the presence of 6.81  $\mu\text{M}$  TDZ with a mean of 39,2 shoots per explant. The morphogenic events in the development of shoots in the explants were described using light microscopy. Flow cytometric analysis of leaf tissue of acclimatized seedlings revealed diploidy ( $2n$ ) when originating from the zygote embryo and triploid ( $3n$ ) from endosperm tissues originating from the zygotic embryo and triploid ( $3n$ ) from endosperm tissues.

**Keywords:** Yellow passion fruit, 2,4-D, In vitro morphogenesis, Cytokinins, Ploidy level.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Conhecido popularmente como maracujá-amarelo ou azedo *Passiflora edulis* Sims se destaca no setor agrícola, especialmente pela comercialização no mercado de fruto *in natura* (Ruggiero et al., 1996; Cunha et al., 2002; Vilela, 2013), assim como na produção de derivados como, geleias, doces, farinhas, sorvetes e suco (Ruggiero, 1998). Várias espécies de *Passiflora* possuem princípios ativos terapêuticos, usados como ansiolíticos e sedativos pela cultura tradicional (Blumenthal et al., 2000; Conrado et al., 2003).

O Brasil é o país em primeiro no ranking de produção e consumo dos frutos do maracujá *in natura* e derivados (Lima et al., 2016). O cultivo segundo IBGE (2014) é estimado em 14.488 Kg/ha/ano, com média de produção final de 823, 284 mil toneladas. A produtividade é relativamente baixa em relação ao potencial de mercado, devido à carência tecnológica no manejo e a falta de informações técnicas dos produtores (Melo et al., 2001).

A polinização do maracujá é realizada prioritariamente por via sexuada ou assexuada, através da enxertia, estacas e via cultivo *in vitro* (Nhut et al., 2007; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010). São espécies diploides  $2n=2x=18$  cromossomos, alógamas e auto incompatíveis do tipo esporofítica (Martin e Nakasone, 1970; Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010), que confere a diferença como uma planta de alta variabilidade genética e desuniforme nas características agrônômicas (Otoni et al., 2013).

No cultivo *in vitro* vários fatores são considerados para o estabelecimento de protocolos responsivos, tais como o balanço entre os reguladores de crescimento, luz, temperatura, nutrientes, pH dentre outros (Monteiro et al., 2000). As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento frequentemente utilizados neste sistema de cultivo. As citocininas são utilizadas na indução da organogênese as auxinas indução de rizogênese e da embriogênese somática (Edwin et al., 2008; Saini et al., 2013).

A cultura de tecidos vegetais destaca-se como a técnica de micropropagação de grande valia tanto para programas de melhoramento quanto para produção de genótipos elite superiores, como também na produção de mudas, porta-enxertos e mudas enxertadas isentas de contaminantes. Podendo multiplicar plantas em larga

escala em tempo reduzido independente da época do ano, sendo em muitos casos a única alternativa para programas de melhoramento genético (Zerbini et al., 2008).

Na organogênese in vitro, via mais comumente descrita por regenerar espécies de *Passiflora* (Nhut et al., 2007; Zerbini et al., 2008) ocorre à formação de gemas adventícias, nome no qual é conferido devido o fato de se originarem em locais diferentes daqueles que se formam o curso normal de desenvolvimento da planta. Dessa forma esta via morfogênica pode ser direta ou indireta. No entanto, para se obter sucesso na regeneração depende intrinsecamente dos reguladores de crescimento que controlam a resposta morfogênica (Moura et al., 2001).

Para a micropropagação de *P. edulis* são utilizados diferentes tipos de explantes em protocolos já estabelecidos como segmentos hipocotiledonares (Reis et al., 2007; Fernando et al., 2007; Alexandre et al., 2009), segmentos radiculares e de hipocótilos (Rocha et al., 2016), segmentos radiculares (Lombardi et al., 2007; Silva et al., 2011) discos ou segmentos foliares (Fernando et al., 2007; Lombardi et al., 2007) e segmentos nodais (Cancino et al., 1998). A regeneração pela embriogênese somática a fonte de explante utilizada é a partir de embriões zigóticos (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2015b; Rosa et al., 2015b; Silva et al., 2015).

Para obtenção da rota de regeneração *de novo* a partir da embriogênese somática células ou grupos de células determinadas sob indução, sofrem mudanças morfológicas e bioquímicas que são fundamentais para o desenvolvimento dos embriões somáticos (Zimmerman, 1993; Komamine et al., 2005; Rose et al., 2010). A embriogênese é uma importante via de regeneração, para os estudos dos padrões de desenvolvimento em plantas, assim como os aspectos fisiológicos e moleculares da diferenciação celular (Yang e Zhang, 2010). A embriogênese somática consiste na expressão das células que adquirem a totipotência, que é definida como o potencial das células vegetais a responder sinais específicos e reprogramar por meio de desdiferenciação e/ou rediferenciação (Féher et al., 2003; Xu e Huang et al., 2014).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar as respostas morfogênicas através da embriogênese somática na presença de irradiância a partir de embriões zigóticos maduros em populações comerciais e

estabelecer sistema de regeneração *de novo* na produção de plantas diploides e triploides para a espécie *Passiflora edulis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae atualmente é pertencente ao grupo das Malpighiales, constituída por três famílias, Malesherbiaceae, Turneraceae e Passifloraceae, designada a maior família do grupo com 28 gêneros e cerca de 900 espécies (Stevens, 2001; Kubitzki, 2007). Dentre os gêneros se destaca a *Passiflora*, sendo o maior da família, com 17 gêneros e aproximadamente 700 espécies (Ulmer e Macdougall, 2004; Feuillet e Macdougall, 2007; Souza e Lorenzi, 2008; Souza e Lorenzi, 2012). No Brasil, ocorrem 150 espécies nativas com 87 endêmicas (Bernacci et al., 2014), no qual junto com a Colômbia integra o segundo maior centro de diversidade do gênero, com aproximadamente 240 espécies nativas (Ulmer e Macdougall, 2004; Bernacci et al., 2014; Pacheco et al., 2014).

No gênero *Passiflora* são encontradas plantas herbáceas ou lenhosas, de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, glabras ou pilosas (Vanderplank, 2000). As plantas apresentam variação foliar, podendo ser alternas, simples, pecioladas ou raramente composta, inteira ou lobada e de formas variáveis, de margem inteira ou serrilhada ou ainda dentada; pecíolos providos de glândulas nectaríferas com diferença de forma, número e posição ou ausentes, o que confere valor ornamental em função da variação fenotípica das folhagens (Cervi, 1997; Abreu et al., 2009; Montero et al., 2013).

No Brasil, as espécies que possuem maior área de produção para fim comercial são a *Passiflora edulis* (maracujá-amarelo ou azedo) e *P. alata* (maracujá-doce) (Souza e Meletti, 1997). O maracujá amarelo é o mais cultivado no mundo, com área cultivada de aproximadamente 95% dos pomares comerciais, devido à importância de seus frutos, vigor e produtividade para fabricação industrial de sucos concentrados, o que confere principal produto de exportação (Meletti et al., 2005). O Brasil se enquadra como o maior produtor e consumidor mundial de maracujá (Lima et al., 2016).

Além de ser consumido *in natura*, e na fabricação de geléias, sucos e sorvetes, ainda apresenta potencial farmacológico devido á propriedades sedativas encontrado nas folhas e frutos como passiflorina (maracujina) e as substâncias tanóides (Souza e Meletti, 1997; Cunha et al., 2002).

Métodos para o melhoramento na cultura do maracujazeiro tem sido estudados, visando explorar a variabilidade existente no gênero, a resistência a pragas e doenças, como a antracnose causado pelo fungo (*Colletotrichum gloeosporioides*), disseminada pelo aumento das condições do ambiente (temperatura e umidade), não podendo ser controlada por métodos tradicionais (Santos Filho et al., 2004; Junqueira et al., 2005), além da virose do endurecimento do fruto, septoriose, verrugose e bacteriose (Junqueira et al., 2003).

A variabilidade genética existente no gênero torna possível revelar fontes de alternativas de resistência ou tolerância para o controle dessas doenças no campo ou suporte em programas de melhoramento genético (Otoni, 1995; Silva et al., 2011; Junqueira et al., 2005). De acordo com Braga et al. (2005) as técnicas existentes de melhoramento vegetal podem suprir de maneira eficaz para o desenvolvimento e aumento da competitividade da cultura.

## **2.2. A espécie *Passiflora edulis* Sims**

A denominação para a origem do nome maracujá se difundiu através dos indígenas no Brasil, chamada de fruta “maraú-ya”, que provem do fruto “marahu”, que por sua vez vem de “ma-râ-ú”, que se resume em “coisa que se come de cuia” ou “alimento em forma de cuia” (Amaya, 2009). Vavilov (1992) descreveu *Passiflora edulis* como espécie nativa do Brasil, mais especificamente da região Amazônica considerada como o centro de diversidade, e que apresentam frutos amarelados (maracujá-amarelo), além de outras variações.

Atualmente a espécie mais cultivada é a *Passiflora edulis* Sims, conhecida popularmente como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (Martins et al., 2006; Junqueira et al., 2005; Bernacci et al., 2008). A cultura do maracujazeiro ocupa, no Brasil, área de aproximadamente 57.183 ha com uma produção de 823, 284 mil toneladas e produtividade de 14, 488 kg/ha no ano de 2014 (IBGE, 2014).

*Passiflora edulis* se distingue em duas variedades utilizadas em cultivo comercial, ocupando cerca de 95% da área plantada. A primeira é a variedade

‘FB200 – Yellow Master’ apresenta como benefícios para o produtor, atender o mercado de frutas *in natura*, possuindo características agronômicas de frutos com maior uniformidade de formato, tamanho, cor, com casca mais espessa proporciona maior resistência durante o transporte. O rendimento de suco em torno de 36%, apresentando a média de sólidos solúveis totais em torno de 14,0° Brix. Média do peso de fruto de 240g, com potencial para uma produtividade média de 50 ton/ha/ano. E a segunda variedade ‘FB300 – Araguari’ é destinada a atender a indústria, apresenta boa estabilidade produtiva, rendimento acima de 42% de suco, assim como a variedade FB-200, pode atingir produtividades de 50 toneladas ha<sup>-1</sup> ano, porém, não apresenta homogeneidade em forma, cor dos frutos e tamanho dos frutos, apresentando peso médio de 120 gramas (Viveiros Flora Brasil, 2008).

### **2.3. Cultura de tecidos aplicado à cultura do maracujazeiro**

A partir da década de 90, que se iniciou o desenvolvimento do melhoramento genético do maracujazeiro, resultando no desenvolvimento de cultivares, ea solidificação de pesquisas nos grandes centros (Meletti et al., 2005). Neste contexto, a predominância de pesquisas sobre *Passiflora*, é atualmente aliada com uso de técnicas de biotecnologia, com a finalidade de produzir novas variedades, e genótipos agronomicamente superiores, bem como obtenção de regenerantes *in vitro* para produção em larga escala e com alta qualidade fitossanitária (Lima et al., 2000).

A técnica de cultivo *in vitro* depende de vários fatores, sendo de suma importância o controle externo da morfogênese através de fatores químicos, bem como os reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura (Biondi et al., 1998; Kumar et al., 1998).

As principais ferramentas biotecnológicas utilizadas no melhoramento genético em *Passiflora* são a hibridação sexual e intervarietal e sexual interespecífica, seleção massal, seleção por teste de progênes e a introdução de plantas (Bruckner & Otoni, 1999; Oliveira e Ferreira, 1991; Bruckner et al., 2002). Além disto, a biotecnologia é uma importante ferramenta que contribui eficientemente para otimização do melhoramento do maracujazeiro, podendo-se utilizar ferramentas como a transformação genética e a inserção de genes de interesse como a de resistência a doenças (Vieira e Carneiro, 2004), assim com a

fusão de protoplastos visando à hibridização somática entre maracujás não compatíveis a nível cromossômico, requerendo a existência de protocolos fidedignos de regeneração in vitro para a espécie (Brukner e Otoni, 1999; Otoni, 1995; Vieira e Carneiro, 2004; Silva et al., 2009; Pinto et al., 2010a).

Para que se tenha sucesso na regeneração deve-se verificar qual explante utilizar, que pode ser desde folhas, hipocótilo, raízes, embrião, endosperma ou qualquer outro tecido que possa regenerar com estímulos do meio de cultura in vitro (Torres et al., 2000).

Diferentes técnicas de cultura de tecidos já foram realizadas no cultivo do maracujazeiro, dentre elas a micropropagação (Dornelas e Vieira, 1994; Nhut et al., 2007), transformação genética (Manders et al., 1994; Reis et al., 2007; Silva, 2007; Paim Pinto et al., 2009), protoplasto e hibridação somática (Otoni et al., 1995; Davey et al., 2005), seleção in vitro visando resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Flores et al., 2012), sementes sintéticas (Silva, 2015), ginogênese (Rêgo et al., 2011), conservação in vitro (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007), indução de autotetraplóides (Rêgo et al., 2011), organogênese (Dornelas e Vieira, 1994; Becerra et al., 2004; Pipino et al., 2010; Pinto et al., 2010a; Prammanee et al., 2011; Garcia et al., 2011; Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Rocha et al., 2015a), embriogênese somática (Otoni, 1995; Anthony et al., 1999; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Albino, 2013; Ferreira et al., 2015; Silva et al., 2015; Rocha et al., 2015b).

A técnica mais utilizada atualmente para micropropagar espécies do gênero *Passiflora* é por via organogênica (Nhut et al., 2007; Zerbini et al., 2008; Pinto et al., 2010a), entretanto, a morfogênese via embriogênese somática atualmente tem demonstrado viabilidade no estabelecimento de protocolos responsivos.

#### **2.4. Embriogênese Somática**

A embriogênese é primordial para a existência da vida, tanto para animal ou vegetal. Em vegetais, a embriogênese não se restringe à fertilização, pois muitas espécies utilizam o artifício de produção natural de embriões, por via assexuada em sementes como é o caso da apomixia ou pela indução de embriões somático via da cultura de tecidos. Podem ser induzidos embriões de origem assexuada com a

utilização de uma gama de tecidos somáticos, com o uso de reguladores de crescimento para que induza o desenvolvimento embrionário (Ikeda et al., 2006).

A embriogênese somática foi observada pela primeira vez em 1958 por Steward em cultivo de calos de raízes de cenoura (*Daucus carota*). Desde então, essa técnica vem se destacando por sua importância, como via de regeneração de plantas in vitro, como modelo de estudo para áreas da fisiologia e morfogênese em plantas (Zimmerman, 1993).

A embriogênese somática adventícia ou assexual, sendo a via em que células diploides e/ou haploides desenvolvem embriões (George et al., 2008). É um processo morfogênico semelhante à embriogênese zigótica, que se desenvolve por meio de diferentes estádios embrionários, dando origem a uma estrutura bipolar, que consiste em apresentar ápice caulinar e radicular que dará origem a uma planta completa sem que ocorra a fusão de gametas (Zimmerman, 1993; George et al., 2008; Yang e Zhang, 2010; Rose et al., 2010; Rocha e Dornelas, 2013; Rizvi et al., 2013).

A embriogênese somática refere-se ao processo em que células somáticas a partir de indução, são submetidas a alterações morfológicas e bioquímicas, bem como eventos de desdiferenciação, divisão celular e reprogramação metabólica e fisiológica, e expressão gênica para formar células embrionárias (Yang & Zhang, 2010).

Existem duas vias para embriogênese somática in vitro a direta e a indireta. A primeira via, os embriões se originam a partir de células do tecido organizado do explante, enquanto que na embriogênese indireta a formação de embriões é a partir de células de calo, proveniente da desdiferenciação celular do explante, que apresenta distintos estádios de diferenciação e determinação para adquirir competência e originar embriões somáticos (Williams e Maheswaran, 1986; Guerra et al., 1999; George et al., 2008; Sharp et al., 1980; Yeung, 1995; Rizvi et al., 2013).

Independente se a embriogênese somática partir da via direta ou indireta, os embriões passam por estágios de desenvolvimento embrionário semelhante ao de formação de embriões zigóticos, sendo o globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. A característica primordial que distingue o embrião somático é a bipolaridade, ou seja, apresenta ápice caulinar e radicular, com sistema vascular fechado, não

possuindo conexão com os tecidos do explante (Otoni et al., 2013; Pilarska et al., 2015).

Otoni (1995) foi o primeiro a descrever embriogênese somática do gênero *Passiflora*, com a espécie *P. giberti* a partir de explantes foliares com utilização do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com picloram, formando assim massas de calos que posteriormente foram feitas suspensões celulares, desenvolvendo assim, embriões somáticos. Entretanto, a espécie que se destaca como modelo para estudos morfogênicos por via embriogênica é a *Passiflora cincinnata* Masters estabelecido por Silva et al. (2009). Esta espécie de *Passiflora*, tornou base para o estabelecimento de protocolos de regeneração para diversas espécies como *Passiflora edulis*, *Passiflora alata*, *Passiflora crenata*, e *Passiflora gibertii* (Rosa et al., 2015b), *P. miniata* e *P. speciosa* (Ferreira et al., 2015).

O estabelecimento dos protocolos de embriogênese somática possibilitou estudos relacionados às técnicas histoquímicas e histocitológicas como as descritas para *P. edulis* (Rocha et al., 2012; Silva et al., 2015), estabilidade genética através da citometria de fluxo (Pinto et al., 2010b). Para a espécie *P. edulis*, população 'Maguary FB-100', obteve-se embriogênese somática a partir de embriões zigóticos com a utilização de 72,4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4,4  $\mu\text{M}$  de BA, contudo, não ocorreu a conversão dos embriões em plântulas (Paim Pinto et al., 2011). No entanto Rosa et al. (2015b), obteve a conversão de embriões somáticos em plantas de *P. edulis* 'população FB- 100. Silva et al. (2015), em um trabalho realizado com *P. edulis* população 'Araguari FB-300' na indução da embriogênese somática através de embriões zigóticos suplementados com picloram (31,06  $\mu\text{M}$ ) combinados com as citocininas, BA (2,22  $\mu\text{M}$ ) e TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ), induziram a estádios de embrião globular somático, mas não houve conversão para demais estágios embrionários, sendo assim uma sugestão para otimização de protocolos para regeneração, no que se trata de desenvolvimento e conversão de embriões somáticos em plantas.

A embriogênese somática envolve varias etapas como a ativação da divisão celular, desdiferenciação das células, reprogramação metabólica e expressão dos genes responsáveis pela indução destes embriões (Yang e Zhang, 2010).

Neste sentido, na fase de indução, determinados genes são acionados através de hormônios exógenos ou algum fator de stress, o que desencadeia a formação de células embriogênicas que são divididas em fases, sendo a

desdiferenciação, expressão da totipotencialidade e a determinação celular (Elhiti et al., 2013), e a reprogramação metabólica do desenvolvimento. Para que esta via de regeneração ocorra, é necessário que existam células competentes, e determinadas com receptor apto a seguir a via embriogênica (Féher et al., 2003). No entanto, a fase de transição de células somáticas para embriogênica é uma peça da embriogênese somática menos elucidada no momento (Fehér 2005; Karami et al., 2009; Elhiti et al., 2013).

## **2.5. Organogênese**

Dentre as técnicas mais utilizadas no cultivo in vitro para o gênero *Passiflora*, se destaca a organogênese, sendo o processo de formação de órgãos, brotos ou raízes a partir de tecidos ou células sob estímulos, resultando em uma estrutura unipolar, chamada de primórdio vegetativo, que apresenta sistema vascular com o tecido de origem (Otoni et al., 2013). Neste processo pode ser de dois tipos, sendo a via direta que ocorre a partir de células do explante de origem ou a indireta que é através da formação de calos (Grattapaglia e Machado, 1998).

Geralmente, para que ocorra a indução de organogênese é necessário o equilíbrio da auxina e citocinina com base no controle do processo morfogênico. Existem três fases da organogênese: a primeira é a capacidade de competência do tecido/células, definida como habilidade de responder aos sinais hormonais durante a fase de indução. Na segunda fase é conhecida como desdiferenciação, que determina a formação de algum órgão sob influência dos reguladores de crescimento, ou seja, independente das fontes exógenas de reguladores durante a terceira fase, e, que o órgão procede de forma independente de fitormônios exógenos (Sugiyama, 1999; Bhatia e Bera, 2015).

