

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
GIZELLY MENDES DA SILVA

Embriogênese somática, hibridização *in situ* e histoquímica de
maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims)

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO- BRASIL
FEVEREIRO - 2014

GIZELLY MENDES DA SILVA

**Embriogênese somática, hibridização *in situ* e histoquímica de
maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims)**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

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

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Telma Nair Santana Pereira

**TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO- BRASIL
FEVEREIRO – 2014**

Silva, Gizelly Mendes.

S5861e Embriogênese somática, hidrização *in situ* e histoquímica de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims) / Gizelly Mendes da Silva. – Tangará da Serra , 2014
85 f. ; 30 cm. Ilustrado

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade do Estado de Mato Grosso.

Bibliografia: f. 80-83

Orientador: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

1. Maracujá. 2. Gene *SERK*. 3. Morfogênese. I. Autor. II. Título.

CDU 582.681.41

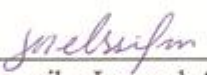
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* E
HISTOQUÍMICA DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* Sims)

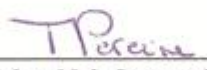
GIZELLY MENDES DA SILVA

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

Aprovada em 07 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:


Prof.ª. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho


Prof.ª. Dra. Telma Nair Santana Pereira


Prof. Dr. Wagner Campos Otoni

A meus pais, Leandro e Sônia

A meu irmão, Cleberson

Ao Ricardo

Dedico.

À minha orientadora,

Ao Prof.º Dr. Wagner C. Otoni

À Dra. Ana Claudia Ferreira da Cruz

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

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 Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, pela amizade, profissionalismo, ensinamentos, críticas construtivas, apoio, motivação, oportunidades concedidas e confiança em mim depositada. Serei eternamente grata.

Ao professor Dr. Wagner Campos Otoni, por ter me recebido e permitido a realização do trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos, pelo exemplo de pessoa e de profissional que és, pela atenção e confiança a mim destinadas, por possibilitar a vivência de experiências únicas e fazer eu me sentir parte desta verdadeira família LCT.

À professora Dra. Telma Nair Santana Pereira, pela co-orientação, sugestões e atenção.

À Dra. Ana Claudia Ferreira da Cruz, por me ajudar sempre sem medir esforços, pela disponibilidade, atenção, paciência, convivência, ensinamentos, sinceridade, praticidade e imensa ajuda nas análises de anatomia e histoquímica. Sua ajuda foi crucial na realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Lorena Melo Vieira e Dra. Andréa Dias Koehler, pela amizade, convivência, aprendizado e auxílio na técnica de hibridização *in situ*.

Ao professor Dr. Ilio Fealho de Carvalho que desde o início acompanhou o desenvolvimento deste trabalho e que muito acrescentou na minha formação acadêmica e pessoal com suas valiosas sugestões e conselhos.

Ao Diego, pela amizade, pelo exemplo de pessoa, pela ajuda, companheirismo, ensinamentos e principalmente pelas conversas e alegrias compartilhadas.

Ao Marcos Fernando Basso, pela amizade, companhia e pelos momentos de alegria.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT II), Anyela, Leidy, Marcos, João, Diego, Elyabe, Brener, Ricardo, Maria, Crislene, Márcia, Jaíza,

Débora, Maíra, Evelyn, Natan, Perácio, Dona Elcy e Tatiane, pela recepção, carinho, amizade, convivência e pelos deliciosos cafés acompanhados de risadas e agradáveis conversas.

À Elisonete Garcia Lani (Lili), pelo suporte técnico e pela convivência.

Às colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Acsa, Tatiane e Andréia, pela agradável convivência, apoio e amizade.

À Kalliane Zaira, pela amizade e companheirismo de sempre, principalmente na reta final do meu mestrado.

Aos meus colegas de turma pelas agradáveis experiências, estudos e principalmente pela amizade.

Aos meus pais, por todo amor, apoio e por me proporcionarem uma educação digna e uma boa formação acadêmica. Ao meu irmão pelo carinho.

Ao Ricardo, pelo companheirismo, amizade, compreensão e principalmente pelo incentivo e por acreditar em mim.

Ao meu padrasto Edirson e minha madrastra Margarida pelo carinho e ensinamentos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela possibilidade de realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela possibilidade de realização das análises anatômica e histoquímica.

Aos Viveiros Flora Brasil pelo fornecimento das sementes.

A todos os amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

GIZELLY MENDES DA SILVA, filha de Leandro Antônio da Silva e Sônia Maria Mendes Oliveira, nasceu no dia treze de maio de 1990, em Juína, Mato Grosso.

Em março de 2008 ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade do Estado de Mato Grosso, MT, graduando-se como Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas em janeiro de 2012.

Em fevereiro de 2012, ingressou no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biotecnologia e Recursos Genéticos Vegetais. Em fevereiro de 2014, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O gênero <i>Passiflora</i>	3
2.2. Cultura de tecidos aplicada à cultura do maracujazeiro	5
2.3. Embriogênese somática.....	6
2.4. Expressão do gene <i>SERK</i> durante a embriogênese somática	9
2.5. Caracterização histoquímica na mobilização de reservas durante a embriogênese somática	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I - Embriogênese somática em maracujá amarelo (<i>P. edulis</i> Sims) a partir de embriões zigóticos maduros e expressão transiente do gene <i>SERK</i> .	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Indução da embriogênese somática	26
2.2. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos	27
2.3. Análise citológica	27
2.4. Análise anatômica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
2.5. Análise da expressão do gene <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i>	28
2.5.1. Coleta e preparo das amostras.....	28
2.5.2. Síntese da sonda marcada com digoxigenina	29
2.5.3. Hibridização <i>in situ</i>	29
2.6. Análise estatística	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1. Indução da embriogênese somática	32
3.2. Análises anatômicas e citológicas.....	35
3.3. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos	38
3.4. Hibridização <i>in situ</i>	40

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO II - Avaliação histoquímica da indução da embriogênese somática em <i>Passiflora edulis</i> Sims	52
RESUMO.....	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Indução da embriogênese somática	56
2.2. Preparo das amostras e caracterização anatômica e histoquímica	56
2.3. Análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4. CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	69

RESUMO

SILVA, Gizelly Mendes da, M.Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, fevereiro de 2014. **Embriogênese somática, hibridização *in situ* e histoquímica de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims).** Orientadora: Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-orientadora: Dra. Telma Nair Santana Pereira.

O objetivo geral do trabalho foi estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros, caracterizar a expressão do gene *SERK* e avaliar a histoquímica dos eventos morfogênicos em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims, população FB-300 Araguary). O primeiro capítulo teve como objetivo estabelecer protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *P. edulis* Sims, realizar a caracterização morfo-anatômica do processo e avaliar a expressão transiente do gene *SERK* por hibridização *in situ*. A combinação de 31,06 μM de picloram + 2,22 μM de benziladenina (BA) + 2,27 μM de tidiazuron (TDZ) apresentou maior frequência de explantes embriogênicos (76%). Cortes histológicos revelaram a presença de embriões somáticos globulares originados diretamente das folhas cotiledonares e indiretamente do eixo embrionário. A dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Análises de hibridização *in situ* com a sonda heteróloga de *PcSERK* (*Passiflora cincinnata* *SERK*) revelaram a expressão transiente do gene *SERK* em células do embrião zigótico e durante o desenvolvimento dos embriões somáticos até 40 dias de cultivo em meio de indução e ausência de sinal aos 20 dias de cultivo em meio de maturação. Para a histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, foram testados diferentes concentrações de sacarose, ágar e polietilenoglicol combinado ou não com 0,037 μM de ácido abscísico (ABA) e meio MS modificado com vitamina B5 e gelificado com 0,28% de Phytigel. Contudo, não se observou a conversão dos embriões somáticos em plântulas, permanecendo em estágio globular até a completa necrose ou até o desenvolvimento de primórdios foliares, demonstrando que as células não apresentavam-se completamente determinadas a seguir a rota embriogênica. O objetivo do segundo capítulo foi descrever o acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em maracujazeiro amarelo obtido a partir de embriões zigóticos maduros através de métodos histoquímicos. Embriões zigóticos maduros foram cultivados em meio de indução da embriogênese somática,

composto por sais básicos de MS e 31,06 μM de picloram + 2,22 μM BA + 2,27 μM de TDZ. Explantes de embriões zigóticos com 0, 10, 20, 30 e 40 dias de indução da embriogênese somática foram coletados e fixados em solução de Karnovsky e, posteriormente, submetidos à desidratação em série etílica e incluídos em resina acrílica. Cortes transversais e longitudinais foram corados com azul de toluidina para caracterização anatômica, Xylidine Ponceau para a detecção de proteínas totais, ácido periódico-reagente de Schiff para polissacarídeos neutros, sudan black B para detecção de lipídios, vermelho de rutênio para detecção de pectinas e reagente de lugol para detecção de amido. Observou-se a indução de embriogênese somática direta e indireta. Os testes histoquímicos revelaram a presença de grande quantidade de corpos proteicos e grãos de amido em embriões zigóticos, os quais foram gradualmente metabolizados durante o período de indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. Corpos lipídicos foram identificados somente após 20 dias de cultivo e situavam-se principalmente na bainha parenquimática. O presente trabalho representa o primeiro relato de indução de embriogênese somática em *P. edulis* utilizando picloram, combinado BA e TDZ. Informações relevantes sobre aspectos anatômicos, ultraestruturais, histoquímicos e padrão de expressão gênica durante a indução da embriogênese somática também são apresentadas.

Palavras-chave: Maracujá, gene *SERK*, morfogênese *in vitro*.

ABSTRACT

SILVA, Gizelly Mendes da, M. Sc., Mato Grosso State University, February 2014. **Somatic embryogenesis, *in situ* hybridization and histochemic of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims).** Adviser: Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-adviser: Dra. Telma Nair Santana Pereira.

The general aim of the work was to establish a protocol for somatic embryogenesis induction from mature zygotic embryos, to characterize the *SERK* gene expression and to evaluate the histochemic of morphogenetic events in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims, population FB-300 Araguary). The first chapter aimed to establish a protocol for somatic embryogenesis induction from mature zygotic embryos of *P. edulis*, to perform a morphological and anatomical characterization of the process and to evaluate the transient expression of the *SERK* gene through *in situ* hybridization. The combination of 31.06 μ M of picloram + 2.22 μ M of benzyladenine (BA) + 2.27 μ M thidiazuron (TDZ) showed the highest embryogenic explants frequency (76%). Histological sections revealed the presence of globular somatic embryos directly from the cotyledonal leaves and indirectly from the embrionary axis. The double coloring with carmine acetic and Evans blue reassured the embryogenic competency of the material. Hybridization analysis *in situ* using a heterologous probe *PcSERK* (*Passiflora cincinnata* *SERK*) showed the transient expression of the *SERK* gene in embryonary zygotic cells and throughout the somatic embryos development up to the 40th day of culture in induction medium and absence of signal at 20 days of culture in maturation medium. For histodifferentiation and maturation of the somatic embryos it was tested different concentrations of sucrose, agar and polyethylene glycol combined or not with 0.037 μ M of abscisic acid (ABA) and MS medium modified with B5 vitamin and gelified with 0,28% of Phytigel. However, there was no conversion of the somatic embryos in seedlings, remaining in the globular stage until complete necrosis or until the development of leaf primordia, indicating that the cells were not completely determined to follow the embryogenic route. The aim of the second chapter was to describe the reserves accumulation throughout the somatic embryogenesis process in yellow passion fruit obtained from mature zygotic embryos through histochemical methods. Mature zygotic embryos were cultivated on somatic embryogenesis induction medium, composed of basic MS salts and 31.06 μ M of picloram + 2.22 μ M of BA + 2.27 μ M TDZ. Explants of zygotic

embryos with 0, 10, 20, 30 and 40 days of somatic embryogenesis induction were collected and fixed in a Karnovsky solution and, subsequently, subjected to dehydration through an etilic series and embedded in an acrylic resin. Transversal and longitudinal sections were colored with toluidine blue for anatomical characterization, Xylidine Ponceau for detection of total protein, Schiff's periodic-reagent acid for neutral polysaccharides, sudan black B for lipids, rutenio red for pectin and Lugol reagent for starch detection. It was observed the direct and indirect somatic embryogenesis induction. Histochemical tests revealed the presence of large amounts of protein bodies and starch grains in zygotic embryos, which were gradually metabolized during somatic embryo development. Lipid bodies were identified only after 20 days of culture and they were located mainly in the parenchymatic sheath. This work represents the first report of somatic embryogenesis induction in *P. edulis* using picloram combined with BA and TDZ. Relevant information on anatomical aspects, ultrastructural, histochemical and gene expression pattern during the somatic embryogenesis induction are also presented.

