

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

PAULA PINHEIRO DE CARVALHO

**Organogênese in vitro de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora
miniata* Master - Passifloraceae**

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO – 2016

PAULA PINHEIRO DE CARVALHO

**Organogênese in vitro de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora
miniata* Master - Passifloraceae**

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.

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

Coorientador: Prof. Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO – 2016

Carvalho, Paula Pinheiro de

Organogênese in vitro de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora miniata* Master (Passifloraceae)./Paula Pinheiro de Carvalho. – Tangará da Serra/MT: UNEMAT, 2016.
102f.

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

Orientadora: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Coorientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi

1. Maracujá. 2. Maracujazeiros - regeneração. 3. Citocininas. 4. Passiflora. 5. Maracujazeiro – morfogênese. I. Título.

CDU: 634.776.3

Organogênese in vitro de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora miniata* Master – (Passifloraceae)

PAULA PINHEIRO DE CARVALHO

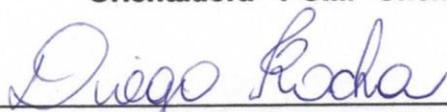
Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 16 de dezembro de 2016.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr.ª Maureciline 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

[...] Deus é força e gratidão, tudo o que fizeres, seja em palavra, seja em ação façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai [...]

Colossenses 3:17

À Deus
Aos meus pais Rosely e Osvaldo
À minha vó D. Marcelina
À minha bisá D. Eduvirgens [in memorian]
À minha irmã Michelly
À todos familiares e amigos.
Dedico.

À minha orientadora, Dra. Maurecilne Lemos da Silva Carvalho
À Prof.^a e amiga Dra. Francielly Martins
Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á DEUS pelo amor incondicional, por ser meu melhor amigo e companheiro, por guiar e iluminar todos os meus passos, objetivos e decisões. A certeza da sua presença na minha vida me faz seguir em frente firme e forte, pois nada abala um coração que habita o senhor Jesus.

Aos meus pais pela confiança, incentivo, pelo imenso amor, dedicação, ensinamentos e por mesmo longe estarem sempre presente e consagrando ao meu lado mais uma conquista e realização acadêmica.

À minha vizinha D. Marcelina pelo exemplo de vida, pelo coração enorme, cheio de amor, simplicidade, força, determinação e esperança, Te amo minha vida!

À minha irmã linda e amada pela amizade e carinho e a todos da família Pinheiro pelo apoio e incentivo.

À minha segunda família Uespiana pela oportunidade, carinho e apoio na realização deste sonho e pela contribuição contínua na minha formação acadêmica, pessoal e profissional, em especial a Francielly Martins, Pedro Martins, Nilma Nascimento, Fábio Vieira, Daniela Grangeiro, Mara Danielle, Marina Macedo, Cintia Clementino e a Cristina. Eternamente grata!

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

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

À minha orientadora, professora Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, pela amizade, dedicação, pelas palavras de apoio e motivação, pelas críticas construtivas, pela confiança, credibilidade e oportunidade de conhecer e trabalhar com a cultura de tecidos vegetais e por compartilhar seu vasto conhecimento e experiência como profissional competente e pesquisadora admirável. Imensamente grata.

Ao professor Dr. Ilio Fealho de Carvalho pelas válidas sugestões, paciência, auxílio e acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho, e que muito acrescentou na minha formação acadêmica e pessoal, obrigada!

À professora Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi, pela co-orientação, amizade, disponibilidade, atenção e pelo fornecimento das sementes para realização do trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Dr. Rogério Benedito da Silva Anez pelo apoio, esclarecimentos e ajuda sobre o processo de desenvolvimento das técnicas de análise anatômica vegetal. Suas explicações, dicas e acompanhamento foram fundamentais, obrigada!

Aos professores de disciplinas cursadas e docentes do Programa em Genética e Melhoramento de Plantas, Dr^a.Isane Vera Karsburg, Dr^a.Leonarda Grillo Neves, Dr. Marco Antonio Aparecido Barelli, Dr.Petterson Batista da Luz e Dr^a. Celice Alexandre Silva pelo profissionalismo, dedicação, paciência e ensinamentos.

Ao Rodrigo Brito de Faria pela amizade, disponibilidade, contribuição e imensa ajuda na realização das análises de anatomia, muitíssimo obrigada!

À todos da equipe LCTV, Nayara Tayane, Carla Fernandes, Wolffe Ferreira, Naielly Anizelli e Andréia Izabel pela amizade, companhia, risadas e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos Jessica Moreira, Gabriella Iguacyara, Alisson Conrado e Jéssica Alcântara pelo carinho, amizade sincera, pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimos e incertezas, pela presença, paciência e por compreender muitas vezes minha ausência. Vocês fazem parte da minha vida e desta conquista, obrigada!

Aos amigos conquistados na cidade acolhedora de Tangará da Serra-MT, Vivia Lemos, Camila Antoniazzi, Camila Filipin, Talita (Tata), Patrícia (Paty), Amanda, Amábile Matei, Marcos Foschiera e Leonardo Mazzuco pelo carinho, por compartilhar cada momento de alegria, de paz, pelos conselhos e principalmente pela receptividade nessa cidade encantadora.

À todos os amigos e familiares que acreditaram no meu desempenho, e que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional e pessoal e para a realização de mais um sonho e conquista acadêmica.

BIOGRAFIA

Paula Pinheiro de Carvalho, filha de Osvaldo Pereira Rosa e Rosely Pinheiro Neto, nasceu no dia trinta de Dezembro de 1989 na cidade de Picos-Pi.

Em março de 2010 ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Piauí-PI, graduando-se como Licenciada em Ciências Biológicas em 28 de Março de 2014.

Em Fevereiro de 2015, ingressou no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de Mestrado, na linha de Pesquisa em Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais, com o desenvolvimento de pesquisa em Cultura de Tecidos Vegetais.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O gênero <i>Passiflora</i>	4
2.2. A espécie <i>Passiflora alata</i> Curtis	6
2.3. A espécie <i>Passiflora miniata</i> Master	8
2.4. Cultura de tecidos in vitro aplicada à cultura do maracujazeiro	9
2.5. Organogênese in vitro	13
2.6. Reguladores de Crescimento	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO I Determinação do potencial morfogênico a partir do cultivo in vitro de embriões zigóticos e endosperma de <i>Passiflora alata</i> Curtis (Passifloraceae).....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1. Material vegetal.....	32
2.2. Indução à organogênese	32
2.3. Análise anatômica	32
2.4. Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO II Regeneração in vitro via organogênese de <i>Passiflora miniata</i> Master (Passifloraceae).....	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1. Material Vegetal	61
2.2. Obtenção dos explantes zigóticos	61

2.3. Obtenção dos explantes radiculares.....	62
2.4. Indução a organogênese	62
2.5. Alongamento e enraizamento.....	62
2.6. Caracterização anatômica.....	62
2.7. Análise estatística.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4. CONCLUSÃO	81
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	87

RESUMO

CARVALHO, Paula Pinheiro, Universidade do Estado de Mato Grosso, dezembro de 2016. **Organogênese in vitro de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora miniata* Master - Passifloraceae.** Orientadora: Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Coorientadora: Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi.

O objetivo geral do trabalho foi o estabelecimento de protocolos para regeneração via organogênese em duas espécies de maracujazeiros *Passiflora alata* e *Passiflora miniata*. Embriões zigóticos e o endosperma da semente foram utilizados como fonte de explante para a regeneração de *P.alata* e para *P.miniata* embriões zigóticos e segmentos radiculares. Os explantes foram inoculados em meio MS com a adição de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 6-Benziladenina (BA), Thidiazuron (TDZ) e Cinetina (CIN) durante 30 dias de cultivo in vitro. A regeneração in vitro de *P.alata* ocorreu via organogênese direta e indireta. O maior número de brotos regenerados a partir do cultivo do embrião foi observado na presença de CIN, na concentração de 4,6 μM , com a maior média 37,6 na produção de brotos, seguida de TDZ na presença de 9,0 μM com média de 36,4 brotos e a citocinina BA na presença de 2,2 μM com média de 33,6 brotos. A resposta morfogênica observada na maioria dos tratamentos com o cultivo do endosperma foi o desenvolvimento de calos recobrando todo explante, onde o maior percentual 72% e 64% são obtidos na concentração de 7,9 e 9,0 μM de TDZ, respectivamente. O desenvolvimento de brotos ocorreu principalmente na presença de 5,6 μM de TDZ, com média de 8,4. Na presença de BA, a regeneração ocorreu apenas em meio com 6,6 μM , resultando na média de 5,6 brotos. Nos embriões zigóticos de *P. miniata* o desenvolvimento dos primórdios das brotações iniciou-se com a formação de estruturas organogênicas que posteriormente se diferenciaram e desdiferenciaram-se em multibrotações. Na presença da citocinina BA 80% dos brotos desenvolveram via organogênese direta, enquanto que na presença de TDZ 60% e CIN 58% foram pela via direta. A maior média no número de brotos produzidos foi na concentração de 3,4 μM de BA com 40,2 de brotos por explantes. No meio de alongamento observou-se que 68% dos brotos desenvolveram raiz, com média de 11,4 por explante, sendo a maior média no comprimento dos brotos de 11,0 cm. Já os explantes radiculares apresentaram o maior índice de regenerantes em meio com TDZ, com percentual de 52% de brotações pela via direta e 48% pela indireta, onde a maior média obtida foi de 37,8

em 6,8 μM . Na presença de BA 8% dos brotos apresentaram organogênese pela via direta e 92% pela indireta, com a maior média de 14,0 na concentração de 4,4 μM . O percentual de regeneração utilizando a CIN foi de 5% pela via direta e 95% pela indireta, com maior média 2,0 brotações por explantes na concentração de 3,4 μM . No processo de alongamento e enraizamento foi observado que 75% dos brotos que foram regenerados na presença de TDZ apresentaram raiz, com a maior média de 1,4 por explante e comprimento em média de 5,4 cm. A morfogênese in vitro através da organogênese direta e indireta foi estabelecida para as duas espécies de *Passiflora* sp.

Palavras-chave: Maracujazeiros; Regeneração in vitro, Citocininas, Morfogênese in vitro.

ABSTRACT

CARVALHO, Paula Pinheiro, State University of Mato Grosso, December 2016. **Organogenesis in vitro of *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora miniata* Master-Passifloraceae.** Advisor Dr^a. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co- advisor: Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi.

The general objective of the work was to establish protocols for regeneration via organogenesis in vitro species of passion fruit *Passiflora alata* and *Passiflora miniata*. Zygotic embryos and the endosperm of the seed were used as source of explant for the regeneration of *P.alata* and for *P.miniata* the zygotic embryos and root segments. The explants were inoculated in MS medium with the addition of different growth regulators concentrations of the 6-Benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ) and Kinetin (KIN) for 30 days of culture in vitro. In vitro regeneration of *P.alata* occurred via direct and indirect organogenesis. The highest number of shoots regenerated from the embryo culture was observed in the presence of kinetin at the concentration of 4.6 μM , with the highest 37.6 in shoots production, followed by TDZ in the presence of 9.0 μM with average of 36.4 shoots and the cytokinin BA in the presence of 2.2 μM with average of 33.6 shoots. The morphogenic response observed in the majority of treatments with the endosperm cultivation was the development of callus covering all explants, where the highest percentage of 72% and 64% were obtained in the concentration of 7.9 and 9.0 μM of TDZ, respectively. The development of shoots occurred mainly in the presence of 5.6 μM TDZ with average of 8.4. In the presence of BA, regeneration occurred only in medium with 6.6 μM , resulting in an average of 5.6 shoots. In the zygotic embryos of *P. miniata* the development of early shoots began with the formation of organogenic structures that later differentiated and dedifferentiated into multi-shoots. In the presence of the cytokinin BA 80% of the shoots, organogenesis occurred by the direct route, whereas in the presence of TDZ 60% was by the direct route and with 58% KIN. The highest averages in the number of shoots produced in 3.4 μM BA were 40.2. In the medium of elongation 68% of the shoots developed root with an average of 11.4 per explant, being the highest average in the length of shoots of 11.0 cm. The root explants presented the highest regenerant index in medium with TDZ, with 52% of shoots by direct route and 48% by indirect ones, where the highest average obtained was 37.8 in 6.8 μM . In the presence of BA 8% of the shoots had organogenesis by the direct route and 92% by the indirect, with the highest average of 14.0 in the concentration of 4.4 μM . The

percentage of regeneration using the KIN was 5% by the direct route and 95% by the indirect, with a higher average of 2.0 shoots per explants in the concentration of 3.4 μM . In the process of elongation and rooting, it was observed that 75% of the shoots that were regenerated in the presence of TDZ presented, with the highest average of 1.4 per explant and average length of 5.4 cm. In vitro morphogenesis through direct and indirect organogenesis was established for the two species of *Passiflora* sp.

Keywords: Passion fruit; Regeneration in vitro, Cytokinins, Morphogenesis in vitro.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* abrange 24 subgêneros com cerca de 520 espécies distribuídas nos trópicos do Novo Mundo em regiões tropicais e subtropicais, e a família Passifloraceae destaca-se pela sua importância econômica, devido ao valor nutricional de seus frutos, propriedades farmacêuticas presente nos seus compostos ativos como a passiflorina, maracujina e substâncias tanóides e também ao notável valor ornamental de suas flores (Viana et al., 2010; Silva et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Cutri et al., 2013; Cerqueira-silva et al., 2014a).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá, com produção anual de aproximadamente 920.000 toneladas (IBGE, 2011). Neste seguimento, os estados da Bahia, São Paulo, Sergipe, Espírito Santo, Pará, Ceará e Minas Gerais, representam 80% da produção nacional (Roncatto et al., 2011), onde a espécie *Passiflora edulis* é a mais cultivada comercialmente, seguida da *Passiflora alata*, conhecida popularmente por maracujá-doce que apresenta destaque no cenário nacional como fonte de princípios ativos para indústria farmacêutica, cosmética e medicinal, onde das folhas e dos ramos é extraída a passiflorina, uma substância tranquilizante (Moreira et al., 2012).

O maracujá-doce (*Passiflora alata*) é cultivado no Brasil para o consumo *in natura*, tendo em vista as características da polpa muito saborosa e doce e a aplicação em projetos paisagísticos introduzido como planta ornamental devido à beleza das flores que são grandes e vermelhas (Pinto et al., 2010; Montero et al., 2013).

O Brasil é o centro de diversidade dos maracujazeiros com mais de 150 espécies nativas, das quais 83 são consideradas endêmicas, incluindo as espécies silvestres, que representam ampla variabilidade genética com características de interesse que podem ser introduzidas nas espécies comerciais via melhoramento genético (Junqueira et al., 2007; Pinto et al., 2010; Bernacci et al., 2016).

No estado de Mato Grosso espécies endêmicas de maracujazeiros são pouco estudadas, e é o caso da *Passiflora miniata* da Amazônia Meridional, de beleza exuberante, com flores de coloração vermelha intenso com grande potencial de utilização como planta ornamental. É uma espécie encontrada em clareiras nas

matas e com o desmatamento intenso nestas regiões, a erosão genética é inevitável e a necessidade de conservação se faz necessário.

O maracujá como planta ornamental produz grande atratividade pela beleza e exuberância de suas flores, com grande variação de coloração forte e brilhante e algumas, outras de coloração tênue e suave (Montero et al., 2013). As flores também são consideradas exóticas e complexas, principalmente pela presença da corona, que caracteriza esta família, sendo uma fonte alternativa na geração de renda para a agricultura, otimizando o uso dos recursos naturais (Abreu et al., 2009). O potencial ornamental das passifloras é pouco explorado no Brasil, porém, nos países do Hemisfério Norte já foi registrado mais de 400 híbridos para fins ornamentais (Peixoto, 2005).

A propagação do maracujazeiro é realizada predominantemente por meio de reprodução sexuada, devido às características florais e principalmente a autoincompatibilidade, que acarretam consequências na produção de plantas com elevada variabilidade genética e desuniformidade em relação às características agrônômicas (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010).

Métodos de propagação *in vitro*, em destaque a de cultura de tecidos vegetais, aliado aos estudos morfoanatômicos, podem proporcionar a viabilização e otimização de protocolos de micropropagação pelas diversas vias morfogênicas de espécies frutíferas comerciais e silvestres como fonte de recurso genético, permitindo a conservação *in vitro* de germoplasma de alto valor genético, o acompanhamento das fases do processo morfogênico (Yang et al., 2010; Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2016).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a organogênese é a principal via morfogênica de regeneração no gênero *Passiflora* (Zerbini et al., 2008). Trata-se de um processo complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente, dependendo também da ação dos reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (Otoni et al., 2013).

Desta forma, tendo em vista a importância econômica e ecológica das espécies em estudo e do conhecimento do processo de regeneração *in vitro* o

estudo visa o estabelecimento de protocolos para regeneração via organogênese nas espécies de maracujazeiro *Passiflora alata* e *Passiflora miniata*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae forma um grupo monofilético, constituído por 20 gêneros e cerca de 630 espécies, dos quais o de maior importância econômica é o gênero *Passiflora*, comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, incluindo desde a região Amazônica até o Paraguai e o Nordeste da Argentina (Souza e Lorenzi, 2008; Souza e Lorenzi, 2012; Muschner et al., 2012). O Brasil e a Colômbia formam os maiores centros de diversidade com cerca de 400 a 530 espécies (Feuillet e Macdougall, 2007). Destas, 150 a 200 são registradas no país, com aproximadamente 83 espécies endêmicas e o Centro-Norte é o maior centro de distribuição geográfica (Bernacci et al., 2003; Ulmer e Macdougall, 2004; Lopes, 2009; Bernacci et al., 2013).

O gênero *Passiflora* compreende plantas trepadeiras perene, herbáceas ou lenhosas com caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso, onde as folhas apresentam grande variação fenotípica podendo ser simples ou compostas, alternas, lobadas ou trilobuladas e palminérvias, com margem inteira ou serrilhada, apresentando ainda, glândulas nectaríferas na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha e no pecíolo (Vanderplank, 2000; Feuillet e Macdougall, 2007; Cervi et al., 2010). Estudos com as folhas e o pericarpo dos frutos das espécies de *Passiflora edulis* e da *Passiflora alata* tem relatado a presença de constituintes químicos como os alcalóides, compostos cianogênicos, fenóis, lignanos, esteróis e os flavonóides do tipo C-glicosilados, comumente utilizados em preparações fitoterápicas pela medicina popular (Zeraik et al., 2010).

A autoincompatibilidade do tipo esporofítica presente no gênero *Passiflora* é uma característica importante da biologia floral da espécie, pois determina a alogamia, fator que contribui para o aumento da variabilidade genética, uma vez que, as espécies de maracujazeiros são plantas de polinização cruzada (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010). Sua propagação é realizada preferencialmente pela via sexuada através das sementes que resulta na formação de mudas desuniformes e heterogêneas, ou ainda pela via assexuada por meio da enxertia, estaquia e pela cultura de tecidos in vitro, que possibilita a seleção e a multiplicação de plantas com alta produtividade, a formação de mudas mais uniformes e livres de fitopatógenos (Roncetto et al., 2008; Sousa et al., 2010).

No que diz respeito aos aspectos florísticos, apresentam ampla diversidade em cores, formas e tamanhos, caracterizados por uma beleza peculiar e excêntrica com grande potencial para uso no mercado ornamental que podem ser utilizadas em lugares desde sombreados até ao pleno sol, como cerca viva para apreciação da paisagem com arranjo repleto de flores vistosas e perfumadas ou atrativamente como plantas em vasos para decoração de eventos, em varandas ou até mesmo dentro de casa, proporcionando para a agricultura familiar uma fonte alternativa na geração de renda (Bernancci et al., 2016).

A produção do fruto de maracujá tem sido assunto de diversas pesquisas, resultando na caracterização de inúmeros constituintes voláteis, presentes desde a casca até a semente, sendo identificadas mais de 40 substâncias, como ésteres, aldeídos, cetonas e álcoois, responsáveis pelo aroma desta fruta (Zeraik et al., 2010).

Além disso, o maracujá é considerado uma rica fonte de carotenoides, pigmentos responsáveis pela cor amarela do suco que em conjunto com o teor de flavonoides também encontrados no fruto, possuem caráter antioxidante, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios relacionados ao envelhecimento (Zeraik et al., 2012; Wondracek et al., 2012).

Por sua vez, as sementes do maracujá são consideradas boa fonte de ácido graxo essencial, entre eles o ácido linoléico, conhecido como ômega 6, sendo importante no aumento do colesterol bom (HDL), seguido do ácido oleico que é o ômega 9, utilizado na dieta alimentar para a redução do colesterol ruim (LDL) na corrente sanguínea (Janebro et al., 2010; Barbalho et al., 2012). Outra substância presente no óleo extraído da semente é a passiflorina que atua na redução da ansiedade, no combate a insônia, ao estresse e a depressão (Janebro et al., 2010).

Deste modo, as espécies do gênero *Passiflora*, principalmente as silvestres, tem atraído a atenção dos cientistas por caracterizarem-se como importante fonte de recursos genéticos do interesse de muitos pesquisadores e melhoristas, uma vez que, reúne ampla variabilidade de genes superiores e favoráveis à produtividade, a presença de propriedades farmacológicas e a resistência a pragas e doenças que afetam a produção da cultura (Faleiro et al., 2005; Moreira et al., 2012; Sabir et al., 2012; Silva et al., 2014).

Entre as principais doenças que atacam e limitam a produtividade do maracujá, estão a mancha bacteriana causada pelo *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, a fusariose causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, o endurecimento de frutos causado pelo *Cowpea aphidborne* mosaic virus e a antracnose, causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* que comprometem a produção da cultura (Nascimento et al., 2004; Junqueira et al., 2005; Barros, 2011; Cerqueira-Silva et al., 2014b).