Para iniciar o cultivo in vitro, diferentes fontes de explantes podem ser utilizados. No gênero *Passiflora*, autores relatam o uso de segmentos nodais e internodal (Kantharajah & Dodd, 1990; Faria e Segura, 1997; Komanthi et al., 2011; Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Ragavendran et al., 2012; Nhut et al., 2007; Ozarowski et al., 2012; Ozarowski et al., 2013b), meristemas apicais (Prammanee et al., 2011), segmentos hipocotiledonares (Fernando et al., 2007; Dias et al., 2009; Silva et al., 2011; Pinto et al., 2010a; Vieira et al., 2011), segmentos foliares e discos foliares (Monteiro-Hara, 2000; Lombardi et al., 2007; Fernando et

al., 2007; Busilacchi et al., 2008; Komanthi et al., 2011; Vieira et al., 2011; Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Ozarowski et al., 2013b), segmentos de pecíolo (Ozarowski et al., 2013b), gavinhas (Pipino et al., 2010), segmentos de raiz (Rosa et al., 2016), primórdios de brotos (Kawata et al., 1995), embriões zigóticos (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2010b; Rosa e Dornelas, 2012; Rocha et al., 2012; Rosa et al., 2015b), cotilédones (Figueiredo Carvalho et al., 2013; Silva e Carvalho, 2013) e tecidos endospermicos (Mohamed, 1996).

## **2.6. Cultura de explantes endospermicos**

Os tecidos endospermicos possuem células totipotentes, possibilitando a regeneração de indivíduos triploides (Johri e Bhojwani, 1965). O uso deste tecido comparado aos métodos convencionais, a cultura de endosperma facilita a regeneração de plantas com barreiras reprodutivas ou difícil propagação in vivo (Chaturved et al., 2003; Thomas e Chaturvedi, 2008). A totipotência deste tecido foi relatada primeiramente na cultura de *Exocarpus cupressiformis* (cereja nativa) por Johri e Bhojwani. (1965). Desde então a cultura deste tecido é relatado em diversas espécies comerciais, como *Citrus* sp. (Gmitter et al., 1990), *Morus alba* (Thomas et al., 2000), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003), kiwi *Actinidia* sp., e *A. deliciosa* (Machno e Przywara, 1997; Góralski et al., 2005) e *Lonicera caerulea* (Miyashita et al., 2009).

O cultivo in vitro de tecido endospermico pode ser usado em estágio imaturo ou maduro, sendo um fator crucial para determinar a regeneração dos indivíduos. O estágio de endosperma imaturo tem sido relatado para a produção de plântulas in vitro nas espécies de *Morus alba* (Thomas et al., 2000), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003) e *Carthamus tinctorius* (Walia et al., 2007). Já explantes oriundos de endosperma maduros foram relatados para as espécies *Lycium barbarum* (Gu et al., 1985), *Emblica officinalis* (Sehgal e Khurana, 1985), *Annona squamosa* (Nair et al., 1986), *Asparagus officinalis* (Liu et al., 1987), *Citrus* spp. (Gmitter et al., 1990), *Mallotus philippensis* (Sehgal e Abbas, 1996) e *Actinidia* spp. (Góralski et al., 2005; Machno e Przywara, 1997).

A regeneração de indivíduos triploides apresentam benefícios importantes, principalmente no quesito comercial, como frutos sem sementes (banana, cítricos e melão), ou podem potencializar o sabor, melhorando a palatabilidade de seus

antepassados diploides como é o caso da batata, se tornando assim importante o desenvolvimento desta técnica (Gorálski et al., 2005).

## **2.7. Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é comumente utilizada na cultura in vitro, uma vez que é possível estimar o nível de ploidia, como o efeito das condições de cultivo e a estabilidade do nível de ploidia dos regenerantes, com finalidade de adequação de protocolo fidedigno em larga escala na propagação de genótipos superiores (Loureiro, 2007).

Atualmente a técnica tem sido utilizada para aferir variações genéticas vegetais de regenerantes da micropropagação é a citometria de fluxo. Sendo uma ferramenta importante para informar diferentes formações in vitro, e detecta principalmente por meio do DNA nuclear das células vegetais, tecidos ou órgãos possíveis variações genéticas (Orbovie et al., 2008; Medrano et al., 2014).

Essa técnica envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de estruturas (células, núcleos, cromossomos, organelas e etc.) que fluem em uma suspensão líquida baseada na intensidade da fluorescência dos núcleos corados de DNA (Dolezel, 1997; Loureiro e Santos, 2004). Sendo as amostras coradas com corantes específicos para o DNA (iodeto de propídio, brometo de etídeo) o que possibilita ao aparelho estimar a quantidade de DNA.

Este método possibilita diversas estimativas com aplicações desde uma pesquisa básica até o melhoramento de plantas, em que se estima o tamanho do genoma, produção de ploidias, detecção de mixoploidias e aneuploidias, avaliação do ciclo celular, estudo de deleção cromossômica, separação de células, organelas ou cromossomos (Dolezel e Bartos, 2005)

## **2.8. Reguladores de crescimento e a morfogênese in vitro em *Passiflora* sp.**

Os reguladores de crescimento classificam-se de acordo com a sua origem, distinguindo-se os reguladores de crescimento em que são substâncias sintéticas, produzidas em laboratório que alteram o padrão celular das plantas, e os hormônios vegetais definidos pela classe de compostos de origem natural ou endógena das

plantas, que tem como função carrear sinais químicos para regular os processos de crescimento e desenvolvimento da morfogênese in vitro (Guerra e Nodari, 2006).

Uma vez que esses reguladores de crescimento exercem sua função através de receptores presentes em células responsivas, que traduzem sinais hormonais tanto em eventos bioquímicos ou fisiológicos (Guerra et al., 1999). Já os reguladores de crescimento, por sua vez, são sintetizados e substituem os efeitos hormonais no metabolismo celular (Furtado, 2010).

Plantas in vivo também possuem reguladores endógenos para controlar o crescimento e executar as divisões celulares, principalmente com as auxinas e citocininas. Charles Darwin foi um dos primeiros cientistas de meados do século XX, no estudo do efeito da luz na curvatura de plântulas. Em que, observaram o desenvolvimento de plantas com ápices cobertos ou excisados, mostrando que a curvatura de crescimento destas, cessava, o que os levou a supor que haveria uma determinada substância responsável pela ação. Mas, somente em 1928, Fritz Went conseguiu isolar e quantificar a substância, denominando como hormônio, que anos após seria descrita como evento natural da auxina ácido indol-acético (AIA). Décadas após, Thimann, Bonner e Skoog contribuíram de forma promissora para a compreensão do papel das auxinas no desenvolvimento de uma vasta variedade de auxinas sintéticas, amplamente utilizadas na cultura de tecidos vegetais e na agricultura, destacando entre elas o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) (Vasil, 2008).

Outro regulador de crescimento de origem vegetal com importância na cultura de tecidos são as citocininas. Skoog e Miller (1957) contribuíram por demonstrar a interação de auxina- citocininas (AIA e Cinetina), como precursor na regulação da morfogênese in vitro vegetal, com a indução de brotos, raízes e massas de calos e, alongamento celular, sendo isto estimado como um marco importante na micropropagação e na morfogênese vegetal (Vasil, 2008; Furtado, 2010).

Sendo assim, é notório que para cultivo in vitro vegetal é imprescindível à utilização de reguladores de crescimento exógenos (auxinas e citocininas) para o início ou a continuação do processo de divisão celular (Fehér et al., 2003; Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006).

Para a indução e formação de embriões somáticos, a utilização de altas doses de auxinas no cultivo in vitro geralmente para indução da embriogênese

somática (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Sua ação é atribuída à determinada células somáticas, que por apresentarem sensibilidade à auxina as quais possuem competência para determinar a produção de células filhas, nas quais se diferenciam nos embriões somáticos (Guerra et al., 1999; George et al., 2008).

A principal auxina usada para induzir a embriogênese somática é o ácido 2,4 diclorofenoxiacético ou comumente conhecido como “herbicida 2,4-D”, uma substância sintética, que adicionada ao meio de cultura in vitro induz a embriogênese somática em diversas espécies (Dudits et al., 1991).

De acordo com estudos de Silva et al. (2009), a combinação de reguladores de crescimento, como as auxinas e citocininas são fatores essenciais para iniciar o processo de embriogênese somática em *Passiflora*. Sendo os protocolos estabelecidos com diferentes concentrações de 2,4-D combinados com BA é relatado pela maioria das espécies, como: *P. giberti* (Otoni, 1995); *P. cincinnata* (Silva et al., 2009); *P. edulis*, *P. alata*, *P. crenata*, *P. edulis*, *P. foetida* e *P. gibertii* (Rosa et al., 2015b), *P. edulis* (Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2015a) e *P. edulis* (Silva et al., 2015).

Entretanto, a principal via de micropropagação do gênero *Passiflora* é ainda pela organogênica, podendo ser direta (Dornelas e Vieira, 1994; Appezzato-da-Glória et al., 1999; Hall et al., 2000; Becerra et al., 2004) ou indireta (Monteiro et al., 2000; Lombardi et al., 2007), o que depende do tipo de explante e do genótipo. Comumente, são utilizadas as citocininas, como benziladenina (BA), cinetina (CIN) e zeatina (Zea), TDZ (Thidiazuron) podendo ser combinadas com baixas doses de auxinas, como ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) ou até mesmo com ácido diclorofenoxiacético 2,4-D (Monteiro et al., 2000).

Em protocolos para indução de organogênese em explantes de *Passiflora* é rotineiro o uso de BA e menos frequente o de TDZ. Desta forma a via organogênica está interligada com o estímulo de reguladores exógenos, tanto auxinas como citocininas com a habilidade do tecido responder durante o cultivo. Mostrando que a cultura de tecidos é uma ferramenta manipulável com capacidade de se explorar em diversas áreas, para o entendimento dos processos fisiológicos (Christianson & Warnik, 1985; Lo et al., 1997), resultando em processos morfogênicos in vitro.

## **2.9. Fatores que influenciam na morfogênese in vitro**

Existem diversos fatores que influenciam a embriogênese somática de espécies de *Passiflora*. Vários autores descrevem a ampla variabilidade genética do gênero *Passiflora* (Ferreira et al., 1998; Castellen et al., 2005). Como exemplo *Passiflora edulis* Sims que atualmente existem diversas variedades comerciais do maracujazeiro amarelo, desta forma cada variedade demonstra um comportamento distinto, tanto em campo quanto no cultivo in vitro, o que remete a influência da resposta morfogênica de acordo com o genótipo.

Como descreve Guerra et al. (1999), explantes provindos de uma mesma cultura, quando coletados em épocas distintas apresentam diferentes respostas á indução embriogênica. Outro fator importante na resposta morfogênica vegetal é a intensidade luminosa. O método mais comum para indução da embriogênese somática é normalmente no escuro, com explantes em meio de cultivo com regulador 2,4-D, tendendo á indução dos calos embriogênicos. Para a maturação dos embriões comumente, coloca-se em meios nutritivos ausentes de reguladores, para que diferenciem os embriões somáticos.

No entanto, a morfogênese pode ocorrer na ausência de reguladores de crescimento vegetal e em ambiente luminoso (Falco et al., 1996) e em algumas espécies pode promover resposta positiva na obtenção de calos embriogênicos (Garcia et al., 2007), contudo o uso de reguladores e o fator de ausência de fotoperíodo comumente potencializa esse processo (Chengalrayan e Gallomeagher, 2001).

Outros fatores estão envolvidos com o processo de indução da embriogênese somática, desde a escolha do material genético, tipo de explante e as condições de cultivo que serão submetidas, como o fotoperíodo, irradiância, composição do meio básico (sacarose, nitrogênio e outros elementos minerais), o agente gelificante, reguladores de crescimento e pH (Preece, 1995).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**. 166: 307-315, 2009.

ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. Propagação vegetativa *ex vitro* do maracujazeiro: estaquia e enxertia. In: ALEXANDRE, R. S.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, 2009. p. 210.

ALBINO, B. E. S. **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2013. 74p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).

AMAYA, J. E. 2009. **El cultivo de maracuyá *Passiflora edulis* forma. flavicarpa** gerencia regional agraria La libert, Trujuli, Perú, 30 p.

ANTHONY, P.; OTONI, W. C.; POWER, J. B.; LOWE, K. C.; DAVEY, M. R. Protoplast isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R. D. (ed). **Plant cell culture protocols**. Wageningen: Humana Press. 169–181, 1999.

APG III. Angiosperm Phylogenetic Group III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**.161:105-121, 2009.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.34: 2007- 2013, 1999.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GONGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitromorphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.79:87-90, 2004.

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. (2014). ***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: 09 Jul. 2016.

BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M. M.; TORRIGIANI, P. Ethylene involvement in the vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**. 202: 134-144, 1998.

BHATIA, S.; BERA, T. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In: Bhatia, S.; Sharma, K.; Dariya, R.; Bera, T. (ed). **Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**. India, 2015. p. 201-228.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A. AND BRINCKMANN, J. **Herbal medicine: expanded comission e monographs**. Integrative Medicine, Newton Communications. pp. 293-296, 2000.

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P. Maracujá-doce: melhoramento genético e germoplasma. IN: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p, 601-617.

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 Horticultrae**. 370: 45-57, 1995.

BRUCKNER, C. H.; MELETTI, L. M. M.; OTONI, W. C.; ZERBINI JR., F. M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 373-409.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. H. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 379-399.

BUSILACCHI, H., SEVERIN, C., GATTUSO, M., AGUIRRE, A., DI SAPIRO, O., GATTUSO, S. Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. **Boletim Latino Americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**.7: 257-263, 2008.

CANCINO, G. C.; DAVEY, M. R.; LOWE, K. C.; POWER, J. B. Shoot regeneration from leaf and root explants of *Passiflora molissima*. **Journal of Experimental Botany**. 49: 87, 1998.

CASTELLEN, M. S.; CERVI, A. C.; AMARAL, W. A. N. O gênero *Passiflora* L. nos Tabuleiros Costeiros. In: SILVA Jr., J. F. (Org.). **Recursos genéticos dos tabuleiros e seus ecossistemas associados-fruteiras**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 32 p.

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

CONRADO, D. J.; FRONZA, T.; PAIVA, R. M.; DRESCH, A. P.; GEREMIAS, D.; FENNER, R.; VIANA, A. F.; RATES, S. M. K. Aspectos químicos, farmacológicos e emprego terapêutico do gênero *Passiflora* (Maracujá). **Revista Afarg**s.15:14-19, 2003.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104 p. Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, n. 15.

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.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. **Developmental Biology**. 112: 494-497, 1985.

CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In vitro Cellular and Development Biology – Plant**. 37: 434-439, 2001.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**. 23: 131-171, 2005.

DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D. M.; BARROS, R. S.; FLOH, E. I. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 199-208, 2009.

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

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. 95: 99–110, 2005.

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

DUDITS D.; BOGRE L.; GYORGYEY J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **Journal of Cell Science**. 99:473–482, 1991.

EDWIN, S.; JARALD, E.; EDWIN, D. L.; JAIN, A. Wound healing and antioxidant activity of *Achyranthes aspera*. **Pharmaceutical Biology**. 46: 824-828, 2008.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 49:631-642, 2013.

FALCO, M. C.; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B. A. Histological characterization of in vitro regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 9:93-97, 1996.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 411-453.

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

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. flavicarpa. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 33:209-212, 1997.

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

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; ŠAMAJ, J. (Eds.). **Somatic Embryogenesis**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 85-101.

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

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. New insights into the in vitro organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 91: 37-44, 2007.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de maracujá. In: **Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro no Brasil**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1998. p. 48-53.

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

FEUILLET, C. P.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. In: Kubitzki, K. 2007. **The families and Genera of vascular Plants**. Springer Berlin Heidelberg. 9: 270-281, 2007.

FIGUEIREDO CARVALHO, M. A.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; DE CASTRO, E.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**. 36:141-151. 2013.

FURTADO, M. B. **Indução e controle da embriogênese somática em *O. catharinensis* e *O. odorífera* (Lauraceae)**. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, 2010. (Dissertação Mestrado).

GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. In vitro morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 90:181-190, 2007.

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

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, v. 1, 2008.

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.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI. 1: 183-260, 1998.

GORALSKI G.; POPIELARSKA M.; SLESK H.; SIWINSKA D.; BATYCKA M. Organogenesis endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward' cultured *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia**. 47: 121–128, 2005.

GU, S.R.; GUI, Y. I.; XU, T. Y. Induction of endosperm plantlets in Lycium. **Acta Botanica Sinica**. 27, 106–109, 1985.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia, 2006. GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: **Culturas de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v. 2, p. 533-568.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGINS, C. M.; DIETZGEN, R. G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* × *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**. 48: 673-680, 2000.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**. 23: 153-161, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal:** culturas temporária e permanente. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

JABLONSKI, J. R.; SKOOG, F. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. **Journal of Plant Physiology**. 7: 16–24, 1954.

JOHRI, B. M.; BHOJWANI, S. S. Growth responses of mature endosperm in culture. **Nature**. 208: 1345–1347, 1965.

JUNQUEIRA, N. T. V.; ANSELMO, R. M.; PINTO, A. C. Q.; RAMOS, V. H. V.; PEREIRA, A. V.; NASCIMENTO, A. C. Severidade da antracnose e perda de matéria fresca de frutos de dez procedências de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* dryander) em dois ambientes de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**.25: 71-73, 2003.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI LC (2005).Potential of wild species of passion fruit plant as resistance source to diseases.In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds). **Passionfruit: germplasm and breeding**. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 80–108.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic to embryogenic transition in plants. **Journal of Chemical Biology**. 2:177–190, 2009.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A.In vitromicropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**. 65: 337-339, 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Jounal ofPlant Physiology**. 147: 281-284, 1995.

KOMANTHI, S., RAJALAKSHMI, G., SAVETHA, S., AYYAPPADAS, M.P.In vitroregeneration of *Passiflora foetida* L. **Jounal of Biological Research**. 8:653-659, 2011.

KOMAMINE, A.; MURATA, N.; NOMURA, K. 2004 SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures—Morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 41: 6-10, 2005.

KUBITZKI, K. Malesherbiaceae.In: Kubitzki, K. (Ed). **The families genera of vascular plants**. p. 247- 249, 2007.

KUMAR, P. P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T. A. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular e Developmental Biology - Plant**. 34:94–103, 1998.

LIMA, D. M. D.; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Application of biotechnological processes to passion fruit culture. **Ciência Rural**. 30: 359-363, 2000.

LIMA, A. A.; CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. S.; PIRES, M. M. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPACNPMF, 2013. (Boletim, 29), 2016.

LIU, S. Q.; GUI, Y. I.; GU, S. R.; XU, T. Y. Induction of endosperm calluses and regeneration of endosperm plantlets of *Asparagus officinalis*. **Acta Botanica Sinica**. 29:373–376, 1987.

LO, K. H.; GILES, K. L.; SAWHANEY, V. K. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confuse* hybrids (African violet) cultured in vitro. **Plant Cell Reports**. 16: 416-420, 1997.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; DA GLORIA, B. A. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 50: 239-247, 2007.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. **Boletim de Biotecnologia**. 77: 18-29, 2004.

LOUREIRO, J.; CAPELO, A.; BRITO, G.; RODRIGUEZ, E.; SILVA, S.; PINTO G.; SANTOS, C. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. **Biologia Plantarum**. 51: 14, 2007.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana. 2006. 416 p.

MACHNO, D.; PRZYWARA, L. Endosperm culture of *Actinidia* spp. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 39:55–61, 1997.

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

MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. Y. The edible species of *Passiflora*. **Economical Botany**. 24: 333-343, 1970.

MARTINS, M. R.; REIS, M. C.; MENDES NETO, J. A.; GUSMÃO, L. L.; GOMES, J. J. A. Influência de diferentes métodos de remoção do arilo na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* deg.). **Revista FZVA**. 13: 28-38, 2006.

MEDRANO, R. M. E. G.; BORGES, J. I. M.; TAN, M. J. B.; GONZÁLEZ, N. V.; KU-CAUICH, J. R. Using flow cytometry and cytological analyses to assess the genetic stability of somatic embryo-derived plantlets from embryogenic *Musa acuminata* Colla (AA) ssp. *malaccensis* cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 116: 175-185, 2014.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Passionfruit breeding: past and future. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds). **Passionfruit: germplasm and breeding**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2005. p. 55–78.

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

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. *emphylocalyx*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. 98: 291–301, 2009.

MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**. 57: 571-573, 2000.

MONTEIRO, A. D. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 36: 527-531, 2000.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero *Passiflora***. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2000. 82 p. (Dissertação- Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)

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

MOURA, T. L.; DE ALMEIDA, W. A. B.; MADALENA, B.; MENDES, J.; FILHO, F. D. A. A. M. Organogênese in vitro de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 23: 240-245, 2001.

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.

NAIR, S.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Reports**. 5: 132–135, 1986.

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

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

OTONI, I. W. C.; BLACKHALL, N. W.; D'UTRA VAZ, B.; CASALI, V. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species. *P. edulis* *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**. 46: 777–785, 1995.