Key-words: Passion fruit, *SERK* gene, *in vitro* morphogenesis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora*, o qual é considerado o maior e mais importante economicamente da família Passifloraceae (Pérez et al., 2007; Braglia et al., 2010). Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou utilizados na confecção de doces, geléias e sucos. Já suas plantas são utilizadas para a ornamentação, tanto para flores de corte como envasadas (Braglia et al., 2010), e para a indústria farmacêutica e na medicina popular, devido aos seus compostos ativos como a passiflorina, maracujina e substâncias tanóides (Cunha et al., 2002; Melo e Guerra, 2003).

O maracujazeiro é uma planta alógama, possui autoincompatibilidade do tipo esporofítica (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010), e suas principais espécies são ploidediploides com $2n=2x=18$ cromossomos (Martin e Nakasone, 1970). A propagação dessas plantas é realizada preferencialmente por via sexuada, através de sementes ou assexuadamente, pela utilização de estaquia, enxertia e cultura de tecidos *in vitro* (Nhut et al., 2007; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010).

A cultura de tecidos vegetais, através a técnica de micropropagação, é um importante método para multiplicar rapidamente genótipos superiores com alto rendimento e/ou resistentes a doenças, em espaço físico e tempo reduzidos, oferecendo muitas vezes alternativas únicas aos programas de melhoramento (Zerbini et al., 2008). Além disso, a micropropagação permite a conservação *in vitro* de germoplasma de alto valor genético, que em se tratando de *Passiflora*, o número de coleções, assim como o número de acessos resguardados ainda é muito pequeno, sendo necessária a priorização de ações de coleta e intercâmbio, aliadas aos processos de conservação de germoplasma dessa cultura (Faleiro et al., 2005).

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

Durante a indução da embriogênese somática, os tecidos envolvidos sofrem alterações bioquímicas e morfológicas, as quais estão fortemente relacionadas com

alterações no padrão de expressão gênica (Sharp et al., 1980; Zimmerman, 1993; Sahni et al., 2013). A caracterização e identificação de células embriogênicas, através de análises histocitológicas, são de suma importância para o estudo do processo de regeneração *in vitro* de plantas. Aspectos moleculares e químicos, como a expressão gênica e mobilização de reservas durante a embriogênese somática, também são relevantes por possibilitarem uma melhor compreensão, otimização e validação dessa via morfogênica em protocolos de transformação genética (Otoni et al., 2013).

Diante do acima exposto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo responsivo de indução de embriogênese somática caracterizando a expressão do gene *SERK* e acúmulo de reservas durante a morfogênese de *Passiflora edulis* Sims. O primeiro capítulo teve como objetivo estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. edulis*, realizar a caracterização morfo-anatômica do processo e avaliar a expressão transiente do gene *SERK* por hibridização *in situ*. O segundo capítulo teve como objetivo descrever o acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em *P. edulis* obtido a partir de embriões zigóticos maduros através de métodos histoquímicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae L. está incluída na ordem Malpighiales que é dividida em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004; Cervi, 2005). Esta última é representada por 17 gêneros entre estes, *Ancistrothysus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. estão presentes no Brasil (Cervi, 2005).

O gênero *Passiflora*, onde o maracujazeiro está inserido, é o maior e mais importante economicamente da família Passifloraceae, com cerca de 500 espécies (Pérez et al., 2007; Braglia et al., 2010) e apresenta ampla variabilidade genética inter e intraespecífica (Bellon et al., 2009). O maracujazeiro é originário da América tropical, local onde a maioria das espécies ocorre, porém há relatos de ocorrência de algumas espécies na Ásia e Austrália e uma espécie em Madagascar (Alexandre et al., 2004; Cuco et al., 2005).

As passifloráceas são plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas com gavinhas axilares (Vanderplank, 2000). Possuem folhas alternas, pecioladas, inteiras ou lobadas, geralmente com nectários extraflorais no pecíolo e estípulas comumente presentes. As flores são bissexuais, actinomorfas, solitárias ou em inflorescências, normalmente com brácteas, cinco sépalas, cinco pétalas, e uma ou mais séries de filamentos, formando a coroa. O androceu é composto por 5 estames livres e o gineceu por 3 carpelos. Os frutos são carnosos do tipo baga, indeiscentes, globosos a fusiformes. As sementes são comprimidas, com arilo carnoso colorido e testa reticulada, pontuada ou alveolada (Leitão Filho e Aranha, 1971; Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougall, 2004; Short, 2011).

As principais espécies do gênero *Passiflora* são diploides ($2n=2x=18$ cromossomos), porém alguns tetraploides ($2n=24$), hexaploides ($2n=36$) e octoploides ($2n=72$) também foram registrados (Martin e Nakasone, 1970; Snow e MacDougall, 1993; Melo et al., 2001). As espécies comerciais de maracujazeiro, como *P. edulis* (maracujá-roxo), *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) e *P. alata* (maracujá-doce) são alógamas, condicionadas pelo fenômeno da autoincompatibilidade, do tipo esporofítica (Bruckner et al., 1995; Ferreira et al., 2010).

A propagação em escala comercial do maracujazeiro é realizada principalmente por via sexuada, através de sementes, porém algumas espécies podem ser propagadas assexuadamente por meio de estaquia, enxertia e por cultura de tecidos *in vitro* (Ferreira et al., 2001; Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010). O método de propagação sexuada pode levar à formação de lavouras heterogêneas em termos de produção e qualidade de frutos (Meletti et al., 2002), enquanto que métodos assexuados permitem a manutenção das características da planta matriz, conferindo maior uniformidade ao pomar quanto às características das plantas e dos frutos, além de proporcionar solução para alguns problemas fitossanitários (Siqueira e Pereira, 2001; Salomão et al., 2002).

Cerca de 70 espécies de maracujá produzem frutos comestíveis, dentre estas, a espécie *P. edulis*, conhecida como maracujá amarelo, está entre as mais utilizadas em escala comercial e amplamente difundida na América tropical (Souza e Meletti, 1997; Cunha et al., 2002; Ferraz e Lot, 2007). O valor econômico desta espécie é principalmente devido às qualidades gustativas e farmacodinâmicas do seu suco, fruto, casca e sementes, sendo esses últimos utilizados também na alimentação animal (Manica, 1981).

Devido à sua importância econômica, a propagação do maracujazeiro, em especial de *P. edulis* é de interesse de muitos pesquisadores e melhoristas (Nhut et al., 2007). Neste sentido, diversas espécies de *Passiflora* tem sido utilizadas em programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de cultivares de alto rendimento e resistentes a doenças como a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, endurecimento de frutos causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e antracnose (Vieira e Carneiro, 2004; Junqueira et al., 2005).

A ampla variabilidade relatada no gênero, como produtividade, características de fruto e resistência a pragas e doenças, permite encontrar alternativas genéticas que proporcionam suporte a eficientes programas de melhoramento genético para as espécies cultivadas (Otoni, 1995; Faleiro et al., 2005; Silva et al., 2011). De acordo com Bruckner (1997), vários métodos de melhoramento podem ser aplicados na cultura do maracujazeiro, seja pelo aumento da frequência de genes favoráveis ou pela exploração do vigor híbrido. Dentre os métodos de melhoramento mais aplicados, citam-se a introdução de plantas, a seleção massal, a seleção com teste de progênie e a hibridação (Oliveira e Ferreira,

1991; Bruckner et al., 2002), os quais visam principalmente a “qualidade” do fruto, produtividade e resistência a doenças (Faleiro et al., 2005).

Devido à incompatibilidade entre algumas espécies no gênero *Passiflora*, determinados cruzamentos são dificultados, algumas vezes envolvendo espécies consideradas fontes de resistência a pragas e doenças (Otoni, 1995). A hibridação somática e a transformação genética, por sua vez, são alternativas promissoras e suplementares da hibridação sexual para a transferência de genes em plantas com incompatibilidade sexual, porém a aplicação de ambas as técnicas requer a existência de protocolos eficientes de regeneração *in vitro* para cada espécie estudada (Otoni, 1995; Liu et al., 2005; Silva et al., 2009; Pinto et al., 2010).

2.2. Cultura de tecidos aplicada à cultura do maracujazeiro

Os avanços da biotecnologia vegetal propiciaram novos conhecimentos na área da fisiologia, da genética e da biologia molecular vegetal (Lima et al., 2000). Dentre as ferramentas biotecnológicas, a cultura de tecidos vegetais vem tendo relevante papel no desenvolvimento das ciências básica e aplicada na área agrônômica. Mediante seu uso, vários pesquisadores vêm atuando tanto no melhoramento vegetal, quanto no estudo de funções gênicas desconhecidas, além de entender melhor os mecanismos fisiológicos vegetais (Lee e Phillips, 1988; Figueiredo e Takita, 2004).

A técnica de cultura de tecidos pode ser definida como o processo de cultivo de segmentos de tecidos vegetais, chamados explantes, em meios de cultura estéreis e específicos, com o objetivo de regenerar uma nova planta *in vitro* que será idêntica à planta doadora do explante (Amaral e Silva, 2003). O explante pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (Torres et al., 2000). Essa técnica se baseia no fenômeno de totipotencialidade, ou seja, a capacidade que a célula vegetal possui de se organizar em um novo indivíduo, mantendo a informação genética necessária, sem haver recombinação gênica, dando origem a uma nova planta (Kerbaudy, 1999).

O sucesso das diferentes técnicas de cultura de tecidos depende da divisão e diferenciação das células dos explantes utilizados (Kerbaudy, 1999), as quais são influenciadas por fitormônios, reguladores de crescimento, compostos orgânicos e inorgânicos e carboidratos (Guerra et al., 1999; Chugh e Khurana, 2002).

Estudos em cultura de tecidos de *Passiflora* foram iniciados em 1966 com a espécie *P. caerulea* por Nakayama, e subsequentemente vários protocolos diferentes foram estabelecidos para espécies do gênero (Nakayama, 1966; Vieira e Carneiro, 2004; Vieira et al., 2005; Zerbini et al., 2008; Alexandre et al., 2009; Silva et al., 2011).

Dentre os protocolos estabelecidos é possível citar a morfogênese via organogênese (Dornelas e Vieira, 1994; Becerra et al., 2004; Pipino et al., 2010; Pinto et al., 2010; Prammanee et al., 2011; Garcia et al., 2011; Silva et al., 2011; Rosa e Dornelas, 2012), morfogênese via embriogênese somática (Otoni, 1995; Anthony et al., 1999; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2010; Albino, 2013; Florido, 2013), hibridação somática (Otoni et al., 1995; Davey et al., 2005), transformação genética (Reis et al., 2007; Silva, 2007; Paim Pinto et al., 2009), produção de sementes sintéticas (Silva, 2007), ginogênese (Rêgo et al., 2011), androgênese (Silva, 2007), indução de autotetraploides (Rêgo et al., 2011), seleção *in vitro* visando resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Flores et al., 2012) e conservação *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007).

No que diz respeito à micropropagação, a organogênese é a principal via morfogênica de regeneração no gênero *Passiflora* (Nhut et al., 2007; Zerbini et al., 2008; Pinto et al., 2010), contudo a regeneração via embriogênese somática tem se mostrado promissora e com possibilidades de aplicação no melhoramento de maracujazeiros.