A incompatibilidade presente entre algumas espécies do gênero *Passiflora* podem limitar ou até mesmo impossibilitar o uso de técnicas do melhoramento genético clássico. Neste caso, a transformação genética e a hibridação somática, tornam-se alternativas viáveis e suplementares da hibridação sexual na transferência de genes de interesse para alcançar o objetivo desejado (Otoni et al., 1995; 2013). Contudo, para que isso aconteça, o estabelecimento e a otimização de protocolos eficientes de regeneração *in vitro* das espécies a partir da cultura de células e/ou tecidos, incluindo a organogênese são imprescindíveis (Silva et al., 2009; Silva et al., 2015).

2.2 A espécie *Passiflora alata* Curtis

Passiflora alata é nativa da América do Sul, com ocorrência registrada no Pará, da Bahia ao Rio Grande do Sul e no Centro-Oeste, podendo ser encontrada ainda, na Argentina, Paraguai e no Peru (Koehler-Santos et al., 2006, Pinto et al., 2010). É a segunda espécie mais cultivada do Brasil, com grande importância econômica e social, podendo ser consumida *in natura*, pois a polpa do fruto é doce e agradável, por meio de produtos industrializados como sucos e geleias, na produção de fármacos e cosméticos ou como planta ornamental pela beleza de suas flores grandes e de cor carmim intensa (Figura 1). Dependendo da localidade de ocorrência da espécie é conhecida popularmente por maracujá-doce, maracujá-açu ou maracujá-grande (Varassin et al., 1999; 2001).

É uma trepadeira robusta com gavinhas, de caule firme, com folhas membranáceas, simples e inteiras de cor verde-escuro e no verso são pálidas de formato ovadas ou ovado-oblongas, com margem lisa ou finamente denticulada, apresentando pecíolo curto com estípulas pequenas. Já as flores com tamanhos extremamente grandes e vistosas, são hermafroditas, com incompatibilidade sexual,

actinomorfa, pentâmeras e geralmente isoladas com sépalas e pétalas carnosas e avermelhadas internamente. Produzem frutos com formato que vai de ovoide a piriforme ou glabro com cor amarela enquanto maduro, onde a polpa extremamente doce é comestível ao natural (Nunes et al., 2001).



Figura 1. Planta com flores de *Passiflora alata*

Passiflora alata é uma das diversas espécies que agregam porção significativa da diversidade genética de maracujá com uso medicinal, considerada uma droga oficial da quinta edição da Farmacopeia Brasileira por apresentar propriedades farmacológicas de interesse, como: os alcaloides, fenóis, compostos cianogênicos, lignanos, esteróis e flavonóides (isovitexina, isorientina, vitexina, orientina, schaftosídeo e isoschaftosídeo), encontrados principalmente nas folhas e no pericarpo do fruto, utilizados na medicina popular de vários países como tranquilizantes e na cura de enfermidades. (Pereira e Vilegas, 2000; ANVISA, 2010, Zucolotto et al., 2011; Gosmann et al., 2011; Moreira et al., 2012).

No caso dos flavonoides, substância de maior abundância na espécie, atua na defesa contra ataque de patógenos, na atração de polinizadores, no controle da ação de hormônios vegetais e dependendo da estrutura química, atuam como antioxidante associado à prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares ou no retardo do envelhecimento (Botta et al., 2001; Filho et al., 2001; Zuanazzi e Montanha, 2004; Petkovsek et al., 2011; Sabir et al., 2012).

O cultivo in vitro de células vegetais vem sendo cada vez mais utilizada devido ao seu potencial na produção de metabólitos secundários de interesse, chamando a atenção dos cientistas pela possibilidade de produção em larga escala e sob condições controladas, independente da localização e sem problemas de reprodutibilidade (Petkovsek et al., 2011; Sabir et al., 2012; Pacheco et al., 2012).

A cultura in vitro de *P. alata* tem sido descrita apenas a partir de segmentos nodais e de folhas (Rodriguez et al., 2007) e segmentos hipocotiledonares (Pinto et al., 2010). No entanto, o estabelecimento e a otimização de protocolos de regeneração in vitro da espécie são necessários para auxiliar no processo de transformação genética ou até mesmo na produção de híbridos que visam à manipulação de genes potencialmente úteis, uma vez que, o sucesso destas técnicas de melhoramento biotecnológico está condicionado à existência de um protocolo eficiente de regeneração (Trevisan et al., 2006).

2.3 A espécie *Passiflora miniata* Master

Espécies silvestres de maracujá são frequentemente utilizadas em programas de melhoramento por apresentarem ampla variabilidade genética (Faleiro e Junqueira, 2009; Cervi et al., 2010) com genes de interesse que podem ser empregados em espécies comercialmente cultivadas, com características agrônômicas relevantes no mercado, objetivando a produtividade e qualidade do fruto, para extração de compostos químicos, produção de fármacos ou cosméticos e ainda, para lançamento de novos híbridos com potencial ornamental (Faleiro et al., 2005, 2006, 2013; Vieira et al., 2014).

Passiflora miniata é uma espécie silvestre, que pertence ao subgênero *Passiflora* e foi descrita por Vanderplank no ano de 2006. Tem sua origem e distribuição na região Amazônica meridional do Brasil, Colômbia, Peru e nas Guianas (Lim, 2012). Segundo as observações e estudos realizados por Vanderplank (2006), a espécie apresenta flor de coloração vermelho intenso, possui três séries de filamentos da corona com uma coloração púrpura (Figura 2) e seus frutos são pequenos e variegados com coloração verde e creme. Sendo uma espécie diploide, apresentando em sua constituição cromossômica, $2n=18$ cromossomos (Geronimo et al., 2014).



Figura 2. Planta com flor e botões florais de *Passiflora miniata*

A espécie apresenta grande potencial ornamental, podendo ser empregada como fonte alternativa na geração de renda para agricultura familiar no estado de Mato Grosso. Estudos que envolvem a regeneração *in vitro* de *P. miniata* somente foi relatado por (Ferreira et al., 2015) no estabelecimento de protocolo de embriogênese somática e partir de embriões zigóticos. No entanto, trabalhos de cultura de tecidos da espécie ainda são insipientes.

2.4 Cultura de tecidos aplicada à cultura do maracujazeiro

A cultura de tecidos vegetais representa um dos principais sistemas experimentais utilizados para o estudo da morfogênese de plantas por meio da investigação das bases estruturais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares dos processos de desenvolvimento subjacentes (Guerra et al., 2016). Além disso, vem sendo bastante aceita e aplicada, uma vez que, proporciona o desenvolvimento de novos indivíduos, podendo ser geneticamente estáveis, sadios e vigorosos em escala comercial (Gerra et al., 2016).

A técnica é baseada na pluripotência celular, que consiste na capacidade da célula vegetal em sofrer divisão e diferenciação, desenvolvendo um novo indivíduo, com as mesmas características genótípicas da planta matriz (Guerra et al., 1999; George et al., 2008). Para isso, é necessário o isolamento de um segmento de tecido vegetal, denominado de explante, que pode ser qualquer parte da planta,

como: raízes, gemas, células isoladas, folhas, protoplastos, sementes, embriões zigóticos, anteras e inoculado em meio de cultura estéril contendo macro e micronutrientes, acrescidos ou não de reguladores de crescimento específico, submetidos a condições controladas de iluminação, temperatura e umidade, adequada para indução da competência celular envolvida no processo morfogênico (Rose et al., 2010; Almeida et al., 2015).

A escolha do explante dependerá dos objetivos desejados, da disponibilidade e da capacidade de resposta do material vegetal (Almeida et al., 2015; George et al., 2008). No entanto, as condições ambientais influenciam notavelmente o cultivo *in vitro*, sendo a luz o fator ambiental mais relevante (Vieira et al., 2014).

Atualmente, dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, as principais vias de regeneração são a organogênese e a embriogênese somática (George et al., 2008). No entanto, a organogênese é a principal via morfogênica de regeneração no gênero *Passiflora*, pois comparada ao processo de regeneração via embriogênese somática é um método menos complexo e laborioso (Zerbini et al., 2008).

O processo da regeneração *in vitro* via organogênese consiste na formação de órgãos adventícios monopolares (caulinares ou radulares) com o sistema vascular conectado ao tecido parental (Sharp et al., 1980, Moura, 2001).

Em *Passiflora*, estudos de propagação *in vitro* foram descritos primeiramente pelo pesquisador Nakayama (1966), na qual foi o responsável pelo estabelecimento de protocolos para a espécie *P. caerulea* (Nakayama, 1966). Isso possibilitou o desenvolvimento de trabalhos, com outras espécies do gênero *Passiflora* (Tabela 1).

Tabela 1. Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora*.

Espécie	Objetivo	Referências
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. caerulea</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. coccinea</i> , <i>P. herbertiana</i> , <i>P. suberosa</i>	Organogênese	Drew, 1991
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. giberti</i> , <i>P. maliformis</i> , <i>P. amethystina</i> .	Organogênese	Dornelas e Vieira, 1994

<i>P. edulis</i>	Organogênese	Kawatta et al., 1995
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Faria e Segura, 1997
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Biasi et al., 2000
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> e <i>P. suberosa</i>	Organogênese	Monteiro et al., 2000
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Reis et al., 2003
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Becerra et al., 2004
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Nhut et al., 2007;
<i>P. coerulea, P. costaricensis, P. foetida, P. quadrangularis, P. trifasciata, P. vitifolia, P. watsoniana, P. allardii</i>	Organogênese	Pipino et al., 2008
<i>P. hybrid</i>	Organogênese	Pipino et al., 2010
<i>P. alata</i>	Organogênese	Pinto et al., 2010
<i>P. edulis, P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Prammanee et al., 2011
<i>P. suberosa</i>	Organogênese	Garcia et al., 2011
<i>P. cincinnata</i> e <i>P. edulis</i>	Organogênese	Silva et al., 2011
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Rosa e Dornelas, 2012
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Anand et al., 2012
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Pacheco et al., 2012

<i>P. setacea</i>	Organogênese	Vieira et al., 2014
<i>P. edulis f. flavicarpa, P. giberti</i>	Embriogênese somática	Anthony et al., 1999
<i>P. cincinnata</i>	Embriogênese somática	Silva et al., 2009
<i>P. morifolia</i>	Embriogênese somática	Albino, 2013
<i>P. ligularis</i>	Embriogênese somática	Florido, 2013
<i>P. gibertii, P. alata, P. crenata, P. edulis</i>	Embriogênese somática	Rosa et al., 2015
<i>P. miniata, P. speciosa</i>	Embriogênese somática	Ferreira et al., 2015
<i>P. edulis</i>	Embriogênese somática	Silva et al., 2015
<i>P. coccinea</i>	Hibridação somática	Otoni et al., 1995
<i>P. edulis</i>	Hibridação somática	Davey et al., 2005
<i>P. cincinnata</i>	Transformação genética	Reis et al., 2007
<i>P. cincinnata</i>	Embriogênese somática e Transformação genética	Silva, 2007
<i>P. cincinnata</i>	Produção de sementes sintéticas	Silva et al., 2015
<i>P. edulis</i>	Ginogênese	Rêgo et al., 2011
<i>P. edulis</i>	Indução de autotetraploides	Rêgo et al., 2011
<i>P. edulis, P. giberti, P. laurifolia</i>	Conservação in vitro	Faria et al., 2007

2.5 Organogênese in vitro

O sucesso de técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento de plantas perenes como, o maracujazeiro, está condicionado à existência prévia de uma metodologia eficiente de regeneração. Com isso, vários estudos vêm atuando para compreender os mecanismos fisiológicos vegetais, e assim, manipular genes de interesse tanto para o setor agrônômico e medicinal quanto para o mercado ornamental (Figueiredo e Takita, 2004).

A organogênese é constantemente utilizada como método de regeneração in vitro mais aplicada em espécies do gênero *Passiflora* (Yang e Zhang, 2010; Rocha et al., 2012; Vieira et al., 2014). Isso ocorre devido às inúmeras vantagens que o sistema dispõe, como a propagação rápida e em massa de brotos, ambiente reduzido e em condições controlada, uma vez estabilizada e otimizado o protocolo, tem baixo custo, o armazenamento em longo prazo de germoplasma e sua adaptação para plantas de difícil propagação por meio de técnicas convencionais de propagação e a obtenção de propágulos livres de doenças (Sharp et al., 1980; Guerra et al., 2016).

O sistema consiste na diferenciação de tecidos que são induzidos a sofrer mudanças para produzirem órgãos adventícios com estrutura unipolar, denominada de primórdio caulinar ou de raiz, cujo sistema vascular apresenta-se conectado ao tecido parental (Sharp et al., 1980, Moura, 2001). A organogênese in vitro pode ocorrer com base em duas rotas distintas a direta e a indireta (Skoog e Miller, 1957, George, 2008; Xu e Huang, 2014).

Na organogênese direta, o órgão vegetal é induzido e desenvolve diretamente do explante, isto é, sem passar por uma fase inicial de calo, ou seja, sem ocorrer a desdiferenciação dos tecidos dos explantes, o que caracteriza para formação de massa de células que podem apresentar certo grau de diferenciação (Xu e Huang, 2014). Na indireta, há uma fase inicial de proliferação e crescimento de calo (tecidos desdiferenciados) seguido por indução de brotos ou raízes e o desenvolvimento desses tecidos (Mantell et al.1994; Carvalho et al., 2006). O calo é o aglomerado de células em diferentes estádios de desdiferenciação (George et al., 2008; Xu e Huang et al., 2014).

O processo morfogênico é direcionado por uma serie de eventos que envolvem não apenas os fatores abióticos (nutrientes do meio, a luminosidade do

ambiente ou a temperatura do local), mas, também os fatores bióticos, como os hormônios (endógenos e exógenos), a composição genética do material manipulado, os níveis de competência celular, o posicionamento do explante e o desempenho do controle gênico (Dhaliwal et al., 2003; Ozarowski e Thiem, 2013).

Durante o processo morfogênico a planta passa por diferentes estágios de desenvolvimento até o seu completo ciclo de regeneração. As células dos tecidos exposta ao meio de cultivo recebem estímulos por intermédio de vários sinais para aquisição da competência morfogênica, que uma vez adquirida à competência, as células são determinadas e entram em estado de diferenciação e/ou dediferenciação, seguida de uma reprogramação celular (rediferenciação) e são redirecionadas para a formação de novos tecidos e órgãos (Almeida et al., 2012; Almeida et al., 2015; Guerra et al., 2016).

A determinação celular ocorre quando a célula torna-se limitada a uma rota específica decorrente da aquisição adquirida, podendo ser influenciada pela sinalização hormonal endógena ou exógena, pela expressão gênica do genótipo e/ou pelo posicionamento celular (Chupeau et al., 2013; Almeida et al., 2015). Outro fator que influencia no sistema de regeneração morfogênica é a idade fisiológica da planta e o posicionamento do explante no meio (Lombardi et al., 2007).

O meio de cultivo contém nutrientes essenciais para o crescimento dos tecidos, responsáveis em grande parte, pelo padrão do desenvolvimento in vitro. Atualmente, o meio básico mais empregado nas culturas de modo geral, para micropropagação é o MS (Murashige e Skoog, 1962), desenvolvido a partir de testes realizados por White a partir de extratos de folha de fumo, empregado na cultura de diversas espécies, inclusive na regeneração de espécies do gênero *Passiflora* (Ozarowski e Thiem, 2013).

Além do meio básico de macro e micronutrientes presentes no MS é comum à utilização deste na metade de suas concentrações e/ou acrescentando a vitamina B5 entre outros aditivos químicos, como o nitrato de prata, carvão ativado ou até mesmo a água de coco para induzir ou acelerar a produção de gemas adventícias ou para a fase de alongamento dos brotos, influenciando muitas vezes no sistema de regeneração das espécies de *Passiflora* (Pinto et al., 2010; Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012; Rosa e Dornelas, 2012; Rocha et al., 2012; Ozarowski e Thiem, 2013).

Recentemente, estudos de regeneração via organogênese que abrangem a influência dos fatores externos e internos no processo morfogênico *in vitro* têm sido reportados para várias espécies de *Passiflora* (Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011; Garcia et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Rocha et al., 2012; Pacheco et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Ozarowski e Thiem, 2013; Otoni et al., 2013; Merhy, 2014; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016; Rosa et al., 2016).

2.6 Reguladores de Crescimento

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são regulados por uma série de fatores externos e internos (Christianson et al., 1985). Os fatores internos são substâncias químicas como os hormônios e as enzimas que atuam em resposta conjunta com as condições ambientais de temperatura e luminosidade, diretamente ligados com a programação genética da planta (Werner et al., 2012; Vieira et al., 2014).

Os reguladores de crescimento de plantas são substâncias sintéticas que produzem efeitos similares aos hormônios naturais. Seu uso é um requisito fundamental para o processo de divisão e diferenciação celular, uma vez que, plantas cultivadas *in vitro* tem seu metabolismo heterotrófico (Pierik, 1988; Grattapaglia e Machado, 1998; Guerra et al., 1999; 2016). Funcionam como complemento do meio básico, que influenciam positivamente ou negativamente, dependendo da concentração utilizada e da sua finalidade, em todos os estágios da regeneração *in vitro* que vai desde a indução até ao enraizamento e o alongamento das plantas (Peres, 2002; Carvalho et al., 2006).

Dentro das classes dos reguladores, as citocininas desempenham um papel fundamental em muitas fases do crescimento e do desenvolvimento das plantas, pois influenciam diretamente nas alterações das taxas metabólicas e atividade enzimática, assim como, no retardamento da senescência de tecidos e órgãos e, quando adicionados ao meio de cultivo *in vitro*, promovem a superação da dormência apical quebrando a dominância das gemas laterais, estando assim, relacionadas com a indução e produção de brotos (George et al., 2008). Entre elas, as mais utilizadas no processo de regeneração *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* são a 6-Benziladenina (BA); o Thidiazuron (TDZ) e a Cinetina (CIN) (Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Vieira et al., 2014; Carvalho et al., 2015).

A citocinina mais aplicada no cultivo in vitro de espécies do gênero *Passiflora* é a 6- Benziladenina (BA), com a indução de multibrotações a partir da diferenciação da parte aérea e de meristemas apicais e radiculares (Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012; Rosa e Dornelas, 2012).

O Thidiazuron (TDZ) e a Cinetina (CIN) também são reguladores de crescimento dentro da classe das citocininas que estão sendo comumente utilizado na regeneração via orgnogênese de *Passiflora*, sendo biologicamente mais ativos que o BA em baixas concentrações, promovendo no cultivo in vitro a indução das divisões e diferenciações das células teciduais, e conseqüentemente, na formação e no desenvolvimento de órgãos adventícios para maioria das espécies na qual tem sido testado (Mok et al., 1987; Murthy et al., 1998; Pinto et al., 2010; Garcia et al., 2011).

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.
- 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).
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**. 31: 1495-1515, 2012.
- ALMEIDA, M.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ARTIOLI, F. A.; ALMEIDA, L. V.; LEONE, G. F.; BACCARIN, F. J. B.; ANTONELLI, P. O.; CORDEIRO, G. M.; OBERSCHELP, G. P. J.; PIOTTO, K. D. B. Plant morphogenesis: theoretical bases. **Advances in Forestry Science**. 2: 13-22, 2015.
- 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. p. 169–181, 1999.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ed. Brasília, 2010. 1448p. Disponível em: 6 http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd_farmacopeia/index.htm. (Acesso, Fevereiro de 7 2016).
- BARROS, D. R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA JUNIOR, J. E. A.; ANTUNES, T. F. S.; ZERBINI, F. M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology Wien**. 56: 1085-1091, 2011.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 25: 355-356, 2003.
- BECERRA D. C.; FORERO A. P.; GÓNGORA G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. flavicarpa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 79:87-90, 2004.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S. **Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade**. In: BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. da 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*, Jaboticabal. 30: 566-576, 2008.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. 2016. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: Acesso em: 30 mar. 2016.

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

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354- 379.

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

BRUCKNER, C. H. Perspectivas do melhoramento do maracujazeiro. In: MANICA, I. (ed). **Maracujá: temas selecionados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 25 46.

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

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. ; JESUS, O. N. ; OLIVEIRA, E. J. ; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**. 200: 345–359, 2014a.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCENÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, A. P.;CORRÊA, R. X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology, Heidelberg**. 139: 261-270, 2014b.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL , N. W.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB) **Considerações Gerais Sobre Organogênese**. Campina Grande, 2006 26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 150)

CARVALHO, M. A. D. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M. D.; PAIVA, P. D. D. O.; VARGAS, D. P. Induction, morphologic and ultra-structural analyses of native passion fruit calluses. **Revista Ceres**. 62: 340-346, 2015.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; 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.

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

CHUPEAU, M. C.; GRANIER, F.; PICHON, O.; RENOU, J. P.; GAUDIN, V.; CHUPEAU, Y. Characterization of the early events leading to totipotency in an *Arabidopsis* protoplast liquid culture by temporal transcript profiling. **The Plant Cell**. 25: 2444-2463, 2013.

CUTRI, L.; NAVE, N.; AMI, M. B.; CHAYUT, N.; SAMACH, A. ;DORNELAS, M.C. Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. **Mechanisms of Development** .130: 61-69, 2013.

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

DHALIWAL, H. S. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis in vitro. **Canadian Journal of Botany**,. Ottawa. 81: 611-621, 2003.

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

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Current Science**. 26: 23-27, 1991.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. v. 1, 677.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). **The state of Brazil's plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture**. Brasília, DF: Embrapa Technological Information: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Brasília, DF. 2009. Chapter 5. p. 101-106.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JESUS, O. N.; COSTA, A. M. **Avances y perspectivas del fitomejoramiento de las passifloráceas em Brasil**. In: Congreso Latino Americano de Passifloras. Neiva. Analise Neiva: Corporación Cepas Colombia, 2013.p-12-23.