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

OZAROWSKI, M.; BLASZKIEWICZ, S.; GRYSZCZYNSKA, A.; THIEM, B.; BUDZIANOWSKI, J. Search for C-glycosyl flavones and phenolic acids in callus and shoot in vitro culture of *Passiflora caerulea* L. **International conference: "Business meets science to cooperate in current topics"**. Bioconnect. Poznan, Poland. 2012.

OZAROWSKI, M.; SEDZIK, K.; GRYSZCZYNSKA, A.; THIEM, B. Optimization of conditions for in vitro propagation of valuable medicinal plants of *Passiflora incarnata* L. and *P. caerulea* L. International conference: **"Facilitating dialogue between business and academia"**. Bioconnect. Poznan, Poland. 2013a.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B.; GRYSZCZYNSKA, A.; BUDZIANOWSKI, J. Studies on in vitro seed germination and plant regeneration from mature leaf, internodal and petiole explants of *Passiflora caerulea* L. **56th Convention of the Polish Botanical Society**, Interdisciplinary and Practical Significance of Botanical Sciences. Olsztyn, Poland. 2013b.

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

ORBOVIE, V.; CALOVIE, M.; VILORIA, Z.; NIELSEN, B.; GMITTER, F. G. J. R.; CASTLE, W. S.; GROSSER, W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. **Euphytica**. 161:329–335, 2008.

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, C. A.; SCHUTZER, K.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; MONTERO, D. A. V.; MELETTI, L. M. M. Physicochemical and sensory analyses of purple and yellow passion fruit. **International Research Journal of Horticulture**. 2: 1–5, 2014.

PAIM PINTO, D. L. **Embriogênese somática, expressão do gene *Serk* e otimização da transformação genética via SAAT mediante avaliação transiente do gene *Gus* em *Passiflora* spp.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 105p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).

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

PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma in vitro e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: 49 Faleiros, F.; Junqueira, N.; Braga, M. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005, p. 361-383.

PILARSKA, M.; MALEC, P.; SALAJ, J.; BARTNICKI, F.; KONIECZNY, R. High expression of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* coincides with initiation of various developmental pathways in vitro culture of *Trifolium nigrescens*. **Protoplasma**. 1-11, 2015.

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

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

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**. Humana Press, pp. 153-162. 2010.

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

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. 1: 26-37, 1995.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 86: 285– 301, 2006.

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. **Pelagia Research Library**. 2: 707-711, 2012.

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

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

RIZVI, M.Z.; DAS, S.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P.S. Somatic Embryogenesis in Monocots. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (Eds.). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 18-34.

ROCHA, D. I.; 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.; DORNELAS, M. C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews - A reviews journal covering agriculture, global health, nutrition, natural resources and veterinary science**. 8: 1-17, 2013.

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, 2015a.

ROCHA, D. I.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of *SERK* gene expression. **Protoplasma**.1:15, 2015b.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; AIZZA, L. C. B.; DORNELAS, M. C. A passion fruit putative ortholog of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 gene is expressed throughout the in vitro *de novo* shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.1-11, 2016.

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

ROSA, Y. B. C. J.; BELLO, C. C. M.; DORNELAS, M. C. In vitro organogenesis and eficiente plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae). **In vitro Cellular e Developmental Biology Plant**.120: 69-77, 2015a.

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, 2015b.

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

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. K.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI,

R.; PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA, 1996. 64p. (Série FRUTPEX, 19).

RUGGIERO, C. **Maracujá: do plantio à colheita**. In: Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Maracujazeiro, 5, Jaboticabal, 1998, 388p.

SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P. K. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**. 32: 741-757, 2013.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F.; BARBOSA, C. J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 239-280.

SEHGAL, C. B.; KHURANA, S. Morphogenesis and plant regeneration from cultured endosperm of *Emblica officinalis* Gaertn. **Plant Cell Reports**. 4:263–266, 1985.

SEHGAL, C. B.; ABBAS, N. S. Induction of triploid plantlets from the endosperm culture of *Mallotus philippensis* Mull. **Argic Phytomorphology**. 46:283–289, 1996.

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

SILVA, M. L.; PAIM-PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue 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, T. C. R.; CARVALHO, C. R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 50:158-165, 2013.

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**. 1:7, 2015.

SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; LANII, E. R. G.; CARVALHO, I. F.; ROSSI, A. A. B. E.; OTONI, W. C. Sementes sintéticas de uma espécie selvagem de maracujá com potencial ornamental. **Horticultura Ornamental**. 21: 331-338, 2015.

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

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of Society for Experimental Biology Journal**. 11: 118–131, 1957.

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

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2:704, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 3:768, 2012.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12. July 2012. 2001(onwards). Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Último acesso em 26/08/2016.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II: organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**. 45: 705–708, 1958.

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

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

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

VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M. E.; BLAKESLEE, A. F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science**. 94:350–351. 1941.

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

VASIL, I. K. A brief history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**. 27: 1423-1440, 2008.

VAVILOV, N. I. **Origin and geography of cultivated plants**. Cambridge: Cambridge University, 1992. 498p.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. *Passiflora* spp., passionfruit. In: Litz, R.E. (ed.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. CABI Publishing, Oxford, pp. 435-453, 2004.

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D.; TAQUETTI, M. F.; DA SILVA, L.; OTONI, W. C. 2011. **Organogenese in vitro de *Passiflora setacea* D.C (*Passifloraceae*)**. XIII Congresso Brasileiro de fisiologia vegetal XIV Reuniao Latino-Americana de fisiologia vegetal do gene a planta. Buzios, Brasil.

VILELA, M. S. **Diversidade genética, produtividade e reação de progênies de maracujazeiro à doenças sob condições de campo**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília-Brasília, 2013, p. 183 (Tese de Doutorado).

VIVEIROS FLORA BRASIL: **FB 200 – Araguarié FB-300 - Maguary** [Araguari-MG]: 2008. Disponível em: <<http://www.viveiroflorabrasil.com.br/variedade.html>>. Acesso em 18 Agosto 2016.

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

WALIA, N.; KAUR, A.; BABBAR, S. B. Proliferation and differentiation from endosperms of *Carthamus tinctorius*. **Biologia Plantarum**. 51, 749–753, 2007.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**. 57: 443-462, 1986.

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

YEUNG, E. C.; Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. **In vitro embryogenesis in plants**. p. 205- 247, 1995.

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.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. 5: 1411, 1993.

## CAPÍTULO I

---

### **Avaliação das respostas morfogênicas durante o cultivo de embriões zigóticos sob irradiância em populações comerciais (FB200 e FB300) de *P. edulis* Sims.**

#### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi descrever as respostas morfogênicas durante a indução e a histodiferenciação da embriogênese somática na presença de irradiância das 'populações FB-200 Yellow Master e FB- 300 Araguay' de *Passiflora edulis*. Embriões zigóticos foram cultivados em meio de indução compostos por sais básicos de MS e suplementado com 2,4-D (13,57; 18,10; 22,62; 27,15; 31,67; 36,20; 40,72 e 45,25  $\mu\text{M}$ ) combinados com 4,5  $\mu\text{M}$  de BA. Os experimentos foram mantidos em sala de cultivo sob irradiância, à temperatura  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . As avaliações foram realizadas aos 40 dias em meio de indução e aos 60 dias para a histodiferenciação. Nas duas populações de a morfogênese ocorreu pelas vias embriogênica e organogênica. Para a variedade FB200 aos 40 dias a maior produção de embriões somáticos ocorreu por via indireta na concentração de 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D, enquanto que por via direta a maior média foi obtida o maior de embriões somáticos produzidos ocorreu por via indireta na concentração de 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA, enquanto que por via direta em 40,72  $\mu\text{M}$  2,4-D. A organogênese direta foi observada no tratamento na ausência de PGRs e por via indireta na concentração de 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D. Aos 60 dias de cultivo o maior número de embriões produzidos via indireta foi no na presença de 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D e para a para organogênese, a maior média ocorreu por via direta no tratamento com 27,15  $\mu\text{M}$  2,4-D e indireta em 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D. A caracterização anatômica confirmou a morfogênese in vitro pelas vias embriogênica e organogênica.

**Palavras-chave:** Morfogênese in vitro, Embrião somático, Maracujá, Irradiância.

**Evaluation of morphogenic responses during culture of zygotic embryos under irradiation in commercial populations (FB200 and FB300) of *P. edulis* Sims.**

**ABSTRACT**

The objective was to describe the morphogenic responses during the induction and histodifferentiation of somatic embryogenesis in the presence of irradiance of the 'FB-200 Yellow Master and FB-300 Araguary' populations of *Passiflora edulis* Sims. Zygote embryos were cultured in induction medium composed of basic salts of MS supplemented with 2,4-D (13.57, 18.10, 22.62, 27.15, 31.67, 36.20, 40.72 and 45.25  $\mu\text{M}$ ) combined with 4.5  $\mu\text{M}$  BA. The experiments were kept in culture room under irradiance at  $26 \pm 2$  °C. The evaluations were performed at 40 days in induction medium and at 60 days for histodifferentiation. In both populations the morphogenesis occurred through the embryogenic and organogenic pathways. For the FB200 variety at 40 days, the highest production of somatic embryos occurred indirectly at a concentration of 22.62  $\mu\text{M}$  2,4-D, whereas by direct route the highest average was obtained from somatic embryos produced indirectly in the concentration of 22.62  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4.5  $\mu\text{M}$  BA, whereas directly in 40.72  $\mu\text{M}$  2,4-D. Direct organogenesis was observed in the treatment in the absence of PGRs and indirectly in the concentration of 13.57  $\mu\text{M}$  2,4-D. At 60 days of culture the largest number of embryos produced indirectly was in the presence of 22.62  $\mu\text{M}$  2,4-D and for the one for organogenesis, the highest mean occurred directly in the treatment with 27.15  $\mu\text{M}$  2,4-D and indirect in 13.57  $\mu\text{M}$  2,4-D. The anatomical characterization confirmed in vitro morphogenesis by the embryogenic and organogenic pathways.

**Keywords:** In vitro morphogenesis, Somatic embryo, Passion fruit, Irradiance.

## 1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um fenômeno definido como um exemplo de plasticidade no desenvolvimento de células vegetais (Fehér, 2008; 2015). Esta via de regeneração envolve uma série de eventos através das quais células somáticas sob condições indutivas desenvolvem células embrionárias (Zimmerman, 1993).

Mudanças morfológicas e bioquímicas são fundamentais para a formação de embriões somáticos, onde diferentes e complexos padrões de desenvolvimento são requeridos, como a dediferenciação celular, a ativação e as divisões celulares, reprogramação do metabolismo, fisiologia e expressão de genes que estão envolvidos na geração de células embriogênicas (Nomura e Komamine, 1985; Quiroz-Figueroa et al., 2002; Rose et al., 2010).

O processo de regeneração pela via embriogênica ainda não é aplicável para todas as espécies, principalmente nas fases da aquisição da competência, considerado um fator fundamental para desencadear o processo (Yang e Zhang 2010; Duclercq et al., 2011).

No sistema embriogênico uma estrutura bipolar é formada e se assemelha ao embrião zigótico e desenvolve-se na ausência de conexão vascular com o tecido de origem (Zimmerman, 1993). Os estágios de desenvolvimento são típicos do embrião zigótico durante a fertilização (Yang e Zhang, 2010; DeFillipis, 2014). Sendo considerada fase complexa, perante a capacidade das células somáticas em readquirir a totipotência das células embrionárias destinadas a produção de embriões (Fehér, 2015).

A espécie *Passiflora edulis* Sims é conhecida pelo valor comercial e econômico, além das características de palatibilidade, qualidade e rendimento de seus frutos e importância farmacológica (Tozzi e Takaki, 2011). Estudos referente à obtenção embriogênese somática tem sido descrito para algumas espécies de *Passiflora*, através de suspensões de celulares de *P. giberti* (Otoni et al., 1996), segmentos de raiz transformada via *A. rhizogenes* (Reis et al., 2007), a partir de embriões zigóticos (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012a; Rocha et al., 2015; Rosa et al., 2015; Ferreira et al., 2015; Silva et al., 2015).

Os protocolos já estabelecidos de embriogênese somática na fase de indução para espécies do gênero *Passiflora* são exclusivamente na ausência de luz. A ausência de irradiância durante a indução da embriogênese somática de acordo com George et al. (2008), é devido o fato que crescimento de calos e as divisões celulares iniciais são impedidos sob a exposição de fotoperíodo sendo o ambiente ausente de luminosidade recomendado para a diferenciação celular (Takayama e Misawa, 1980; Priyadarshi e Sen, 1992).

A exposição dos explantes a irradiância pode inibir a formação de calos devido ao fato de estar associado ao aumento de compostos fenólicos no explante, contribuindo para o aumento destes compostos gradativamente com o aumento da incidência de luz (Davies, 1972). Além disso, o desenvolvimento vegetal é inteiramente influenciado pela qualidade de luz recebida, através de fotorreceptores denominados de fitocromo que são pigmentos envolvidos no fenômeno de fotomorfogênese, sendo responsável por regular a expressão gênica (Spalding e Folta, 2005).

Atualmente, tem se estabelecido protocolos com uso de irradiância testando a incidência de luz (fluxo de fótons), qualidade (comprimento de onda) na morfogênese in vitro (Reuveni e Evenor, 2007; Chen et al., 2014) Michler e Lineberger. (1987) relatam que no cultivo de suspensões celulares de cenoura (*Daucus carota*) submetidas a diferentes espectros e intensidades de luz, resultou na formação de embriões somáticos.

Outro fator que influencia na morfogênese in vitro é o controle e o balanço entre os reguladores de crescimento, que pode induzir a obtenção de obter ambas as vias morfogênicas a embriogênese somática e a organogênese (Dornelas et al., 1992; Jeannin et al., 1995; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2010; Bouamama et al., 2011; Lu et al., 2013; Rocha et al., 2016).

Estudos realizados com as espécies *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*, a regeneração ocorreu por ambas às vias morfogênicas, através de um único tipo de explante são considerados importantes para a elucidação dos fatores envolvidos e nos mecanismos moleculares das células somáticas quanto a sua totipotencialidade e pluripotencialidade (Kraut et al., 2011; Wang et al., 2011).

Dado ausência de informações na literatura sobre a capacidade de aquisição de competência e da diferenciação celular no desenvolvimento de

embriões somáticos utilizando-se embriões zigóticos como fonte de explante na presença de irradiância em *Passiflora*. O objetivo do trabalho foi descrever as respostas morfogênicas durante a indução e a histodiferenciação da embriogênese somática na presença de irradiância em ‘populações comerciais “FB-200 Yellow Master e FB- 300 Araguary” de *Passiflora edulis* Sims.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e indução da embriogênese somática

Sementes de *P. edulis* ‘das populações FB-200 Yellow Master’ e ‘FB-300 Araguari’, foram fornecidos pelo Viveiro Flora Brasil Ltda, Araguari - MG.

Primeiramente o tegumento das sementes foram removidos com auxílio de uma mini-morsa (Reis et al., 2007). As sementes foram desinfetadas em câmara de fluxo laminar, mediante imersão em álcool 70% (v/v) por 2 minutos, em seguida em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) por 25 minutos, e acrescentado 2 gotas de Tween 20 a 0,1 % (v/v) em 100 mL de solução. Após as sementes foram submetidas a três enxágues consecutivos em água destilada e autoclavada e mantidas em *overnight* em água estéril para hidratação e facilitar a remoção dos embriões zigóticos.

Os embriões zigóticos foram removidos assepticamente dos endospermas e inoculados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de MS, 0,01% e (p/v) de mioinositol, 3% (p/v) de sacarose e 8 gL<sup>-1</sup> (p/v) de Ágar (Acumedia®) como agente gelificante, acrescido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzil-adenina (BA). As concentrações dos reguladores de crescimento para a indução da embriogênese somática foram: T1) Tratamento controle T1) MS; T2) 13,57µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA; T3) 18,10 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA; T4) 22,62 µM+ 4,5 µM de BA; T5) 27,15 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA; T6) 31,67 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA; T7) 36,20 µM DE 2,4-D + 4,5 µM de BA; T8) 40,72 µM + 4,5 µM de BA; T9) 45,25 µM de 2,4-D + 4,5 µM de BA.

O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 1 e posteriormente autoclavado durante 15 minutos á 121°C e 1,1 atm de pressão. Os embriões foram inoculados em placas de Petri de poliestireno cristal (90 x 15 mm) contendo 30 mL de meio e vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®), e

mantidos em sala de cultivo sob irradiância  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas de luz.

## **2.2. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos**

Após 40 dias de cultivo em meio de indução, os explantes foram transferidos para o meio de maturação e histodiferenciação dos embriões somáticos, composto por sais básicos de MS, vitaminas de MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% de sacarose (p/v), gelificado com Ágar  $8 \text{ gL}^{-1}$  (p/v).

O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 1$  e posteriormente foi autoclavado durante 15 minutos á  $121^\circ\text{C}$  e 1,1 atm de pressão. Após foram vertidos 30 mL meio em placas de Petri de poliestireno cristal (90x15mm) e após solidificadas foram vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®) e cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

## **2.3. Caracterização anatômica**

O explantes foram fixados em solução de FAA 50% (formalina: ácido acético: álcool etílico na proporção de: 5:5:90) (Johansen, 1940) e em seguida foram desidratados em três séries crescentes de álcool (70, 80 e 90%) e posteriormente embebidas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Os cortes transversais e longitudinais com  $5 \mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótopo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (O' Brien e McCully, 1981).

A captura de imagens foram realizadas em microscópio (Nikon Infinity 2.0/Japão) e fotografadas utilizando software de análise de imagem (NIS-Elements 2.0/Nikon/Japão).

## **2.4. Análise estatística**

O experimento seguiu o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). As características avaliadas foram à frequência de formação de calos pró-embriogênicos e não embriogênicos, número embriões somáticos e de brotos formados de forma direta e/ou indireta aos 40 dias de cultivo in vitro. Na fase

de histodiferenciação avaliou-se o número de brotações e embriões somáticos por via direta e indireta aos 60 dias de cultivo.

O experimento de indução da embriogênese somática foi composto por 10 repetições por tratamento, sendo representado por uma placa de Petri contendo 10 embriões zigóticos. Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as medias foram comparados pelo teste Tukey 5% analisados através do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

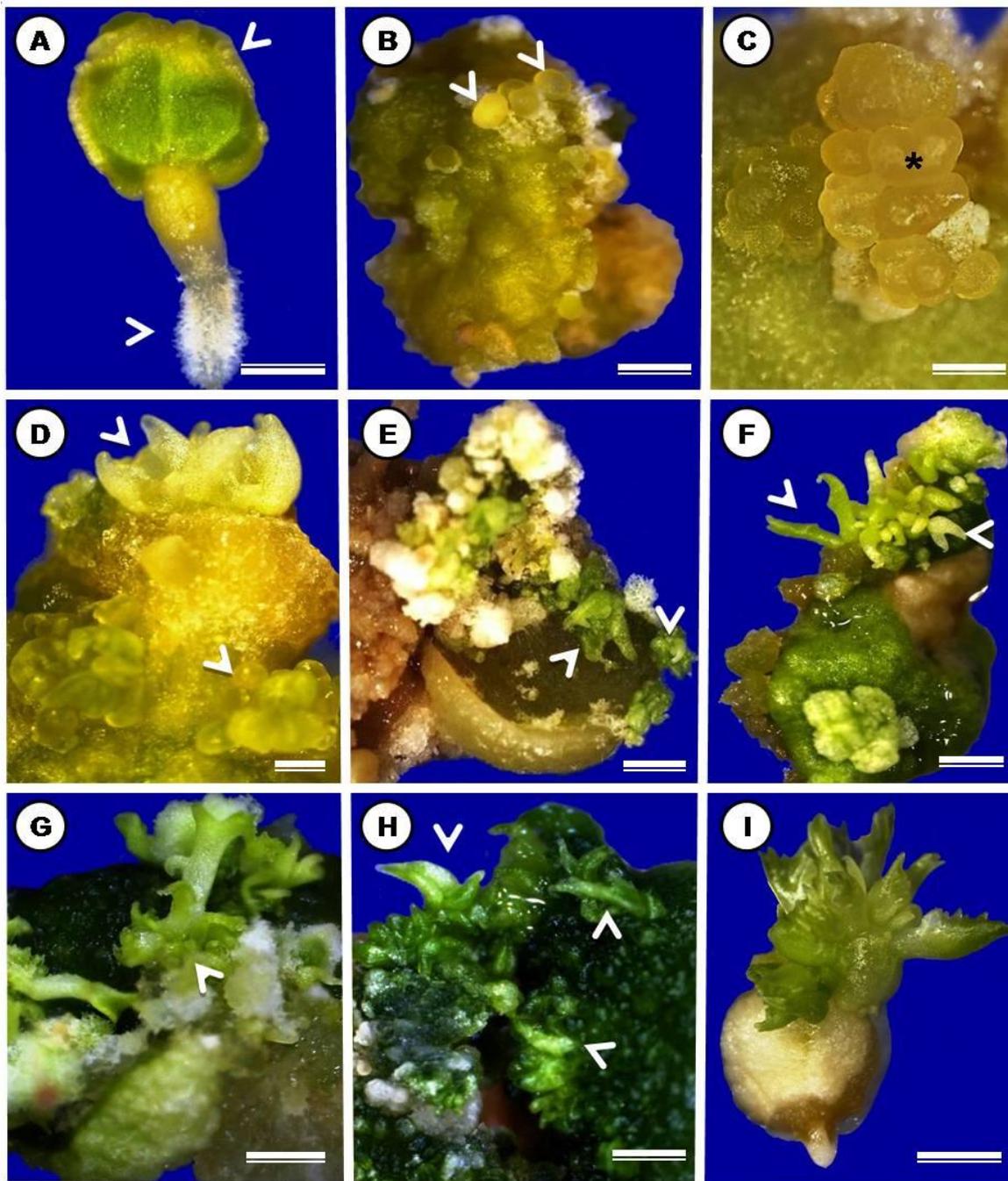
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Indução da embriogênese somática em *P. edulis* população 'FB-200' na presença de irradiância.**

Os embriões zigóticos da população 'FB-200', cultivados sob irradiância aos 10 dias de cultivo in vitro na presença de 2,4-D e BA iniciaram o intumescimento principalmente na região das bordas dos cotilédones (Figura 1A). Aos 20 dias de cultivo, primórdios dos embriões globulares já estavam visíveis (Figura 1B) e no tratamento controle os explantes apresentaram intumescimento na região dos cotilédones do embrião zigótico.