2.3. Embriogênese somática

A embriogênese somática *in vitro* é o processo pelo qual células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas, num processo morfogenético semelhante à embriogênese zigótica, dão origem a uma estrutura bipolar, constituída de ápices caulinar e radicular, que ao final do processo de diferenciação dará origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (Zimmerman, 1993; Yang e Zhang, 2010; Rose et al., 2010; Rocha e Dornelas, 2013; Rizvi et al., 2013).

Essa via morfogênica é frequentemente relatada como uma das principais metodologias de multiplicação de genótipos elite (Kim, 2000) e apresenta inúmeras vantagens, como: a oferta de linhagens celulares para a engenharia genética, regeneração de uma estrutura bipolar a partir de uma única célula, produção ilimitada de clones com características elite, pesquisa básica funcional e molecular,

produção de sementes sintéticas e conservação de recursos genéticos pela criopreservação (Li et al., 2006; Yang e Zhang, 2010; Aslam et al., 2011).

Dois padrões básicos de indução de embriogênese somática são reconhecidos: a direta e a indireta. Na embriogênese somática direta, os embriões são formados diretamente na superfície de um tecido organizado, enquanto que na embriogênese somática indireta, a formação dos embriões é precedida por um estágio intermediário de calo, o qual após estímulos externos desenvolve células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências e originar embriões somáticos (Sharp et al., 1980; Yeung, 1995; Rizvi et al., 2013).

Em *P. cincinnata*, espécie considerada modelo para estudos morfogênicos no gênero *Passiflora*, há um processo intermediário entre as embriogêneses somáticas direta e indireta, o qual é caracterizado pela formação de protuberâncias. Essas protuberâncias são constituídas de células parenquimáticas e tecido vascular, e sua formação precede o desenvolvimento de embriões somáticos, porém a organização histológica durante a sua formação e a incapacidade de proliferar indefinitivamente não confere a característica de calo (Rocha et al., 2012).

O primeiro relato de embriogênese somática no gênero *Passiflora* foi feito por Otoni em 1995, trabalhando com a espécie *P. giberti*. O autor reportou a obtenção de calos embriogênicos a partir de explantes foliares utilizando meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo 2,4 ou 4,8 mg.L⁻¹ de picloram. A partir desses calos, o autor obteve suspensões celulares, as quais desenvolveram embriões somáticos.

Silva em 2007 propôs um protocolo de embriogênese somática a partir de anteras de *P. cincinnata*. A autora utilizou meio MS contendo 4,4 µM 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinado com 2,3 µM de BA (6- benzil-adenina) para a indução de calos embriogênicos, os quais foram transferidos para meio MS contendo carvão ativado e maltose, na ausência de reguladores de crescimento, dando origem à embriões somáticos primários e secundários. Utilizando embriões zigóticos maduros de *P. cincinnata*, Silva et al. (2009) estabeleceram um protocolo modelo de regeneração via embriogênese somática. Para tanto, os autores utilizaram meio MS acrescido de 18,1 µM da auxina 2,4-D, combinado com 4,5 µM de BA. Após 30 dias de cultivo em meio de indução, os calos embriogênicos foram transferidos para meio MS, acrescido de carvão ativado e desprovido de reguladores

de crescimento, o qual proporcionou a obtenção de alta taxa de embriões somáticos que se diferenciaram em plântulas e foram aclimatizados em casa de vegetação.

A embriogênese somática também foi relatada para a espécie *P. edulis* a partir de embriões zigóticos utilizando-se 72,4 μM de 2,4-D e 4,4 μM de BA, entretanto, não ocorreu conversão dos embriões somáticos em plântulas, demonstrando a necessidade da otimização do protocolo para a espécie (Paim Pinto et al., 2011).

Recentemente, Albino (2013) induziu a produção de embriões somáticos originados diretamente de raízes de *P. morifolia*, cultivadas em meio MS contendo concentrações entre 6,78 e 11,3 μM de 2,4-D. Calos embriogênicos e embriões somáticos em estágio globular foram obtidos a partir de embriões zigóticos de *P. ligularis* por Florido (2013), utilizando meio MS suplementado com 45,2 μM de 2,4-D, 2,2 μM de BA e 2,3 μM de TDZ (tidiazuron). Contudo, esses autores não obtiveram a conversão dos embriões em plântulas.

Segundo Yang e Zhang (2010), o processo de embriogênese somática inclui uma série de eventos característicos, como a desdiferenciação de células, a ativação da divisão celular e a reprogramação de seus padrões de fisiologia, metabolismo e expressão gênica. Essas características, aliadas às respostas morfológicas *in vitro* de modo genótipo-específico (Jiménez, 2005; d'Onofrio e Morini, 2006), dificultam o estabelecimento de protocolos responsivos de embriogênese somática em diversas espécies. Tal fato explica o número incipiente de protocolos de embriogênese somática disponíveis na literatura, em especial para espécies do gênero *Passiflora* (Faria et al., 2007; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011).

A caracterização e identificação de células embriogênicas, através de análises histocitológicas, são de suma importância para o estudo do processo de regeneração *in vitro* de plantas. Aspectos moleculares e químicos, como a expressão gênica e mobilização de reservas durante a embriogênese somática, também são relevantes por possibilitarem uma melhor compreensão, otimização e validação dessa via morfogênica em protocolos de transformação genética (Otoni et al., 2013).

2.4. Expressão do gene *SERK* durante a embriogênese somática

Durante a indução da embriogênese somática, os tecidos envolvidos sofrem alterações bioquímicas e morfológicas, as quais estão fortemente relacionadas com alterações no padrão de expressão gênica (Sharp et al., 1980; Zimmerman, 1993; Chugh e Khurana, 2002; Sahni et al., 2013). Entre os genes envolvidos na embriogênese somática, o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) possui um importante papel na aquisição de competência embriogênica (Santos et al., 2005; Suprasanna e Sidha, 2013).

O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-quinase específico de plantas, cuja função está associada à percepção de moléculas sinalizadoras que desencadeiam o processo embriogênico em células somáticas ou zigóticas e, um domínio extracelular, constituído por um peptídeo sinal, seguido por um zíper de leucina, cinco repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio rico em prolina (SPP), que ocorre exclusivamente em proteínas *SERK* servindo como uma marca para identificá-las (Schmidt et al., 1997; Baudino et al., 2001).

As proteínas quinases receptoras, quando ativadas iniciam uma cascata de sinalização que culmina em uma resposta metabólica, incluindo a repressão e ativação de transcritos (Becraft, 2002; Salaj et al., 2008), sendo importantes para diferentes processos no desenvolvimento vegetal, como no desenvolvimento do pólen e inflorescência, no estabelecimento de padrões celulares, formação do meristema apical caulinar e embriogênese (Thomas et al., 2004; Salaj et al., 2008).

A primeira descrição do gene *SERK* foi realizada em células competentes de cenoura, *Daucus carota* (*DcSERK*) por Schmidt et al. (1997). A partir de então outros homólogos deste gene foram encontrados em *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*) (Hecht et al., 2001), *Dactylus glomerulata* (*DgSERK*) (Somleva et al., 2000), *Helianthus annuus* (*HaSERK*) (Thomas et al., 2004), *Theobroma cacao* (*TcSERK*) (Santos et al., 2005), *Citrus unshiu* (*CuSERK*) (Shimada et al., 2005), *Musa acuminata* (Huang et al., 2010), *Medicago truncatula* (*MtSERK*) (Nolan et al., 2009), *Oryza sativa* (*OsSERK*) (Singla et al., 2009) e *Cocos nucifera* (*CnSERK*) (Pérez-Núñez et al., 2009).

O gene *SERK* exerce um importante papel durante a embriogênese somática e é considerado um marcador específico de competência embriogênica (Suprasanna e Sidha, 2013), podendo ser utilizado para distinguir células

embriogênicas de células não embriogênicas através de técnicas como a hibridização *in situ*.

2.5. Caracterização histoquímica na mobilização de reservas durante a embriogênese somática

Estudos envolvendo métodos histoquímicos são importantes por permitirem a análise da mobilização, síntese e metabolização dos compostos químicos envolvidos na morfogênese *in vitro* via organogênese ou embriogênese somática, assim como reconhecer regiões e/ou tecidos que requerem alta demanda energética (Branca et al., 1994; Cangahuala-Inocente et al., 2009). Esses estudos podem auxiliar na otimização de protocolos de regeneração *in vitro* (Almeida et al., 2006; Otoni et al., 2013).

Os principais compostos de reserva em vegetais são carboidratos, lipídios e proteínas, os quais variam quanto à quantidade entre as plantas (Tozzi e Takaky, 2011). O amido é considerado uma fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular, fornecendo energia para o desenvolvimento de embriões somáticos (Stamp, 1987; Martin et al., 2000). As proteínas estão envolvidas na regulação da expansão celular e criação de características biofísicas necessárias para a morfogênese (Jiménez, 2001). O lipídio, juntamente com proteínas, exerce papel fundamental na composição das membranas celulares (Buchanan et al., 2000). Assim, o acúmulo dessas substâncias é considerado um dos processos chave na embriogênese, fornecendo energia nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário (Merkle et al. 1995).

No gênero *Passiflora*, estudos envolvendo métodos histoquímicos foram realizados, em sua maioria, durante a organogênese *in vitro* (Appezzato-da-Glória et al., 1999; Fernando et al., 2007; Lombardi et al., 2007). Em se tratando da morfogênese via embriogênese somática, Rocha et al. (2012) avaliaram o padrão de mobilização de reservas durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*, contudo trabalhos como este no gênero *Passiflora* ainda são escassos na literatura.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, B.E.S. **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* Masters (Passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene *SERK***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2013. 74p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ALEXANDRE, R. S.; JUNIOR, A. W.; NEGREIROS, J. R. S.; PARIZZOTO, A.; BRUCKNER, C. H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39: 1239-1245, 2004.
- ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W.C.; DIAS, J. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. Propagação *in vitro* do maracujazeiro. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, 2009, p. 117-184.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.W.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, 50: 321–325, 2006.
- AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcalóides e óleos essenciais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30: 55-59, 2003.
- 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, 1999. p.169–181.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2007–2013, 1999.
- ASLAM, J.; KHAN, S. A.; CHERUTH, A. J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18: 369-380, 2011.
- BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDER, R.; HECHT, V. F.; DRESSELHAUS, T.; LÖRZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. M. Molecular

characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, 213: 1- 10, 2001.

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.

BECRAFT, P.W. Receptor kinase signaling in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 18: 163-192, 2002.

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

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

BRANCA, C.; TORELLI, A.; FERMI, P.; ALTAMURA, M. M.; BASSI, M. Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma**, 182: 59–64, 1994.

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.

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

BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31: 501-514, 2009.

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

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. **Current Science**, 83:715–730, 2002.

CUCO, M. S.; VIEIRA, M.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, 58: 220-228, 2005.

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

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, 107: 194-199, 2006.

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

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

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

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

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

FERRAZ, J. V.; LOT, L. **Fruta para consumo *in natura* tem boa perspectiva de renda**. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2007. p. 387-394.

FERREIRA, G.; FOGAÇA, L. A.; MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23: 160-163, 2001.

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

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

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

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

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V.; SCHMIDT, E. D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127: 803-816, 2001.

HUANG, Y.; LI, F.; CHEN, K. Analysis of diversity and relationships among Chinese orchid cultivars using EST-SSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38: 93-103, 2010.

- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, 47: 91-110, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 196-223, 2001.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K.P.; FIALHO, J.F. Melhoramento genético do maracujá-doce. In: MANICA, I.; JOSÉ, A.R.S.; BRUCKNER, C.H.; HOFFMANN, M. (Eds.). **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. p. 39-46.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. p. 519-531.
- KIM, Y. Somatic embryogenesis in *Quercus acutissima*. In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 671-686.
- LEE, M.; PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 39: 413-37, 1988.
- LEITÃO FILHO, H.F.; ARANHA, C. Botânica do Maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, Campinas, 1971. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1971. p. 13.
- LI, Z. T.; DHEKENY, S.; DUTT, M.; VAN ANAN, M.; TATTERSLL, J.; KELLEY, K. T.; GRAY, J. Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 42: 220–227, 2006.
- LIMA, D.M.; GOLOMBIESKI, E.R.; AYUB, R.A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, 30: 359-363, 2000.
- LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hybridisation and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82:19–44, 2005.
- LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; 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.