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

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.

FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Melhoramento e biotecnologia: cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Laranja**. 25: 439-459, 2004.

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

FERREIRA, 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.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. In: KUBITZI, K. (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. v. 9. Berlin: Springer, 2007. p. 270-281.

FILHO D. W.; SILVA E. L.; BOVERIS, A. Flavonoides oxidantes de plantas medicinais e 1 alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes RA, Calixto JB (eds) 2 **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 317-3 334.

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.

FLORIDO, L. Y. D. **Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss. e influência da irradiância no desenvolvimento e metabolismo secundário *in vitro* de *P. mollissima* Bailey H.B.K.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 64 p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

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

GERÔNIMO, I. G. C. **Caracterização de espécies silvestres de *passiflora* via análise meiótica e conteúdo 2C DNA.** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014. 54 p. (Dissertação- Mestrado – Genética e Melhoramento)

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

GLORIA, B. A.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELLAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived in leaf explants pf passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 24: 2007-2013, 1999.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.

GOSMANN, G.; PROVENSIL, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e 9 aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Brasileira de Biociências**. 9: 88-99, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998. p. 99-170.

IBGE. **Censo Agropecuario**. Lavoura permanente e temporária. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2011/>. Acesso em: 30 de outubro de 2016.

JANEBRO, D. I. Análise dos componentes da síndrome metabólica antes e após a suplementação dietética com farinha da casca do maracujá, em pacientes diabéticos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 42: 217-222, 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

KOEHELER-SANTOS, P.; LORENZ-LEMKE, A. P.; MUSCHNER, V. C.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society** 88: 611-630, 2006.

LIM, T. K. *Passiflora miniata*. **Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants Fruits**. 4: 178 -180, 2012.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I .R. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZATO-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.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33: 083-091, 2011.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A.; GONÇALVES-ESTEVEES, V. A taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae) in Brazil. **Phytotaxa**. 53: 1–68, 2012.

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

MONTERO, D. A. V.; MELETTI, L. M. M.; MARQUES, M. O. 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.

MONTEIRO, L. B.; MENDONÇA, M. R.; ANDRADE, A. T.; CAMARGO, T.; SOUSA, K. M.; OI, R.; MORAES, M. S.; LIA, L. R. B.; JUNIOR, D. M. Curva de Secagem do Mesocarpo do Maracujá. **Ceciliana**. 2: 42-44, 2010.

MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Propriedades químicas e medicinais do maracujá. **Informe Agropecuário** 33: 7-16, 2012.

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.

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

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

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

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

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).

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

PACHECO, G. 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.

PAIM PINTO, D. L.; 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.

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

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

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p. 458-462.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 4: 44-48, 2002

PETKOVSEK, M. M.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. **Biologia Plantarum**. 55: 725-730, 2011.

PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* 15 organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 46: 28-33, 2010.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo In vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1988.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero 10 *Passiflora* com ênfase em *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 3: 1-12, 2000.

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.

REIS, L. B.; PAIVA.; NETO, V. B.; TOLEDO; PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; REGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 39: 618–622, 2003.

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.

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

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.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. 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, 2012a.

ROCHA, D. I.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C.; Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**. 252: 249-257, 2014.

ROCHA, D. I.; 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.

RODRIGUEZ, M. V.; SEVERÍN, C. R.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, M. A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, A. O.; GATTUSO, S. J. Cultivo in vitro de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. **Acta Horticulturae**. 48: 69-72, 2007.

RONCATTO, G.; ASSIS, G. M. L. D.; OLIVEIRA, T. K. D.; LESSA, L. S. Pegamento da enxertia em diferentes combinações de variedades e espécies utilizadas como copa e como porta-enxertos de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33: 791-797, 2011.

RONCATTO, G.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C. D. & MARTINS, A. B. G. Enraizamento de estacas de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) no inverno e no verão. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 1089-1093, 2008.

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

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

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

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

SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; HAMID, A.; KHAN, M. Q.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, D. B.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**. 131: 741-747, 2012.

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.

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

SILVA, M. L. **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, I. P. Fungos Endofílicos: Fonte Alternativa a Metabólitos Secundários de Plantas. **Enciclopédia Biosfera**.10: 3888, 2014.

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.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 11: 118-131, 1957.

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. 2ed, 2008. 704p.

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, 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, 2012. 768p.

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

TREVISAN, F, MENDES, B. M. J, MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETI, L. M. M.; REZENDE, J. A. M.; Resistance to passion fruit woodiness vírus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**. 90:1026–1030, 2006.

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

VANDERPLANK, J. Plate 562: *Passiflora miniata* (Passifloraceae). **Curtis's Botanical Magazine**. 23: 223–230, 2006.

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

CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. & BERNACCI, C. Passifloraceae. In: Forzza, R. C. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em Acesso 20 Out 2011.

VANDERPLANK, J. Plate 562: *Passiflora miniata* (Passifloraceae). **Curtis's Botanical Magazine**. 23: 223–230, 2006.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3. ED. CAMBRIDGE: The MIT Press, 2000. 224p.

VARASSIN, I. G.; SILVA, A. G. A. Melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em Vegetação de Restinga. **Rodriguésia**. 50:76-77, 1999.

VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in Southeastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 136: 139-152, 2001.

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

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; 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.

WERNER, E. T.; LIMA, A. B. P.; AMARAL, J.A. T. Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia Biosfera**, 8: 552-580, 2012.

WONDRACEK, D. C. Influência da saponificação na determinação de carotenóides em maracujás do cerrado. **Química Nova**. 35: 180-184, 2012.

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

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

YANG, J. L.; SEONG, E. S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU C. Y.; LI, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L.var.italica) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.100:49-58, 2010.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. The polysaccharide composition of yellow passion fruit rind cell wall: chemical and macromolecular features of extracted pectins and hemicellulosic polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 88: 2125-2133, 2008.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow Passion Fruit Rind - A Potential Source of Low-Methoxyl Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 2738-2744, 2006.

Zeraik, M. L.; Pereira, C. A. M.; Zuin, V. G.; Yariwake, J. H. Maracuja: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacogn**. 20: 459-471, 2010.

ZERAIK, M. L. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Química Nova**. 35: 541-545, 2012.

ZERBINI, F. 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.

ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.; PETROVIK, P. R. (eds) **Farmacognosia: da planta ao 21 medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC. 576-614p.

ZUCOLOTTI, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* 4 species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**. 23: 232-239, 2006.

CAPÍTULO I

Determinação do potencial morfogênico a partir do cultivo in vitro de embriões zigóticos e endosperma de *Passiflora alata* Curtis - (Passifloraceae)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi descrever o potencial morfogênico de embriões zigóticos e do endosperma de *Passiflora alata*. As sementes foram desinfestadas e os endospermas e embriões zigóticos foram isolados. Os explantes foram inoculados em meio suplementado com diferentes concentrações das citocininas, 6-Benziladenina (BA), Thidiazuron (TDZ) e Cinetina (CIN). Amostras com potencial organogênico foram coletadas, fixadas e incluídas em historesina e submetidas a colorações com azul de toluidina. A regeneração a partir dos embriões ocorreu através da organogênese direta e indireta, enquanto que através do uso do endosperma, somente a via indireta foi observada. A CIN na concentração de 4,6 μM proporcionou o maior número de brotos com média de 37,6 seguida de TDZ a 9,0 μM com média 36,4 de brotos e de BA a 2,2 μM com média 33,6 de brotos. O BA, além de induzir a regeneração em todos os tratamentos proporcionou também o alongamento dos propágulos, principalmente em baixas concentrações. A resposta morfogênica observada na maioria dos tratamentos com o cultivo do endosperma foi o desenvolvimento de calos recobrando todo explante, onde os maiores percentuais foram de 72% e 64% nas concentrações de 7,9 e 9,0 μM de TDZ, respectivamente. A maior produção das brotações ocorreu na presença do TDZ a 5,6 μM , com média de 8,4. Na presença de BA, a regeneração ocorreu apenas em meio com 6,6 μM , resultando na média de 5,6 brotos. Os resultados demonstram a capacidade morfogênica no processo de regeneração a partir da organogênese dos tecidos não meristemáticos de origem a partir da semente.

Palavras-chave: Morfogênese, Maracujá-doce, Organogênese in vitro.

Determination of the morphogenic potential of the in vitro culture from of zygotic embryos and endosperm of *Passiflora alata* Curtis - (Passifloraceae)

ABSTRACT

The objective of this work was to describe the morphogenic potential of zygotic embryos and the endosperm of *Passiflora alata*. The seeds were desinfestation the endosperm and zygotic embryos were isolated. The explants were inoculated in medium supplemented with different concentrations of cytokinins, 6-benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ) and Kinetin (KIN). Samples with organogenic potential were collected, fixed and included in historesin and stained with toluidine blue stains. Regeneration from the embryos occurred through the two pathways of organogenic regeneration, both direct and indirect, whereas through the use of the endosperm only the indirect pathway was noticed. Through the anatomical analysis it is possible to observe that the structures formed originated from successive mitotic divisions found on the peripheral surface of the tissue and/or callus, confirming the regeneration routes. The KIN at the concentration of 4.6 μM provided the highest number of shoots, with a mean of 37.6 followed by TDZ, at a concentration of 9.0 μM , producing a mean of 36.4 shoots and of BA with a of 33.6 of shoots at the concentration of 2.2 μM . 6-Benzyladenine (BA) in addition to inducing regeneration in all treatments also provided the elongation of the propagules, especially in low concentrations. The morphogenic response observed in the majority of treatments with endosperm cultivation was the development of large callus covering all explants, where the highest percentage 72% and 64% were obtained in the concentration of 7.9 and 9.0 μM TDZ, respectively. The development of shoots is concentrated, mainly in the presence of TDZ, in the concentration of 5.6 μM , with an average of 8.4 shoots. In the presence of BA, regeneration occurred only in medium with 6.6 μM , resulting in an average of 5.6 shoots. The results demonstrate the morphogenic capacity in the regeneration process from the organogenesis of non-meristematic tissues of origin from the seed.

Key words: Morphogenesis, Sweet passion fruit, Organogenesis in vitro.

1. INTRODUÇÃO

Passiflora alata, conhecida popularmente por maracujá doce é cultivada em todo o território nacional, mas encontrada também, no Peru, Paraguai e Argentina (Pereira e Vilegas, 2000; Meletti et al., 2011). É uma cultura de interesse e grande valor comercial, sendo amplamente aceita no mercado de frutas frescas devido ao aroma e a baixa acidez dos frutos de sabor adocicado (Manica et al., 2005).

O maracujazeiro doce também é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética, por apresentar propriedades medicinais e farmacêuticas como a passiflorina, alcalóides e os flavonóides (Zuanazzi e Montanha, 2004; Anvisa, 2010; Pinto et al., 2010; Moreira et al., 2012). As suas flores são grandes e exuberantes com destaque na cor vibrante de carmim intensa que configura potencial de utilização como planta ornamental (Monteiro et al., 2013).

A auto-incompatibilidade presente na maioria das espécies de maracujazeiro , condiciona a produção de mudas heterogêneas em relação as características agrônômicas (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010). Contudo, o cultivo da espécie tem sido limitado devido ao ataque e susceptibilidade a doenças causadas por vírus, bactérias e fungos (Paula et al., 2010; Fischer et al., 2010).

Técnicas de propagação in vitro têm sido aplicadas ao cultivo dos maracujazeiros como uma alternativa para a produção de plantas sadias e homogêneas. A organogênese é a principal via de regeneração aplicada à produção de plantas do gênero *Passiflora* (Otoni et al., 2013). Nesta via de regeneração, as células somáticas e os tecidos são estimulados a sofrerem mudanças na sua organização e expressão gênica, que os levam a formação de órgãos monopolares com conexão vascular ao tecido de origem (Nour e Thorpe, 1994).

A organogênese ocorre através de duas rotas, a direta, onde os propágulos regenerados são diferenciados diretamente do explante e a indireta, onde a estrutura unipolar é formada a partir do desenvolvimento de calos, que são células em diferentes graus de diferenciação (Trevisan e Mendes, 2005; Silva et al., 2011; Otoni et al., 2013).

A capacidade regenerativa em plantas ocorre devido à totipotencialidade das células em responder a diferentes estímulos para aquisição da competência e determinação celular até formar um indivíduo completo (Skoog e Muller, 1957; Xu e

Huang et al., 2014). No entanto, a eficácia desse processo depende do estabelecimento e/ou otimização de protocolo de regeneração in vitro, uma vez que, o sucesso da morfogênese está diretamente ligada à interação positiva e equilibrada entre os fatores bióticos e abióticos, influenciada principalmente pelo tipo de explante e pela combinação dos reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957, Silva et al., 2011).

Vários trabalhos relatam a morfogênese in vitro pela rota organogênica em espécies de maracujazeiros a partir de explantes meristemáticos e não meristemáticos, sendo explantes foliares (Busilacchi et al., 2008; Pinto et al., 2010; Garcia et al., 2011; Komathi et al., 2011; Vieira et al., 2014); nodais e intermodais (Biasi et al., 2000; Reis et al., 2003; Garcia et al., 2011; Anand et al., 2012; Shekhawat et al., 2015b), hipocotiledonares (Dornelas e Vieira, 1994; Dias et al., 2009; Pinto et al., 2010; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016) e gemas apicais (Scorza e Janick, 1980; Drew, 1991; Faria e Segura, 1997).

Os embriões zigóticos e o endosperma da semente são fonte de células juvenis em constante divisão mitótica e alto potencial morfogenético que facilita o processo de diferenciação celular e conseqüentemente o da regeneração (Elhiti e Stasolla, 2011). Porém, estudos que visam à regeneração via organogênese de espécies de maracujá a partir do uso de embriões zigóticos (Rocha et al., 2015; Rosa et al., 2015) e do endosperma (Mohamed et al., 1996; Guzzo et al., 2004; Faria, 2016), como fonte de explante ainda são insipientes. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a descrição do potencial morfogenético de embriões zigóticos e do endosperma de *Passiflora alata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros de *P. alata* foram coletados de uma propriedade particular no município de Tangará da Serra-MT e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade do Estado de Mato Grosso.

As sementes (Figura 1A) foram extraídas manualmente e com o auxílio de uma peneira foram friccionadas para retirada total do arilo e mucilagem. Em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem.

Com o auxílio de uma mini morsa foram retirados os tegumentos das sementes (Figura 1B), e sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas mediante a imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 3 minutos, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v v⁻¹) acrescido de duas gotas do agente dispersante Tween-20 por 40 minutos e submetidas a enxágues consecutivos em água destilada e autoclavada. Após as sementes foram excisadas para isolamento dos endospermas e dos embriões zigóticos (Figura 1C).

2.2 Indução à organogênese

Os explantes foram inoculados em meio de cultura suplementados com meio MS contendo sais básicos de 0,3% (p v⁻¹) de sacarose, 0,01% (p v⁻¹) de mio-inositol, gelificado com ágar a 0,8% (p v⁻¹) e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento: 6-Benziladenina (BA) 2,2, 3,3, 4,4, 5,5, 6,6, 7,7; 8,8 µM, Thidiazuron (TDZ) 2,2, 3,4, 4,5, 5,6, 6,8, 7,9; 9,0 µM e Cinetina (CIN) 2,3; 3,4; 4,6; 5,8; 6,9; 8,1; 9,2 µM. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, em seguida, autoclavados por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão. O meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno cristal de 90 x 15 mm estéreis em alíquotas de 30 mL, sendo seladas com filme de policloreto de vinila - PVC esticável de 9-10 µm de poro.

O experimento foi mantido em sala de cultivo, sob irradiância de fótons de 36 µmol m⁻²s⁻¹, temperatura de 26 °C ± 2 e fotoperíodo de 16 horas.

2.3 Análise Anatômica

Amostras dos explantes foram coletadas aos 30 dias de cultivo e fixadas em solução de FAA 50% (formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico) por 24

horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradualmente em álcool etílico nas concentrações de 70%, 85% e 95% por 24 horas.

Após as amostras foram inclusas em historesina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha RM 2155, Leica Microsystems Inc., USA) por 48 horas. Cortes transversais e longitudinais com 5 μm de espessura foram obtidos a partir do micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica Microsystems Inc., USA) e equipado com navalha de aço descartável. Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981). A captura das imagens foi realizada em microscópio óptico equipado com o software de análise de imagens NIS-Elements Analysis D 4.30.01 com câmera digital acoplada (Nikon, Tóquio, Japão).

2.4 Análise estatística

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos para cada regulador de crescimento BA (2,2; 3,3; 4,4; 5,5; 6,6; 7,7 e 8,8 μM), TDZ (2,2, 3,4, 4,5, 5,6, 6,8, 7,9 e 9,0 μM) e CIN (2,3; 3,4; 4,6; 5,8; 6,9; 8,1 e 9,2 μM) e o controle, com cinco repetições, representada por uma placa de Petri e cinco explantes cada.

Após 30 dias de cultivo in vitro, as características avaliadas para o cultivo dos embriões zigóticos foram o percentual de explantes com resposta morfogênica, a média do número de brotos regenerados via organogênese direta e indireta para cada tratamento, do total de brotos independente da via de regeneração e a média do número de raízes. Para o cultivo do endosperma foi avaliado o percentual de explantes com resposta morfogênica, a frequência de calos e a média do número de brotos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo software Sisvar®, versão 5.6 (Ferreira, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfogênese in vitro em embriões zigóticos de *P. alata*

Os embriões zigóticos de *P. alata* apresentaram resposta morfogênica entre 10 e 20 dias de cultivo in vitro. As respostas morfogênicas observadas aos 20 dias de cultivo foram o intumescimento principalmente dos cotilédones do embrião zigótico, a formação de massa celular em diferenciação e a produção dos primórdios das gemas adventícias. Nesse período, em meio suplementado com BA, a formação de estruturas potencialmente organogênicas foram evidentes principalmente nas bordas e com o desenvolvimento mais tardio estas estruturas diferenciaram-se em gemas adventícias (Figura 1D).

A resposta morfogênica obtida nos embriões zigóticos quando cultivados na presença de TDZ responderam com o desenvolvimento das estruturas organogênicas (Figura 1E) que aos 20 dias de cultivo in vitro diferenciaram-se em primórdios de gemas adventícias (Figura 1F-G). Os embriões zigóticos cultivados em meio com CIN apresentaram inicialmente o intumescimento nas bordas dos cotilédones, seguida da formação de estruturas potencialmente organogênicas (Figura 1H). Já o controle, onde os embriões foram cultivados na ausência dos reguladores de crescimento, não ocorreu à produção de gemas adventícias, apenas o intumescimento da região cotiledonar do embrião zigótico.

Assim, os resultados demonstram as divisões celulares e a aquisição da competência e determinação celular dos explantes a partir do uso dos reguladores de crescimento citocínicos principalmente BA e TDZ para o desenvolvimento das gemas adventícias nos embriões de *P. alata*.

Após 30 dias de cultivo in vitro dos embriões de *P. alata* é possível observar que a regeneração via organogênese ocorreu de forma direta e indireta, onde a maior média 37,6 de brotos foi obtida na presença de 4,6 μM de CIN (Tabela 1) e (Figura 2A). Diferindo estatisticamente do observado quanto ao número de brotos em concentrações mais baixa de cinetina, pois na presença de 2,3 e 3,4 μM proporcionaram uma média de 2,4 e 3,0 brotos por explantes, respectivamente (Tabela 1).

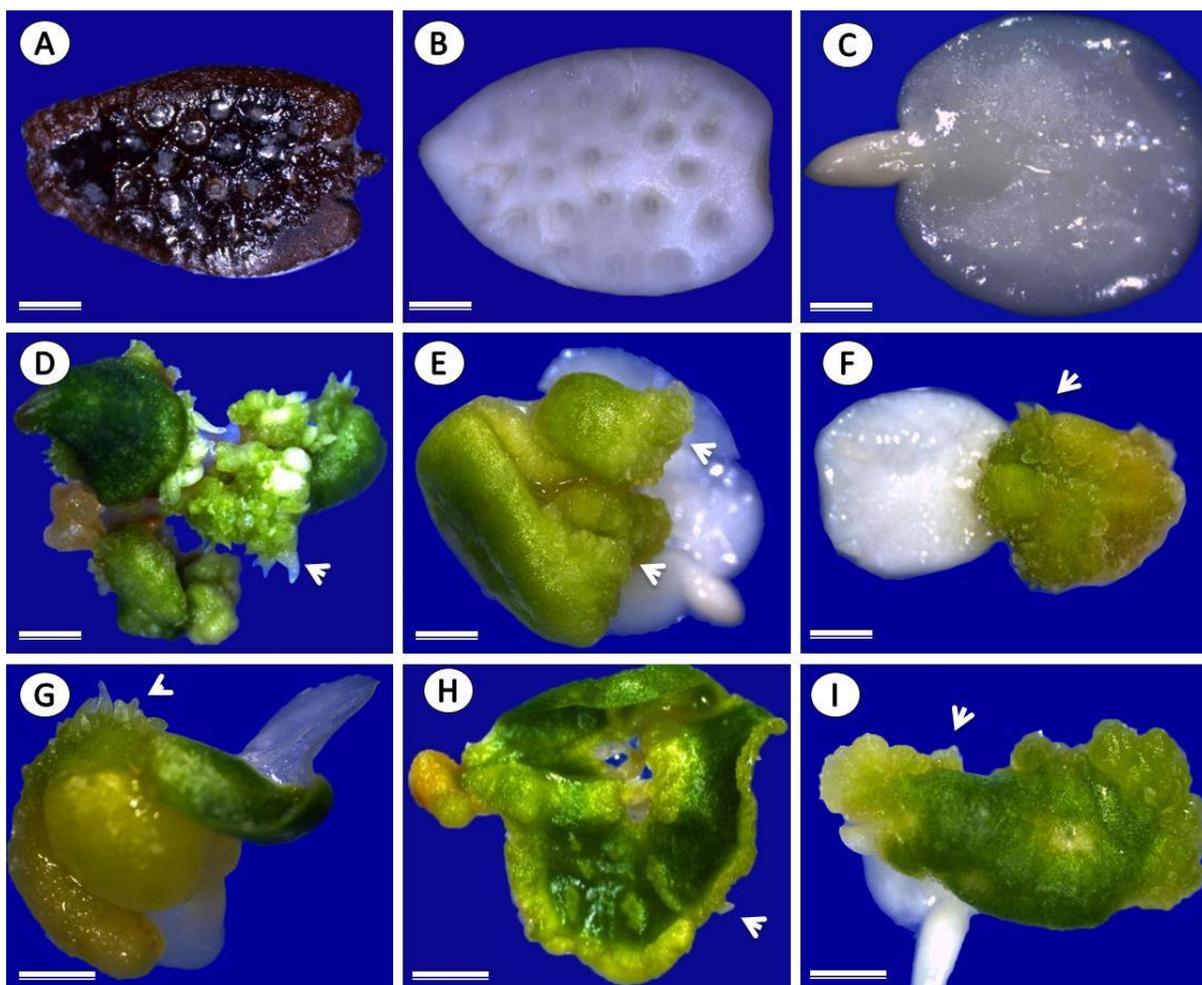


Figura 1. Cultivo in vitro dos embriões zigóticos de *P. alata* com 10 e 20 dias de cultivo suplementado com as citocininas BA, TDZ e CIN. A- Semente com tegumento; B- Semente sem o tegumento; C- Embrião zigótico; D- Desenvolvimento de gemas adventícias; E- Resposta morfogênica do embrião na presença de 9,0 μM de TDZ; F-G- Primórdios de gemas adventícias; H- Intumescimento nas bordas dos cotilédones cultivado com 4,6 μM de CIN; I- Desenvolvimento de estruturas organogênicas na presença de 3,4 μM de CIN. A-B-C (Bars= 80 μM); D-E-G-H-I (Bars= 90 μM); F (Bar= 80 μM).