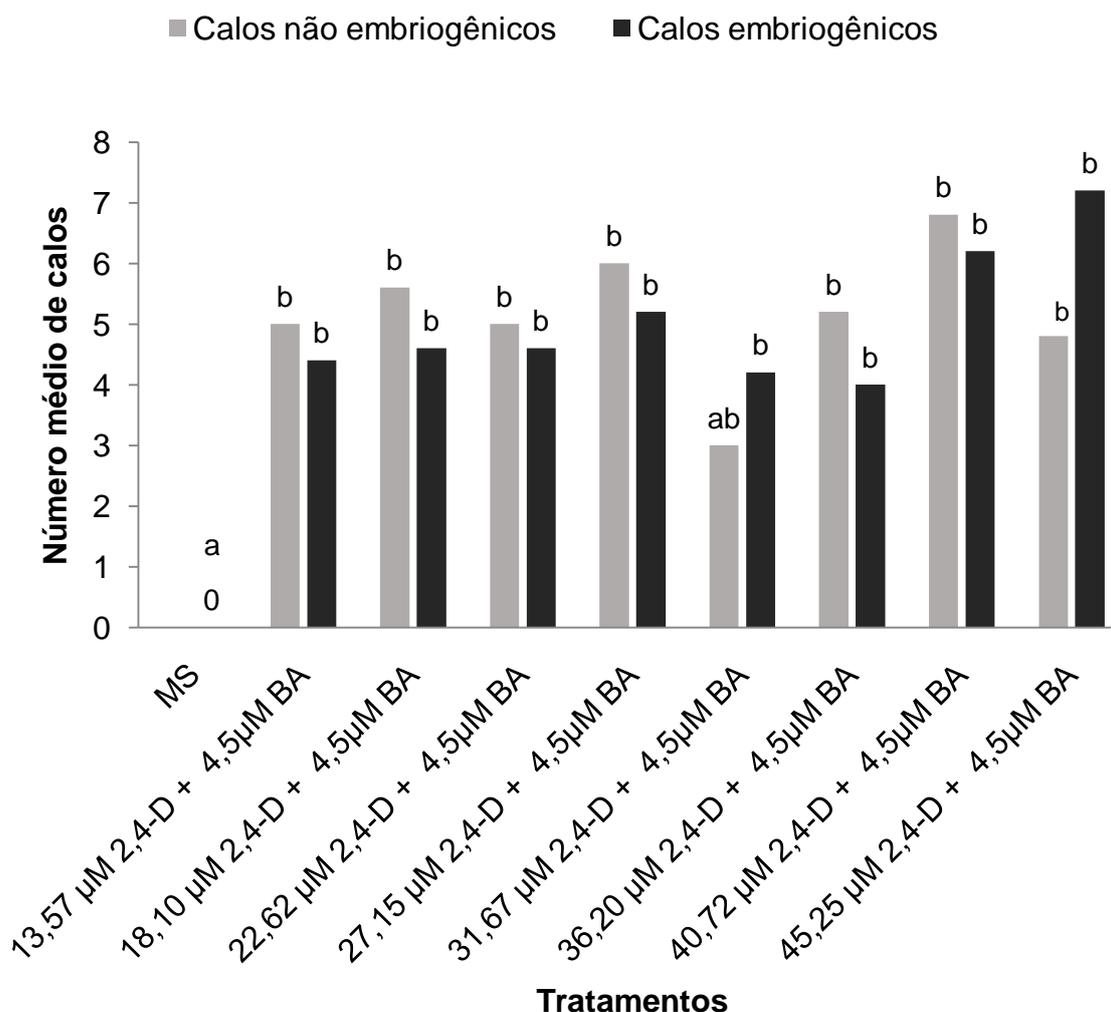
Aos 30 dias foi possível observar embriões somáticos em fase cordiforme de coloração amarelada de aspecto brilhante (Figura 1C) principalmente nas concentrações de 18,10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  BA e 22,62  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  BA. Os calos não embriogênicos apresentaram coloração branca e de aspecto pouco friável. Neste período de cultivo estruturas organogênicas e brotações em desenvolvimento foram observadas (Figura 1D). Explantes cultivados na presença de 40,72  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  BA já apresentaram brotações adventícias de forma direta e indireta nas regiões dos cotilédones e no eixo do embrião zigótico conforme observado na Figura 1E

Aos 40 dias de cultivo a frequência de explantes que apresentaram calos pró- embriogênicos e não embriogênicos no meio de indução não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, ocorreu maior proliferação de calos pró-embriogênicos nos tratamentos com 45,25  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA com média de 7,2 calos. A maior frequência de calos não embriogênicos foram nos tratamentos acrescidos de 40,72  $\mu\text{M}$  de 2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA (Figura 2).



**Figura 1:** Morfogênese in vitro pelas vias embriogênica e organogênica *Passiflora edulis* 'FB-200' cultivados sob irradiância. (A) Explante com início do desenvolvimento de estruturas embriogênicas nas regiões dos cotilédones do embrião zigótico (setas superior) e alongamento do eixo embrionário (seta inferior); (B) Formação de estruturas embriogênicas (setas); (C) Embrião somático em fase cordiforme (asterisco); (D) Embrião somático em fase pré-cotiledonar oriundos da concentração de 40,72  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e embrióides (seta inferior); (E) Embriões cotiledonares (setas) no tratamento com 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (F) Estruturas organogênicas na superfície do cotilédone no tratamento com 27,15  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (G) Estruturas organogênicas na superfície do

cotilédone no tratamento com 27,15  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (H) Estruturas organogênicas por via direta na superfície cotiledonar do tratamento com 40,72  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (I) Estruturas organogênicas bem desenvolvidas produzida no meio de histodiferenciação no tratamento com 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Barras: (A) 50  $\mu\text{m}$ ; (B) 60  $\mu\text{m}$ ; (C) 130  $\mu\text{m}$ ; (D) 110  $\mu\text{m}$ ; (E) 70  $\mu\text{m}$ ; (F) 60  $\mu\text{m}$ ; (G) 80  $\mu\text{m}$ ; (H) 70 $\mu\text{m}$ ; (I) 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2:** Resposta morfogênica na produção de calos embriogênicos e não embriogênicos a partir de embriões zigóticos como fonte de explantes cultivados na presença de irradiância em *P. edulis* (população 'FB-200') aos 40 dias de cultivo in vitro. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 40 dias de cultivo foi avaliado o número médio de embriões somáticos em meio de indução e de primórdios de brotações, diferindo estatisticamente entre si, no entanto, apresentou maior média de 1,4 embriões

por via direta com a concentração de 40,72  $\mu\text{M}$  e maior produção com média de 6,4 embriões de forma indireta no tratamento 22,62  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Tabela 1). No tratamento com 27,15  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentou por via direta maior média de 9,4 brotos, seguido por via indireta com média de 19,8 brotações com 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,5  $\mu\text{M}$  de BA (Tabela 1).

**Tabela 1:** Respostas morfogênicas aos 40 e 60 dias de cultivo in vitro de *Passiflora edulis* população 'FB-200' cultivadas em meio de indução e histodiferenciação.

Tratamentos ( $\mu\text{M}$ )	Embriogênese Somática				Organogênese			
	Direta		Indireta		Direta		Indireta	
	40 Dias	60 Dias	40 Dias	60 Dias	40 Dias	60 Dias	40 dias	60 Dias
MS	0,0 b	0,0 a	0,0 c	0,0 d	10,2 a	9,4 abc	0,0 b	0,0 d
13,57 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 a	0,0 b	0,0 d	5,0 abc	6,8 bcd	19,8 a	8,8 a
18,10 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 a	2,8 b	2,8 b	1,6 bc	3,4 cd	6,8 b	8,0 a
22,62 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 a	6,4 a	6,6 a	3,4 abc	9,0 abc	8,8 b	3,4 b
27,15 2,4-D+ 4,5 BA	0,2 b	0,0 a	3,2 b	3,4 b	9,4 ab	14,4ab	2,4 b	2,0 cd
31,67 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 a	0,4 c	0,2 cd	6,8 abc	9,8 abc	7,0 b	5,2 b
36,20 2,4-D+ 4,5 BA	0,2 b	0,0 a	0,0 c	0,0 d	2,8 abc	1,2 d	1,4 b	0,6 d
40,72 2,4-D+ 4,5 BA	1,4 a	0,2 a	3,0 b	3,0 b	2,6 abc	14,8 a	5,0 b	4,4 bc
45,25 2,4-D+ 4,5 BA	0,2 b	0,0 a	1,8 bc	1,8 bc	0,4 c	1,4 d	6,0 b	4,0 bc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ( $p \leq 0.05$ ).

Embriões somáticos em estágios cotiledonares foram observados pela via direta (Figura 1F) obtidos na concentração de 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e na Figura 1G a embriogênese indireta aos 60 dias de cultivo in vitro.

Proliferação de estruturas organogênicas e brotações adventícias diferenciadas foram formadas no meio de indução, como observado na Figura 1I, o desenvolvimento de multibrotações adventícias formadas na região do

cotilédone do embrião zigótico. No tratamento com 40,72  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA produziu maior número de brotos por via direta com média de 14,8 brotos (Tabela 1) e diferenças estatísticas não foram observadas.

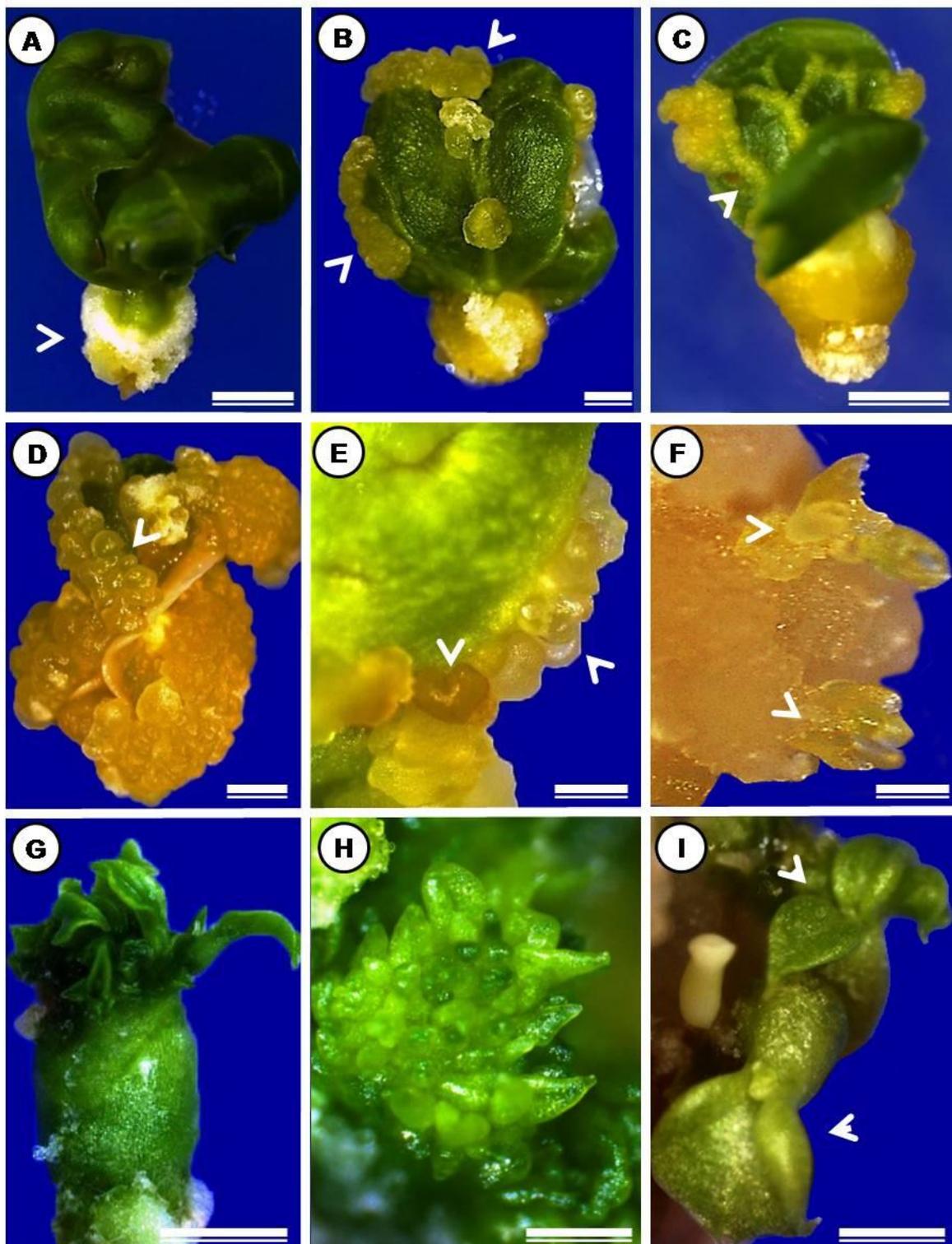
### **3.2. Indução da embriogênese somática em *P. edulis* população 'FB-300' na presença de irradiância**

A espécie *P. edulis* população 'FB-300', apresentou intumescimento e alongamento do eixo embrionário dos embriões zigóticos aos cinco dias de cultivo in vitro na presença de irradiância. Já após 10 dias de cultivo foi possível observar o início da formação de calos de coloração branca e pequenas estruturas embriogênicas no final do eixo embrionário (Figura 3A).

No decorrer do cultivo em meio de indução, estruturas potencialmente embriogênicas desenvolveram-se na superfície, na base e eixo embrionário (Figura 3B) e nas regiões de nervura dos cotilédones e a proliferação destas estruturas no embrião zigótico evidenciado na Figura 3C. No tratamento controle aos 7 dias de cultivo in vitro iniciou-se a germinação.

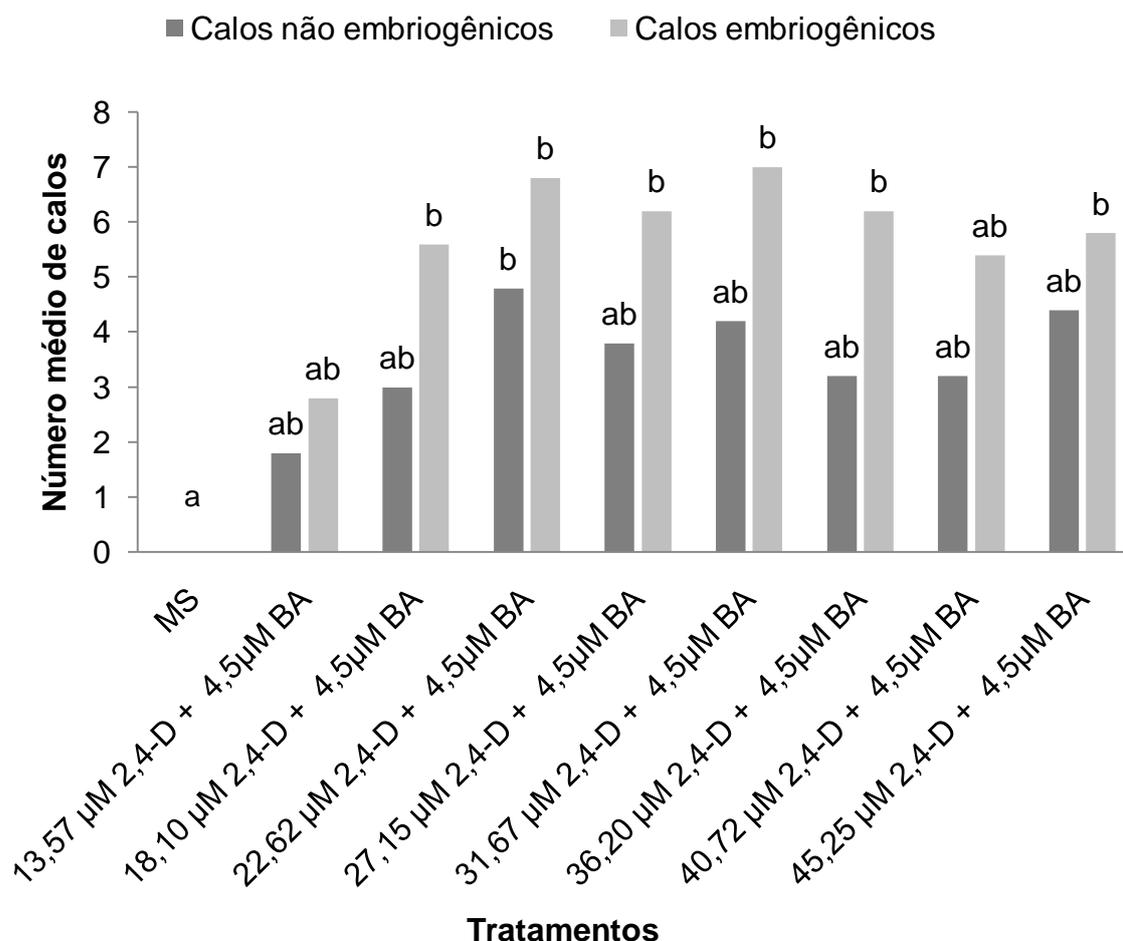
Aos 40 dias em meio de indução foi possível observar calos e estruturas pró-embriogênicas de aspecto amarelado e esverdeado, ambos compactos e brilhantes presentes desde o eixo embrionário, nas bordas dos cotilédones e nas nervuras do embrião zigótico (Figura 3D). Também ocorreu a diferenciação dos embriões somáticos, onde na Figura 3E pode-se observar embrião em estágio cordiforme. Já aos 60 dias em meio de histodiferenciação foi observado embriões somáticos em fase cotiledonar produzidos pela via indireta (Figura 3F) no tratamento com 2,4-D  $\mu\text{M}$  a 18,10; 27,15; 31,67; 40,72; 45,25 + 4,5  $\mu\text{M}$  BA.

Em meio de indução foram avaliados calos pró-embriogênicos e calos na ausência de potencial embriogênico. Na maioria dos tratamentos diferença significativas foram observadas. O tratamento com 22,62  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentou diferença significativa sendo a maior média com 4,8 de calos não embriogênicos. Já para as médias de calos pró-embriogênicos, ocorreu diferença entre os tratamentos (Tabela 2).