- MANICA, I. **Fruticultura tropical - maracujá**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981. 151p.
- MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGOS, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenesis and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154: 143-151, 2000.
- MARTIN, F.W.; NAKASONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany**, 24: 333 - 343, 1970.
- MELETTI, L.M.M.; FURLANI, P.R.; ALVAREZ V.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; AZEVEDO-FILHO, J.A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônomo**, 54: 30-33, 2002.
- MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, 226: 69-84, 2001.
- MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, 92: 309-316, 2003.
- MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.
- MILWARD-de-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A. *Passiflora* L. Subgênero Decaloba (Dc.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, 55: 17-54, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NAKAYAMA, F. *In vitro* tissue culture of *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agricultura Nacional de La Plata**, 42: 63-74, 1966.
- NHUT, D. T.; KHIET, B. L. T.; THI, N. N.; THUY, D. T. T.; DUY, N.; HAI, N. T.; HUYNH, 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.
- NOLAN, K. E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R. J. Expression of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR- LIKE KINASE1 (*SERK1*) gene is associated with

developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, 60: 1759–1771, 2009.

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

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

OTONI, W. C.; CASALI, V. W.; CECON, P. R.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**, 42: 461-468, 1995.

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

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

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

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: FALEIROS, F.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 361-383.

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

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, 28: 11–19, 2009.

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

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

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

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

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

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

ROCHA, D. I.; DORNELAS, M. C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Reviews**, 8: 1-17, 2013

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

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

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.

SAHNI, S.; SONI, K. K. N.; HUSSAIN, S.; ALI, Z.; NURULA, A. SINGH, H. B.; SRIVASTAVA, P. S. Genetic perspective of somatic embryogenesis. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (Eds.) **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 201-230.

SALAJ, J.; VON RECKLINGHAUSEN, I. R.; HECHT, V.; VRIES, S. C.; SCHEL, J. H. N.; VAN LAMMEREN, A. A. M. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46: 709-714, 2008.

SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, W. E.; DUARTE, R. C. C.; SIQUEIRA, D. L. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24: 163-167, 2002.

SANTOS, M. O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K. S. C.; TINOCO, M. L. P.; DIAS, B.B. A.; ARAGÃO, F. J. L. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, 168: 723–729, 2005.

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

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.

SHIMADA, T; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M. Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, 103: 233–238, 2005.

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

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

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

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

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Structural Characterization and Expression Analysis of the *SERK/SERL* Gene Family in Rice (*Oryza sativa*). **International Journal of Plant Genomics**, ID 539402, doi: 10.1155/2009/539402

SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, W. E. Propagação. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2001. p. 85 - 137.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, 18: 261-273, 1993.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Reports**, 19: 718–726, 2000.

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

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

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, 57: 451-459, 1987.

- SUPRASANNA, P.; SIDHA, M. Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 188-200.
- THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 35–42, 2004.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.
- TOZZI, H. H.; TAKAKI, M. Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims fo. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. **Brazilian Journal of Biology**, 71: 701-708, 2011.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora - Passionflowers of the world**. 1 ed. Portland: Timber Press, 2004. 430 p.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3 ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.
- VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 411-453.
- VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. *Passiflora* spp., passion fruit. In: LITZ, R. E. (Ed.) **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Cambridge: CABI Publishing, 2004. p. 435-453.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, 29: 36-57, 2010.
- YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1995. p. 205- 247.
- 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.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell**, 5: 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO I -

Embriogênese somática em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims) a partir de embriões zigóticos maduros e expressão transiente do gene *SERK*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática em *P. edulis* Sims, população FB-300 Araguary, a partir de embriões zigóticos maduros e avaliar a expressão transiente do gene *SERK*. Embriões zigóticos foram cultivados em meio de indução composto por sais básicos de MS com diferentes concentrações e combinações de picloram, BA, ANA, TDZ e 2,4-D. O tratamento T7 (31,06 μ M de picloram + 2,22 μ M de BA + 2,27 μ M de TDZ) apresentou a maior frequência de calos embriogênicos (76%). Cortes histológicos revelaram a presença de embriões somáticos globulares originados diretamente das folhas cotiledonares e indiretamente do eixo embrionário. A dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. Análises de hibridização *in situ* revelaram a expressão transiente do gene *SERK* em células do embrião zigótico e durante o desenvolvimento dos embriões somáticos até 40 dias de cultivo em meio de indução. Para a histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, foram testados diferentes concentrações de sacarose, ágar e polietilenoglicol combinados ou não com 0,037 μ M de ABA e meio MS modificado com vitamina B5 e gelificado com 0,28% de Phytigel. Contudo, não se observou a conversão dos embriões somáticos em plântulas, permanecendo em estágio globular até a completa necrose ou até o desenvolvimento de primórdios foliares, demonstrando que as células não apresentavam-se completamente determinadas a seguir a rota embriogênica. Tais resultados demonstram a necessidade de estudos adicionais quanto aos fatores que possam estar relacionados com maturação e conversão dos embriões somáticos de *P. edulis* em plântulas.

Palavras-chave: Maracujá, morfogênese *in vitro*, hibridização *in situ*.

Somatic embryogenesis in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) from mature zygotic embryos and transient expression of the *SERK* gene

ABSTRACT

The aim of this work was to establish a protocol for somatic embryogenesis induction in *P. edulis* Sims, population FB-300 Araguary, from mature zygotic embryos and evaluate the transient expression of the *SERK* gene. Zygotic embryos were cultured in induction medium composed of basic MS salts with different concentrations and combinations of picloram, BA, NAA, 2,4-D and TDZ. The T7 treatment (31.06 μ M of picloram + 2.22 μ M of BA + 2.27 μ M TDZ) showed the highest frequency of embryogenic callus (76%). Histological sections revealed the presence of globular somatic embryos directly from cotyledonal leaves and indirectly from the embryonary axis. The double coloring with carmine acetic and Evans blue reassured the embryogenic competency of the material. Hybridization analysis *in situ* showed the transient expression of the *SERK* gene in embryonary zygotic cells and throughout the somatic embryos development up to the 40th day of culture in induction medium. For histodifferentiation and maturation of the somatic embryos it was tested different concentrations of sucrose, agar and polyethylene glycol combined or not with 0.037 μ M of abscisic acid (ABA) and MS medium modified with B5 vitamin and gelified with 0,28% of Phytigel. However, there was no conversion of the somatic embryos in seedlings, remaining in the globular stage until complete necrosis or until the development of leaf primordia, indicating that the cells were not completely determined to follow the embryogenic route. Such results indicate the need for additional studies regarding the factors which can be related to the maturation and conversion of somatic embryos of *P. edulis* in seedlings.

Key-words: Passion fruit, *in vitro* morphogenesis, *in situ* hybridization.

1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae é constituída de 17 gêneros com aproximadamente 630 espécies (Feuillet e MacDougal, 2007). O gênero *Passiflora* possui cerca de 500 espécies (Pérez et al., 2007; Braglia et al., 2010), das quais 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento, muitas delas com finalidades múltiplas (Abreu et al., 2009; Pipino et al., 2010; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012).

Cerca de 70 espécies de maracujá produzem frutos comestíveis, dentre estas, a espécie *P. edulis* Sims é uma das mais utilizadas em escala comercial e mais difundida na América tropical (Souza e Meletti, 1997; Cunha et al., 2002). O potencial produtivo dessa espécie, associado ao seu vigor, qualidade e palatabilidade, tem estimulado não só o cultivo como também o seu melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares (Souza et al., 2012).

A propagação do maracujazeiro é realizada predominantemente por meio de reprodução sexuada devido às características florais e, principalmente, à auto-incompatibilidade. No entanto, a maioria das espécies pode ser propagada por estacas, enxertias, mergulhia e por cultura de tecidos (Alexandre et al., 2009; Sousa et al., 2010).

Diferentes técnicas de cultura de tecidos foram utilizadas no cultivo de maracujá, sendo elas a micropropagação (Dornelas e Vieira, 1994; Nhut et al., 2007), protoplasto e hibridação somática (Otoni et al., 1995; Davey et al., 2005), transformação genética (Manders et al., 1994; Reis et al., 2007; Silva et al., 2007), sementes sintéticas (Silva, 2007), ginogênese (Rêgo et al., 2011), conservação *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007), seleção *in vitro* para resistência a doenças (Faleiro et al., 2005; Flores et al., 2012) e embriogênese somática (Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011).

Durante o processo de embriogênese somática *in vitro* uma estrutura bipolar, assemelhando-se a um embrião zigótico, se desenvolve a partir de uma célula somática com ausência de conexão vascular com o tecido original (Arnald et al., 2002; Ma et al., 2012; Rizvi et al., 2013). Essa via morfogênica, quando bem estabelecida, pode ser utilizada para estudos básicos de fisiologia, biologia celular, bioquímica, genética da diferenciação e morfogênese em vegetais, além de possibilitar a propagação massal de clones e melhoramento genético de diferentes

espécies de alto valor comercial (Samson et al., 2006; Yang e Zhang, 2010; Cueva et al., 2012; Rocha et al., 2012).

Durante a indução da embriogênese somática, os tecidos envolvidos sofrem alterações bioquímicas e morfológicas, as quais estão fortemente relacionadas com alterações no padrão de expressão gênica (Sharp et al., 1980; Zimmerman, 1993; Sahni et al., 2013). Entre os genes envolvidos na embriogênese somática, o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) possui importante papel na aquisição de competência embriogênica (Santos et al., 2005; Suprasanna e Sidha, 2013), sendo expresso em diferentes estágios de desenvolvimento e considerado um marcador específico de células embriogênicas (Suprasanna e Sidha, 2013).

Apesar de a embriogênese somática ser uma relevante via de regeneração para plantas transformadas e para a produção de plantas em larga escala (Rocha et al., 2012), até o momento, resultados concretos em termos de eficiência de protocolos no estabelecimento, desenvolvimento e regeneração através da embriogênese somática não foram obtidos para a maioria das espécies do gênero *Passiflora* (Faria et al., 2007; Reis et al., 2007; Silva et al., 2009; Paim Pinto et al., 2011). Alguns fatores têm contribuído para isso, dentre eles destacam-se a ampla complexidade dos eventos envolvidos na embriogênese somática (Rose et al., 2010), a variação das respostas entre genótipos às condições de cultivo, o tipo e condições fisiológicas dos explantes, bem como a composição do meio de cultivo *in vitro* (Fehér, 2005; Jiménez, 2005; Faria et al., 2007; Paim Pinto et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. edulis* Sims e avaliar a expressão transiente do gene *SERK*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Indução da embriogênese somática

Sementes de *Passiflora edulis* Sims, população FB-300 Araguary, foram obtidas dos Viveiros Flora Brasil Ltda, Araguari, MG. Os tegumentos das sementes foram removidos para a retirada dos embriões zigóticos, com auxílio de mini-morsa (Reis et al., 2007).

As sementes foram desinfestadas em capela de fluxo laminar, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, em seguida em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) por 15 minutos, acrescido de duas gotas do agente dispersante Tween-20 a 0,1% (v/v) a cada 100 mL de solução. Posteriormente, as sementes foram submetidas a 4 enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada e após foram mantidas *overnight* em água destilada estéril para reidratar e facilitar a remoção dos embriões zigóticos.

Os embriões zigóticos foram removidos assepticamente do endosperma das sementes e inoculados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, e 0,65% (p/v) de Ágar (Merck®, Alemanha) como agente gelificante, acrescido de diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento picloram, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzil-adenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA) e tidiazuron (TDZ).