Os explantes cultivados em meio suplementado com TDZ em concentrações mais elevadas, com 9,0 μM proporcionou o maior percentual 84% de explante com resposta induzindo a uma média 36,4 na produção de brotos por explantes (Tabela 1). As multibrotações foram observadas intensamente entre os cotilédones do embrião pela via direta (Figura 2B) e nas bordas dos cotilédones (Figura 2C) com o desenvolvimento a partir da organogênese indireta.

Tabela 1. Resposta morfológica de embriões zigóticos aos 30 dias no cultivo in vitro em *P.alata*

Tratamentos (μM)			Embriões zigóticos				
BA	TDZ	CIN	Explantos (%) com resposta	Organogênese Direta	Indireta	Brotos/ Explantos	No. Raiz
Controle			48 ^{AB}	0,0 ^C	0,0 ^B	0,0 ^D	2,2 ^{AB}
2,2	-	-	76 ^{AB}	30,4 ^{AB}	3,2 ^B	33,6 ^{ABC}	0,4 ^B
3,3	-	-	60 ^{AB}	18,6 ^{ABC}	2,0 ^B	20,6 ^{ABCD}	0,2 ^B
4,4	-	-	68 ^{AB}	19,0 ^{ABC}	1,6 ^B	20,6 ^{ABCD}	0,4 ^B
5,5	-	-	84 ^A	25,6 ^{ABC}	2,8 ^B	28,4 ^{ABCD}	0,4 ^B
6,6	-	-	48 ^{AB}	1,2 ^{BC}	0,4 ^B	1,6 ^D	0,8 ^{AB}
7,7	-	-	52 ^{AB}	12,8 ^{ABC}	1,0 ^B	13,8 ^{ABCD}	0,8 ^{AB}
8,8	-	-	48 ^{AB}	15,6 ^{ABC}	1,6 ^B	17,2 ^{ABCD}	0,2 ^B
-	2,2	-	64 ^{AB}	9,8 ^{ABC}	1,0 ^B	10,8 ^{ABCD}	1,0 ^{AB}
-	3,4	-	68 ^{AB}	2,2 ^{BC}	0,0 ^B	2,2 ^D	0,0 ^B
-	4,5	-	72 ^{AB}	18,8 ^{ABC}	2,8 ^B	21,6 ^{ABCD}	0,6 ^B
-	5,6	-	60 ^{AB}	23,4 ^{ABC}	1,4 ^B	24,8 ^{ABCD}	0,2 ^B
-	6,8	-	68 ^{AB}	15,0 ^{ABC}	1,8 ^B	16,8 ^{ABCD}	0,2 ^B
-	7,9	-	60 ^{AB}	6,0 ^{ABC}	0,6 ^B	6,6 ^{ABCD}	0,0 ^B
-	9,0	-	84 ^A	32,8 ^A	3,6 ^B	36,4 ^{AB}	0,0 ^B
-	-	2,3	64 ^{AB}	2,4 ^{BC}	0,0 ^B	2,4 ^D	2,4 ^{AB}
-	-	3,4	44 ^B	3,0 ^{BC}	0,0 ^B	3,0 ^{CD}	1,0 ^{AB}
-	-	4,6	76 ^{AB}	17,6 ^{ABC}	20,0 ^A	37,6 ^A	1,8 ^{AB}
-	-	5,8	68 ^{AB}	0,0 ^C	0,0 ^B	0,0 ^D	2,4 ^{AB}
-	-	6,9	56 ^{AB}	1,6 ^{BC}	4,8 ^B	6,4 ^{BCD}	1,4 ^{AB}
-	-	8,1	72 ^{AB}	0,0 ^C	0,0 ^B	0,0 ^D	3,8 ^A
-	-	9,2	60 ^{AB}	0,0 ^C	0,0 ^B	0,0 ^D	2,4 ^{AB}
C.V.(%)			48,29	59,02	63,03	95,71	41,11

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No tratamento com 2,2 μM de BA, um percentual de 76% dos explantes inoculados apresentaram respostas morfológicas, tendo média de 30,4 de brotos

via organogênese direta e 3,2 de brotos regenerados da diferenciação de calos desenvolvidos durante a morfogênese, caracterizando a organogênese indireta (Figura 2E) e (Tabela 1).

Já na presença de 5,5 μM de BA, 84% dos explantes inoculados foram responsivos, com média de 25,6 brotos formados via organogênese direta e média 2,8 de brotos pela indireta. No entanto, na concentração de 6,6 μM de BA o número de brotos regenerados por explante reduziu para 1,6 brotos/explante, onde a regeneração com média de 1,2 brotos foi observada via organogênese direta e 0,4 via organogênese indireta, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos com BA (Tabela 1).

A brotação induzida em baixas concentrações de BA ocorreu provavelmente porque a quantidade endógena de citocinina/auxina é suficiente para estabelecer o equilíbrio necessário com a concentração exógena do regulador aplicada ao meio de cultura, promovendo a diferenciação do tecido e a diferenciação em brotações. Segundo Skoog e Miller (1957) a alta relação entre citocinina/auxina é favorável para a proliferação de brotos.

Pacheco et al. (2012) observaram que a regeneração da espécie *P. alata* a partir de explantes nodais e internodais ocorreu via organogênese indireta independente da concentração de BA aplicada ao meio de cultura. Entretanto, nas condições de cultivo dos explantes de *P. alata* a frequência de brotos regenerados com uso de BA foi maior em concentrações mais altas. O comportamento regenerativo e as alterações morfogênicas do tecido dependem muito do genótipo utilizado, da espécie escolhida, do tipo de explante, do regulador de crescimento aplicado, assim como, das concentrações, entre outros fatores que são relevantes para o sucesso do desenvolvimento morfogênico (George, 2008; Hartmann et al., 2010; Garcia et al., 2011; Otoni et al., 2013).

Garcia et al. (2011) na indução de organogênese em explantes foliares e nodais de *P. suberosa* observaram a regeneração apenas pela via organogênese indireta independente da concentração de BA aplicada ao meio de cultura, enquanto que explantes intermodais cultivados nas mesmas condições apresentaram brotações pelas duas vias de regeneração.

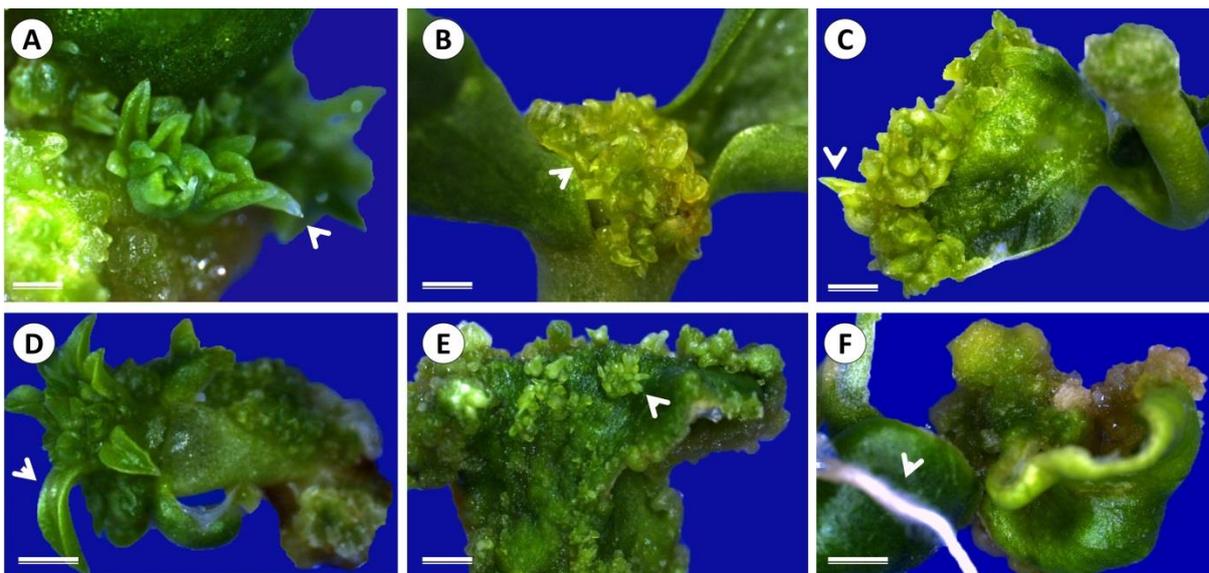


Figura 2. Regeneração in vitro a partir de embriões zigóticos de *P. alata* aos 30 dias de cultivo em meio de indução. A- Desenvolvimento de brotos na superfície do eixo embrionário, em meio com 4,6 μM de CIN; B- Organogênese direta com primórdios de brotos entre as folhas cotiledonares do embrião zigótico cultivados em meio com 9,0 μM de TDZ; C- Multibrotações na borda da folha cotiledonar em meio com 5,6 μM de TDZ; D- Brotos diferenciados da superfície do ápice embrionário em meio de indução com 2,2 μM de BA; E- Brotações direta do explante na superfície e ao redor dos cotilédones em meio com 8,8 μM de BA; F- Desenvolvimento de raiz na presença de 8,1 μM de CIN. A (Bar= 60 μM); B (Bar= 55 μM); C (Bar= 50 μM); D-F (Bars= 70 μM); E (Bar= 50 μM).

O maior número de raiz foi observado em meio com CIN, com média de 3,8 observada na concentração de 8,1 μM , entretanto, brotações adventícias não foram observadas (Figura 2F). O mesmo foi identificado no tratamento controle, onde somente ocorreu a produção de raízes (Tabela 1).

Um dos fatores críticos e de importância na manipulação da morfogênese in vitro é o balanço hormonal entre o meio de cultura e o metabolismo do material vegetal utilizado como explante, que associado com as condições adequadas e controladas do ambiente para a promoção da expressão ou da inativação de genes específicos e seletivos, responsáveis pela aquisição da competência, diferenciação e a reprogramação celular de tecidos ou órgãos com diferentes graus de determinação celular (Vieitez San- Jose, 1996). Logo, a resposta final é a expressão

morfogênica que podem seguir duas rotas de regeneração, denominada de organogênese e/ou embriogênese somática (Xu e Huang et al., 2014).

3.2 Morfogênese in vitro em explantes endospermicos

Aos 10 dias do cultivo in vitro dos endospermas em meio de indução, observou-se o intumescimento de todo tecido endospermico apresentando coloração amarelada esverdeada (Figura 3A) e após 20 dias de cultivo já foi possível observar o desenvolvimento de massa celular (Figura 3B), que posteriormente diferenciaram-se em reduzido número de brotos aos 30 dias de cultivo in vitro (Figura 3C).

O BA promoveu a produção de calos em 85,71% dos explantes inoculados, no entanto, o índice de resposta morfogênica variou de acordo com cada concentração (Tabela 2).

Os calos produzidos na presença do BA configuram um aspecto translúcido, com células aparentemente sem potencial organogênico (Figura 3D) ou estrutura compacta de coloração esverdeada (Figura 3E-F). Entretanto, na presença do BA, a produção e diferenciação dessas estruturas em brotos foram observadas apenas na concentração de 6,6 μM com média 5,6 (Figura 3G) e conforme a descrição na Tabela 2.

O thidiazuron (TDZ) induziu as melhores respostas para regeneração do endosperma de *P. alata*. Em concentrações mais elevadas de TDZ, o endosperma apresenta desenvolvimento de calos com a coloração amarelada e em algumas regiões dos calos com a coloração amarelada e verde (Figura 3H), apresentaram competência e determinação seguida da diferenciação em pequenas brotações (Figura 3I), com média de 2,6 na concentração de 9,0 μM de TDZ (Tabela 2).

O maior índice morfogênico do endosperma foi à formação de calos com 72% e 64% obtidos na presença de 7,9 e 9,0 μM de TDZ, respectivamente. Já para produção de brotos, a maior média 8,4 no tratamento com 5,6 μM de TDZ (Tabela 2).

A ocorrência de brotos foi observada também em meio suplementado com 3,4 μM de TDZ com média 2,0 de brotos e um percentual de 40% dos explantes com desenvolvimento de calos. Nos demais tratamentos não houve regeneração, apenas a formação de calos (Tabela 2). O tecido endospermico não respondeu quando cultivado na presença de cinetina.

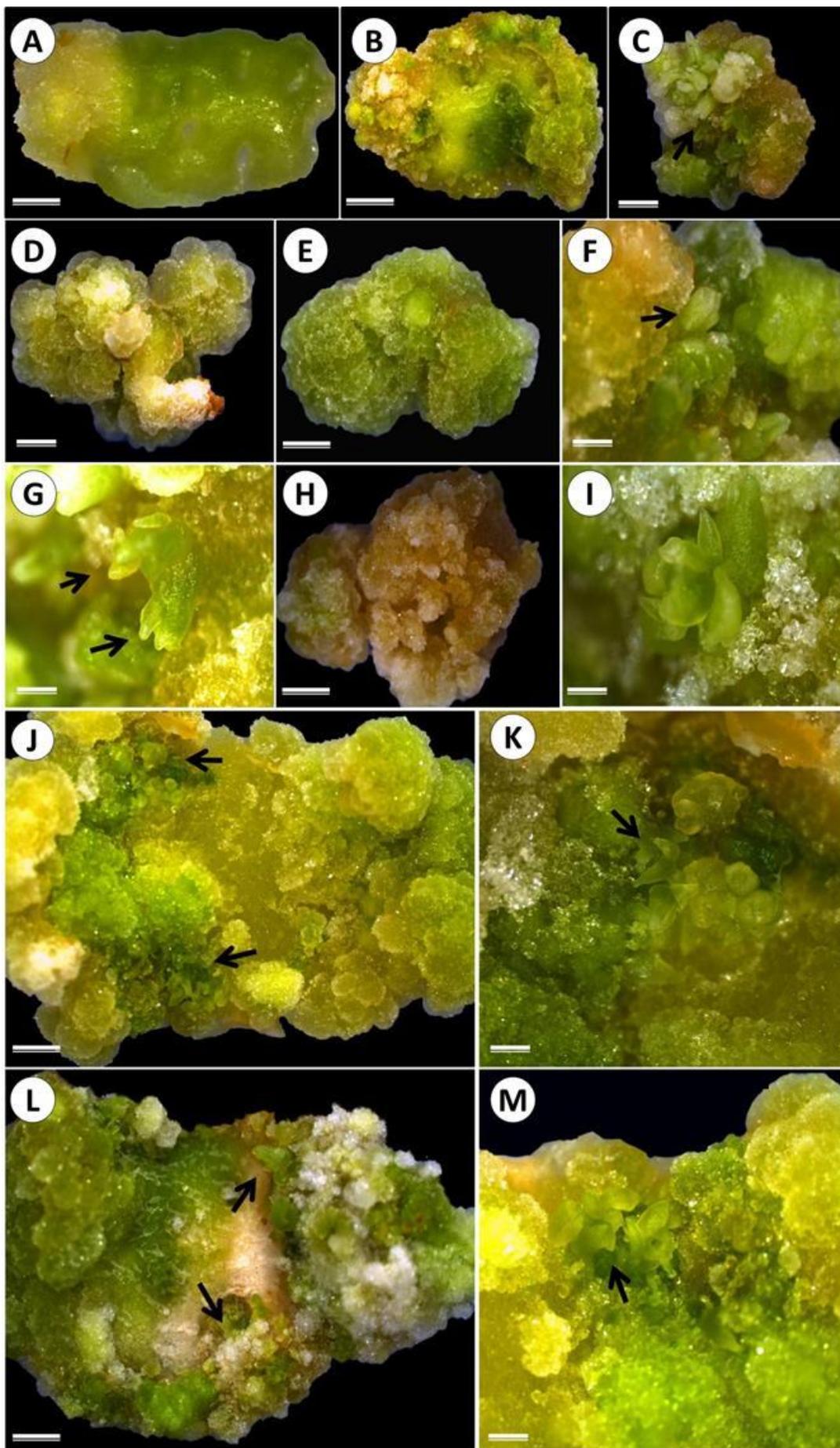


Figura 3. Resposta morfogênese in vitro durante a organogênese em explantes endospermicos da espécie *P. alata*. A-Intumescimento do tecido endospermico; B- Desenvolvimento de massa celular; C- Primórdios de brotos na presença de 5,6 µM de TDZ; D-E- Produção de calos aparentemente sem potencial organogênico na presença de 3,3 µM de BA; F-G- Primórdios de brotações observados na presença de 6,6 µM de BA; H- Calos com ausência de potencial organogênico; I- Calo com brotação formado na presença de 5,6 µM de TDZ; J- Calo com brotações nas extremidades do explante; K- Brotações indiretas produzidas na presença de 9,0 µM de TDZ; L- Brotos indiretos em 5,6 µM de TDZ; M- Primórdios de brotações no tratamento com 9,0 µM de TDZ. A-B (Bars= 40 µM); E-H-C (Bars= 30 µM); F-G (Bars= 50 µM); I-L-M (Bars= 40 µM) J-K(Bars= 70 µM).

O regulador de crescimento TDZ, em baixas concentrações, isolado ou combinado com auxinas e citocininas tem sido empregado com sucesso para produção de brotos a partir de endosperma imaturo da espécie *Morus alba* (Thomas et al., 2000); *Carthamus tinctorius* (Walia et al., 2007); a partir do endosperma maduro, como relatado por Goralski et al. (2005) e Popielarska-Konieczna et al. (2011) para espécie de Kiwi *Actinidia deliciosa*.

Protocolos de regeneração via organogênese utilizando endosperma como base para o desenvolvimento morfogênico foi estabelecido para várias espécies, como *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* (Miyashita et al., 2009); *Euonymus alatus* (Thamina et al., 2011); *Sapium sebiferum* (Tian et al., 2012); *Phlox drummondii* (Tiku et al., 2014); *Gomortega keule* (Muñoz-Concha, 2016).

Estudos que abordam o sistema de regeneração em *Passiflora* utilizando endosperma como fonte de explante é escasso. Mohamed et al. (1996) relataram a obtenção de plantas a partir do endosperma da espécie *Passiflora foetida* e destacam que a regeneração in vitro foi obtida na presença de BA em baixas concentrações. O genótipo e o tipo de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes para o desenvolvimento morfogênico in vitro (Otoni et al. 2013). Deste modo, estudos relatam que a frequência na produção de brotos a partir do endosperma é influenciada pela fisiologia do explante (maduro ou imaturo), pelo regulador de crescimento, assim como, pelo genótipo da espécie (Popielarska-Konieczna et al., 2013; Wang et al., 2016).

Tabela 2. Avaliação das respostas morfogênicas em tecido endospermico de *P. alata* cultivados na presença de diferentes concentrações de BA, TDZ e CIN.