**Figura 3:** Morfogênese in vitro pelas vias embriogênica e organogênica *Passiflora edulis* (população 'FB-300'). (A) Protuberâncias pró-embriogênicas e calos no ápice do eixo embrionário; (B) Estruturas pró-embriogênicas na superfície, base e no eixo embrionário; (C) Presença de protuberâncias pró-embriogênicas nas nervuras cotiledonares (seta); (D) Embrióides (seta) na superfície do cotilédono; (E) Formação de embriões globular e cordiformes

(setas); (F) Embriões em fase cotiledonar (seta); (G) Brotações por via direta formadas na base do cotilédone do tratamento com 13,57  $\mu\text{M}$  2,4-D; (H) Multibrotações provenientes do tratamento com 13,57  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; (I) Embriões somáticos cotiledonares (setas) e embrião pré cotiledonar (asterisco)(setas) 13,57  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Barras: (A) 50  $\mu\text{m}$ ; (B) 150  $\mu\text{m}$ ; (C) 140  $\mu\text{m}$ ; (D)70  $\mu\text{m}$ ; (E)130  $\mu\text{m}$ ; (F)110  $\mu\text{m}$ ; (G)70  $\mu\text{m}$ ; (H)80  $\mu\text{m}$ ; (I)100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4:** Número médio de calos embriogênicos e não embriogênicos produzidos a partir de embriões zigóticos de *P. edulis* população 'FB-300' com 40 dias de cultivo em meio de indução. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embriões somáticos foram obtidos com maior média aos 60 dias no tratamento de 18,1  $\mu\text{M}$  2,4-D e aos 40 e 60 dias apresentaram média inferior á 2,0 de embriões somáticos, tanto por via direta quanto pela indireta (Tabela 2). Estruturas organogênicas e brotações adventícias proliferam nestas condições

de cultivo de forma indireta (Figura 3H) e direta (Figura 3I) no tratamento com 13,57  $\mu$ M 2,4-D + 4,5  $\mu$ M BA.

**Tabela 2:** Respostas morfogênicas aos 40 e 60 dias de cultivo de *P. edulis* população 'FB-300' cultivadas em meio de indução e histodiferenciação.

Tratamentos ( $\mu$ M)	Embriogênese Somática				Organogênese			
	Direto		Indireto		Direto		Indireto	
	40 Dias	60 Dias	40 Dias	60 Dias	40 Dias	60 Dias	40 dias	60 Dias
MS	0,0 b	0,0 c	0,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,2 a
13,57 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,2 bc	0,2 a	0,2 b	4,4 a	33,0 a	1,0 a	0,4 b
18,10 2,4-D+ 4,5 BA	2,2 a	0,2 bc	0,0 a	0,4 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	2,0 a
22,62 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,2 bc	0,0 a	0,2 b	1,6 b	0,6 b	0,0 b	0,4 b
27,15 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	1,6 a	0,0 a	0,2 b	0,0 c	1,8 b	0,0 b	2,0 a
31,67 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 c	0,0 a	0,2 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,4 b
36,20 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 c	0,0 a	0,2 b	0,0 c	0,8 b	0,0 b	3,20 a
40,72 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,0 c	0,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 b
45,25 2,4-D+ 4,5 BA	0,0 b	0,8 b	0,0 a	0,4 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	2,0 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ).

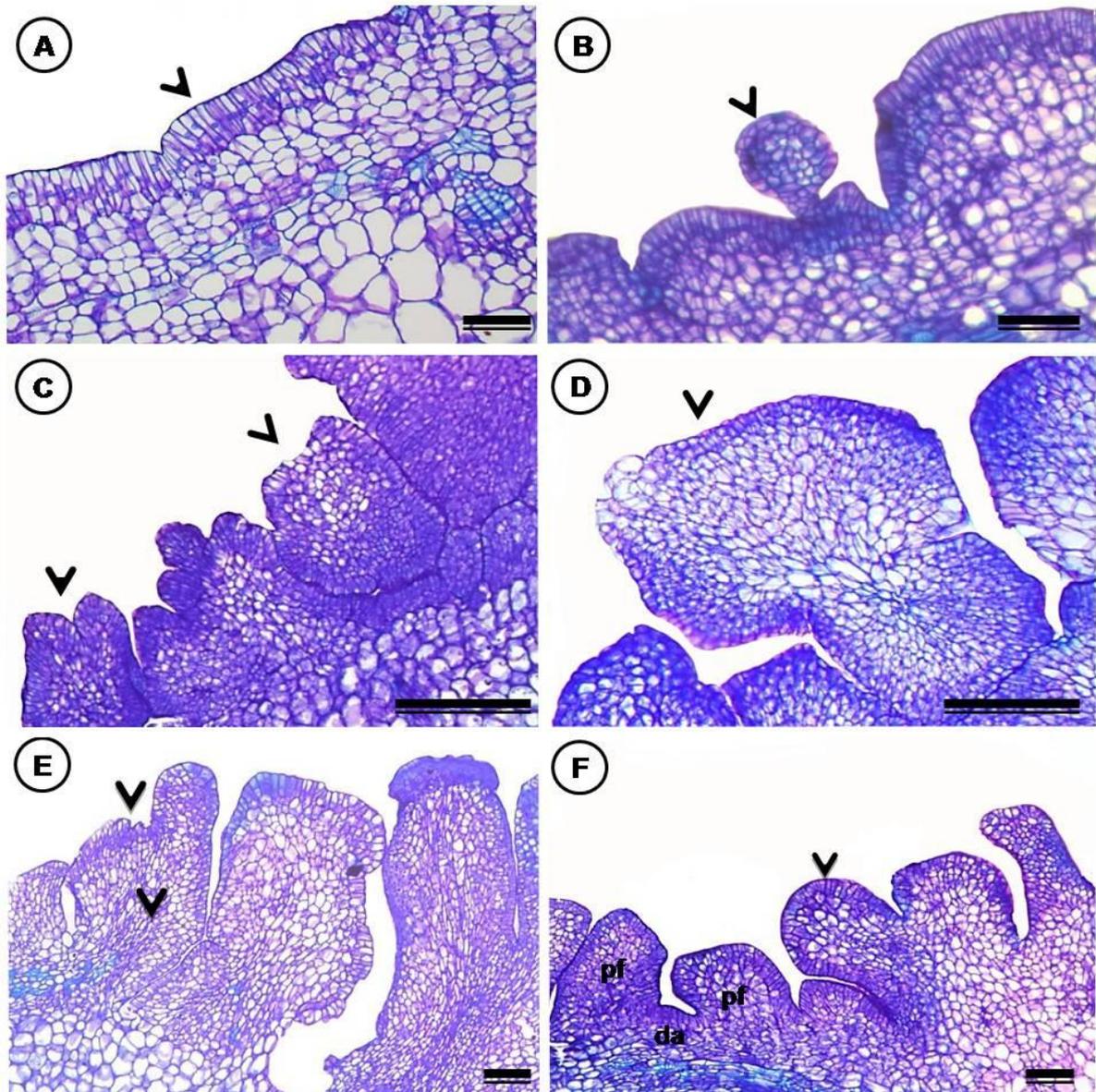
Ao decorrer das avaliações, as concentrações abaixo de 27,15  $\mu$ M de 2,4-D, induziram a formação de primórdios de brotações e emissão de raízes, quando comparada às concentrações mais elevadas de 2,4-D. O maior número de brotações por via direta foi obtido média de 33,0 brotos na concentração de 13,57  $\mu$ M de 2,4-D aos 60 dias de cultivo. As médias obtidas diferiram estatisticamente entre os tratamentos, conforme a tabela (Tabela 2).

### 3.3. Caracterização Anatômica

A análise histológica mostrou padrão desenvolvimento da embriogênese somática e organogênese em resposta ao cultivo de embriões zigóticos cultivados com 2,4-D+BA sob irradiância.

No desenvolvimento dos embriões somáticos de forma direta primeiramente ocorreu divisões celulares, preferencialmente na região cotiledonar do embrião zigótico no plano periclinal (Figura 5A). Nas regiões epidérmicas e subepidérmicas do explante inicial dividem-se intensamente e podem-se diferenciar células potencialmente embriogênicas que são de tamanho reduzido comparado com as células não embriogênicas que são maiores, paredes finas e citoplasma denso. As células de origem dos embriões somáticos dividem-se ativamente nestas regiões como observado na Figura 5B. Embriões somáticos estão presentes na superfície dos cotilédones do explante inicial em vários estágios de desenvolvimento (Figura 5 C). Embrião somático em estágio cotiledonar com células da protoderme e primórdios foliares, também evidenciando a ausência de conexão vascular com o tecido de origem (Figura 5 D).

A organogênese independente do padrão direto ou indireto ocorreu em todo o explante. Células em divisão desenvolveram estruturas típicas na formação de gema adventícias, como um aglomerado celular denominado de meristemóides (não mostrado) nas células parenquimáticas. Os primórdios dos brotos apresentam tecido fundamental e vestígios da formação do sistema vascular com conexão diretamente ao explante de origem (Figura 5E). Já apresentam os primórdios foliares, região do domo apical (túnica-corpo) e o desenvolvimento do sistema vascular (Figura 5F).



**Figura 5:** Caracterização dos eventos morfogênicos durante o cultivo in vitro de embriões zigóticos em meio suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D + BA em ambas as populações de *P. edulis* aos 40 dias de cultivo in vitro. (A) Divisões celulares periclinal na região cotiledonar do embrião zigótico; (B) Formação do embrião em estágio globular com células (seta); (C) Embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (setas); (D) Embrião somático cotiledonar com o eixo embrionário sem conexão com o explante (seta); (E) Primórdios dos brotos (setas) apresentam potencial morfogênico, com tecido fundamental e vestígios da formação do sistema vascular com conexão diretamente ao explante de origem; (F) Primórdios foliares (pf), com evidência do domo apical (da) e desenvolvimento procâmbio e dos primórdios foliares (setas). Barras: (A) 40  $\mu\text{m}$ ; (B) 50  $\mu\text{m}$ ; (C) 60  $\mu\text{m}$ ; (D) 70  $\mu\text{m}$ ; (E) 30  $\mu\text{m}$ ; (F) 40  $\mu\text{m}$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Embriogênese somática em espécies de *Passiflora* são exclusivamente obtidos na ausência de irradiância. Entretanto, o estudo demonstrou que o cultivo de embriões zigóticos sob irradiância e com os reguladores de crescimento 2,4-D e BA, induz a morfogênese in vitro pela via embriogênica e também pela organogênica. Assim, este é o primeiro relato de obtenção das vias morfogênicas nestas condições de cultivo nas populações FB-200 e FB-300 de *P. edulis*.

Estudos mostram que a luz tem feito na indução da embriogênese somática em diversas espécies como relatado em *Picea abies* L. (Verhagen e Wann, 1989), e que o efeito da luz na indução e proliferação do tecido embriogênico é dependente da espécie e dos genótipos (Economou e Read, 1987; Latkowska et al., 2000). Dados na literatura enfatizam que existem informações insuficientes e até mesmo conflitantes, que impedem a compreensão clara do papel da luz na morfogênese in vitro em plantas (Tapingkae et al., 2012). A integração da luz durante o cultivo in vitro possibilita induzir vias de sinalização hormonais e desencadear reações fisiológicas no controle e desenvolvimento vegetal (Briggs e Olney., 2001; Clouse 2001; Li et al., 2010).

A fotoperiodicidade pode modular o crescimento e o desenvolvimento da planta in vitro, principalmente através do fotomorfogênese, uma vez que a fotossíntese é limitada em condições de cultura de tecidos. Em certa medida, pode modificar os níveis endógenos de substâncias vegetais ou alterar a sensibilidade das células aos hormônios (Hutchinson et al., 2000).

O uso de embriões zigóticos como fonte de explante na obtenção de embriogênese somática, primeiramente foi descrita por Silva et al. (2009) com a espécie *P. cincinnata*, utilizando-se de 2,4-D combinado com BA. Sendo na fase de indução o cultivo realizado no escuro e após a transferência para a luz, durante histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos. A embriogênese somática em *P. edulis* foi obtida por (Paim Pinto et al., 2011; Rosa et al., 2015; Rocha et al., 2015) nas mesmas condições de cultivo de *P. cincinnata*.

O processo de indução de embriogênese somática na presença de irradiância foram observados em diversas espécies comercialmente importantes, tais como algodão, banana, morango, uva, batata, milho, orquídeas e lírio (Saebo et al., 1995; Nhut et al., 2003; Li et al., 2010).

O ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o regulador comumente utilizado para a indução da embriogênese somática do gênero *Passiflora*. Este PGR é sintético do grupo das auxinas, utilizado com eficiência na cultura in vitro (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011), sendo a sua aplicação um dos fatores principais para aquisição da competência celular em tecidos somáticos (Fehér et al., 2003) e o 2,4-D ainda exerce importante papel na regulação do ciclo celular, divisão e na diferenciação das estruturas vegetais em órgãos (Fehér et al., 2003; Gaaj, 2004; Fehér, 2005).

A capacidade de regeneração de plantas tem sido amplamente explorada na agricultura moderna (Sussex, 2008). A embriogênese somática, cuja formação do embrião é originada de células somáticas é um mecanismo natural de reprodução assexuada em algumas espécies de plantas e que pode ser induzida in vitro, sendo um processo típico de dediferenciação de retorno de uma célula somática diferenciada ao estado de células totipotentes (Xu e Huang et al., 2014).

O sistema de regeneração do maracujazeiro é baseado na organogênese (Zerbini et al., 2008), e tem sido a principal via de regeneração. Rocha et al. (2015), na indução de embriogênese somática em *P. edulis* FB-100 descreveu a obtenção da via organogênica a partir de um único explante o embrião zigótico, com uso de 72,4  $\mu\text{M}$  2,4-D e 4,5  $\mu\text{M}$  BA na ausência de irradiância. Para indução destas vias, as condições de cultivo in vitro podem resultar em diferentes respostas morfogênicas, sendo determinante a escolha adequada do explante, uma vez que tecidos juvenis, como dos embriões zigóticos são constituídos de células potencialmente totipotentes (Dornelas et al., 1992; Elhiti e Stasolla 2011), providos de genes específicos para desencadear a indução já expressa (Elhiti e Stasolla, 2011).

A formação dos embriões somáticos e/ou brotações iniciaram na superfície do explante, principalmente nos cotilédones do embrião zigótico. Trabalhos anteriores indicam que esta região do explante de *P. edulis* é a mais responsiva morfogênicamente (Paim-Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012b).

A embriogênese indireta foi predominante nos explantes da população FB-200 nas concentrações de 18,10 e 22,62  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Paim Pinto et al. (2011), ressaltaram que o genótipo 'FB-200' resultou maior número de calos em todos os níveis de 2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA. No entanto, para o genótipo FB-300 a embriogênese somática direta foi a que prevaleceu com maior produção na concentração com 18,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D aos 40 dias de cultivo in vitro.

Paim Pinto et al. (2011) relataram que este genótipo foi sensível á doses acima de 72,4 $\mu\text{M}$  de 2,4-D o que proporcionou a redução no número de calos embriogênicos Silva et al. (2009) destacam as concentrações de 18,10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,5  $\mu\text{M}$  de BA como indutora da melhor resposta na obtenção de embriões somáticos primários em *P. cincinnata*. O mesmo foi obtido por Rosa et al. (2014) com o uso das mesmas concentrações para *P. alata*, *P. crenata* e *P. edulis*. Isto demonstra que o 2,4-D combinado com BA é responsável por ativar genes designados á adquirir a competência celular, determinação e diferenciação das células em produzir embriões somáticos em *Passiflora* sp., ou o desenvolvimento de gemas adventícias.

O genótipo FB-200 respondeu na produção de brotações pela via direta em todos os tratamentos, com maior frequência nas concentrações (27,15; 31,67 e 40,72  $\mu\text{M}$  de 2,4-D) aos 60 dias de cultivo, enquanto que por via indireta foi obtido maior produção aos 40 dias de cultivo. Já as brotações adventícias por via direta no genótipo FB-300 ocorreu com maior produção na concentração de 13,57  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Os explantes juvenis são constituídos por células potencialmente totipotentes (Dornelas et al., 1992; Elhiti e Stasolla, 2011), e o embrião zigótico representa essas células com potencial embriogênico com genes competentes para a indução (Elhiti e Stasolla, 2011), e o explante em conjunto com o regulador de crescimento assume papel fundamental nas respostas e no sucesso da morfogênese in vitro para as espécies de maracujazeiros (Nick, 2014; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016).

O tratamento controle na ausência de reguladores de crescimento apresentou a formação de brotações adventícias em *P. edulis* 'FB-200'. A formação de brotações no tratamento controle aparentemente é devido ao fluxo de hormônios endógenos, uma vez que interferem diretamente na morfogênese in vitro (Hisano et al., 2016).

Estudo de caracterização anatômica da morfogênese in vitro de *Passiflora* permitiu observar a formação inicial das células somáticas até a formação de embriões ou gemas adventícias como descrito por (Apezzato-da-Glória et al., 1999, Fernando et al., 2007; Lombardi et al., 2007; Rocha et al., 2012a, b; Rosa e Dornelas, 2012).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo sobre duas populações de *P. edulis*, permitiu concluir que:

As diferentes concentrações de 2,4-D combinados com BA induzem a proliferação de células somáticas potencialmente competentes na indução da embriogênese somática em ambas as populações de *P. edulis*.

Embriogênese somática e organogênese ocorrem tanto de forma direta quanto indireta em ambas as populações de *P. edulis*

A embriogênese indireta ocorreu em maior número nos explantes da população FB-200 e não número de calos em todos os níveis de 2,4-D + 4,5 µM de BA. No entanto, para o genótipo FB-300 a embriogênese somática direta foi a que prevaleceu com maior produção aos 40 dias de cultivo.

A variedade FB-300 teve maior produção de brotações em concentrações menores de 2,4-D combinado com BA por via direta.

Já a variedade FB-200 respondeu na produção de brotações pela via direta em todos os tratamentos, com maior frequência nas concentrações (27,15; 31,67 e 40,72 µM de 2,4-D) aos 60 dias de cultivo, enquanto que por via indireta ocorreu maior produção aos 40 dias de cultivo.

O tratamento controle na ausência de reguladores de crescimento apresentou a formação de brotações adventícias em *P. edulis* 'FB-200'.

Através da caracterização anatômica pode-se confirmar a morfogênese in vitro pelas vias embriogênicas e organogênicas.

Sobre a anatomia comprovou que houve a indução das duas vias morfogênicas pela embriogênese somática e organogênese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A.; MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C. 2005. Morphological, anatomical, histochemical and ultrastructural studies of in vitro organogenesis of passionfruit. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; (eds) **Passionfruit: germplasm and breeding**, 1st edn. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 387–407.
- BOUAMAMA, B.; SALEM, A. B.; YOUSSEF, F. ,B.; CHAIEB, S.; JAAFOURA, M. H.; MLIJI, A.; GHORBEL, A. Somatic embryogenesis and organogenesis from mature caryopses pf North African barley accession “Kerkena” ( *Hordeum vulgare* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**. 47:321-327, 2011.
- BRIGGS, W. R.; OLNEY, M. A. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date.ive photochromes, two cryptochrome one, phototropin and onesuperchrome. **Plant Physiology**. 125:85–88. 2001.
- CHEN, J. R.; CHEN, Y. B.; ZIEMIAŃSKA, M.; LIU, R.; DENG, Z. N.; FILIPIAK, I. N.; LI, Y. N.; JIAO, J. X.; XIONG, X. Y. **Journal of Plant Growth Regulation**. 33: 295. 2014.
- CLOUSE, S. D. Integration light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. **Trends in Plant Science**. 6:443–445. 2001.
- DAVIES, M. E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures o Paul’s Scarlet Rose. **Planta**. 104, p. 50-65. 1972.
- DE FILIPPIS, L. F. “ CropImprovement Through Tissue Culture”. **In Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes**. Springer New York.pp. 289-346, 2014.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histological analysis o organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues o *Stylosanthes scabra*. **Annals of Botany**. 70:477–482, 1992.
- 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.
- ECONOMOU, A. S.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of in vitropropagation systems. **HortScience**. 22:751–754, 1987.
- ELHITI, M.; STASOLL, C. The use o zygotic embryos as explants or in vitro propagation: an overview. **Plant embryo culture: methods and protocols**. 710:229–255, 2011.
- FEHÉR.A.; PASTERNAK. T. P.; DUDITS. D. Transient o somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**.74:201–28. 2003.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In **Somatic embryogenesis**. pp 85–101. 2005.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**. 52:53–56, 2008.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta –Gene Regulatory Mechanisms**. 1849: 385-402, 2015.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the in vitro organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 91: 37-44, 2007.

FERREIRA, D. A. T.; SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for in vitro propagation without plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1:10, 2015.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**. 43: 27-47, 2004.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Effects of the physical environment. In **Plant propagation by tissue culture**. pp. 423-464, 2008.

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.

HUTCHINSON, M. J.; SENARATNA, T.; SAHI, S. V.; SAXENA, P. K. Light mediates endogenous plant growth substances in thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. 9:1–6, 2000.

JEANNIN, G.; BRONNER, R.; AND HAHNE, G.; Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuum* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. **Plant Cell Reports**. 15:200-204, 1995.

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

KRAUT, M.; WÓJCIKOWSKA, B.; LEDWOŃ, A.; GAJ, M. D. Immature zygotic embryo cultures of *Arabidopsis*. A model system for molecular studies on morphogenic pathways induced in vitro. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. 53: 59–67, 2011.

LATKOWSKA, M. J.; KVAALLEN, H.; APPELGREN, M. Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue or

Norway spruce. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. 36: 57-60, 2000.