As concentrações dos reguladores de crescimento para a indução da embriogênese somática foram: **T1)** 45,25 µM de 2,4-D + 4,44 µM de BA; **T2)** 31,06 µM de picloram + 2,22 µM de BA; **T3)** 41,41 µM de picloram + 2,22 µM de BA; **T4)** 51,76 µM de picloram + 2,22 µM de BA; **T5)** 20,70 µM de picloram + 2,22 µM de BA + 2,69 µM de ANA; **T6)** 41,41 µM de picloram + 2,22 µM de BA + 2,69 µM de ANA; **T7)** 31,06 µM de picloram + 2,22 µM de BA + 2,27 µM de TDZ.

O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e posteriormente foram autoclavados durante 20 minutos (121°C e 1,1 atm de pressão). Os embriões zigóticos foram cultivados em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab®, Brasil) contendo alíquotas de 15 mL de meio e vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®), e mantidas em sala de cultivo por 40 dias, na ausência de luz, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de acordo com Silva et al. (2009). Após esse período de

incubação, determinou-se a porcentagem de explantes com resposta e a produção de calos embriogênicos.

2.2. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos

Após 40 dias em meio de indução, os calos obtidos no tratamento com melhor resposta embriogênica foram transferidos para diferentes meios de histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, os quais foram compostos por sais básicos de MS, vitamina de MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 1,5% de carvão ativado, diferindo em: concentrações de sacarose, 3% **(M1)**, 6% **(M2)**, 9% **(M3)**; de ágar, 0,65% **(M4)**, 0,75% **(M5)**, 0,85% **(M6)**; concentrações de polietilenoglicol (PEG), 2% **(M7)**, 4% **(M8)**, 6% **(M9)**; 0,037 μM de ácido abscísico (ABA) combinado com 2% **(M10)**, 4% **(M11)** e 6% **(M12)** de PEG e meio MS modificado com vitamina B5 (Gamborg et al., 1968), 3% de sacarose e gelificado com 0,28 % de Phytigel **(M13)**.

O pH foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$ e o meio esterilizado em autoclave por 20 minutos (121°C e 1,1 atm de pressão). O meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno cristal (90 x 15 mm), cada placa recebeu ± 30 mL de meio e foram vedadas com adesivo acrílico (Nexcare Micropore 3M, Brasil). As culturas foram mantidas por 40 dias em sala de cultivo à temperatura $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil).

2.3. Análise citológica

Para a análise citológica, foram realizados cortes à mão livre de massas pró-embriônicas, as quais foram coradas em lâmina histológica com azul de Evans (0,5%) por 3 minutos, em seguida de carmim acético (1%) por 3 minutos (Durzan, 1998) e cobertas com lamínula. As observações e os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic Instruments Inc., Spot Insightcolours 3.2.0, EUA) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.4. Análise anatômica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram coletados calos embriogênicos com 0, 10, 20, 30 e 40 dias em meio de indução da embriogênese somática para as análises histológicas. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5mM], conforme descrito por Karnovsky (1965) e modificado por Rocha et al. (2012).

Após fixadas em solução de Karnovsky, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Foram obtidas seções transversais e longitudinais com 5 µm de espessura utilizando um micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica Microsystems Inc., USA) e equipado com navalha de aço descartável. A coloração foi realizada com Azul de Toluidina (O'Brien e McCully, 1981) com pH 4,0. As observações e os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic Instruments Inc., Spot Insightcolours 3.2.0, EUA) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Para a análise ultraestrutural, os calos embriogênicos fixados em Karnovsky foram desidratados em concentração crescente de acetona, secos ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha) e metalizados com ouro (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As observações e registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430VP, Zeiss, Heidelberg, Alemanha), no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UFV.

2.5. Análise da expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ*

2.5.1. Coleta e preparo das amostras

Para a análise da expressão do gene *SERK* coletou-se calos embriogênicos aos 0, 15, 25 e 40 dias de indução e 20 dias em meio de maturação. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, submetidas a 40 minutos de vácuo e, em seguida, a solução fixadora foi renovada e as amostras armazenadas a 4°C *overnight*. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), por 4 horas em cada concentração e armazenadas em freezer a -20°C.

Para o preparo dos cortes histológicos realizou-se a infiltração das amostras com etanol:xilol, nas concentrações de 3:1, 1:1, 1:3, a cada 4 horas e finalizando com xilol 100% por 8 horas. Após esse processo, as amostras foram transferidas para a estufa a 65 °C e, gradativamente, infiltradas em parafina (2-3 dias). Em seguida, as mesmas foram emblocadas em parafina fresca em moldes de papel.

Cortes histológicos semi-finos (5 µm) foram obtidos utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (Leica, RM2255, Alemanha), distendidos em banho-maria contendo água tratada com DEPC a 42 °C e montados em lâminas silanizadas.

2.5.2. Síntese da sonda marcada com digoxigenina

Uma sonda heteróloga antisense foi sintetizada utilizando como molde uma sequência parcial de 557 pb do gene *SERK* de *Passiflora cincinnata* (PcSERK). O fragmento previamente clonado codifica uma região conservada que se estende do domínio SPP até parte do domínio quinase. A sonda foi marcada com digoxigenina (DIG-UTP), utilizando-se para tanto o “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)” (Roche Applied Science), segundo recomendações do fabricante.

2.5.3. Hibridização *in situ*

A reação de hibridização *in situ* do gene *SERK* é dividida em 4 etapas: a pré-hibridização, a hibridização, a pós-hibridização e a imunodeteção. Durante a pré-hibridização, as lâminas preparadas foram desparafinizadas realizando dois banhos com xilol (100%), seguido de um banho em solução xilol:etanol absoluto na proporção 1:1 e posteriormente dois banhos em etanol absoluto, com duração de 5 minutos. Depois de secas ao ar, as lâminas foram tratadas com proteinase K (1 µg.mL⁻¹ em 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos a 37°C e em seguida lavadas duas vezes em água tratada com DEPC à temperatura ambiente.

Para a hibridização *in situ*, em cada lâmina foram aplicados 100µL de solução de hibridização [60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL[®]) e 60 ng de sonda desnaturados a 80°C por 5 minutos, 85 µL de tampão de hibridização (10 mM Tris-HCl pH: 7,5; 300 mM NaCl; 50% formamida deionizada; 1 mM EDTA; 1x Denharts; 10% sulfato de dextran) e 3 µL de água DEPC]. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com parafilme, acomodadas em câmara úmida e escura e mantidas

overnight em forno de hibridização (Techne hybridiser HB-1 D, Techne, Cambridge, U.K.) a 42 °C.

Durante a fase de pós-hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X (duas vezes) e 0,5X (solução SSC 20X composta por NaCl 3 M, Na₃-citrato 0,3 M, pH 7,2), cada solução por 20 minutos a 42°C.

Para a realização da imunodeteção, as lâminas foram tratadas com DB1 (0,1 M Tris-HCl e 0,15 M NaCl pH: 7,5) por 5 minutos, em seguida cobertas com 120µL de solução bloqueadora (BSA 2% dissolvido em DB1), mantidas em câmara úmida e escura por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 1 minuto e incubadas durante 1 hora com anticorpo *Anti-Digoxigenine AP Fab Fragments* (Roche®) diluído 1:1000 em tampão de detecção 1. Em sequência, foram realizadas duas lavagens, por 10 minutos cada, em DB1 e por 5 minutos em DB3 (0,1 M Tris-HCl – pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,5 M MgCl₂.6H₂O; pH: 9,5). Para a visualização do sinal de hibridização, as lâminas foram cobertas com solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (0,05 g mL⁻¹) e 4,5 µL de NBT (nitroblue tetrazólio) (0,05 g mL⁻¹) em 1 mL de tampão de detecção 3 por 18 minutos em câmara úmida e escura. Para cessar a reação, as lâminas foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 minutos e enxaguadas duas vezes em água DEPC, por 5 minutos.

A observação e a captura de imagens foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Diagnostic Instruments Inc., Spot Insightcolor 3.2.0, EUA) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

2.6. Análise estatística

Os experimentos foram realizados seguindo o Delineamento Inteiramente Casualizado. Na fase de indução da embriogênese somática, foram avaliadas a frequência de formação de calos e a frequência de calos com potencial embriogênico. Na fase de histodiferenciação dos pró-embriões avaliou-se o número de calos que mantiveram e os calos que perderam o potencial embriogênico ao longo do cultivo *in vitro*.

O experimento de indução da embriogênese somática foi composto por 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma placa de

Petri contendo 10 embriões zigóticos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

O experimento de histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, foi composto por 7 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo 10 calos potencialmente embriogênicos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução da embriogênese somática

Após 5 dias de estabelecimento dos explantes em meio de indução, observou-se o intumescimento do eixo embrionário em todos os tratamentos, e após 10 dias de cultivo ocorreu a formação de pró-embriões e de protuberâncias na região do eixo embrionário e dos cotilédones do embrião zigótico (Figs. 1A-B-C). Embriões zigóticos submetidos ao tratamento controle MS na ausência de reguladores de crescimento, iniciaram o processo de germinação após 10 dias de cultivo.

Em *P. cincinnata*, espécie considerada modelo para estudos morfogênicos no gênero *Passiflora*, também foi observada a formação de protuberâncias durante o processo de indução da embriogênese somática. A formação dessas protuberâncias precedia o desenvolvimento dos embriões somáticos, porém a organização histológica durante a sua formação e a incapacidade de proliferar indefinitivamente não a caracterizava como calo (Rocha et al., 2012).

Aos 20 dias de cultivo, regiões pró-embriogênicas apresentaram coloração amarelada, aspecto brilhante e compacto (Fig. 1D-E), enquanto que calos não embriogênicos foram friáveis, translúcidos e com coloração esbranquiçada. Neste estágio da morfogênese *in vitro*, observou-se principalmente no tratamento T7, alta frequência de pró-embriões globulares originados diretamente das bordas dos cotilédones e do eixo embrionário dos embriões zigóticos como pode ser observado na Figura 1E e em detalhe na Figura 1F. Com 30 dias de cultivo ocorreu intensa proliferação dos embriões somáticos, os quais estavam presentes praticamente em toda a superfície da região cotiledonar dos embriões zigóticos (Fig. 1 G-H-I).

A frequência de explantes que responderam ao meio de indução após 40 dias de cultivo não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, tendo como resposta morfogênica a formação de protuberâncias. Quanto à porcentagem de explantes com agregados celulares pró-embriogênicos, o tratamento T7 apresentou o maior índice com 76%, seguido do tratamento T5 com 35%, sendo T2 e T6 (16 e 13%) os tratamentos com menores índices de potencial embriogênico (Fig. 2).