Tratamentos (μM)			Endosperma		
BA	TDZ	CIN	Explantos com resposta (%)	Calos (%)	Brotos/ Explantos
Controle			0,0 ^E	0,0 ^C	0,0 ^B
2,2	-	-	40,0 ^{BCDE}	6,0 ^C	0,0 ^B
3,3	-	-	92,0 ^A	40,0 ^{AB}	0,0 ^B
4,4	-	-	72,0 ^{ABC}	8,0 ^C	0,0 ^B
5,5	-	-	36,0 ^{BCDE}	8,0 ^C	0,0 ^B
6,6	-	-	72,0 ^{ABC}	24,0 ^{AB}	5,6 ^{AB}
7,7	-	-	68,0 ^{ABC}	32,0 ^{AB}	0,0 ^B
8,8	-	-	40,0 ^{BCDE}	0,0 ^C	0,0 ^B
-	2,2	-	40,0 ^{BCDE}	24,0 ^{AB}	0,0 ^B
-	3,4	-	56,0 ^{ABCDE}	40,0 ^{AB}	2,0 ^{AB}
-	4,5	-	28,0 ^{CDE}	24,0 ^{AB}	0,0 ^B
-	5,6	-	56,0 ^{ABCDE}	36,0 ^{AB}	8,4 ^A
-	6,8	-	36,0 ^{BCDE}	16,0 ^{BC}	0,0 ^B
-	7,9	-	84,0 ^{AB}	72,0 ^A	0,0 ^B
-	9,0	-	72,0 ^{ABC}	64,0 ^{AB}	2,6 ^{AB}
-	-	2,3	28,0 ^{CDE}	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	3,4	28,0 ^{CDE}	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	4,6	24,0 ^{CDE}	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	5,8	16,0 ^E	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	6,9	20,0 ^{DE}	0,0 ^c	0,0 ^B
-	-	8,1	20,0 ^{DE}	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	9,2	16,0 ^E	0,0 ^C	0,0 ^B
C.V(%)			46,22	98,96	61,66

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Caracterização anatômica

Nos embriões zigóticos de *P. alata* primeiramente ocorreu o intumescimento, com a presença de células meristemáticas alongadas, aparentemente com alto grau de vacuolização e citoplasma menos denso (Figura 4A). O desenvolvimento e a diferenciação das estruturas organogênicas foram evidenciados após 20 dias de cultivo com atividade mitótica a partir de células do meristema fundamental, com núcleos evidentes, conteúdo citoplasmático mais denso e parede celular fina (Figura 4B), seguida da formação de meristemóides e protuberâncias presentes principalmente na superfície e nas bordas dos cotilédones e ao longo do eixo embrionário, originadas a partir de divisões celulares na região subepidérmicas (Figura 4C). Após 30 dias de cultivo é possível observar que os meristemóides formados anteriormente diferenciaram-se em brotos com a presença dos primórdios foliares (Figura 4D).

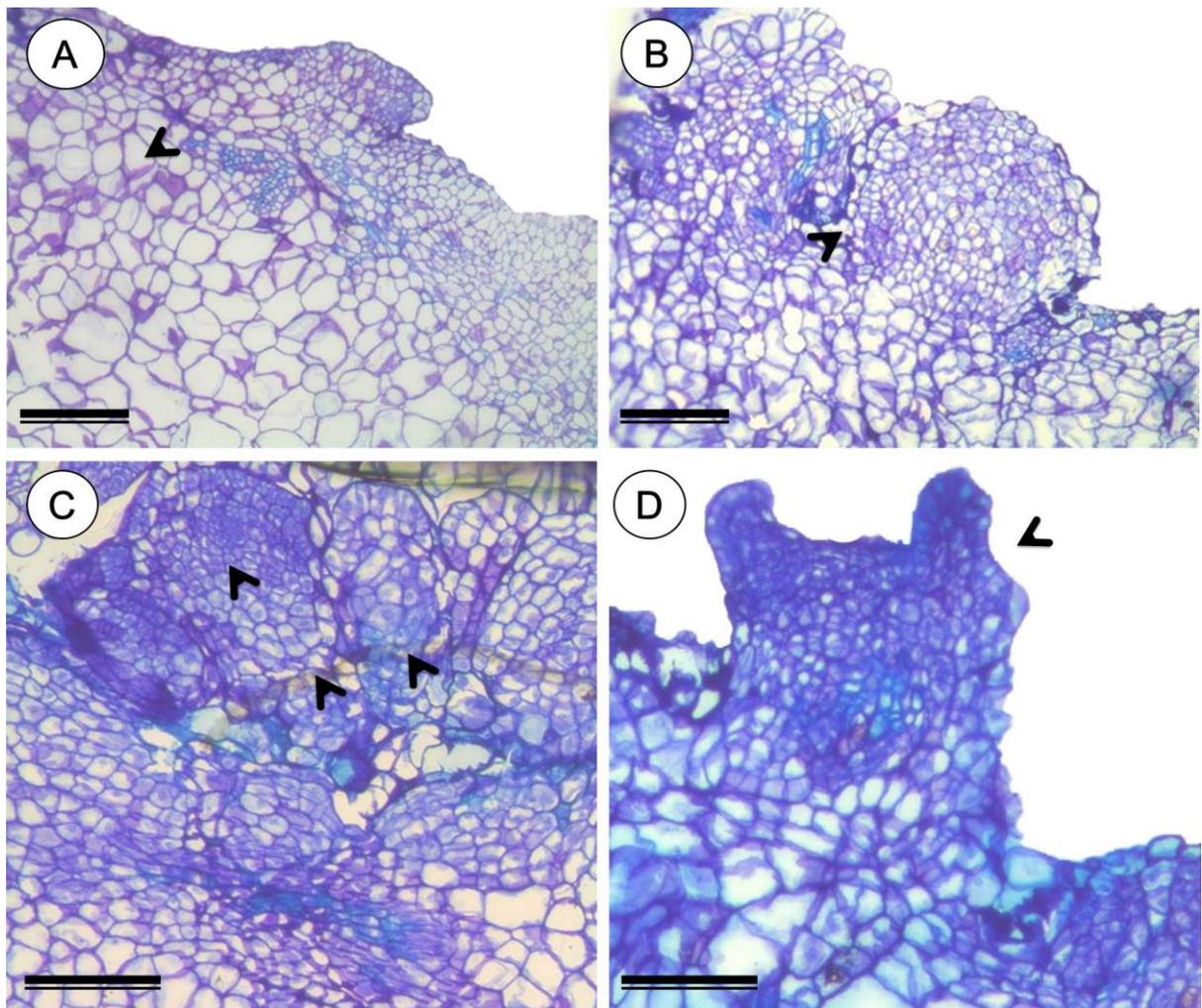


Figura 4. Cortes anatômicos no desenvolvimento de brotações adventícias a partir de embriões zigóticos de *P. alata*. A- Tecido parenquimático com células

meristemáticas vacuolizadas e citoplasma menos denso; B- Desenvolvimento de protuberância na borda do explante; C- Estruturas organogênicas; D- Desenvolvimento de um primórdio de broto. A-B (Bars= 40 µM); C-D (Bars= 80 µM).

A proliferação das células, com a diferenciação dos tecidos em estruturas organogênicas são eventos relatados no processo morfogênico direto e indireto de várias espécies de *Passiflora* (Fernando et al., 2007; Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012; Rocha et al., 2012) e através da caracterização anatômica pode-se evidenciar a diferenciação dos brotos e o início do desenvolvimento do procâmbio.

As gemas adventícias desenvolvidas a partir da diferenciação do endosperma cultivado in vitro são compostas de células isodiamétricas do parênquima, com espaço intracelular e citoplasma (Figura 5A). Enquanto que na Figura 5B, observa-se o desenvolvimento dos meristemóides que posteriormente se desenvolvem em estruturas organogênicas (Figura 5C). Já Na Figura 5D evidencia-se a formação de multibrotações na região periférica do explante endospérmico.

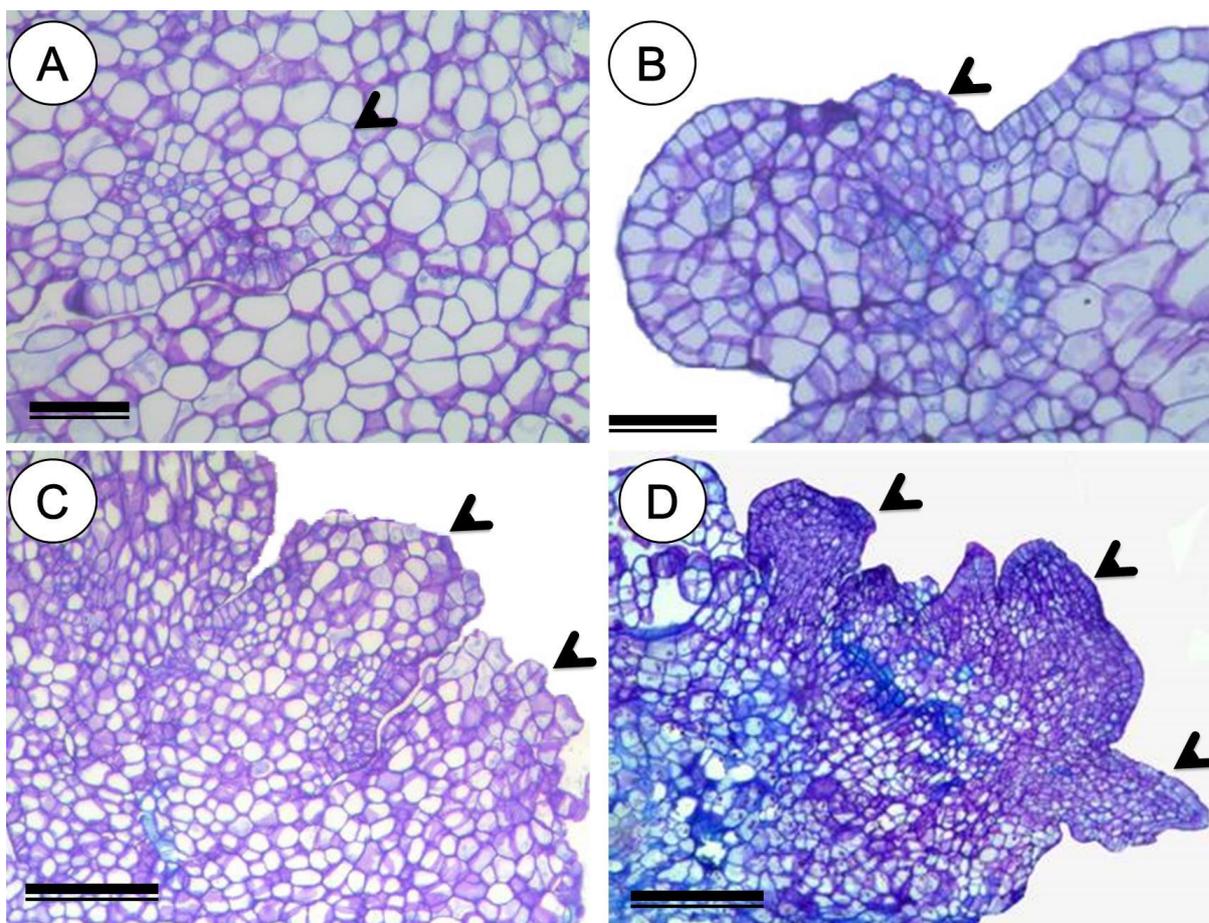


Figura 5. Caracterização anatômica do desenvolvimento de brotações adventícias durante a morfogênese in vitro de explantes endospérmicos de *P. alata*. A- Células

isodiamétricas; B-Meristemóide; C-D Estruturas organogênicas. A (Bar= 50 μ M); B (Bar= 40 μ M); C-D (Bars =60 μ M).

4. CONCLUSÃO

A regeneração via organogênese direta e indireta de *P. alata* a partir de embriões zigóticos foi estabelecida, uma vez que, é possível observar o desenvolvimento de brotos em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BA, TDZ e CIN.

Deste modo, os resultados alcançados constituem informações importantes para a compreensão da via organogênica em *Passiflora alata*, na caracterização de eventos que visam entender o comportamento de diferenciação das células dos tecidos in vitro associados à pluripotência celular envolvidas durante o processo de regeneração in vitro da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**. 31: 1495-1515, 2012.
- ALMEIDA, M.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ARTIOLI, F. A.; ALMEIDA, L. V.; LEONE, G. F.; BACCARIN, F. J. B.; ANTONELLI, P. O.; CORDEIRO, G. M.; OBERSCHELP, G. P. J.; PIOTTO, K. D. B. Plant morphogenesis: theoretical bases. **Advances in Forestry Science**. 2: 13-22, 2015.
- AMORIM, J. S.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. J. C.; CORRÊA, R. X.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. **Plant Systematics and Evolution**. 300: 1147-1162, 2014.
- ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. 22: 87-91, 2012.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotside/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 29 Out. 2016.
- 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.
- BAG, N.; PALNI, L. M. S.; CHANDRA, S.; NANDI, S. K. Somatic embryogenesis in maggar bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*) and field performance of regenerated plants. **Current Science**. 102: 1279-1287, 2012.
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 25 Out. 2016.
- BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**. 57: 661-665, 2000.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**. 370:45-57, 1995.
- BUSILACCHI, H.; SEVERIN, C.; GATTUSO, M.; AGUIRRE, A.; DI-SAPIO, O.; GATTUSO, S. Field culture of micropropagated *Passiflora caerulea* L. histological and chemical studies. **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 7: 257-263, 2008.

CAPELLE, S. C.; MOK, D. W. S.; KIRCHNER, S. C.; MOK, M. C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Y²-Isopentyl) adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. **Journal of Plant Physiology**. 73: 796-802, 1983.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p.87-132.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; 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.

CARVALHO, M. A. D. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M. D.; PAIVA, P. D. D. O.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**. 62: 340-346, 2015.

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

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

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Current Science**, 26: 23-27, 1991.

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

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 677p.

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.

FARIA, R. B. **Sistemas de regeneração de novo a partir da organogênese e embriogênese somática em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi, (Passifloraceae)-Uma espécie da Amazônia Meridional**. Mato Grosso: Univerdade do Estado de Mato Grosso, 2016. 124p. (Dissertação- Genética e Melhoramento de Plantas).

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência Agrotecnologia**. 38: 109-112, 2014.

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.

FISCHER, I. H.; BUENO, C. J. R.; GARCIA, M. J. M.; ALMEIDA, A. M. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum Agronomy**. 32: 223-227, 2010.

GAGLIANONE, M. C.; ROCHA, H. H. S.; BENEVIDES, C. N. J.; JUNQUEIRA, C. N.; AUGUSTO, S. C. Importância de Centridini(apidae) na polinização de plantas de interesse agrícola: o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) como estudo de caso na região sudeste do Brasil. **Oecologia Australis**. 14: 152-164, 2010.

GAMBHIR, D.; SRIVASTAVA D. K. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in leaf and petiole explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. Capitata). **Journal of Biotechnology & Biomaterials**. 5:172, 2015.

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

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. 31: 166-174, 2013.

GORALSKI, G.; POPIELARSKA, M.; SLESACK, 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.

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

HARTMANN, H.T. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010. 915p.

HESAR, A. A.; KAVIANI, B.; TARANG, A.; ZANJANI, S. B. Effect of different concentrations of kinetin on regeneration of (*Matthiola incana*). **Plant Omics**. 4: 236-238, 2011.

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.

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

JONES, K. D.; REED, M. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter, and fertility in hydrangea macrophylla. **Horticulture Science**. 42: 483-488, 2007.

KHODASHENAS, M.; KERAMAT, B.; Emamipoor, Y. Efficient in vitro Regeneration System for Conservation of *Levisticum officinale*: A Rare Medicinal Plant. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**. 6: 66-70, 2016.

KOMATHI, S.; RAJALAKSHMI, G.; SAVETHA, S.; AYYAPPADAS, M. P. In vitro regeneration of *Passiflora foetida* L. **Journal in Research Biology**. 8:653-659, 2011.

KUMARI U. R.; LAKSHMI, S. M.; THAMODHARAN, G. Effect of Growth hormones for direct organogenesis in Bael (*Aegle marmelos* (L.) corr). **Journal of Applied and Natural Science**. 7: 98-101, 2015.

LATA, H.; CHANDRA, S.; WANG, Y. H.; RAMAN, V.; KHAN, I. A. TDZ-Induced high frequency plant regeneration through direct shoot organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener. **American Journal of Plant Sciences**. 4: 117-128, 2013.

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

MAYATI, C. H. N.; BOARD, M. R. Effects of Zeatin and Kinetin on in vitro Regeneration of *Hevea brasiliensis* RRIM 2025. **Journal of Rubber Research**. 18: 127-138, 2015.

MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A.; VASCONCELLOS, M.A.S.; Junqueira, N.T.V. Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. **Porto Alegre: Cinco Continentes**. 198, 2005.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**. 33: 83-91, 2011.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R.; SOLTA, B. Endogenous auxinand cytokine cortents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 15: 107-112, 2003.

MILLER, M.; ZHANG, C. Q.; CHEN, Z. J. Ploidy and hybridity effects on growth vigor and gene expression in *Arabidopsis thaliana* hybrids and their parents. **Genetics**. 2: 505-514, 2012.

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

MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Propriedades químicas e medicinais do maracujá. **Informe Agropecuário**. 33: 7-16, 2012.

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

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

NORTHMORE, J.; SIGURDSON, D.; SCHOOR, S.; RUSTUM, A.; CHUONG, S. D. X. Thidiazuron induces high-frequency indirect shoot organogenesis of *Bienertia sinuspersici*: a single-cell C₄ species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 126: 141-151, 2016.

NOUR, K. A.; THORPE, T. A. The effect of the gaseous state on bud induction and shoot multiplication *in vitro* in eastern white cedar. **Physiology Plant**. 90: 163-172, 1994.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty Ltd, 1981. 352p.

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* sp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 1-17.

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.

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.

PAULA, M. S.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; PEIXOTO, J. R. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 32: 222-229, 2010.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase em *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 3: 1-12, 2011.

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

RADHAKRISHNAN, R.; RAMACHANDRAN, A.; KUMARI, B. D. R. Rooting and shooting: Dual function of thidiazuron *in vitro* regeneration of Soybean (*Glycine max.* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**. 31: 1213- 1217, 2009.

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

REIS, L. B.; NETO, V. P.; PICOLI, E. T.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 39: 618- 622, 2003

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 *Passiflora edulis* flavicarpa. **Acta Horticulturae**. 738: 425- 431. 2007.

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.; 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, 2015.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. 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, 2012a.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; 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, 2012b.

RODRIGUEZ, M. V.; SEVERÍN, C. R.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, M. A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, A. O.; GATTUSO, S. J. Cultivo *in vitro* de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. **Acta Horticulturae**. 48: 69-72, 2007.

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

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

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

SAVITA.; SINGH, B.; VIRK, G. S.; NAGPAL, A. K. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. 17:161–169, 2011.

SCORZA, R.; JANICK, J. In vitro flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 105: 892-897, 1980.

SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 13: 209-214, 2015a.

SHEKHAWAT, M. S.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. An improved micropropagation protocol by ex vitro rooting of *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* deg. through nodal segment Culture. **Scientifica**. 2015: 578- 676, 2015b.

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

SILVA, G. M.; CRUZ, A. C.; 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.; 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.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 11: 118-131, 1957.

SUGIYAMA, S. I. Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. **Annals of Botany**. 96: 931-938, 2005.

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

SU, Y. H.; LIU, Y. B.; ZHANG, X. S. Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. **Molecular Plant**.4: 616-625, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2013. 918p.
TAPAN, K. M. Genetics breeding. In. **Breeding and biotechnology of tea and its wild species**. India: Delhi, Springer, 2014. p.9-34.

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

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

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

VARASSIN, I. G.; SILVA, A. G. A. Melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em Vegetação de Restinga. **Rodriguésia**. 50:76-77, 1999.

VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in Southeastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 136: 139-152, 2001.

VERMA, M.; BANSAL, Y. K. Effect of a potent cytokinin thidiazuron (TDZ) on *in vitro* regeneration of *Hedychium coronarium* j. koenig – A valuable medicinal plant manju verma and yogendra kumar bansal. **International Journal of Recent Biotechnology**. 2: 38-44, 2014.

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; 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.

VIEITEZ, A. M.; SAN-JOSE, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 32: 140-147, 1996.

VISSER, C.; QURESHI, J. K.; GILL, R.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron: Substitution of auxin- cytokinin requirement of somatic embryogenesis in hypocotyl cultures of geranium. **Journal of Plant Physiology**. 99: 1704-1707, 1992.

WALIA, N.; KAUR, A.; BABBAR, S. B. Proliferation and differentiation from endosperms of *Carthamus tinctorius*. **Biology Plant**. 51: 749-753, 2007.

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

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. Growth and differentiation in plants. **Oxford: Pergamon**, p.343, 1982.

XING, S. C.; CAI, Y. H.; ZHOU, K. D. A new approach for obtaining rapid uniformity in rice (*Oryza sativa* L.) via a 3x x 2x cross. **Genetics and Molecular Biology**. 33: 325-327, 2010.

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

YU, M. D.; JING, C. J.; WU, C. R.; LU, C. Breeding of new artificial triploid mulberry variety jialing. **Science of Sericulture**. 3: 225-229, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. (ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS / UFSC, 2004. p. 576-614.

CAPÍTULO II

Regeneração in vitro via organogênese de *Passiflora miniata* Master (Passifloraceae)

RESUMO

O trabalho teve como objetivo induzir a regeneração in vitro de *P. miniata* via organogênese utilizando-se de embriões zigóticos maduros e segmentos radiculares. Os embriões zigóticos foram isolados e cultivados no meio MS com a adição dos reguladores de crescimento 6-Benziladenina (BA), Thidiazuron (TDZ) e Cinetina (CIN). A regeneração nos embriões zigóticos ocorreu de forma direta e/ou indireta. Um percentual de 80% dos explantes cultivados na presença de BA apresentaram organogênese pela via direta e 20% pela indireta, com TDZ 60% foram regenerados pela direta e 40% pela indireta. Já nos tratamentos com CIN 58% do explantes apresentaram regeneração por organogênese direta e 42% pela indireta. O desenvolvimento dos primórdios das brotações iniciou-se com a formação das estruturas organogênicas que posteriormente se diferenciaram em multibrotações. As maiores médias no número de brotos produzidos foram na concentração de 3,3 μM de BA com 40,2 de brotos por explantes diferindo estatisticamente da produção em meio com 7,7 μM de BA, com média de 10,6 brotos por explantes. No meio de alongamento observou-se que a maior média no comprimento dos brotos foi de 11,0 cm e 68% dos brotos desenvolveram raiz, com média de 11,4 por explante. Já os explantes radiculares apresentaram o maior índice de regenerados com TDZ, com percentual de 52% de brotações pela via direta e 48% pela indireta, onde a maior média obtida foi de 37,8 na concentração de 6,8 μM . Em meio com BA 8% dos brotos foram regenerados pela via direta e 92% pela indireta, com a maior média de 14,0 observada na concentração de 4,4 μM . O percentual de regeneração utilizando a CIN foi de 5% pela via direta e 95% pela indireta, apresentando a maior média de brotações com 2,0 por explantes na concentração de 3,4 μM . No alongamento e enraizamento das brotações observou-se que 75% dos brotos que foram regenerados na presença de TDZ apresentaram raiz, com a maior média de 1,4 por explante e média de 5,4 cm de comprimento. Deste modo, a regeneração da espécie silvestre *P. miniata* via organogênese direta

e indireta, demonstra maior efetividade na produção de brotações com uso do regulador BA, em relação às citocininas TDZ e CIN.