LI, H. M.; XU, Z. G.; TANG, C. M. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 103: 155–163, 2010.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. D. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 50: 239-247, 2007.

LU, J.; CHEN, R.; ZHANG, M.; SILVA, J. A. T.; MA, G. Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature cotyledons of *Camellia nitidissima* Chi. **Journal Plant Physiology**. 170:1202–1211, 2013.

MICHLER, C. H.; LINEBERGER, R. D. Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 11: 189-207, 1987.

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

NHUT, D. T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 73: 43-52, 2003.

NICK, P. **Applied Plant Cell Biology: Cellular Tools and Approaches for Plant Biotechnology**. Springer Science & Business Media. 22, 2014.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology**. 79: 988-991, 1985.

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

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Protoplast isolation from leaf mesophyll of *Passiflora suberosa* L.: influence of age of donor plants. **Revista Ceres**. 43: 157-164, 1996.

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

PRIYADARSHI, S.; SEN, S. A revised scheme for mass propagation of Easter lily. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 30: 193–197, 1992.

QUIROZ-FIGUEROA, F.; FUENTES-CERDA, C.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**. 20: 1141-1149, 2002.

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.

REUVENI, M.; EVENOR, D. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1: 49-54, 2007.

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

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, A. O.; DA SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 111: 69-78, 2012b.

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

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; AIZZA, L. C. B.; DORNELAS, M. C. A passion fruit putative ortholog of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 gene is expressed throughout the in vitro *de novo* shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1-11, 2016.

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

ROSA, Y. B. C. J.; BELLO, C. C. M.; DORNELAS, M. C. Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 120: 69-77, 2015.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S. K.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. **In Plant developmental biology-biotechnological perspectives**. pp. 3-26. 2010.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 41: 177–185, 1995.

SILVA, M. L.; PAIM-PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; LOH, 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, 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**. 1-7, 2015.

SOUZA, L. B.; SILVA, E. M.; GOMES, R. L.; LOPES, A. C. A.; SILVA, I. C. V. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 34: 832-839, 2012.

SUSSEX, I. M. The scientific roots of modern plant biotechnology. **The Plant Cell**. 20:1189–1198, 2008.

SPALDING, E. P.; FOLTA, K. M. Illuminating topics in plant photobiology. **Plant Cell & Environment**. 28: 39–53, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Sinauer Associates, Inc: Sunderland, USA. 4ª Edição, 2006. 764p.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium bulboscales* grown in vitro: effect of various cultural conditions. **Physiologia Plantarum**. 46: 184–190, 1979.

TAPINGKAE, T.; ZULKARNAIN, Z.; KAWAGUCHI, M.; IKEDA, T.; TAJI, A. Somatic (asexual) procedures (haploids, protoplasts, cell selection) and their applications. In: **Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century**. pp. 141–162, 2012.

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

VERHAGEN, S. A.; WANN, S. R. Norway spruce somatic embryogenesis: High-frequency initiation from light-cultured mature embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 16: 103–111, 1989.

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

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69: 233-249, 2002.

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

XUE, M. F.; GUO, Y. L.; LI, M. Y.; PEI, Y. Effects of long-term subculture on embryogenesis capability of cotton callus and somatic variation. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**. 15: 19–21, 2002.

WANG, W.; ZHAO, X.; ZHUANG, G.; WANG, S.; CHEN, F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 95: 57-67, 2008.

WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; SHEAHAN, M. B.; AND ROSE, R. J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany**. 107: 599-609, 2011.

WAREING, P. Determination and related aspects of plant development. In: Smith, H.; Grierson, D. (eds). **The molecular biology of plant development**. p. 517–541, 1982.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**. 29: 36–57, 2010.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**. 13:1–9, 2010.

ZERBINI, M.; OTONI, W. C.; VIEIRA, M. L. C. Passionfruit. In: KOLE, C.; HALL, T. C. (Eds). **Compendium of transgenic crop plants fruits and nuts** (Tropical and subtropical). New York: John Wiley e Song. 2008, p. 213–234.

ZHANG, N.; FANG, W.; SHI, Y.; LIU, Q.; YANG, H.; GUI, R.; LIN, X. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 103:325–332, 2010.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. 5:1411-1423, 1993.

ZOGLAUER, K.; BEHRENDT, U.; RAHMAT, A.; ROSS, H. Somatic embryogenesis – the gate of biotechnology in conifers. **In Plant Tissue Culture**. 175–202. 2003.

## CAPÍTULO II

---

### **Produção de plantas diploides e triploides em *Passiflora edulis* Sims., População FB-300.**

#### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi estabelecer a organogênese *de novo* para a produção de plantas diploides e triploides em *P. edulis* Sims população FB-300. Embriões e endospermas foram cultivados em meio de MS com diferentes concentrações de Benzil-adenina (BA), Tidiazuron (TDZ) e Cinetina (CIN). Os explantes foram sob irradiância, à temperatura  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 60 dias de cultivo. O TDZ foi à citocinina que induziu a maior produção de brotações nos explantes. O maior número de brotos produzidos utilizando de embrião zigótico foi com  $4,54 \mu\text{M}$  de TDZ com média de 168,80. Nos explantes endospermicos somente foi produzida brotações na presença de TDZ, sendo o maior número obtido de 39,20 brotos na presença de  $6,81 \mu\text{M}$ . A análise em citometria de fluxo de tecido foliar de plântulas aclimatizadas revelou a diploidia ( $2n$ ) quando de origem a partir do embrião zigótico e triploidia ( $3n$ ) a partir de tecidos endospermicos.

**Palavras-chave:** Regeneração, Morfogênese in vitro, Maracujazeiro, Conteúdo de DNA.

## **Production of diploid and triploid plants in *Passiflora edulis* Sims., FB-300 population**

### **ABSTRACT**

The objective of the work was to establish the *de novo* organogenesis for the production of diploid and triploid plants in *P. edulis* Sims population FB-300. Embryos and endosperms were cultured in MS medium with different concentrations of Benzyl-adenine (BA), Thidiazuron (TDZ) and Kinetin (KIN). The explants were kept in culture room under irradiance, at temperature  $26 \pm 2$  °C for 60 days of culture. The TDZ was the cytokinin that most induced the production of shoots in the explants. The highest number of shoots produced using a zygote embryo was with a concentration of 4.54  $\mu$ M TDZ with a mean of 168,80 shoots at 60 days of cultivation. In the endosperm explants shoots were only produced in the presence of TDZ, being the largest number obtained 39.20 shoots in the presence of 6.81  $\mu$ M TDZ. Morphogenic events were described using light microscopy. Flow cytometric analysis of leaf tissue of acclimatized seedlings revealed diploidy (2n) when originating from the zygotic embryos and triploidy (3n) from endosperm tissues.

**Key-words:** In vitro morphogenesis, Regeneration, Passion fruit, DNA content.

## 1. INTRODUÇÃO

A organogênese *de novo* é o principal processo de micropropagação, além de ser fundamental nos estudos da biologia do desenvolvimento em plantas (Ozawa et al., 1998; Duclercq et al., 2011). É um mecanismo que é possível revelar a pluripotência das células somáticas, ou seja, a capacidade de regenerar sob condições *in vitro* uma planta a partir de uma única ou grupos celulares (De Klerk et al., 1997; Davey e Anthony, 2010).

A organogênese consiste em três fases distintas, a primeira é a desdiferenciação no qual os tecidos e/ou célula adquirem competência e respondem aos estímulos à segunda é a indução durante a qual células determinadas iniciam a formação de um órgão específico em resposta aos reguladores de crescimento exógenos e a última fase é a diferenciação morfológica de um órgão (De Klerk et al., 1997; Duclercq et al., 2011). A primeira fase pode envolver o desenvolvimento de calos (organogênese indireta), mas, frequentemente células do explante tornam-se competentes na ausência de calos o que caracteriza a organogênese direta (Wareing, 1982; De Klerk et al., 1997; Xu e Huang, 2014).

A organogênese *de novo* tem sido a principal via de regeneração para o gênero *Passiflora*. Diferentes fontes de explantes são usados como segmentos foliares, nodais e internodais (Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012), segmentos hipocotiledonares (Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016), segmentos de raiz (Silva et al., 2011; Rosa et al., 2016).

A utilização de embrião zigótico foi recentemente descrito por Rocha et al. (2015), em que a taxa de auxina influenciou na obtenção das respostas morfogênicas pelas vias organogênicas ou embriogênese somática. Entretanto, os embriões zigóticos geralmente são utilizados para a indução de embriogênese somática (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011; Rosa et al., 2015; Ferreira et al., 2015).

No gênero *Passiflora* a cultura de tecido endospermico não é comumente aplicada. A cultura de tecido endospermico foi realizado por Mohamed et al. (1996) com a espécie *P. foetida* visando a obtenção de plantas triploides. Em maracujazeiros o endosperma persiste nas sementes maduras

(Raju, 1956), podendo ser usado como uma fonte potencial para a produção de triploides.

O potencial morfogênico do endosperma foi primeiramente demonstrado por Johri e Bhojwani. (1965). Atualmente, a produção de brotos, embriões e a obtenção de plantas a partir do cultivo de endosperma têm sido relatados para mais de 64 espécies e aproximadamente 20 famílias. Na maioria os regenerantes obtidos foram triploides. Como o endosperma é um tecido triploide, acredita-se que a sua cultura é o método mais direto e eficiente para a obtenção deste tipo de planta (Wang et al., 2016 revisão).

Geralmente, as sementes de plantas com nível de ploidia  $3n$  são estéreis, entretanto, diversas características desejáveis são obtidas, por apresentar um conjunto cromossômico que influenciam no maior vigor das plantas, maior espessura e comprimento das folhas e a coloração verde escura. As flores ou frutos são maiores, o que leva ao aumento de produtividade e rendimento (Wang et al., 2016). Plantas triploides ainda possuem células somáticas e células guardas dos estômatos aumentadas (Jones et al., 2007), bem como maior formação de cloroplastos, atenuando a taxa fotossintética (Padoan et al., 2013; Mondal, 2014).

O objetivo deste capítulo foi estabelecer a regeneração *de novo* por organogênese para a produção de plantas diploides e triploides de *P. edulis* ‘população FB-300’.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e indução da organogênese**

Sementes de *P. edulis* ‘variedade FB-300 Araguari’ foram fornecidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda, Araguari – MG.

Primeiramente o tegumento das sementes foram extraídos com auxílio de uma mini-morsa (Reis et al., 2007). Após as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, mediante imersão em álcool 70% (v/v) por 2 minutos, em seguida em hipoclorito comercial 2,5% (v/v) por 25 minutos, acrescido de duas gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v) a 100 mL de solução. Em seguida foram submetidas a três enxagues consecutivos em água destilada e

autoclavada e mantidas em *overnight* em água destilada para reidratar e facilitar a remoção dos endospermas e embriões.

## **2.2. Histodiferenciação e maturação**

Embriões zigóticos e endospermas foram inoculados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de MS, 0,01% (p/v) de mioinositol, 3% (p/v) de sacarose e 8 gL<sup>-1</sup> (p/v) de Ágar (Acumedia®) como agente gelificante, e acrescido das citocininas benzil-adenina (BA), cinetina (CIN) e tidiazuron (TDZ). As concentrações dos reguladores de crescimento para a indução da organogênese para ambos explantes foram: T1) MS controle; T2) BA: 2,21 µM; 4,43 µM; 6,65 µM; 8,87 µM; T3) TDZ: 2,27 µM; 4,54 µM; 6,81 µM; 9,08 µM; T4) CIN: 2,32 µM; 4,64 µM; 6,97 µM; 9,29 µM.

O pH do meio foi ajustado para 5,7±1 e posteriormente o meio foi autoclavado durante 15 minutos á 121°C e 1,1 atm de pressão. Os explantes foram inoculados em placas de Petri de poliestireno cristal 90 x 15 mm contendo 30 mL de meio e vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac ®), e mantidos em sala de cultivo sob irradiância 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) e temperatura de 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de irradiância.

## **2.3. Alongamento das plantas e aclimatização**

Após 60 dias de cultivo em meio de indução brotações regeneradas de aproximadamente 3mm de comprimento foram transferidas para meio com os sais básicos de MS, vitamina de MS e suplementado à 0,01% (p/v) de mioinositol, 3% (p/v) de sacarose e 8 gL<sup>-1</sup> (p/v) de Ágar (Acumedia®) como agente gelificante. As brotações foram cultivadas em frascos de cultura.

As culturas foram mantidas sob regime de luz e temperatura e condições de cultivo descritas anteriormente. Plantas (±8 cm) retiradas dos frascos de cultivo foram lavadas para a remoção do meio de cultura e depois de transferidas para copos plásticos contendo substrato Plantmax® e envoltas em sacos plásticos por cinco dias. Após este período os sacos plásticos foram removidos e as plantas foram levadas para casa de vegetação, após dez dias as plantas foram consideradas aclimatizadas.

#### **2.4. Caracterização anatômica**

As amostras das regiões potencialmente morfogênicas foram fixadas em solução de FAA 50% (Johansen, 1940) e posteriormente foram desidratadas em série crescente de etanol. Posteriormente foram infiltradas e polimerizadas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (O' Brien e McCully, 1981).

A captura de imagens foram observadas em microscópio (Nikon Infinity 2.0/Japão) e fotografadas utilizando software de análise de imagem (NIS-Elements 2.0/Nikon/Japão).

#### **2.5. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado DIC. Foram realizadas duas avaliações com períodos de 30 e 60 dias de cultivo para ambos os tipos de explantes. As respostas morfogênicas avaliadas foram à frequência de brotos por explante, produção de calos e raízes. O experimento Foi composto por 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo 10 explantes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro ( $p \leq 0.05$ ) programa Sisvar (Ferreira, 2011).

#### **2.6. Análise do nível de ploidia**

Para determinar o conteúdo de DNA de *P. edulis* 'FB 300' foram macerados aproximadamente 25 mg de folhas juntamente com o padrão interno *Pisum sativum* L. cv. "Ctirad", 2C DNA = 9,09 pg (Dolezel et al. 2007).

As amostras foram maceradas em placas de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado usando lâmina de bisturi para liberação dos núcleos na suspensão (Dolezel et al. 1989). Os núcleos foram filtrados em membrana de nylon com mesh de 50 µm e corados com 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 feitas no citômetro de fluxo FACSCantoll™ (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:

$$\text{Conteúdo (2C DNA) pg} = \frac{\text{Média do Pico G1 } P. \text{ edulis} \times 9,09}{\text{Média Pico G1 } P. \text{ sativum}}$$

Foram analisadas três amostras para cada indivíduo para avaliar a variação do conteúdo de DNA entre as amostras. Os coeficientes de variação foram menores que 5% assegurando a acurácia das medições (Dolezel et al., 1997).

### 3. RESULTADOS

A regeneração pela organogênese *de novo* nos embriões zigóticos iniciou com a proliferação de células na região dos cotilédones aos 10 dias de cultivo *in vitro* (Figura 1A). Já aos 20 dias observou-se intensa proliferação de estruturas potencialmente organogênicas (Figura 1B). As estruturas organogênicas (Figura 1C-D) desdiferenciaram-se em multibrotações aos 30 dias de cultivo, sendo preferencialmente localizadas nas bordas dos cotilédones e primórdios de gemas adventícias de forma direta (Figura 1E). A citocinina que melhor induziu brotações adventícias nos embriões zigótico foi o TDZ. Aos 30 dias de cultivo na concentração de 2,27  $\mu\text{M}$  produzindo média de 59,0 brotos por explante (Tabela 1).

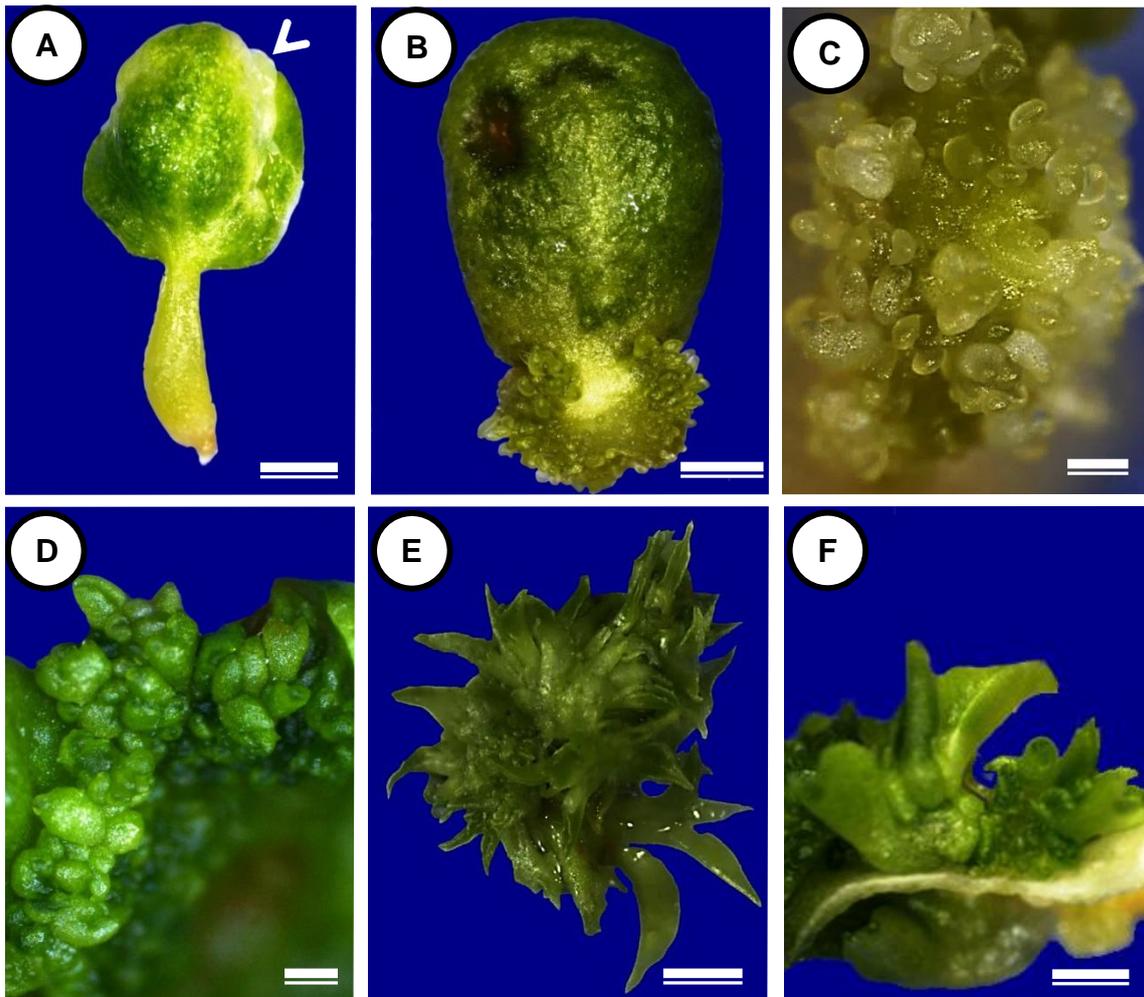
Aos 60 dias de cultivo, as brotações com os primórdios foliares foram observadas (Figura 1F). Houve diferença estatística no número de brotos produzidos quando cultivados com o regulador TDZ (Tabela 1). Intensa proliferação das brotações ocorreu na presença de TDZ a 4,54  $\mu\text{M}$  produzindo uma média de 168,8 brotos por explante, conforme observado na Tabela 1. O PGR CIN foi o regulador que induziu respostas menos significativas na produção de brotações adventícias, entretanto, maior número de raízes foram obtidas (Tabela 1).

Para a produção de calos durante a organogênese em *P. edulis*, BA, TDZ e CIN não apresentaram diferenças significativas aos 30 e 60 dias de cultivo, no entanto a maior média de 3,0 calos aos 30 dias na presença de 2,27

$\mu\text{M}$  de TDZ. Já aos 60 dias ocorreu a maior produção de calos com média de 3,6 na concentração de 6,65  $\mu\text{M}$  BA. Os calos produzidos apresentaram aspecto compacto e esverdeado. Já as médias obtidas para CIN foram às menores, sendo 1,8 calos, considerados a maior média na concentração 4,64  $\mu\text{M}$  aos 30 dias. (Tabela 1).

Entre os reguladores BA, CIN e TDZ houve diferença significativa apenas com BA, com a média de raízes de 3,8 no tratamento com 4,45  $\mu\text{M}$  aos 60 dias, no entanto, CIN mostrou média superior com 4,8 no tratamento com 4,64  $\mu\text{M}$  aos 30 dias de cultivo (Tabela 1).