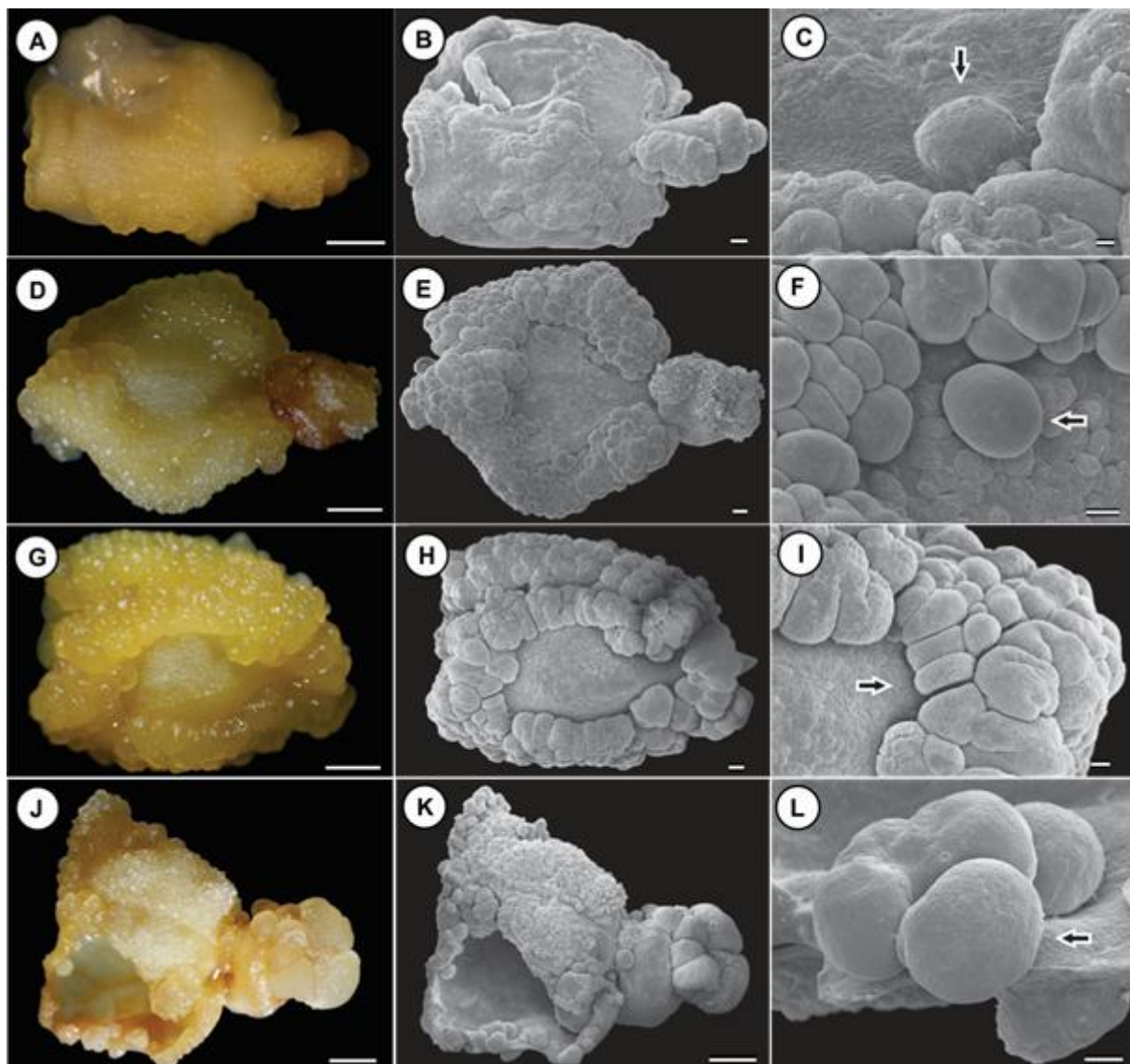


Figura 1. Embriogênese somática de *Passiflora edulis* Sims a partir de embriões zigóticos maduros em microscopia de luz (A;D;G;J) e em microscopia eletrônica de varredura (B;C;E;F;H;I;K;L). A-B) Formação de pró-embriões e de protuberâncias na região do eixo embrionário e dos cotilédones do embrião zigótico após 10 dias em meio de indução T7 (31,06 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA + 2,27 μ M de TDZ). C) Detalhe da formação de um pró-embrião sobre a superfície abaxial do embrião zigótico. D-E) Regiões pró-embriogênicas após 20 dias em meio de indução. F) Embrião globular sobre a face abaxial do cotilédone. G-H-I) Embriões globulares sobre a superfície dos cotilédones após 30 dias em meio de indução. J-K). Explante embriogênico após 40 dias em meio de indução da embriogênese somática. L) Embrião somático globular desenvolvido na região do cotilédone do embrião zigótico. Barras: A, D, F, G, I, J e L = 100 μ m; B, E e H = 200 μ m; C = 20 μ m; K = 1 mm.

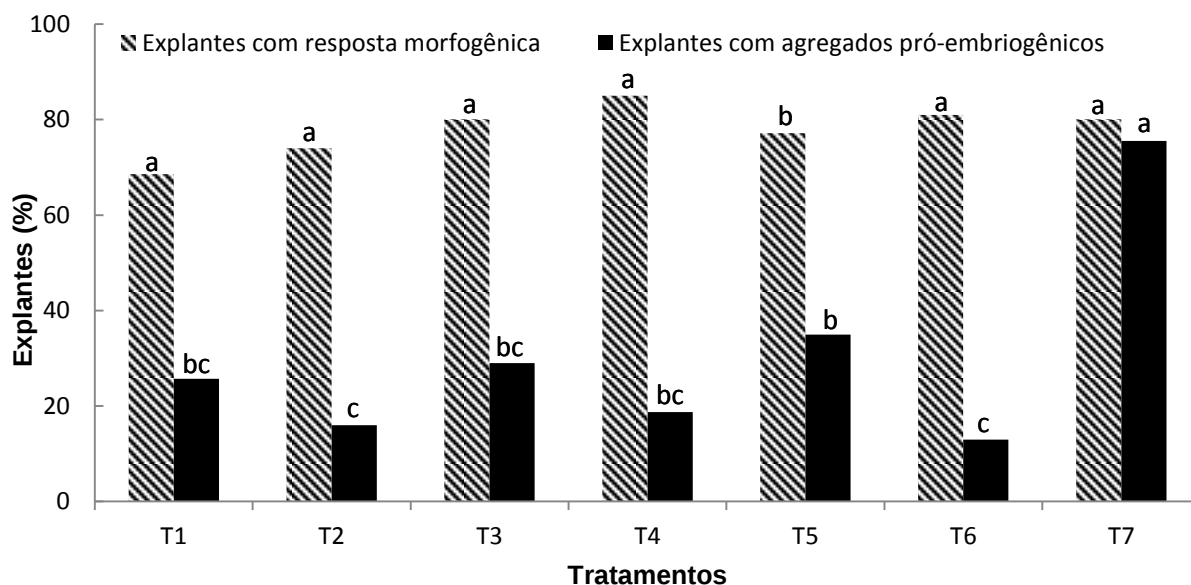


Figura 2. Médias de embriões zigóticos maduros de *Passiflora edulis* Sims com resposta morfogênica e formação de agregados pró-embriônicos globulares, após 40 dias de cultivo em meio de indução da embriogênese somática. **T1)** 45,25 μ M de 2,4-D + 4,44 μ M de BA; **T2)** 31,06 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA; **T3)** 41,41 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA; **T4)** 51,76 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA; **T5)** 20,70 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA + 2,69 μ M de ANA; **T6)** 41,41 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA + 2,69 μ M de ANA; **T7)** 31,06 μ M de Picloram + 2,22 μ M de BA + 2,27 μ M de TDZ. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos permitem inferir que ocorreu uma interação sinérgica entre a auxina picloram e as citocininas BA e TDZ, visto que o uso de picloram isolado ou combinado com BA durante a indução da embriogênese somática em *P. edulis* não promoveu respostas positivas, sendo necessário o uso de TDZ para a maior produção dos pró-embriões. Observa-se que a presença de TDZ foi essencial para as divisões celulares, formação de protuberâncias e, posteriormente, na desdiferenciação das mesmas em embriões somáticos globulares.

O tidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia) é um composto do grupo das feniluréias e não apresenta o anel comum às citocininas tipo adenina, tais como, benzilaminopurina, cinetina ou zeatina, podendo ser a mais potente das difenil uréias que já foram avaliadas para uso em cultura de tecidos vegetais (Mok et al., 1982; Chevreau et al., 1989). Esta citocinina possui maior estabilidade e é mais ativa biologicamente em baixas concentrações que outras citocininas sintéticas como a cinetina e benzilaminopurina (Mok et al., 1987).

O picloram tem sido utilizado com sucesso na indução de embriogênese somática em diversas espécies, como em *Fragaria ananassa* (Gerdakaneh e Zohori, 2013), *Musa acuminata* (Smitha e Nair, 2011) e *Prunus incisa* (Kaouther et al., 2011). No gênero *Passiflora* relatos do uso de Picloram na indução de embriogênese somática são restritos à cultura de células em suspensão e de protoplastos derivados de suspensões celulares de *P. giberti* realizados por Otoni (1995) e Anthony et al. (1999).

O presente trabalho representa o primeiro relato de indução de embriogênese somática em *Passiflora edulis* Sims utilizando Picloram, combinado com BA e TDZ. O balanço entre esses reguladores de crescimento proporcionou condições favoráveis para a divisão e diferenciação celular, o que resultou na obtenção de alta taxa de embriões somáticos em estágio globular, os quais foram confirmados por análises anatômicas e citológicas.

3.2. Análises anatômicas e citológicas

Secções histológicas do embrião zigótico maturo do maracujazeiro amarelo revelaram a presença de protoderme unisseriada, com células retangulares, mesofilo indiferenciado com pouco espaço intracelular e presença de coifa bem conservada (Fig. 3A), seguindo o mesmo padrão encontrado em *P. cincinnata* (Rocha et al., 2012).

Após 10 dias em meio de indução, foi observado o início da formação de protuberâncias na região cotiledonar do explante inicial, originadas a partir de divisões das células da epiderme no sentido anticlinal e divisões das células do mesofilo em orientações diversas. Neste estágio pequenos nódulos meristemáticos com células isodiamétricas, núcleos proeminentes, citoplasmas densos e pouco vacuolizados, apresentando intensa atividade mitótica foram observados (Fig. 3B). Protuberâncias originadas a partir de divisões das células parenquimáticas e células do meristema fundamental, seguida pela formação de pró-embriões, também foram observadas (Fig. 3C). Em *P. cincinnata*, respostas embriogênicas também foram precedidas pela formação de protuberâncias, sugerindo que o desenvolvimento dessas estruturas esteja associado com a redeterminação de células embriogênicas (Rocha et al., 2012).

Os embriões zigóticos com 20 dias de cultivo apresentaram estruturas semelhantes à de embriões somáticos, as quais não possuíam conexão com o

tecido vascular do explante inicial (Fig. 3E). Já aos 30 dias os pró-embriões desenvolveram protoderme diferenciada e ocupavam praticamente toda a face abaxial dos cotilédones. Neste estágio de desenvolvimento observou-se o início do processo de vacuolização das células, o qual ocorreu de forma gradual partindo das camadas periféricas para as camadas internas do explante (Fig. 3F). Com 40 dias em meio de indução da embriogênese somática, os embriões somáticos em estágio globular já se constituíam de protoderme bem definida e isolados do explante inicial (Fig. 3G).

O potencial embriogênico dos calos mantidos em meio de indução durante 40 dias de cultivo foi confirmado via coloração com carmim acético e azul de Evans. As células com potencial embriogênico coraram intensamente de vermelho e as células não embriogênicas de azul. As células pró-embriogênicas apresentaram tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso, núcleo volumoso e vacúolos pequenos, enquanto que as células não embriogênicas eram mais alongadas, com maior grau de vacuolização, núcleos reduzidos e citoplasma menos denso (Fig. 3D).