Palavras chaves: Maracujá silvestre, Embrião zigóticos, Organogênese, Brotações adventícias.

**In vitro regeneration via organogenesis of *Passiflora miniata* Master -
(Passifloraceae)**

ABSTRACT

The objective of this work was to induce the in vitro regeneration of *P. miniata* via organogenesis using mature zygotic embryos and root segments. The zygotic embryos were isolated and cultured on MS medium with the addition of 6-Benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ) and Kinetin (KIN) growth regulators. Regeneration in zygotic embryos occurred directly and/or indirectly. A percentage of 80% of the explants cultivated in the presence of BA presented organogenesis by the direct route and 20% by the indirect with TDZ 60% regenerated by the direct route and 40% by the indirect. Already in the treatments with KIN 58% of explants presented regeneration by direct organogenesis and 42% by indirect. The development of early shoots began with the formation of organogenic structures that later differentiated into multi-shoots. The highest average number of shoots produced was 3.3 μM BA with 40.2 shoots per explant, differing statistically from the production in medium with 7.7 μM BA, with an average of 10.6 shoots per explant. In the medium of elongation, it was observed that the highest average length of shoots was 11.0 cm and 68% of shoots developed root, with average of 11.4 per explant. The root explants presented the highest regenerated presence of with TDZ, with 52% of shoots by direct route and 48% by indirect, where the highest average obtained was 37.8 in the concentration of 6.8 μM . In the presence of BA, 8% of shoots for regenerated presented direct and shoots 92% for indirect, with the highest average of 14.0 observed in the concentration of 4.4 μM . The percentage of regeneration using the CIN was 5% by the direct route and 95% by the indirect one, presenting the highest average of shoots with 2.0 by explants in the concentration of 3.4 μM . In the shoot sand rooting, it was observed that 75% of the shoots that were regenerated in the presence of TDZ showed root, with the highest average of 1.4 per explant and average of 5.4 cm in length. Thus, the regeneration of the wild species *P. miniata* via direct and indirect organogenesis, demonstrates greater effectiveness in the production of shoots with the use of the BA regulator, in relation to the cytokinins TDZ and KIN.

Keywords: Wild passion fruit, Zygotic embryos, Organogenesis, Adventitious shoots.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem sido considerado um dos mais importantes centros de diversidade de *Passiflora* (Amorim et al., 2014), com aproximadamente 25% o que corresponde um total de 140 espécies e do qual 60%, ou seja, 84 espécies são consideradas endêmicas (Bernacci et al., 2014).

Atualmente espécies de *Passiflora* ganharam atenção como plantas ornamentais, principalmente devido à beleza e exuberância de suas flores, com grande variação de coloração forte e brilhante e algumas outras de coloração tênue e suave (Montero et al., 2013). As flores também são consideradas exóticas e complexas, principalmente pela presença da corona, que caracteriza esta família (Abreu et al., 2009). O potencial ornamental dos maracujazeiros é praticamente inexplorado no Brasil, apesar de ser considerado centro de origem e de diversidade. Nos países do hemisfério norte já foi produzido e registrado mais de 400 híbridos para fins ornamentais (Peixoto, 2005).

Passiflora miniata Mast. é uma espécie silvestre nativa da Amazônia Meridional brasileira, podendo ser encontrada também, na Bolívia, Colômbia, Peru, assim como Venezuela e Guianas (Lim, 2012). Tem sido extensivamente cultivada de forma errônea como *Passiflora coccinea*, devido às características similares das flores de coloração vermelha intensa (Vanderplank, 2006). Estudos que envolvem a regeneração in vitro de *P. miniata* somente foi relatado por (Ferreira et al., 2015) no estabelecimento de protocolo de embriogênese somática e a regeneração pela via organogênica ainda não foi descrita.

As técnicas aplicadas para a regeneração em passifloráceas por meio da cultura de tecidos aumentaram em todo o mundo, utilizando-se de diferentes tipos de explantes, como discos foliares em *P. edulis* (Amugune et al., 1993), segmentos intermodais em *P. edulis* (Biasi et al., 2000), segmentos radiculares em *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* (Silva et al., 2011), segmentos foliares de *Passiflora alata* (Pacheco et al., 2012), em *P. suberosa* de forma indireta por meio de segmentos nodais, intermodais e segmentos foliares (Garcia et al., 2011), hipocotiledonares em *P. setacea* (Vieira et al., 2014), segmentos nodais em *P. foetida* (Anand et al., 2012; Shekhawat et al., 2015), embrião zigótico (Rocha et al., 2015), segmentos hipocotiledonares, radiculares provenientes de *P. edulis* (Rocha et al., 2016).

A regeneração via organogênese refere-se à formação de brotos e raízes a partir dos explantes cultivados em condições *in vitro* sendo influenciado principalmente pelo tipo de explante e a combinação dos reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957; Duclercq et al., 2011; Xu e Huang, 2014). As vias de regeneração são dependentes da sinalização dos reguladores de crescimento que o leva a redefinição do padrão de expressão de genes, da proliferação e diferenciação celular até o desenvolvimento de um órgão (De Klerk et al., 1997).

Atualmente o uso de raízes como fonte de explante na regeneração *in vitro* de *Passiflora* spp. pela via organogênica tem sido crescente (Silva et al., 2011; Rosa et al., 2016). Segmentos radiculares são considerados de fácil manuseio e manutenção na cultura *in vitro*, pelo potencial organogênico comparado a outros explantes não meristemático e assim ser uma alternativa de uso para estudos de transformação genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Smetanska, 2008).

Já os embriões zigóticos são utilizados como explantes porque são fontes de células juvenis, em constante divisão mitótica, com potencial embriogênico que facilita o processo de indução e conseqüentemente o da regeneração (Elhiti e Stasolla, 2011).

Devido ao potencial da espécie de maracujazeiro amazônico e a escassez de estudos de regeneração, o trabalho teve como objetivo induzir a regeneração *in vitro* de *P. miniata* via organogênese utilizando-se de embriões zigóticos maduros e segmentos radiculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros de *P. miniata* foram coletados de plantas adultas em parques urbanos no município de Alta Floresta- MT. No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, situado na Universidade do Estado de Mato Grosso-UNEMAT, na cidade de Tangará da Serra- MT, os frutos foram lavados em água corrente para extração manual das sementes.

As sementes foram lavadas e pressionadas em peneira até a total eliminação do arilo e da mucilagem e, em seguida colocadas sobre papel, à sombra em temperatura ambiente por um período de sete dias para secagem. Os tegumentos das sementes foram removidos (Figura 1A) com o auxílio de uma mini morsa.

As sementes foram desinfestadas em álcool a 70% (v/v⁻¹) por 2 minutos, lavadas com água corrente, deionizada e autoclavada, logo depois, imersa em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v v⁻¹), acrescido de 3 gotas de Tween 20 por 100 mL de solução durante 15 minutos e submetidas a 4 lavagens com água deionizada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas em frascos de cultivo contendo meio com os sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) com 0,3% (p v⁻¹) de sacarose, 0,01% (p v⁻¹) de mio-inositol, e gelificado com ágar a 0,8% (p v⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e vertido em frascos contendo 60 mL de solução e autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. Os frascos foram selados com filme de policloreto de vinila - PVC esticável de 9-10 µm de poro.

O material foi mantido no escuro por 30 dias e após esse período foram transferidos para sala de cultivo sob irradiância com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro com 36 µmolm⁻²s⁻¹ e duas lâmpadas fluorescente (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brazil), com temperatura de 26 ± 2 °C por 15 dias.

2.2 Obtenção dos explantes zigóticos

Em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas e materiais esterilizados, as sementes sem o tegumento foram desinfestadas em álcool a 70% (v/v⁻¹) por 3 minutos, lavadas com água corrente, deionizada e autoclavada, logo depois, imersa em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v v⁻¹), acrescido

de 3 gotas de Tween 20 por 100 mL de solução durante 20 minutos e submetidas a 4 lavagens com água deionizada e autoclavada. Em seguida, com auxílio de um bisturi, os embriões zigóticos de *P. miniata* (Figura 1B) foram isolados e inoculados em meio de indução para regeneração via organogênese.

2.3 Obtenção dos explantes radiculares

Plântulas com 30 dias de cultivo e ± 10 cm de altura com raízes de ± 8 cm obtidas a partir da germinação *in vitro*, como descrito no item 2.1 foram selecionadas, excisadas e subdivididas em segmentos radiculares de ± 1 cm e inoculados em meio de indução da organogênese.

2.4 Indução a organogênese

Os embriões zigóticos e segmentos radiculares foram inoculados em meio MS contendo 0,3% (p v⁻¹) de sacarose, 0,01% (p v⁻¹) de mio-inositol, e gelificado com ágar a 0,8% (p v⁻¹). Os reguladores de crescimento utilizados para a indução da organogênese foram a 6-Benziladenina (BA) 2,2, 3,3, 4,4, 5,5, 6,6, 7,7; 8,8 μ M, o Thidiazuron (TDZ) 2,2, 3,4, 4,5, 5,6, 6,8, 7,9; 9,0 μ M e a Cinetina (CIN) 2,3; 3,4; 4,6; 5,8; 6,9; 8,1; 9,2 μ M.

O pH do meio de indução foi ajustado a $5,7 \pm 0,1$, em seguida, autoclavados por 20 minutos, 121 °C e 1,1 atm de pressão. O meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno cristal de 90 x 15 mm estéreis em alíquotas de 25 a 30 mL, sendo essas seladas com filme de policloreto de vinila - PVC esticável de 9-10 μ m de poro.

2.5 Alongamento e Enraizamento

Brotações de ± 2 cm de comprimento de origem a partir de embriões zigóticos e segmentos radiculares foram isolados e subcultivados em tubos de ensaio contendo cerca de 15 mL em meio MS e cultivados nas mesmas condições anteriormente descritas. As culturas foram mantidas durante 30 dias de cultivo *in vitro*.

2.6 Caracterização Anatômica

Amostras dos explantes de embriões zigóticos e de raiz foram coletadas aos 30 dias de cultivo para caracterização das estruturas formadas durante o processo

de regeneração. As amostras coletadas foram fixadas em solução de FAA 50% (formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico) por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradualmente em álcool etílico nas concentrações de 70%, 85% e 95% por 24 horas.

As amostras foram inclusa em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha RM 2155, Leica Microsystems Inc., USA) por 48 horas. Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidos a partir do micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica Microsystems Inc., USA) e equipado com navalha de aço descartável. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O'Brien e McCully, 1981). A captura das imagens foi realizada em microscópio óptico equipado com o software de análise de imagens NIS-Elements Analysis D 4.30.01 com câmera digital acoplada (Nikon, Tóquio, Japão).

2.7 Análise estatística

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos para cada regulador de crescimento BA (2,2; 3,3; 4,4; 5,5; 6,6; 7,7 e 8,8 µM), TDZ (2,2, 3,4, 4,5, 5,6, 6,8, 7,9 e 9,0 µM) e CIN (2,3; 3,4; 4,6; 5,8; 6,9; 8,1 e 9,2 µM) e o controle, com cinco repetições, representada por uma placa de Petri e cinco explantes cada. As características analisadas foram o percentual de organogênese direta e indireta para cada regulador de crescimento, o percentual de explantes com resposta morfogênica, a média de produção de brotações adventícias, a média do comprimento dos brotos e o número de raiz.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo software Sisvar®, versão 5.6 (Ferreira, 2014). Dados Transformados: Raiz quadrada de $Y+0.5$ - $SQRT(Y+0.5)$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Regeneração a partir de embriões zigóticos

Após 20 dias de estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir dos embriões zigóticos de *P. miniata* pode-se observar o desenvolvimento de primórdios de brotos via organogênese indireta e direta (Figura 1C-D). As estruturas organogênicas na presença de 2,2 μM de TDZ proliferaram-se por todo o explante e gemas adventícias de forma assincrônica diferenciaram como observado nas Figuras 1E-F.

Aos 30 dias os embriões cultivados na presença de BA responderam com um percentual de 80% pela regeneração via organogênese direta (Figura 2) com a formação de brotações direto do tecido do explante (Figura 1G-H).

Durante a organogênese o uso da 6-Benziladenina (BA) em baixas concentrações promoveu a regeneração com maior número de brotos apresentando média 40,2 de brotos/explantes com percentual de 88% de explantes com resposta morfogênica (Tabela 1).

Os embriões zigóticos cultivados no meio com TDZ apresentaram brotações pela via direta em 60% dos explantes inoculado e 40% por via indireta. Já nos tratamentos com cinetina 58% dos explantes foram regenerados pela via direta e 42% pela indireta (Figura 2).

No cultivo dos embriões foi possível observar que número de explante com resposta, não houve diferença significativa dentre as concentrações de cada regulador de crescimento. Entretanto, ao comparar cada tratamento entre os reguladores observou-se a ocorrência de diferença entre as respostas morfogênicas correspondentes as concentrações de 3,3; 4,4; e 6,6 μM de BA, com percentual 88% de explantes (Tabela 1).

A organogênese é o sistema de regeneração que resulta na formação de uma estrutura unipolar, denominada de eixos caulinares, desenvolvidos a partir de gemas pré-existentes ou neoformadas que podem originar a partir do tecido do explante com conexão vascular, caracterizando a organogênese direta ou por meio da formação de células desdiferenciadas, denominada de calos, caracterizando a rota da organogênese indireta (Skoog e Miller, 1957; Duclercq et al., 2011; Xu e Huang, 2014). A ação dos reguladores de crescimento é determinada pela sinalização específica em seus sítios reguladores que promovem a ativação e/ou inativação de

uma cascata de genes responsáveis pela aquisição da competência e determinação celular para diferenciação, seguida do desenvolvimento do órgão. (Che et al., 2006; Hamant et al., 2010; Duclercq et al., 2011).

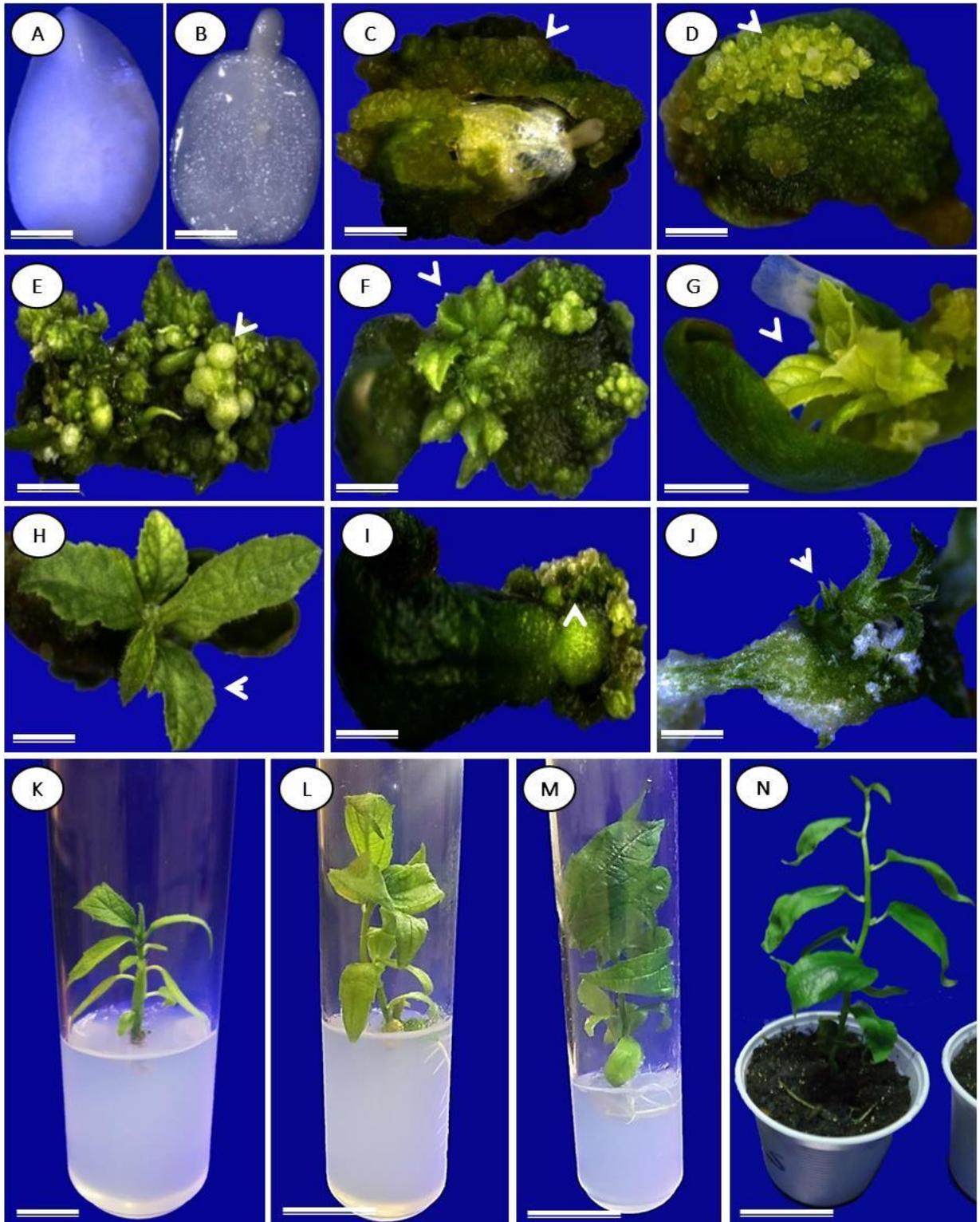


Figura 1. Aspectos da organogênese in vitro utilizando embriões zigóticos como fonte de explantes de *P. miniata* aos 30 dias de cultivo. A- Semente na ausência de tegumento; B- Embrião zigótico; C- Organogênese indireta (setas); D- Organogênese direta (setas); E- Primórdios de brotos (setas) na presença de 2,2 μM de TDZ; F- Brotações diferenciadas com primórdios foliares (setas) meio 2,2 μM de TDZ; G-H- Organogênese direta 3,3 μM e 4,4 μM BA (setas) e brotos com folhas expandidas; I-Primórdios de brotos desenvolvidos (setas) em meio com a presença 2,3 μM de CIN; J- Organogênese direta produzida no tratamento controle (setas); K - Broto isolado com \pm 3 cm em meio de alongamento; L- Broto alongado regenerado com 2,2 μM de BA; M- Broto isolado do meio de indução com 3,3 μM de BA; N- Plântula aclimatizada. A-B-D-E-H (Bars = 35 μm); C (Bar = 35 μm); F (Bar= 25 μm); G-J (Bars = 80 μm); I (Bar= 60 μm); K-L-M-N (10mm).

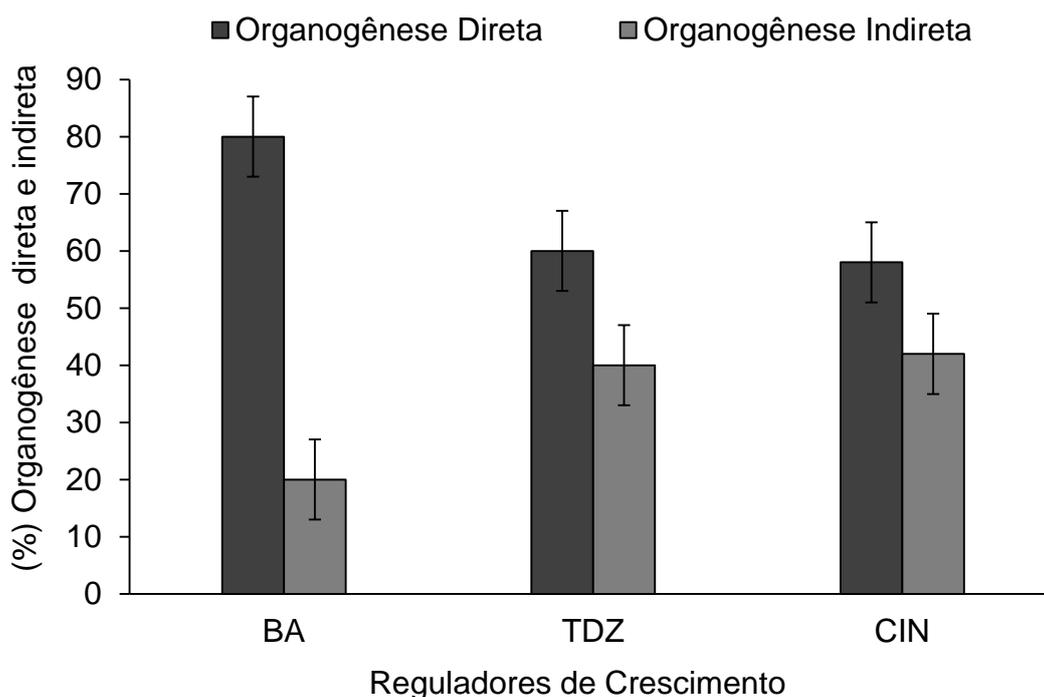


Figura 2. Organogênese direta e indireta a partir de embriões zigóticos após 30 dias de cultivo in vitro na presença das citocininas BA, TDZ e CIN.