Os explantes endospermicos de *P. edulis* aos 10 dias de cultivo in vitro apresentaram pequena proliferação celular na presença dos PGRs (Figura 1A). Já aos 20 dias os explantes cultivados com TDZ nas concentrações mais elevadas induziram a proliferação de estruturas organogênicas como observado na Figura (1B e C). Primórdios de brotações foram observados aos 30 dias de cultivo (Figura 1D). Os explantes cultivados na presença dos PGRs BA e CIN senesceram aos 30 dias de cultivo in vitro e o meio controle na ausência dos reguladores de crescimento (Tabela 1).



**Figura 1:** Organogênese *de novo* em *P. edulis* utilizando-se de embriões zigótico como fonte de explante. (A) Explante com 10 dias de cultivo mostrando a proliferação celular (seta); (B) Explante evidenciando a formação de estruturas organogênicas no eixo embrionário; (C) Estruturas organogênicas em detalhe na superfície do cotilédone; (D) Primórdios de multibrotações por via indireta; (E-F) Multibrotações por via direta. Barras: (A) 50  $\mu\text{m}$ ; (B) 70  $\mu\text{m}$ ; (C) 90  $\mu\text{m}$ ; (D) 90  $\mu\text{m}$ ; (E) 120  $\mu\text{m}$ ; (F) 100  $\mu\text{m}$ .

Raízes adventícias não foram observadas em todos os tratamentos e calos foram produzidos nas concentrações de 4,54, 6,81 e 9,08  $\mu\text{M}$  somente com o PGR TDZ (Tabela 3).

**Tabela 1:** Respostas morfogênicas durante organogênese *de novo* em embriões zigótico de *P. edulis* 'FB-300 Araguari' aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro.

Tratamentos	Nº de Brotos		Nº de Calos		Nº de Raízes	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Controle	8,6 abc	11,6b	0,0a	0,0a	0 c	0 a
2.21 µM BA	14,6abc	34,4b	1,4a	1,2 <sup>a</sup>	1,6 abc	1,2 a
4.45 µM BA	33abc	48,8b	2,2a	1,0a	1,6 abc	3,8 a
6.65 µM BA	4,4 ab	19,4b	0,0a	3,6 <sup>a</sup>	1,0 abc	0,8 a
8.87 µM BA	31,4abc	36,8 b	1,6 a	0,6 <sup>a</sup>	1,2 abc	0,2 a
2.27 µM TDZ	59 a	88,2ab	3,0a	2,6 <sup>a</sup>	0,2 bc	0 a
4.54 µM TDZ	44,4ab	168,8a	2,0a	2,6 <sup>a</sup>	0,4 bc	0 a
6.81 µM TDZ	22,2abc	50,6ab	0,4a	1,6 <sup>a</sup>	0,4 bc	0 a
9.08 µM TDZ	52 ab	100,2 ab	2,0 a	1,4 <sup>a</sup>	0,6 bc	0,2 a
2.32 µM CIN	0 c	2,4b	1,0a	0,0a	4,2 ab	2,6 a
4.64 µM CIN	15,6abc	17,8b	1,8a	1,0a	4,8 a	2,4 a
6.97 µM CIN	1,4ab	4,0b	0,4a	0,4 <sup>a</sup>	0 c	1,4 a
9.29 µM CIN	1,8ab	5,6b	1,2a	0,2a	3,0 abc	2,6 a

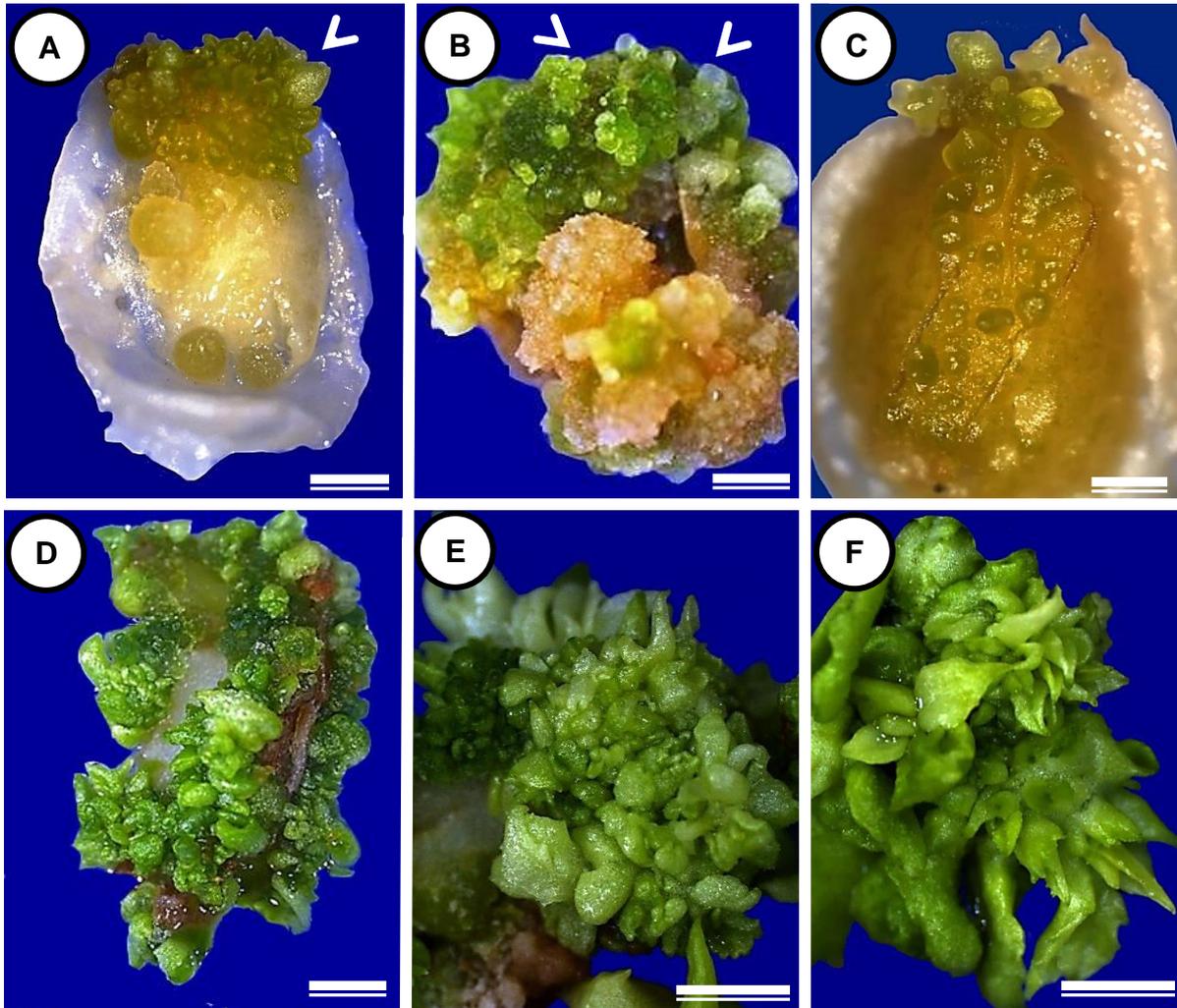
Médias seguidas das mesmas letras nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro ( $p \leq 0.05$ ).

No cultivo de explantes endospérmicos somente na presença de TDZ nas concentrações de 4,54, 6,81 e 9,08 µM produziram brotações adventícias (Tabela 2). A organogênese ocorreu de pelas vias direta e indireta. O início do desenvolvimento das gemas de forma indireta foi com a proliferação de massa celular (Figura 2A) sendo distribuídas por todo o endosperma (Figura 2B). Na organogênese direta (Figura 2C) o desenvolvimento das brotações foi mais rápido, e aos 30 dias de cultivo já apresentavam primórdios foliares.

O maior número de brotos produzidos aos 30 dias foi na concentração de 9,08 µM de TDZ com média de 2,0 brotos por explante. Aos 60 dias de cultivo in vitro as brotações no tecido endospérmico proliferam conforme

observado nas Figuras 2 D-E e multibrotações com primórdios foliares também foram observadas (Figura 2F).

O maior número de brotos produzidos foi na concentração de 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ apresentando média de 39,2 brotos por explante (Tabela 2).



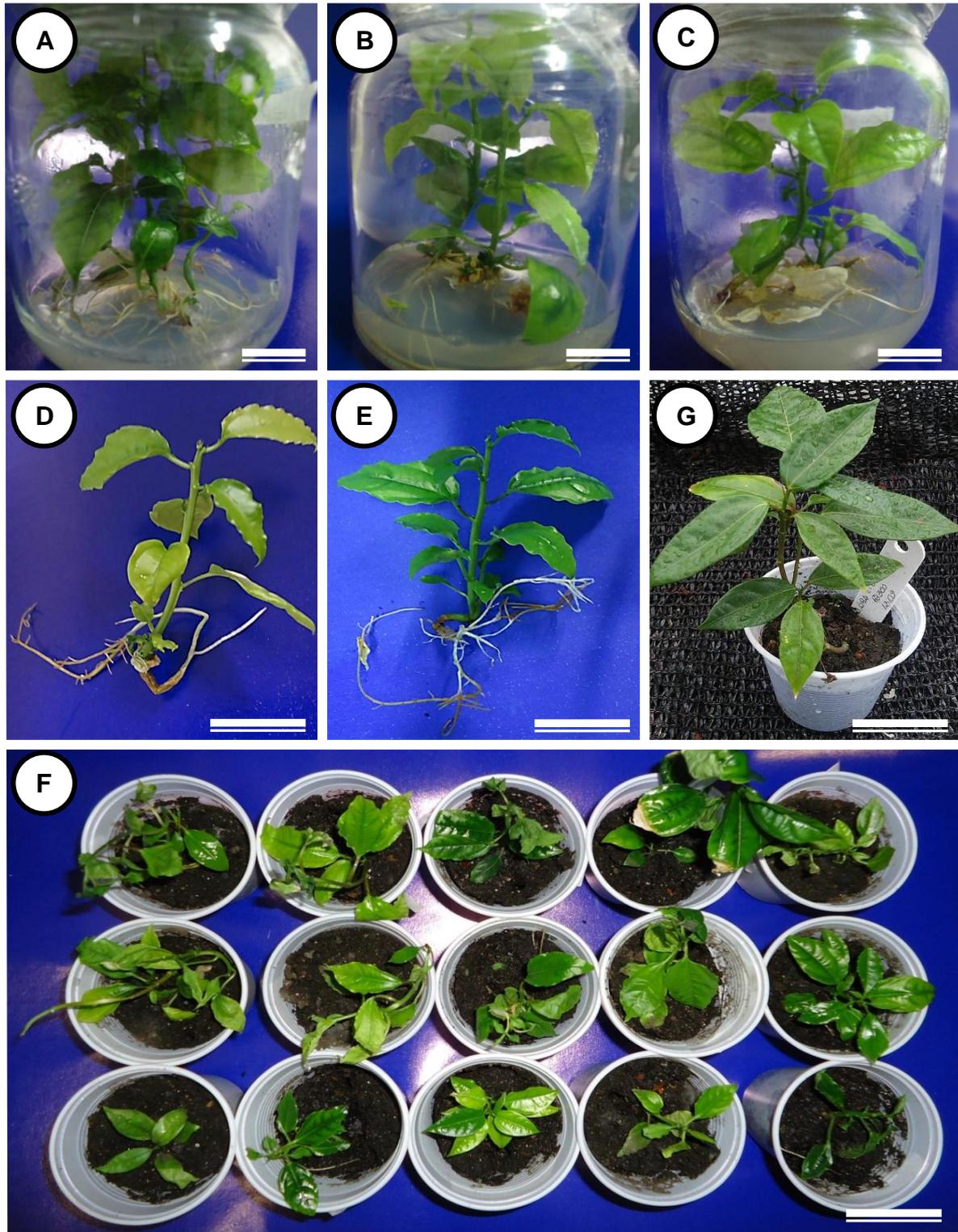
**Figura 2:** Organogênese *de novo* em *P. edulis* utilizando-se de endosperma como fonte de explante. (A) Estruturas organogênicas na superfície (seta); (B) Proliferação das estruturas organogênicas (setas); (C) Primórdios de brotações diretos na superfície cotiledonar com 30 dias de cultivo; (D) Primórdios de Multibrotações; (E) Multibrotações via diretas oriundas do tratamento com 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ; (F) Multibrotações via diretas oriundas do tratamento com 6,81  $\mu\text{M}$  de TDZ. Barras: (A) 90  $\mu\text{m}$ ; (B) 50  $\mu\text{m}$ ; (C) 80  $\mu\text{m}$ ; (D) 80  $\mu\text{m}$ ; (E) 90  $\mu\text{m}$ ; (F) 90  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 2:** Média do número de brotos, raízes e calos obtidos de explantes endospermicos de *Passiflora edulis* 'variedade FB-300 Araguari' aos 30 e 60 dias de cultivo in vitro.

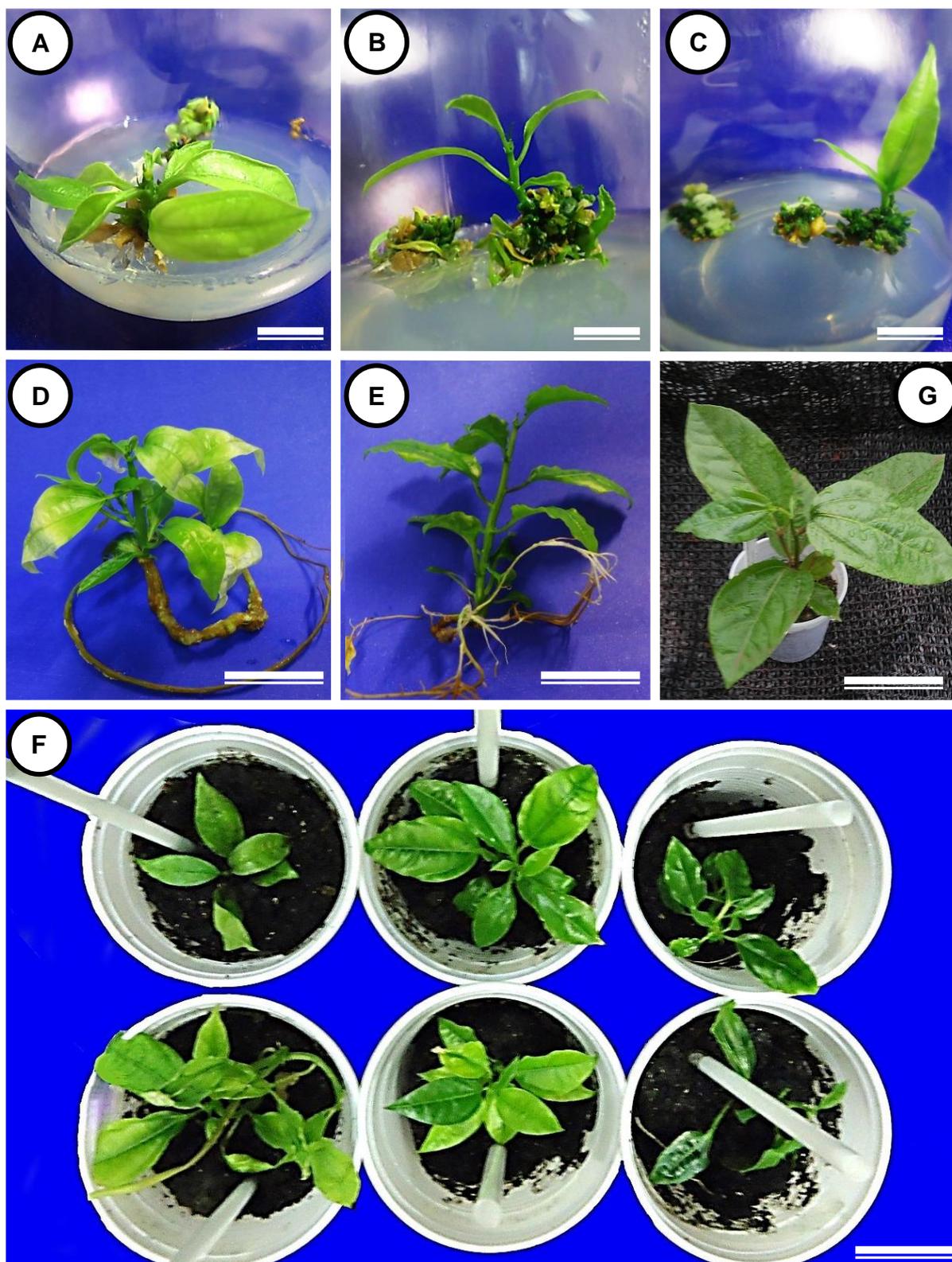
Tratamentos	Nº de Brotos		Nº de Calos	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
MS	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
2,21 µM BA	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
4,45 µM BA	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
6,65 µM BA	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
8,87 µM BA	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
2,27 µM TDZ	0 b	0,0c	0,0a	0,0a
4,54 µM TDZ	0.2 b	29,4a	0,0a	1,2 <sup>a</sup>
6,81 µM TDZ	0.6 b	39,2a	0,8a	0,4 <sup>a</sup>
9,08 µM TDZ	2.0 a	7,8b	0,4 a	1,0a
2,32 µM CIN	0 b	0,0a	0,0a	0,0a
4,64 µM CIN	0 b	0,0a	0,0a	0,0a
6,97 µM CIN	0 b	0,0a	0,0a	0,0a
9,29 µM CIN	0 b	0,0a	0,0a	0,0a

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

Os brotos obtidos dos embriões zigóticos (Figuras 3A-C) e endosperma (Figuras 3A-C) foram cultivados em meio de MS na ausência de reguladores de crescimento por 40 dias e após o cultivo com aproximadamente 8 a 10 cm de comprimento já estavam alongados e enraizados (Figuras 3D-E). As plântulas regeneradas de origem dos embriões zigóticos (Figura 3F) e dos endospermas (Figura 3F) foram aclimatizadas com sucesso em condições de casa de vegetação (Figuras 3G).



**Figura 3:** Fase de alongamento e enraizamento e aclimatização de plântulas de origem a partir dos embriões zigóticos. (A-B-C) Brotações oriundas dos reguladores BA, TDZ e CIN; D-E) Plântulas oriundas do meio MS na ausência e reguladores de crescimento aos 40 dias; (F) Plântulas regeneradas; (G) Plântulas aclimatizadas em casa de vegetação. Barras: (A-B-C) 1 cm; (D-E-F-G) 1,5 cm.



**Figura 4:** Fase de alongamento, enraizamento e aclimatização de plântulas obtidas a partir de explantes endospermicos. (A-B-C) Brotações oriundas dos reguladores BA, TDZ e CIN; (D-E) Plântulas oriundas do meio MS na ausência e reguladores de crescimento aos 40 dias; (F) Plântulas regeneradas; (G)

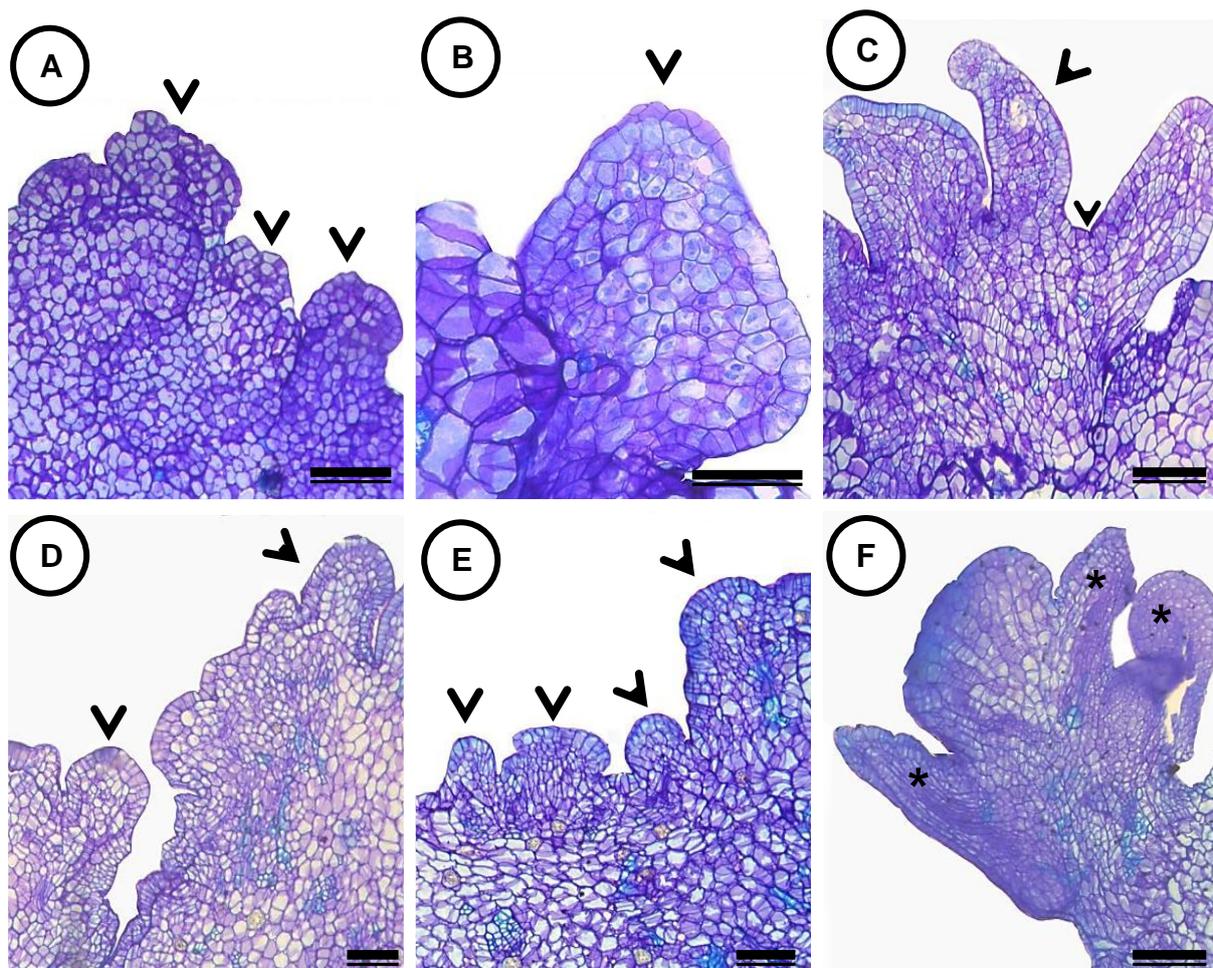
Plântulas aclimatizadas em casa de vegetação. Barras = (A) 50  $\mu\text{m}$ ; (B) 70  $\mu\text{m}$ ; (C) 90  $\mu\text{m}$ ; (D) 90  $\mu\text{m}$ ; (E) 120  $\mu\text{m}$ ; (F) 100  $\mu\text{m}$ ; (G) 5 mm; (H) 10 mm; (I) 15 mm.