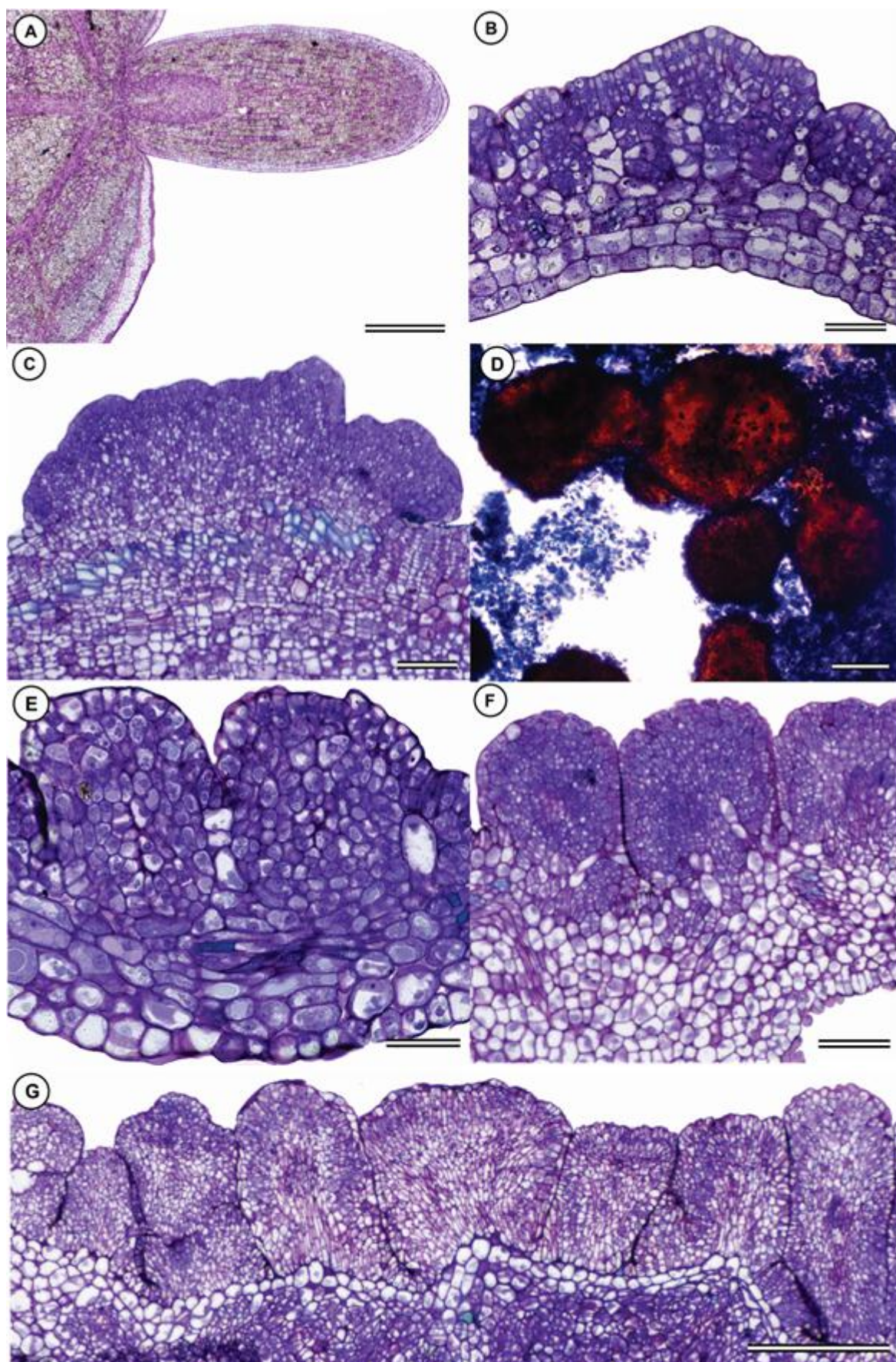


Figura 3. Sequência de eventos morfogênicos no processo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora edulis*

Sims. A) Seção longitudinal do embrião zigótico utilizado como explante na indução da embriogênese somática. B) Seção transversal da face abaxial do cotilédono após 10 dias em meio de indução. Células com núcleo evidentes e formação de meristemóides. C) Formação de protuberâncias a partir de divisões das células parenquimáticas do eixo embrionário. D) Teste histoquímico azul de Evans/carmim acético, evidenciando pró-embriões em vermelho e células não embriogênicas em azul. E) Desenvolvimento dos pró-embriões e formação de novos meristemóides sem conexão com o tecido vascular do explante inicial, após 20 dias de cultivo em meio de indução. F) Pró-embriões com protoderme diferenciada aos 30 dias de cultivo. G) Embriões somáticos globulares com protoderme bem definida e isolados do explante inicial na região cotiledonar do explante inicial, após 40 dias em meio de indução. Barras: A e D = 300 µm; B e E = 50 µm; C e F = 100 µm; G = 250 µm.

3.3. Histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos

Após 30 dias de cultivo dos embriões somáticos em estágio globular nos diferentes tratamentos de maturação, não foi observada a regeneração de plântulas, permanecendo os embriões no estágio globular até a completa necrose ou desenvolveram primórdios foliares, demonstrando que as células não encontravam-se completamente determinadas a seguir a rota embriogênica.

A maturação dos embriões somáticos e a subsequente conversão em plântulas, ainda são consideradas etapas limitantes para a ampla utilização da embriogênese somática em *Passiflora* (Otoni et al., 2013). Durante esta etapa, os embriões somáticos sofrem várias alterações morfológicas e químicas, as quais são evidenciadas pela deposição de materiais de armazenamento, redução da atividade metabólica e a aquisição de tolerância à dessecação (Stasolla et al., 2003). Para adquirir tais características, os embriões somáticos devem ser submetidos a alterações sequenciais que proporcionem condições favoráveis para prosseguirem seu desenvolvimento, tais alterações podem envolver a retirada da auxina do meio de cultura, a inclusão de ácido abscísico (ABA), carvão ativado, citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico (Guerra et al., 1999; Stasolla e Yeung, 2003; Werner et al., 2012).

No entanto, o uso de osmorreguladores, carvão ativado e ABA, nas condições propostas, não possibilitaram o desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos de *P. edulis* em plântulas, sendo necessário testar outras concentrações e/ou combinações dessas substâncias, e até mesmo outros agentes estressantes. Em *P. cincinnata*, o uso de 3% de carvão ativado na ausência de reguladores de crescimento ou osmorreguladores, promoveu o desenvolvimento dos embriões somáticos e a sua posterior conversão em plântulas. Esses resultados

evidenciam a ocorrência de respostas morfológicas *in vitro* de modo genótipo-específico (Jiménez, 2005; d'Onofrio e Morini, 2006) e, consequentemente, a dificuldade em se estabelecer protocolos reproduzíveis de embriogênese somática.

A comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott e Knott revelou que os explantes mantidos nos tratamentos M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M12 mantiveram maior potencial embriogênico após 30 dias em meio de maturação, comparado com os tratamentos M7, M8, M9, M10, M11 e M13 (Fig. 4). Calos com coloração amarelo pardo, verde claro e/ou escuro, na ausência de primórdios foliares e/ou radiculares, foram considerados com potencial embriogênico. Já os calos que apresentaram coloração marrom, com aspecto compacto e denso, ou com coloração esbranquiçada, aspecto friável e presença de células translúcidas alongadas, foram considerados como calos que ao longo do cultivo *in vitro* perderam a capacidade e consequentemente o potencial embriogênico.

Foi observada a formação de primórdios foliares e/ou gemas adventícias em todos os tratamentos testados para a maturação dos embriões somáticos, sendo que os tratamentos M4, M6, M10 e M13, os quais não diferiram estatisticamente, foram os que apresentaram maiores índices de organogênese (Fig. 4). Esses resultados também demonstram que as células não encontravam-se totalmente determinadas a seguir a rota morfogênica via embriogênese somática ou os estímulos externos utilizados não foram suficientes para manter ativo o programa de expressão gênica necessário para a maturação dos embriões somáticos, os quais perderam o potencial embriogênico no decorrer do cultivo.

Durante a fase de maturação dos embriões somáticos uma rápida alteração no padrão de expressão gênica ocorre e uma variedade de genes específicos é ativada ou desativada (Chugh e Khurana, 2002). Recentemente, a indução de embriogênese somática em *P. edulis* a partir de embriões zigóticos maduros utilizando 2,4-D foi relatada por Paim Pinto et al. (2011), contudo os autores também não obtiveram sucesso na diferenciação dos embriões somáticos em plântulas. Tais resultados revelam a dificuldade em se estabelecer as condições adequadas nesta etapa e a necessidade de estudos adicionais quanto aos fatores que possam relacionar com maturação e conversão dos embriões somáticos em plântulas.

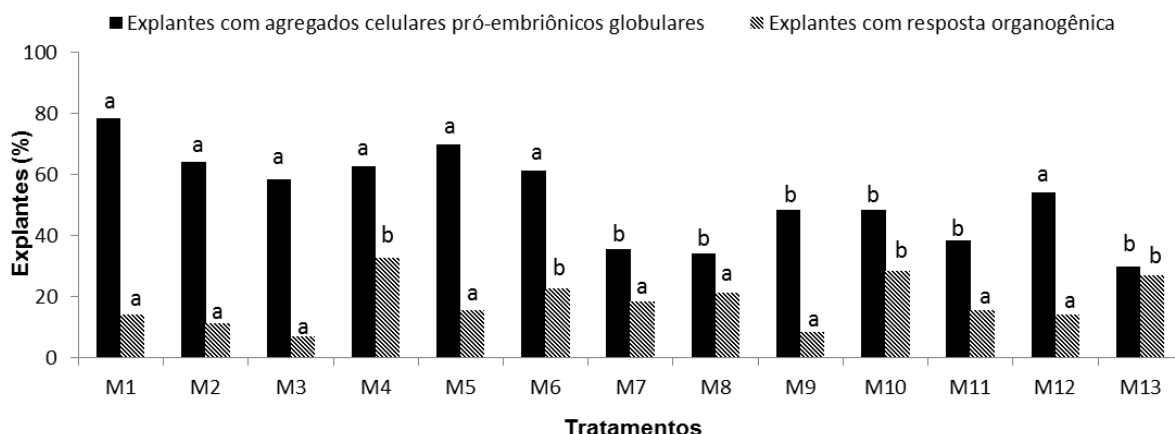


Figura 4. Porcentagem de explantes que apresentaram potencial embriogênico e/ou organogênico após 30 dias de cultivo em meio de maturação. Os meios foram compostos por sais básicos de MS em diferentes concentrações de sacarose, 3% (M1), 6% (M2), 9% (M3); de ágar, 0,65% (M4), 0,75% (M5), 0,85% (M6); PEG, 2% (M7), 4% (M8), 6% (M9) e 0,04 μ M de ABA combinado com 2% (M10), 4% (M11) e 6% (M12) de PEG e meio MS com vitamina B5 3% de sacarose e gelificado com 0,28 % de Phytigel (M13). As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott a 5%.

3.4. Hibridização *in situ*

O padrão espacial da expressão do gene *SERK* durante a embriogênese somática em *P. edulis* foi analisado por meio da técnica de hibridização *in situ* utilizando uma sonda heteróloga desenvolvida para a espécie *P. cincinnata* (*PcSERK*). Esta sonda demonstrou ser passível de uso em *P. edulis*, pois apresentou sinal de hibridização quando utilizada a sequência “anti-sense” e não hibridizou quando utilizada a sequência “sense”.

Pôde-se observar que o embrião zigótico apresentou uma distribuição uniforme do sinal de hibridização (Fig. 5A). O mesmo padrão de expressão do gene *SERK* em embriões zigóticos foi relatado em cenoura (Schmidt et al., 1997), *Arabidopsis* (Hecht et al., 2001), cacau (Santos et al., 2005) e trigo (Singla et al., 2008). Em *P. edulis* f. *flavicarpa* a expressão de *PeSERK* iniciou após 10 dias de indução e não foi observada após o estágio globular (Paim Pinto, 2009). Em *P. ligularis* Juss, a expressão de *SERK* foi registrada em explantes com 5 e 15 dias, tendo o sinal reduzido aos 35 dias de cultivo em meio de indução (Florido, 2013). Tais resultados demonstram que o RNAm de *SERK* está presente transientemente entre o embrião zigótico e embriões somáticos globulares (Suprasanna e Sidha, 2013).

A expressão de *PcSERK* aos 15 dias de cultivo em meio de indução da embriogênese somática ocorreu em todo o explante, com sinal mais evidente na região de formação da protoderme do embrião somático e na epiderme do embrião zigótico (Fig. 5B), evidenciando uma alta taxa de divisão celular e reprogramação celular. Em *P. edulis* (Paim Pinto, 2009) e *P. ligularis* (Florido, 2013), o sinal de hibridização também ocorreu em células associadas à formação da protoderme do embrião somático. Esse padrão de expressão pode ser explicado pelo fato que o gene *SERK* relaciona-se com a reprogramação celular, indicando o início de um novo programa molecular em células que já possuíam função anterior diferente (Hecht et al., 2001).

Os embriões somáticos globulares com 25 dias de cultivo apresentaram sinais de hibridização mais intenso, com coloração azul escura em toda sua extensão (Fig. 5C). A sonda “sense” não hibridizou em nenhum momento da indução ou maturação da embriogênese somática de *P. edulis* (Fig. 5D). Uma redução considerável do sinal da sonda de *PcSERK*, foi observada aos 40 dias em meio de indução da embriogênese somática (Fig. 5E). Com 20 dias em meio de maturação da embriogênese somática, já não havia mais sinal de expressão do gene *SERK* nos embriões somáticos globulares (Fig. 5F).