O regulador de crescimento comumente utilizado na regeneração pela via organogênica em *Passiflora* é a 6-Benziladenina (BA), que promove a manutenção e a diferenciação da parte aérea e de meristemas apicais e radiculares (Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012; Rosa e Dornelas, 2012; Otoni et al., 2013). No entanto, o TDZ tem apresentado ótimos resultados em estudos que visam à regeneração in

vitro de *Passiflora*, principalmente em baixas concentrações (Pinto et al., 2010; Garcia et al., 2011).

Os embriões zigóticos cultivados no meio com TDZ apresentaram o desenvolvimento de primórdios das brotações em toda a região dos cotilédones (Figura 1F). O maior número de brotos produzidos foi de 7,2 na presença de 2,2 μM TDZ, seguido de 2,6 brotos na concentração de 4,5 μM . O aumento nas concentrações aparentemente reduziu a produção e o desenvolvimento das brotações, formando estruturas organogênicas que não se diferenciaram.

Embriões zigóticos de *P. miniata* respondem morfogenicamente em meio suplementado com cinetina, induzindo a produção de brotos (Figura 1I) com maior média de 3,6 no tratamento com 2,3 μM , seguida de 2,4 na concentração de 5,8 μM de CIN. Entretanto, estas não alongam o que dificulta o seu isolamento, assim observa-se a necessidade de utilização de reguladores de crescimento que estimulem o desenvolvimento das brotações.

O potencial morfogênico dos embriões zigóticos é evidenciado no tratamento controle que na ausência dos reguladores de crescimento responderam com o desenvolvimento de brotações apresentando média de 3,0 de brotos por explante (Figura 1J).

No processo de regeneração pela via organogênica do gênero *Passiflora*, comumente são utilizados como fonte de explantes, folha, hipocótilo e segmento nodal (Rocha et al., 2012; Vieira et al., 2014; Vinod e Jayabalan, 2015; Carvalho et al., 2015). Sendo o uso de embriões zigóticos mais empregado na regeneração pela via embriogênica (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Paim Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2014; Silva et al., 2015; Ferreira et al., 2015, Rosa et al., 2015).

Rocha et al. (2015) utilizando-se de embriões zigóticos para a regeneração pelas vias organogênica e embriogênica relatam que este tipo de explante pode responder no desenvolvimento de brotações e/ou embriões somáticos. Além disso, as respostas são dependentes das concentrações dos reguladores de crescimento disponíveis no meio de cultivo. Já Elhiti e Stasolla (2011) relatam que os embriões de modo geral, são fontes de células juvenis, em constante divisão mitótica, o que facilita o processo de regeneração.

Tabela 1. Média de explantes com e sem resposta morfogênica e o número de brotos aos 30 dias a partir de embriões zigóticos como fonte de explante em *P. miniata*.

Tratamentos (μM)			Embriões zigóticos	
BA	TDZ	CIN	Explantes c/ resposta morfogênica (%)	Média no. de brotos
Controle			60 ^{DE}	3,0 ^C
2,2	-	-	68 ^{BCDE}	17,2 ^{ABC}
3,3	-	-	88 ^{AB}	40,2 ^A
4,4	-	-	88 ^{AB}	26,4 ^{ABC}
5,5	-	-	64 ^{CDE}	18,2 ^{ABC}
6,6	-	-	88 ^{AB}	27,2 ^{ABC}
7,7	-	-	84 ^{ABC}	10,6 ^{BC}
8,8	-	-	76 ^{ABCD}	31,0 ^{AB}
-	2,2	-	72 ^{BCDE}	7,2 ^{BC}
-	3,4	-	88 ^{AB}	1,4 ^C
-	4,5	-	96 ^A	2,6 ^C
-	5,6	-	88 ^{AB}	2,6 ^C
-	6,8	-	80 ^{ABCD}	0,8 ^C
-	7,9	-	64 ^{CDE}	0,0 ^C
-	9,0	-	84 ^{ABC}	0,0 ^C
-	-	2,3	68 ^{BCDE}	3,6 ^{BC}
-	-	3,4	60 ^{DE}	1,6 ^C
-	-	4,6	60 ^{DE}	1,2 ^C
-	-	5,8	80 ^{ABCD}	2,4 ^C
-	-	6,9	52 ^E	0,6 ^C
-	-	8,1	72 ^{BCDE}	1,6 ^C
-	-	9,2	52 ^E	0,8 ^C
C.V(%):			25,68	46,69

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A diferenciação dos brotos, assim como, a expansão e o comprimento das raízes formadas durante o processo morfogênico dependem do equilíbrio hormonal

endógeno dos explantes e exógeno presentes no meio de cultura (Muller e Leyser, 2011; Wang et al., 2015; Hisano et al., 2016). Sendo o comprimento e o enraizamento dos regenerantes, duas etapas importantes e altamente complexas, que podem dificultar ou até mesmo impedir o estabelecimento eficiente de um protocolo de micropropagação (Saini et al., 2013).

Após 30 dias de cultivo no meio para o alongamento observou-se que 68% dos brotos desenvolveram raiz conforme os dados na Tabela 2 e a Figura 1L-M-N. Com a maior média do número de raiz produzida por explante de 11,4. E maior comprimento de brotação de 11,0 cm (Tabela 2). A melhor resposta foi obtida de brotações produzidas em meio com 3,3 μM de BA. Muller e Leyser (2011) e Hisano et al. (2016), relatam que as raízes são as principais fontes de citocininas, quanto maior for o número de raízes, maior será a área de absorção, favorecendo o desenvolvimento da parte aérea e conseqüentemente o comprimento dos brotos .

Observou-se que brotações formadas na presença das concentrações mais elevadas dos reguladores TDZ e CIN interferem negativamente no desenvolvimento das brotações durante a fase de alongamento (Tabela 2).

Os brotos regenerados em meio de indução suplementados com 6,8 μM de TDZ apresentaram média de 0,2 cm de comprimento e média de 0,0 no número de raízes. Em concentrações mais altas, como 7,9 e 9,0 μM de TDZ não promoveram o alongamento dos brotos, apresentando senescência. Neste caso, de acordo com Peres (2002) o efeito residual da citocinina pode ter interferido de modo particular no metabolismo hormonal e endógeno da brotação. Explantes cultivados na concentração de 8,1 e 9,2 μM de CIN não foram regenerados apresentando apenas a germinação do embrião, e na presença de 6,9 μM ocorreu à morte dos brotos. Entretanto, em baixas concentrações, a cinetina induz o alongamento dos propágulos apresentando comprimento médio de 1,4 cm da plântula e número médio de raiz com 0,6 em meio com 2,3 μM de CIN.

As plântulas após 10 dias de acondicionamento e sobrevivência foram consideradas aclimatizadas (Figura 1N).

Tabela 2. Respostas morfogênicas obtidas do alongamento de brotações adventícias de *P. miniata* aos 30 dias de cultivo in vitro.

Meio de indução			Meio de alongamento	Embriões zigóticos	
(µM)				Comprimento/brotos (cm)	No. de Raiz
BA	TDZ	CIN			
Controle			MS	1,2 ^{CDE}	2,2 ^C
2,2	-	-	MS	8,2 ^{AB}	6,4 ^A
3,3	-	-	MS	11,0 ^A	11,4 ^C
4,4	-	-	MS	5,8 ^{ABCDE}	1,0 ^C
5,5	-	-	MS	4,2 ^{BCDE}	1,2 ^C
6,6	-	-	MS	7,0 ^{ABC}	1,4 ^C
7,7	-	-	MS	3,8 ^{BCDE}	0,8 ^C
8,8	-	-	MS	6,8 ^{ABCD}	1,4 ^C
-	2,2	-	MS	2,0 ^{BCDE}	0,4 ^C
-	3,4	-	MS	0,6 ^E	0,0 ^C
-	4,5	-	MS	1,2 ^{CDE}	0,4 ^C
-	5,6	-	MS	0,6 ^E	0,4 ^C
-	6,8	-	MS	0,2 ^E	0,0 ^C
-	7,9	-	MS	0,0 ^E	0,0 ^C
-	9,0	-	MS	0,0 ^E	0,0 ^C
-	-	2,3	MS	1,4 ^{CDE}	0,6 ^C
-	-	3,4	MS	0,6 ^E	0,4 ^C
-	-	4,6	MS	1,0 ^{DE}	0,4 ^C
-	-	5,8	MS	1,0 ^{DE}	0,4 ^C
-	-	6,9	MS	0,0 ^E	0,0 ^C
-	-	8,1	MS	0,0 ^E	0,0 ^C
-	-	9,2	MS	0,0 ^E	0,0 ^C
C.V(%). :			-	29,49	21,79

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Organogênese a partir de explantes radiculares

O desenvolvimento de brotações adventícias em explantes de raiz de *P. miniata* ocorreu primeiramente com o intumescimento nas extremidades dos segmentos radiculares, após 10 dias de cultivo in vitro e, posteriormente o rompimento da epiderme (Figura 3A), seguido do desenvolvimento de estruturas organogênicas distribuídas na superfície do explante (Figura 3B). As estruturas organogênicas proliferaram aproximadamente aos 15 dias de cultivo e primórdios de brotações foram visíveis (Figura 3C-D).

A organogênese ocorreu de forma indireta e direta. Sendo que em meio com BA observou-se percentual de 92% com a formação de brotos intermediada pela proliferação de um aglomerado de células que se desdiferenciaram em um percentual de 8% pela organogênese direta (Figura 4). Já na presença do regulador de crescimento CIN, a regeneração foi de 5% pela via direta e 95% pela indireta e com TDZ 52% da organogênese ocorreu pela via direta e a indireta 48% (Figura 4).

A organogênese é um sistema de regeneração baseado na utilização de explantes obtidos in vitro que formam órgãos adventícios unipolares com conexão vascular ao tecido de origem (Skoog e Miller, 1957; Duclercq et al., 2011; Xu e Huang, 2014). Esse processo ocorre porque as células do tecido do explante, influenciados pela sinalização hormonal endógena ou exógena em conjunto com a interferência dos fatores externos, com a expressão dos genes envolvidos e o tipo de explante utilizado, são determinadas a seguir uma rota específica e entram em estado de diferenciação, seguida do desenvolvimento do órgão (Duclercq et al., 2011; Otoni et al., 2013; Xu e Huang, 2014; Rocha et al., 2016).

Protocolos de regeneração, a partir do uso da raiz como fonte de explante foi descrito com sucesso para diversas espécies vegetais (Atta et al., 2009; Arora et al., 2010; Xing et al., 2010; Yang et al., 2010). Em *Passiflora*, a organogênese direta utilizando-se de explantas radiculares já foi descrito pela via organogênica para as espécies *P. cincinnata* (Lombardi et al., 2007), *P. cincinnata* e a *P. edulis* (Silva et al., 2011), *P. edulis* (Rocha et al., 2012); *P. setacea* (Vieira et al., 2014) e *P. suberosa* (Rosa et al., 2016), quanto também pela via indireta (Lombardi et al., 2007; Rocha et al., 2012; Vieira et al., 2014; Rosa et al., 2016).

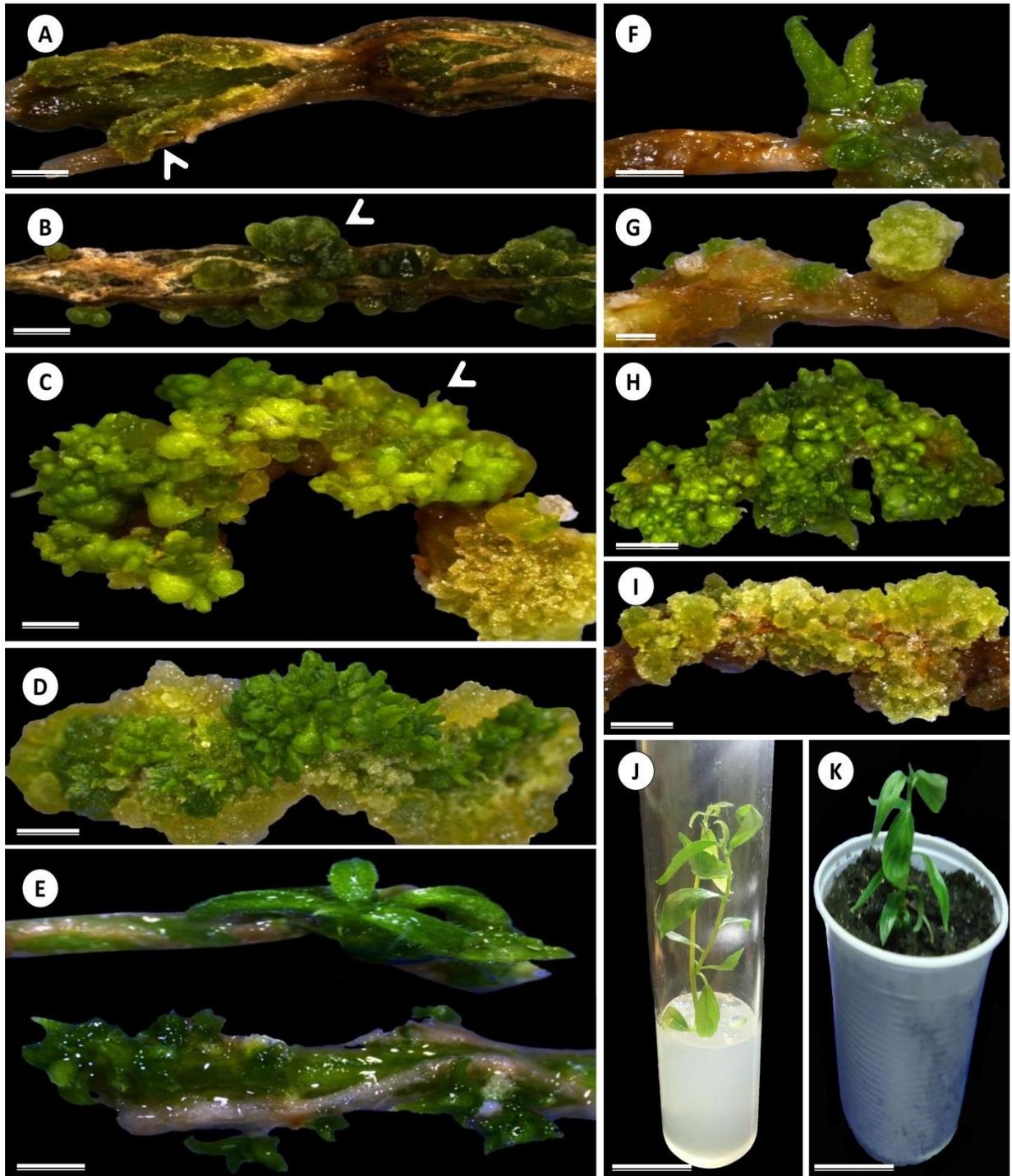


Figura 3. Organogênese a partir de segmentos radiculares de *P. miniata* aos 30 dias de cultivo in vitro. A- Rompimento da epiderme (setas) em meio com 4,4 μM de BA; B- Estruturas organogênicas (setas) de coloração verde escuro em meio de indução com 4,4 μM de BA; C- Estruturas organogênicas de coloração esverdeada e o início das brotações (setas) em meio com 4,5 μM de TDZ; D- Multibrotações via organogênese indireta em meio de indução com 6,8 μM de TDZ; E- Organogênese direta em meio com 6,8 μM de TDZ; F- Broto em meio com BA na

concentração de 4,4 μM de BA; G- Primórdios de brotos em meio de indução com 3,4 μM de CIN; H- Brotações em todo o explante, cultivado em meio com 6,8 μM de TDZ; I- Raiz recoberta por calos em meio de indução com 9,0 μM de TDZ; J- Broto alongado e enraizado em meio MS com ± 7 cm de comprimento, induzido por TDZ na concentração de 6,8 μM de TDZ; K- Plântula em substrato puro plantmax após 10 dias de aclimatização. A (Bar= 25 μM); B-C (Bars= 35 μM); D-H-I (Bars= 40 μM); E-F (Bars: 60 μM); G (Bar= 20 μM); J-K (Bars= 10mm).

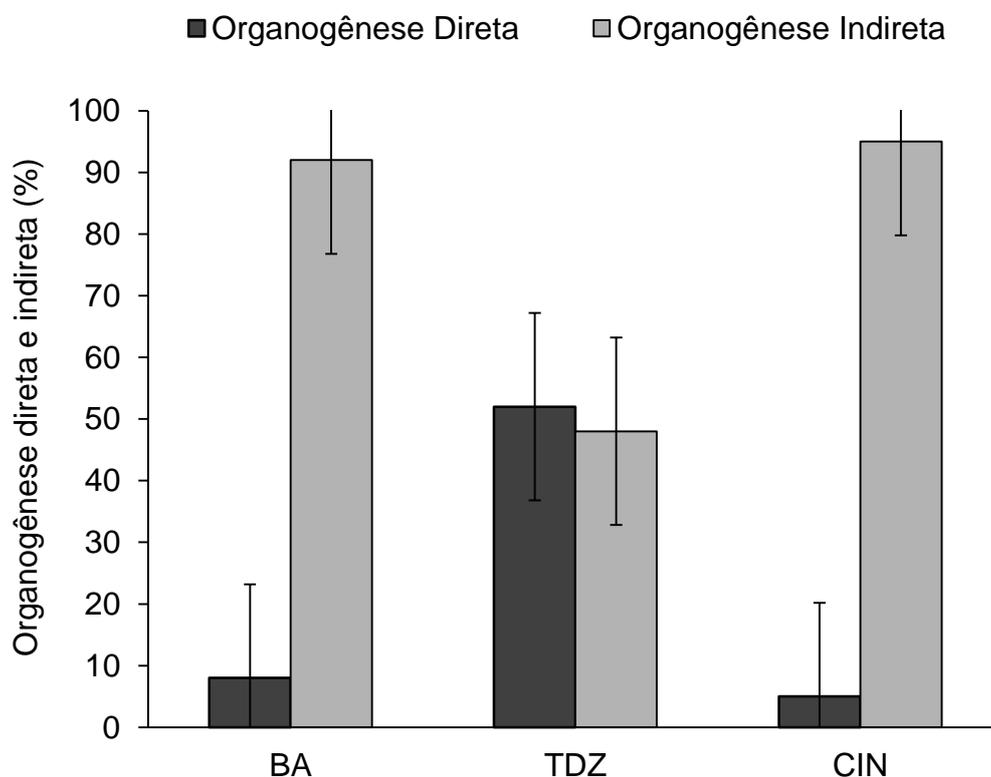


Figura 4. Organogênese direta e indireta a partir de segmentos radiculares após 30 dias de cultivo in vitro na presença das citocininas BA, TDZ e CIN.

Após 30 dias de cultivo dos segmentos radiculares de *P. miniata* em meio de indução foi observado que a regeneração ocorreu na presença dos reguladores de crescimento utilizados (Tabela 3). Entretanto, a diferenciação e/ou a desdiferenciação dos explantes em brotações não foi obtida nos tratamentos com 2,2; 7,9 e 9,0 μM de TDZ, conforme pode ser observado na Tabela 3.

O regulador de crescimento TDZ foi o que promoveu melhor resposta morfogênica com intensa proliferação das estruturas organogênicas (Figuda 3D). O maior número de brotações foi produzido na concentração de 6,8 μM com média de

37,8. Diferindo estatisticamente do observado na presença de 4,5 μM apresentando um percentual de 20% dos explantes com resposta morfogênica que diferenciaram em multibrotações com média de 14,2.

Já na presença do regulador de crescimento BA, a maior média 14,4 de brotos regenerados por explante foi obtido na concentração de 4,4 μM (Figura 3F), seguida da média de 8,8 com 3,3 μM (Tabela 3).

No tratamento controle, os explantes radiculares senesceram após 25 dias de cultivo *in vitro*. A resposta morfogênica e a diferenciação das estruturas organogênicas na presença de CIN (Figura 3G) apresentaram reduzido número de brotações sendo a maior média de 2,0 por explantes na concentração de 3,4 μM (Tabela 3).

O uso de citocininas no processo morfogênico, em destaque a 6-benziladenina (BA) em baixas concentrações é frequentemente utilizada no estabelecimento de protocolos responsivos de regeneração via organogênese a partir de explantes radiculares em espécies do gênero *Passiflora* (Silva et al., 2011; Vieira et al., 2014; Rosa et al., 2016).

A ação deste regulador pode apresentar respostas diferentes para cada espécie estudada do gênero, pois seu comportamento responsivo depende da combinação conjunta e otimizada que envolve a concentração adequada, as condições ambientais, a origem do explante, o genótipo e a necessidade de cada espécie (Vieira et al., 2014; Rosa et al., 2016).

Brotações com folhas expandidas (Figura 3E-H) foram subcultivadas e após 30 dias foi possível observar a produção de raízes em 75% das brotações que foram regenerados na presença de TDZ, com a maior média de 1,4 por explante e média de 5,4 cm no comprimento dos brotos (Tabela 4). As brotações tiveram origem a partir do meio de indução com 6,8 μM de TDZ (Figura 3H). Já em concentrações mais elevadas de TDZ, como em 9,0 μM os explantes apresentaram apenas calos enormes sem a rediferenciação do tecido em brotos (Figura 3I).

Os brotos regenerados a partir de explantes radiculares de *P.miniata* em meio de indução na presença de BA, após a transferência para o meio MS, ausente do regulador apresentaram crescimento com média de 2,0 cm de comprimento (Tabela 3).

Tabela 3. Média de explantes com e sem resposta morfogênica e o número de brotos aos 30 dias a partir de segmentos radiculares como fonte de explante em *P. miniata*.