### **3.1. Caracterização anatômica**

No desenvolvimento das brotações foram observadas inicialmente intensas divisões celulares nos planos periclinal e anticlinal na superfície dos cotilédones do embrião zigótico em regiões de tecido parenquimático com estruturas organogênicas diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 4A). Primórdio de brotação em conexão com o tecido de origem (Figura 4B).

As regiões com estruturas organogênicas diferenciaram-se apresentando os primórdios foliares e o domo apical com células isodiamétricas (Figura 4C) e em desenvolvimento mais tardio a ocorrência de conexão vascular com o tecido de origem.

As gemas produzidas a partir de tecidos endospermicos iniciaram o seu desenvolvimento com divisões celulares ao longo da superfície do tecido parenquimático com divisões periclinais e anticlinais (Figura 4D). Em regiões mais internas do tecido parenquimático podem-se observar aglomerados celulares formando o estágio inicial do desenvolvimento das brotações que são os meristemóides. Na Figura E, observam-se diferentes estágios de desenvolvimento das gemas, posteriormente diferenciaram-se em gemas adventícias em conexão com o explante de origem a partir do tecido endospermico (Figura 4F).

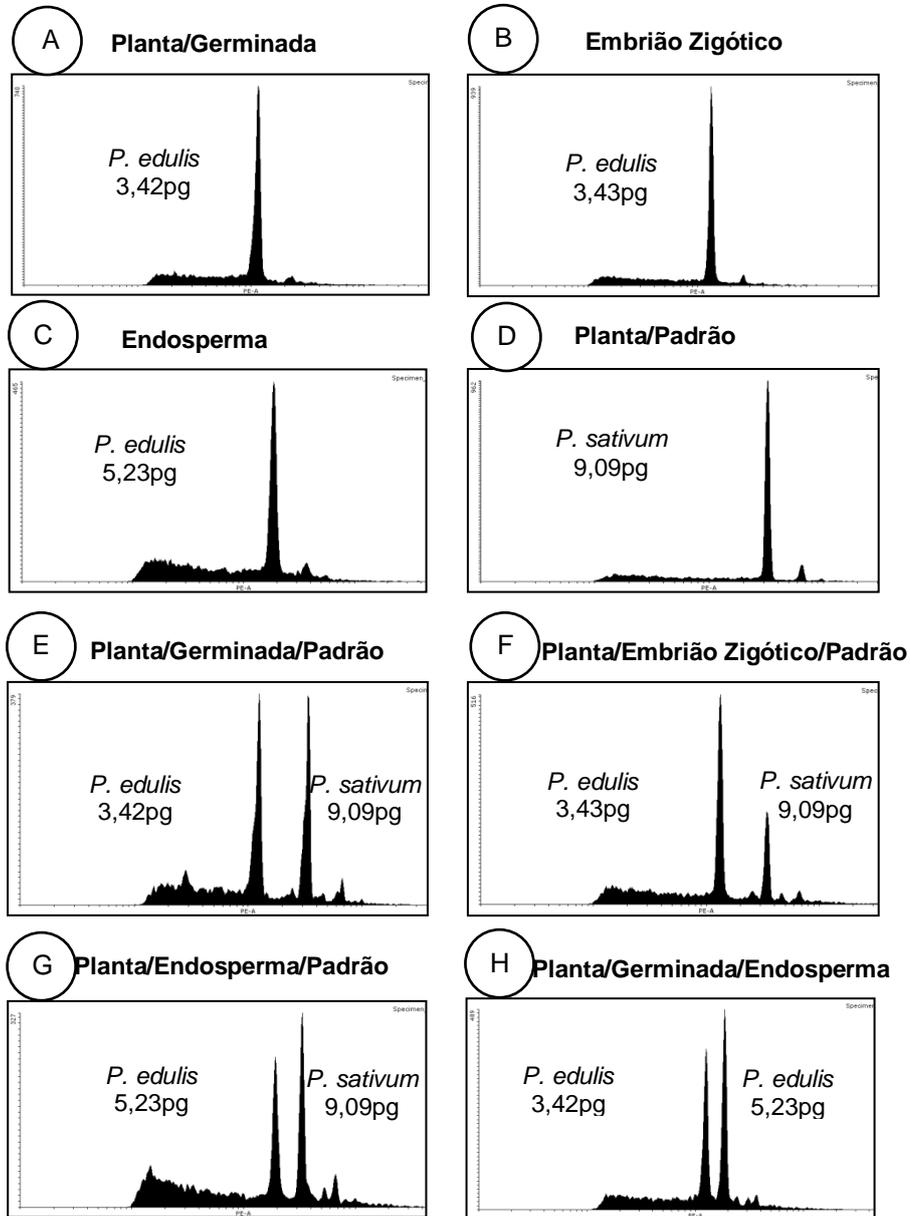


**Figura 4:** Cortes histológicas da organogênese evidenciando o processo de desenvolvimento das brotações aos 30 dias de cultivo *in vitro* em *P. edulis* FB-300 em explantes de embrião zigótico (A, B e C) e endospermicos (C, D e E). (A) Estruturas organogênicas (setas) em diferentes estágios de desenvolvimento; (B) Primórdio de brotação com conexão ao tecido de origem (seta); (C) Estruturas organogênicas apresentando os primórdios foliares e domo apical (setas); (D) Gemas oriundas de tecido endospermico (setas); (E) Gemas em diferentes estádios (setas); (F) Gemas adventícias (asteriscos) com conexão ao explante de origem. Barras: (A) 100  $\mu\text{m}$ ; (B) 110  $\mu\text{m}$ ; (C) 100  $\mu\text{m}$ ; (D) 50 $\mu\text{m}$ ; (E) 60  $\mu\text{m}$ ; (F) 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Análise de estabilidade genética

Na estimativa do conteúdo de DNA através da análise em citometria de fluxo pode evidenciar que plântulas de origem seminífera (3,42 pg) e por embriões zigóticos apresentaram 3,43 pg de DNA com nível de ploidia ( $2n$ ) permanecendo geneticamente estáveis em comparação com o padrão e plantas de origem seminífera de *P. edulis* com 3,28 pg (Silva et al., 2011). Já

as plântulas obtidas a partir de tecidos endospermicos permaneceram também estáveis com conteúdo de DNA a 5,23 pg confirmando a triploidia (3n) (Figura 8).



**Figura 5:** Histogramas da citometria de fluxo de plantas regeneradas a partir da germinação, embrião zigótico e endosperma de *P. edulis* 'população FB-300'. (A) Planta oriunda da germinação 3,42 pg (2C) DNA; (B) 3,43 pg (2C) plantas de origem a partir do embrião zigótico; (C) 5,23 (3C) DNA plantas de origem a partir do endosperma; (D) Padrão *Pisum sativum* (9,09pg); (E) O primeiro pico corresponde ao tecido diploide de *P. edulis* germinada (3,42 pg) oriundo de e o padrão *P. sativum* (9,09 pg); (F) O primeiro pico corresponde ao tecido diploide de *P. edulis* (3,42 pg) oriundo de embrião zigótico e o padrão *P. sativum* (9,09 pg); (G) O primeiro pico corresponde ao tecido triploide de *P.*

*edulis* (5,23pg) oriundo do endosperma e o padrão *P. sativum* (9,09pg); (H) Comparação do tecido diploide 3,42 pg (2C) e triploide 5,23 pg (3C) de *P. edulis*.

#### 4. DISCUSSÃO

A regeneração de brotações in vitro foi estabelecida com sucesso em *P. edulis* população FB-300 Araguari' a partir de embrião zigótico e endospermicos e a produção geneticamente estável das plantas obtidas.

Estudos sobre a regeneração por via organogênica de plantas de *P. edulis* em geral utilizam-se como fonte de explantes segmentos foliares (Becerra et al., 2004; Barbosa et al., 2007; Faria e Segura, 2007; Silva et al., 2009), hipocótilo (Fernando et al., 2007), segmentos hipocotiledonares (Reis et al., 2007; Alexandre et al., 2009, Rocha et al., 2016), segmentos nodais (Cancino et al., 1998; Nhut et al., 2007), segmentos de raiz (Silva et al., 2011; Rosa et al., 2016; Rocha et al., 2016).

Embriões zigóticos são utilizados como fonte de explante visando a indução de embriogênese somática e somente recentemente Rocha et al. (2015), utilizou deste tipo de explante para a obtenção de organogênese em *P. edulis*. Relato de utilização de tecido endospermico como fonte de explante para o gênero *Passiflora* somente foi descrito para a espécie *Passiflora foetida* por Mohamed et al. (1997).

A regeneração pela via organogênica prevalece como modelo para a regeneração em *Passiflora* (Otoni et al., 2013) e a relação está especificamente entre a alta das citocininas e a baixa concentração das auxinas. Drew (1997) e Silva et al. (2011) descrevem que as citocininas, principalmente o BA tem sido necessário para a indução *de novo* da organogênese para a espécie *P. edulis*. Entretanto, neste estudo brotações adventícias foram produzidas a partir de embriões zigóticos na ausência de PGRs o que demonstra o potencial morfogênico deste tipo de explante.

Na regeneração por organogênese tendo como fonte de explantes embriões zigóticos e tecidos endospermicos, o TDZ em concentrações mais elevadas, foi o regulador de crescimento mais efetivo na indução e produção de brotações adventícias. O TDZ é uma feniluréia sintética e atua como uma

das citocininas mais ativas para indução de brotações no cultivo in vitro de plantas de tecidos (Lakshmanan e Taji, 2000), podendo até mesmo ser utilizada para indução da embriogênese somática em algumas espécies, com uso combinado com outros reguladores (Anwar et al., 2010).

O PGR TDZ tem papel diferenciado na morfogênese, pois, está intrinsecamente relacionado com o metabolismo dos reguladores de crescimento endógenos (Murthy et al., 1998), por ser mais ativo que o BA e apenas concentrações menores são eficientes no cultivo in vitro (Lu, 1993).

Outro fator importante revelado na regeneração dos embriões zigóticos é o tempo de cultivo e exposição do explante ao PGR TDZ para *P. edulis*, como verificado na concentração de 4,54  $\mu\text{M}$  aos 30 dias com a produção média de 44,4 e aos 60 dias intensa proliferação ocorreu com média de 168,8 brotos por explante, e para os tecidos endospermicos observa-se também resposta morfogênica semelhante, sendo na concentração de 6,81  $\mu\text{M}$  aos 30 dias produziu 0,6 e aos 60 dias essa media passou para 39,2 brotos.

Mohamed et al. (1997) relatam a produção de 1,9 brotos por explantes no cultivo de endosperma para *P. foetida*, com uso da citocinina BA (2  $\mu\text{M}$ ) combinado com 5  $\mu\text{M}$  de NAA. O presente estudo é o primeiro relato na literatura de produção de plantas utilizando-se de explantes endospermicos para *Passiflora edulis* 'FB 300' com o conteúdo de DNA triploide 5,23 (3n) mantendo a estabilidade genética dos tecidos endospermicos, confirmado através das análises em citometria de fluxo.

As plantas diploides foram obtidas a partir da regeneração dos embriões zigóticos com 3,43 pg (2n), mantendo-se geneticamente estáveis em todas as amostras analisadas. A produção de brotações de origem a partir de tecidos endospermicos constituem indivíduos triploides, pois, em seu genoma apresentam 3 conjuntos cromossômicos, sendo um processo único. A triploidia é devido à fertilização tripla, onde os três núcleos haploides são fundidos com um gameta masculino e dois gametas femininos (Thomas e Chaturvedi, 2008; Hoshino et al., 2011).

Esse evento é fundamental para a formação de frutos com características como de banana, melão e citrus sem semente, ou elevar a palatabilidade, sendo uma característica importante para a comercialização no

mercado de fruticultura e também de se possibilitar o estudo destas respostas em condições *in vitro* (Góralski et al., 2005).

O uso de explantes endospermicos proporciona um método simples para produção de plantas triploides em comparação aos métodos convencionais (Thomas e Chaturvedi, 2008). Chaturvedi et al. (2003) descrevem que a produção de plantas a partir do cultivo de tecidos endospermicos é base de abordagem moderna para o melhoramento de culturas de forma direta e facilita a regeneração de plantas triploides difíceis de modo *in vivo*. As características de maior importância é a esterilidade de sementes, sendo desfavorável em culturas, em que as sementes são utilizadas comercialmente, no entanto, se utiliza para potencializar a qualidade de frutas de importância comercial, como mamão, banana, maçã, uva e dentre outras (Hoshino et al., 2011).

Diversos estudos descrevem a produção plantas triploides a partir do cultivo de endosperma, dentre eles *Citrus* sp. (Gmitter et al., 1990), *Coffea* sp. (Raghuramulu, 1989), *Morus alba* (Thomas et al., 2000), *Azadirachta indica* (Chaturvedi et al., 2003), *Actinidia deliciosa* (Góralski et al., 2005) e *Lonicera caerulea* (Miyashita et al., 2009). No entanto, estudos voltados para obtenção de plantas triploides em *Passiflora* ainda é pouco estudado, principalmente ao que remete às características benéficas para o melhoramento genético como maior vigor vegetativo das plantas.

A organogênese *de novo* a partir de embriões zigóticos e endosperma possibilitou o estabelecimento de um sistema responsivo para a produção de plantas diploides (2n) e triploides (3n) geneticamente estáveis para a espécie *Passiflora edulis* Sims (população FB-300).

## 5. CONCLUSÕES

O sistema de regeneração para a obtenção de plantas diploides e triploides geneticamente estáveis para a espécie *Passiflora edulis* Sims população FB-300 foi estabelecido com sucesso. Para a regeneração a partir de embriões zigóticos as citocininas BA e TDZ foram efetivas na indução, diferenciação e ou desdiferenciação de brotações adventícias e para o endosperma apenas o TDZ em concentrações mais elevadas induziu a morfogênese pela via organogênica.

O trabalho abre perspectivas para o melhoramento genético da espécie em estudo e de outras espécies silvestres endêmicas amazônicas com potencial ornamental.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. **In vitro propagation of passionfruit**. In: ALEXANDRE, R. S.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. (eds) Propagation of passionfruit: morphological, physiological and genetic aspects. EDUFES, Vitória, pp 117–184, 2009.

ANWAR, F.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. No more recalcitrant: hickpea regeneration and genetic transformation. **African Journal of Biotechnology**. 9: 782-797, 2010.

BARBOSA, L. V.; MONDIN, M.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. P.; VIEIRA, M. L. C. Cytological behaviour of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*? *P. cincinnata*. **Plant Breeding**. 126:323–328, 2007.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GONGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitromorphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 79:87-90, 2004.

CANCINO, G. C.; DAVEY, M. R.; LOWE, K. C.; POWER, J. B. Shoot regeneration from leaf and root explants of *Passiflora molissima*. **Journal of Experimental Botany**. 49:87, 1998.

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.

DAVEY, M. R.; Anthony, P. **Plant cell culture: essential methods**. John Wiley & Sons, 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

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

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

DREW, R. A. Micropropagation of *Passiflora* species (passionfruit). In: BAJAJ, Y. P. S. (ed). **Hightech and micropropagation**. Springer Berlin Heidelberg, pp 135–149, 1997.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. 33: 209-212, 1997.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; MACHADO, S. R.; DA GLORIA, B. A. New insights into the in vitro organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 91: 37-44, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: Um sistema de análise estatística computadorizada. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, 35:1039-1042, 2011.

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

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

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.

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.

HISANO, H.; MATSUURA, T.; MORI, I. C.; YAMANE, M. E.; 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.

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.

JOHRI, B. M.; BHOJWANI, S. S. Growth responses of mature endosperm in culture. **Nature**. 208: 1345–1347, 1995.

JONES, K. D.; REED, S. M.; RINEHART, T. A. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter, and fertility in *Hydrangea macrophylla*. **HortScience**. 42: 483-488, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw Hill, New York, 1940.

LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**. 2: 136–148, 2000.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 29: 92-96, 1993.

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. *emphylocalyx*. **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.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 34: 267-275, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**. 15: 473-497, 1962.

NHUT, D. T.; KHIET, B. L. T.; THI, N. N.; THUY, D. T. T.; DUYN, N.; HAI, N. T.; HUYEN, P. X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) technology. IN JAIN, M.; HÄGGMAN, H.(eds.). **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. p. 417- 426, 2007.

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

OTONI, W. C.; PINTO, D. P. L.; ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; DIAS, L. L. C.; SILVA, M. L.; SILVA, C. V.; LANI, E. R. G.; SILVA, L. C.; TANAKA, F. A. O. **Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* spp.)**. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, O. S.; SHARMA, M. P. (eds). Somatic embryogenesis and gene expression, 1st edn. Narosa Publishing House, New Delhi, pp 1–17, 2013.

OZAWA, S.; YASUTANI, I.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A.; SUGYAMA, M. Organogenic Responses in Tissue Culture of *srd* Mutants of *Arabidopsis thaliana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 125:135-142, 1998.

PADOAN, D.; MOSSAD, A.; CHIANCONE, B.; GERMANA, M. A.; KHAN, P. S. S. V. Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 25:283-290. 2013.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATTO, 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.

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

RAJU, M. V. S. Embryology of Passifloraceae. (1) Gametogenesis and seed development of *Passiflora calcarata* Most. **The Journal of Indian Botanical Society**. 35: 126-138, 1956.

RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of coffee. **Journal Coffee Research**. 19: 71–81, 1989.

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.

ROSA, Y. B. C. J.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Organogênese in vitro e eficiente regeneração de plantas a partir de explantes de raiz de *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 52: 64-71, 2016.

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.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; AIZZA, L. C. B. DORNELAS, M. C. A passion fruit putative ortholog of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1* gene is expressed throughout the in vitro *de novo* shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 125:107-117, 2016.

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.

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: 407-41, 2011.

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

MONDAL, T. K. **Breeding and biotechnology of tea and its wild species.** Springer Science & Business Media, 2014.

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

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.

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

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

WAREING, P. F. Plant growth substances. In Plant growth substances. **Academic Press.** 1982.

WANG, X.; CHENG, Z. M.; ZHI, S. AND XU, F. Breeding triploid plants: a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding.* 52:41-54, 2016.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro capítulo foi proposto a indução da embriogênese somática sob irradiância a partir de explantes de embriões zigóticos maduros de duas populações de *P. edulis* 'FB-300 e FB-200' onde pode-se estabelecer duas vias morfogênicas a embriogênese somática e a organogênese. O segundo capítulo constatou que através da regeneração pela rota organogênica da população de *P. edulis* 'população FB-300' com uso explantes a partir de embrião zigótico e endospermicos foi possível obter plantas diploides e triploides geneticamente estáveis confirmadas pelas análises em citometria de fluxo.