Tratamentos (μM)			Segmentos radiculares	
BA	TDZ	CIN	Explantes c/ resposta morfogênica (%)	Média no. de brotos
			0,0 ^C	0,0 ^C
	2,2	-	32,0 ^{ABC}	0,0 ^C
	3,3	-	36,0 ^{ABC}	8,8 ^{BC}
	4,4	-	44,0 ^{AB}	14,4 ^B
	5,5	-	24,0 ^{ABC}	0,2 ^C
	6,6	-	16,0 ^{BC}	0,0 ^C
	7,7	-	14,0 ^{BC}	0,0 ^C
	8,8	-	8,0 ^{BC}	0,0 ^C
	-	2,2	0,0 ^C	0,0 ^C
	-	3,4	24,0 ^{ABC}	0,4 ^C
	-	4,5	20,0 ^{BC}	14,2 ^B
	-	5,6	40,0 ^{ABC}	8,0 ^{BC}
	-	6,8	64,0 ^A	37,8 ^A
	-	7,9	12,0 ^{BC}	0,0 ^C
	-	9,0	8,0 ^{BC}	0,0 ^C
	-	-	0,0 ^C	0,0 ^C
	-	2,3	0,0 ^C	0,0 ^C
	-	3,4	8,0 ^{BC}	2,0 ^C
	-	4,6	20,0 ^{BC}	0,6 ^C
	-	5,8	4,0 ^{BC}	0,0 ^C
	-	6,9	0,0 ^C	0,0 ^C
	-	8,1	0,0 ^C	0,0 ^C
	-	9,2	0,0 ^C	0,0 ^C
C.V(%):			21,19	39,76

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Média do comprimento dos brotos regenerados e o número de raiz a partir de segmentos radiculares em *P.miniata* cultivados aos 30 dias em meio MS.

Meio de indução			Meio de alongamento	Explantos radiculares	
BA	TDZ	CIN		Comprimento brotos (cm)	No. de Raiz
Controle			MS	0,0 ^C	0,0 ^B
2,2	-	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
3,3	-	-	MS	1,6 ^C	0,0 ^B
4,4	-	-	MS	2,0 ^C	0,0 ^B
5,5	-	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
6,6	-	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
7,7	-	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
8,8	-	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	2,2	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	3,4	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	4,5	-	MS	4,0 ^B	0,4 ^B
-	5,6	-	MS	3,8 ^B	0,4 ^B
-	6,8	-	MS	5,4 ^A	1,4 ^A
-	7,9	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	9,0	-	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	2,3	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	3,4	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	4,6	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	5,8	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	6,9	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	8,1	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
-	-	9,2	MS	0,0 ^C	0,0 ^B
C.V(%). :			-	76,44	21,05

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Vieira et al. (2014) relataram que brotos regenerados a partir de explantes radiculares de *Passiflora setacea*, cultivados em meio de indução na presença de

TDZ e alongado em meio com GA₃ proporcionaram aumento no comprimento com média de 5,0% sob irradiância e 12,5% no escuro.

A produção de brotos na presença de cinetina ocorreu apenas entre as concentrações de 3,4 e 4,6 µM com média de 2,0 e 0,6 respectivamente. Porém, o meio de indução com CIN nestas concentrações não alongaram e após a transferência do meio de indução para o de alongamento, os brotos senesceram (Tabela 4). O explantes radiculares cultivados no tratamento controle ocorreu à formação de calos que não se desdiferenciaram em brotações (Figura 3G).

Os brotos alongados na presença de 6,8 µM de TDZ (Figura 3J) que desenvolveram raiz foram transferidos para copo plástico com substrato plantmax puro. Após 10 dias de transferência, acondicionamento e sobrevivência, as plântulas foram consideradas aclimatizadas (Figura 3K).

3.4 Análise Anatômica

As análises anatômicas confirmaram o processo morfogênico pela via organogênica em explantes do embrião zigótico e segmentos radiculares de *Passiflora miniata*. Nos embriões zigóticos as gemas desenvolveram-se de forma indireta a partir da proliferação de células da região do tecido parenquimático que posteriormente se desdiferenciaram em primórdios de brotações (Figura 5A). As células meristemáticas dos primórdios apresentaram parede celular pouco espessa e núcleos proeminentes (Figura 5B).

As gemas desenvolvidas de forma direta iniciaram com divisões celulares na região superficial dos explantes formando estruturas potencialmente organogênicas (Figura 5C). As células apresentaram as mesmas características da organogênese indireta. O desenvolvimento do primórdio do broto com o desenvolvimento direto (Figura 5D) e células da epiderme continuam em divisões periclinal e anticlinal que posteriormente ocorre a formação e a diferenciação de multibrotações (Figura 5E) ao longo do tecido do explante.

Os brotos são desenvolvidos formando o domo apical, ou seja, a túnica corpo (Figura 5F). Com o desenvolvimento dos brotos radiculares observa-se a diferenciação da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio (Figura 5E).

Nos segmentos radiculares, a formação de gemas adventícias ocorreu de forma indireta e direta. No desenvolvimento indireto das gemas adventícias iniciou-se na região cortical do explante radicular com a proliferação de células pouco diferenciadas (Figura 6A). Essas células apresentaram paredes finas e grandes e espaço intracelular. Com a aquisição da competência e da determinação as células proliferaram-se e desenvolveram aglomerados celulares com meristemóides dispersos na região cortical (Figura 6B), aproximadamente aos 15 dias de cultivo in vitro. Esses aglomerados celulares ao longo do desenvolvimento foram se diferenciando até o desenvolvimento das gemas (Figura 6C).

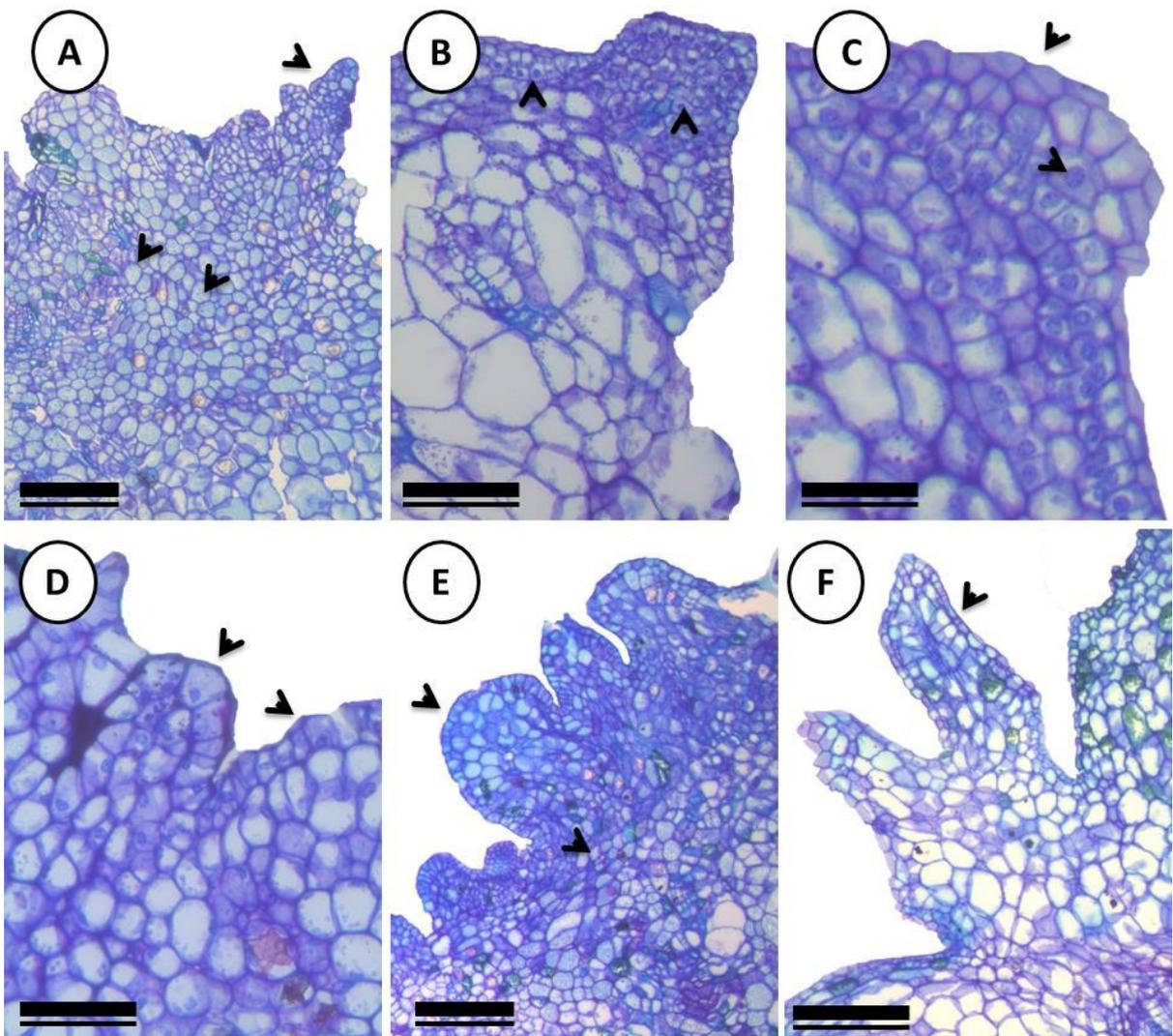


Figura 5. Cortes histológicos do processo de regeneração in vitro a partir de explantes zigóticos potencialmente organogênicos de *P. miniata*. A- Proliferação celular do tecido parenquimático (Setas); B- Parede celular pouco espessa e núcleos proeminentes (Setas); C- Atividade mitótica na região epidérmica do explante

(setas); D- Desenvolvimento direto de primórdios de brotos (setas); E- Diferenciação da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio (setas); F – Domo apical. A-E (Bars= 80µM); B-D-F (Bars= 100 µM); C (Bars= 110 µM).

A formação de meristemóides foram reportadas na regeneração direta e indireta em explantes radiculares das espécies *P. cincinnata* (Lombardi et al. 2007; Silva et al. 2011) e em *P. edulis* (Silva et al. 2011; Rocha et al. 2012). Rocha et al. (2012) ao analisar o processo morfogênico de brotações adventícias em raízes de *P. edulis* observaram que os brotos formaram-se mediante a diferenciação celular do periciclo, determinando a formação de meristemóides, seguido do desenvolvimento dos brotos.

A organogênese direta iniciou-se com divisões celulares principalmente periclinais nas camadas dos tecidos dos segmentos radiculares superficiais na região cortex (Figura 6D). Na Figura 6E é possível observar a formação de gemas adventícias diretamente do tecido dos explantes radiculares. No desenvolvimento mais tardio, estruturas típicas das brotações se desenvolveram (Figura 6F).

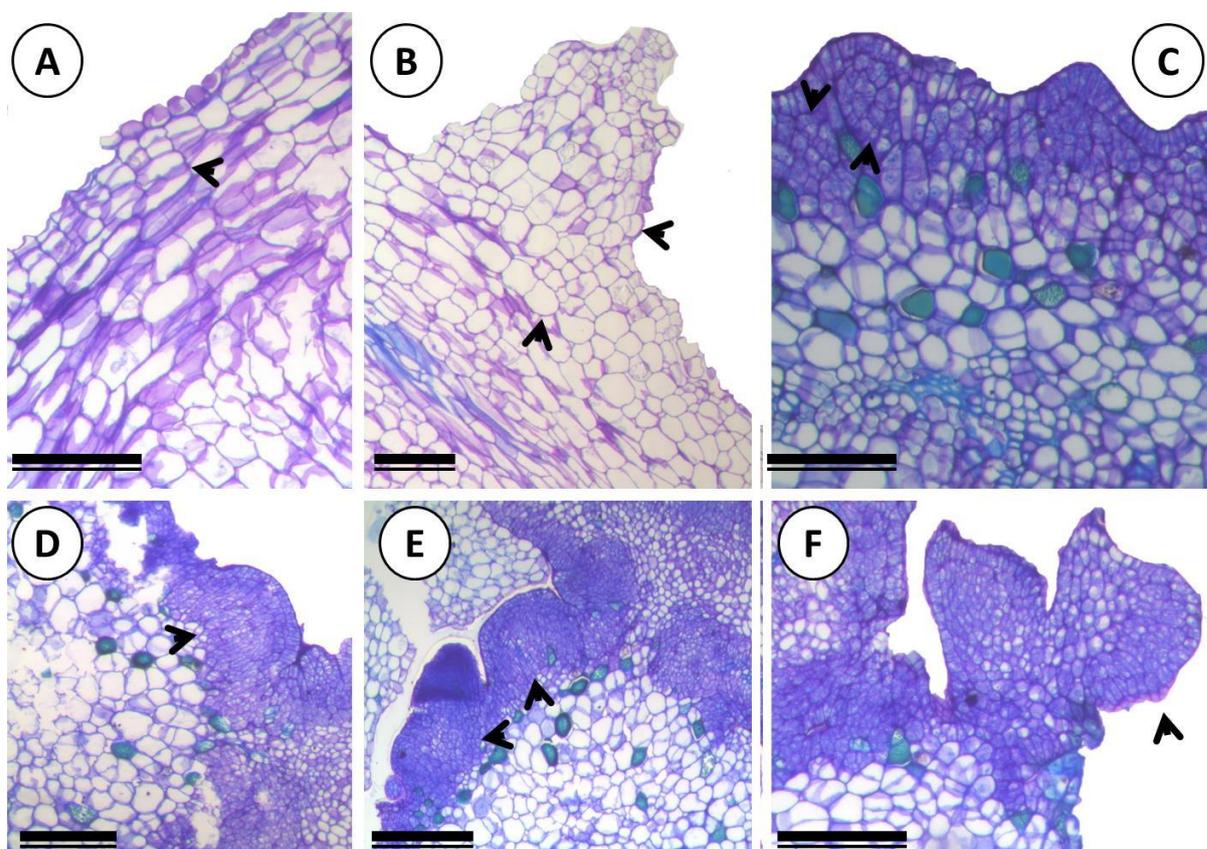


Figura 6. Cortes anatômicos de segmentos radiculares potencialmente organogênico evidenciando o desenvolvimento morfogênico aos 30 dias de cultivo in

vitro da espécie *P.miniata*. A- Proliferação de células meristemáticas de calo com potencial organogênico; B- Meristemóides na região cortical; C- Desenvolvimento de gemas; D- Divisões periclinais na região do córtex; E-F Desenvolvimento de gema adventícia com conexão vascular ao tecido do explante. A-E-F (Bars= 100 μ M); B-C-D (Bars= 60 μ M).

A caracterização anatômica de células envolvidas durante o processo morfogênico em espécies de *Passiflora* tem sido fundamental para compreender a composição, a origem e o posicionamento das estruturas formadas em cada etapa estabelecida até a diferenciação e o desenvolvimento dos brotos ou até mesmo para entender os problemas que dificultam e/ou impedem a regeneração e o alongamento de gemas que morfologicamente apresentam-se responsivas (Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

A regeneração in vitro da espécie silvestre *P. miniata* via organogênese utilizando-se de embriões zigóticos e fragmentos radiculares ocorreram de forma direta e indireta. O regulador de crescimento BA para a regeneração a partir de embriões zigóticos demonstrou maior responsividade na organogênese. Entretanto, para segmentos radiculares o regulador de crescimento TDZ induziu o desenvolvimento e proliferação de gemas adventícias. Desta forma, o protocolo de regeneração via organogênese direta e indireta foi estabelecido para os dois tipos de explantes utilizados, mostrando ser responsivo ao processo de regeneração in vitro pela via organogênica.

5. 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.
- ALMEIDA, M.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ARTIOLI, F. A.; ALMEIDA, L. V.; LEONE, G. F.; BACCARIN, F. J. B.; ANTONELLI, P. O.; CORDEIRO, G. M.; OBERSCHELP, G. P. J.; PIOTTO, K. D. B. Plant morphogenesis: theoretical bases. **Advances in Forestry Science**. 2: 13-22, 2015.
- AMORIM, F. L.; SILVEIRA, P. T. S.; SILVA, G. V.; CAFIEIRO, C. S. P. Elaboração e aceitação sensorial de licor maracujá-do-mato com diferentes tipos de calda. **Revista de Desenvolvimento e Inovação**. 1: 88-91, 2013.
- AMORIM, J. S.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. J. C.; CORRÊA, R. X.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. **Plant Systematics and Evolution**. 300: 1147–1162, 2014.
- ARORA, K.; SHARMA M.; SRIVASTAVA J.; RANADE, S. A.; SHARMA, A. K. In vitro cloning of *Azadirachta indica* from root explants. **Biology Plantarum**. 55:164–168, 2010.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARCH, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT- PAUTOT. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. **The Plant Journal**. 57: 626–644, 2009.
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. **Passifloraceae In: Lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>. Acesso em: 5, Agosto, 2016.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGA, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**. 36:141–151, 2013.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Induction, morphologic and ultra-structural analyses of native passion fruit calluses. **Revista Ceres**. 62: 340-346, 2015.
- CERVI, A. C. O Gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**. 16: 1-5, 2006.

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.

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

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência Agrotecnologia**. 38: 109-112, 2014.

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

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

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.

LIM, T. K. *Passiflora miniata*. **Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants**. 4:178 – 180, 2012.

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

MOK, M. C.; MOK, D.; TURNER, J.; MUJER, C. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. In: Chemical Regulation in Tissue Culture: An Overview, **Horticultural Science**. 22: 1194–1197, 1987.

MONTERO, D. A. V.; MELETTI, L. M. M.; MARQUES, M. O. 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.

MÜLLER D.; LEYSER O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany** 107:1203–1212, 2011.

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

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.

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

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

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (ed.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p. 458-462.

PEREIRA, A. R. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**. 31: 332-336, 2007.

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

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

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. (ed). **Protocols for In vitro Propagation of Ornamental plants, Methods in Molecular Biology**, 2010, p. 153-162.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. 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, 2012.

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

ROCHA, D. I.; 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.

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

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

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

SOUZA, T. V.; THIESEN, J. F.; GUERRA, M. P.; SANTOS, M. Morpho-and histodifferentiation of shoot regeneration of *Billbergia zebrina* (Helbert) Lindley nodular cultures **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1-11, 2016.

VANDERPLANK, J. Plate 562: *Passiflora miniata* (Passifloraceae). **Curtis's Botanical Magazine**. 23: 223–230, 2006.

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

VINOD KANNA, S.; JAYABALAN, N. Regeneration via Direct Organogenesis from Leaf Segments of Eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Plant Sciences**. 10:90-98, 2015.

WANG, H. Y.; CUI, K.; HE, C. Y.; ZENG, Y. F.; LIAO, S. X.; ZHANG, J. G. Endogenous hormonal equilibrium linked to bamboo culm development. **Genetics and Molecular Research**. 14: 11312-11323, 2015.

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 Organ and 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 Organ and Culture**. 107: 407–416, 2011.

XING Y.; YU, Y.; LUO X.; ZHANG J.N.; ZHAO B.; GUO, Y. D. High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. **Biology Plantarum**. 54:231–236, 2010.

YANG, J. L.; SEONG E, S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU, C. Y.; LI, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**. 100:49–58, 2010.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados alcançados constituem informações importantes para a compreensão do processo morfogênico da regeneração via organogênese direta e indireta a partir do uso de diferentes explantes de duas espécies de maracujá, sendo a *Passiflora alata*, uma espécie comercial e a *Passiflora miniata* uma espécie silvestre da Amazônia meridional.

Desta forma, a regeneração obtida a partir do uso das citocininas benziladenina (BA), thidiazuron (TDZ) e cinetina (CIN) utilizados no presente estudo, mostra que as duas espécies apresentam respostas diferentes na produção e desenvolvimento dos brotos formados. Sendo que ao utilizar os embriões zigóticos de *P. alata* como fonte de explante, o maior número de brotos foi observado na presença de CIN, com média de 37,6 por explantes. Apesar de CIN estimular a maior produção de brotos, o explante também foi reponsivo aos reguladores de crescimento, TDZ e BA que proporcionaram uma média de 36,4 e 33,6 de brotos nas concentrações de 9,0 μM de TDZ e 2,2 μM de BA, respectivamente. Já no cultivo in vitro dos explantes endospermáticos da mesma espécie, o maior número de brotos é obtido em meio de cultura com TDZ, induzindo uma média de 8,4 na concentração de 5,6 μM . Os brotos formados a partir dos endospermas não converteram em plantas.

A regeneração in vitro da espécie *P. miniata* a partir de embriões zigóticos e segmentos radiculares ocorreu tanto via organogênese direta quanto indireta. O maior número de brotos a partir do cultivo de embriões zigóticos foi obtido na presença de baixas concentrações da citocinina (BA), com média de 40,2 brotos/explantes na concentração de 3,3 μM . Nos segmentos radiculares como fonte de explantes foi possível obter uma média de 37,8 brotos/explantes na concentração de 6,8 μM de TDZ.

As variações nos resultados com relação ao uso das diferentes citocininas e explantes, provavelmente estão relacionadas com a concentração interna de auxinas e citocininas no tecido do mesmo e que podem variar de acordo com as condições ambientes, com as concentrações dos reguladores no meio de cultura e com os genótipos utilizados. Nesse caso, o balanço hormonal dos reguladores de crescimento, com os genótipos dos diferentes tipos de explantes das duas espécies

de *Passiflora* foram propícias para a expressão morfogênica que seguiram a regeneração via organogênese direta e indireta.

As informações obtidas no presente trabalho são importantes e relevantes para compreender o comportamento regenerativo e responsivo das espécies de *P. alata* e *P. miniata*, assim como, referência para futuros estudos e experimentos com espécies do gênero *Passiflora* que necessite de um protocolo de regeneração via organogênese.