O trabalho apresenta um protocolo responsivo e reproduzível de indução de embriogênese somática em *P. edulis* até o estágio globular, contudo a maturação dos embriões somáticos e sua posterior conversão em plântulas não foram obtidas. A perda do potencial embriogênico, ou até mesmo a ativação da expressão de outros genes que atuam no processo de maturação dos embriões somáticos, pode explicar a não hibridização da sonda de *PcSERK* em embriões globulares de *P. edulis* quando os mesmos foram cultivados no meio de maturação.

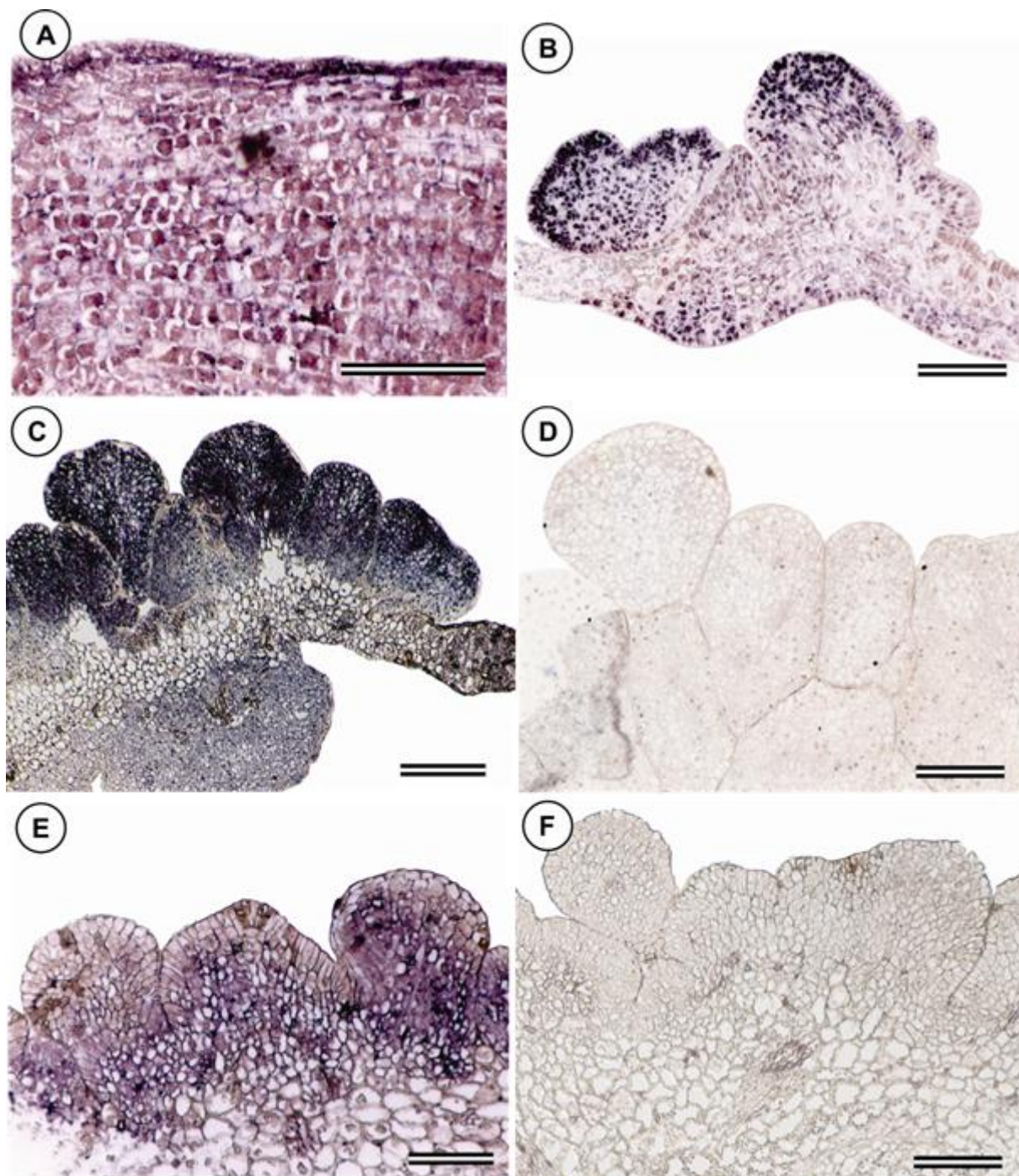


Figura 5. Padrão de expressão do gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*), obtido por hibridização *in situ* com sonda heteróloga desenvolvida para *Passiflora cincinnata*, durante a embriogênese somática em *Passiflora edulis* induzida a partir de embriões zigóticos. A) Cotilédone do embrião zigótico apresentando sinal de hibridização *in situ*. B) Expressão de *SERK* na região de formação da protoderme do embrião somático e epiderme do embrião zigótico aos 15 dias de cultivo em meio de indução da embriogênese somática (31,06 μM de Picloram + 2,22 μM de BA + 2,27 μM de TDZ). C) Embriões somáticos com 25 dias de cultivo em meio de indução apresentando forte sinal de hibridização. D) Ausência de sinal de hibridização *in situ* em explantes embriogênicos e embriões somáticos com 25 dias de cultivo em meio de indução, quando utilizada a sonda “sense” (controle). E) Redução do sinal da sonda de PcSERK aos 40 dias em meio de

indução. F) Embriões somáticos com 20 dias de cultivo em meio de maturação da embriogênese somática não apresentando sinal de expressão do gene *SERK*. Sentido dos cortes: A = longitudinal; B,C,D e E = transversal. Barras: A, B, D e F = 150 μm ; C = 250 μm ; E = 100 μm .

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições experimentais em que o trabalho foi desenvolvido, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

O meio MS acrescido de 31,06 μM de picloram + 2,22 μM de BA + 2,27 μM de TDZ proporcionou a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. edulis*. A dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material.

O gene *SERK* foi expresso em células do embrião zigótico de *P. edulis*, com expressão mais acentuada aos 25 dias de cultivo e redução considerável aos 40 dias de cultivo em meio de indução, e ausência de sinal aos 20 dias em meio de maturação da embriogênese somática.

Não foi observada a regeneração de plântulas, permanecendo os embrióides no estágio globular até a completa necrose ou até o surgimento de primórdios foliares. Tais resultados demonstram a necessidade de estudos adicionais quanto aos fatores que possam estar relacionados com maturação e conversão dos embriões somáticos de *P. edulis* em plântulas.

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.
- ALEXANDRE, R.S.; OTONI, W.C.; DIAS, J.M.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. Propagação vegetativa *ex vitro* do maracujazeiro: estaquia e enxertia. In: ALEXANDRE, R.S.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, J.C. **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, 2009. p. 210.
- ALI, S.B.G.M.; KOUROSH, V.; HASSAN, B.S.; SIAMAK, K.; CHARLES, L. Enhancement of maturation and germination of somatic embryos in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using osmolites, hormones and cold treatments. **African Journal of Food Science**, 4: 735 - 743, 2010.
- 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, 1999. p.169–181.
- ARNOLD, S.V.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 233–249, 2002.
- BRAGLIA, L.; DE BENEDETTI, L.; GIOVANNINI, A.; NICOLETTI, F.; BIANCHINI, C.; PEPINO, L.; MERCURI, A. *In vitro* plant regeneration as a tool to improve ornamental characters in *Passiflora* species. **Acta Horticulturae**, 855:47–52, 2010.
- CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M.; ABU-QAOUD, H. A.; KORBAN, S. S.; SULLIVAN, J. G. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 7: 688-691, 1989.
- CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. **Current Science**, 86:715–730, 2002.
- CUEVA, A.; CONCIA, L.; CELLA, R. Molecular characterization of a *Cyrtocilum loxense* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, 31: 1129-1139, 2012.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (ed). **Maracujá Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2002, 104p.

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

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

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

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

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

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

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

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

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968.

GERDAKANEH, M.; ZOHORI, M. The effect of picloram on somatic embryogenesis of different explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). **British Biotechnology Journal** 3: 133-142, 2013.

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

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V.; SCHMIDT, E. D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127: 803-816, 2001.

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

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, 43: 179-188, 2000.

KAOUTHER, B.M.; NADHRA, E.; AHLEM, C.; JEMMALI, A.; DRUART, P. *In vitro* picloram-induced somatic embryogenesis from leaflets of Cherry (*Prunus incisa* Thunb.). **Journal of Life Sciences**, 5: 913-920, 2011.

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

KLIMASZEWSKA, K.; BERNIER-CARDOU, M.; CYR, D.R.; SUTTON, B.C.S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential and maturation response in embryogenic cultures of (*Pinus strobus* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 36: 279–286, 2000.

KUMAR, G.K.; THOMAS, T.D. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 141–151, 2012.

MA, J.; HE, Y.; HU, Z.; XU, W.; XIA, J.; GUO, C.; LIN, S.; CAO, L.; CHEN, C.; WU, C.; ZHANG, J. Characterization and expression analysis of AcSERK2, a somatic embryogenesis and stress resistance related gene in pineapple. **Gene**, 500: 115–123, 2012.

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

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N- phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, 21: 1509-1511, 1982.

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.

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

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

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

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

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

OTONI, W. C.; PAIM PINTO, D. L.; ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; DIAS, L. L. C.; SILVA, M. L.; SILVA, C. V.; LANI, E. R. G.; SILVA, L. C.; TANAKA, F. A. O. Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* 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.

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

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

PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In:

Faleiros, F.; Junqueira, N.; Braga, M. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 361-383.

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

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

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

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

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

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

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

SAHNI, S.; SONI, K. K. N.; HUSSAIN, S.; ALI, Z.; NARULA, A. SINGH, H. B.; SRIVASTAVA, P. S. Genetic perspective of somatic embryogenesis. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (Eds.). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 201-230.

SAMSON, N. P.; CAMPA, C.; LE GAL, L.; NOIROT, M.; THOMAS, G.; LOKESWARI, T. S.; KOCHKO, A. Effect of primary culture medium composition on high frequency

somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86: 37-45, 2006.

SANTOS, M. O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K. S. C.; TINOCO, M. L. P.; DIAS, B.B. A.; ARAGÃO, F. J. L. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, 168: 723–729, 2005.

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

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

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, 27:833–843, 2008.

SMITHA, P. D.; NAIR, A. S. Effect of picloram on somatic embryogenesis from leaf-sheath explants in diploid *Musa acuminata* cv. Njalipoovan. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 21: 83-87, 2011.

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

- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.
- SOUZA, L. B.; SILVA, E. M.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; SILVA, I. C. V. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34: 832-839, 2012.
- STASOLLA, C.; van ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R.R. The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. **Plant Physiology**, 131: 49–60, 2003.
- STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74: 15-35, 2003.
- SUPRASANNA, P.; SIDHA, M. Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) and regulation of embryogenesis in plants. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 188-200.
- WERNER, E. T.; LIMA, A. B. P.; AMARAL, J.A. T. Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia Biosfera**, 8: 552-580, 2012.
- YANG, L.; BIAN, L.; SHEN, H.; LI, Y. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 115:115–125, 2013.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, 29: 36–57, 2010.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell**, 5: 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO II -
Avaliação histoquímica da indução da embriogênese
somática em *Passiflora edulis* Sims

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever o acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em *Passiflora edulis* Sims 'FB-300', obtido a partir de embriões zigóticos maduros, através de métodos histoquímicos. Embriões zigóticos maduros foram cultivados em meio de indução da embriogênese somática, composto por sais básicos de MS e 31,06 μM de picloram + 2,22 μM de benziladenina (BA) + 2,27 μM de tidiazuron (TDZ). Explantes de embriões zigóticos com 0, 10, 20, 30 e 40 dias de indução da embriogênese somática foram coletados e fixados em solução de Karnovsky e, posteriormente, submetidos a desidratação em série etílica e incluídos em resina acrílica. Cortes transversais e longitudinais com 5 μm de espessura, foram corados com azul de toluidina para caracterização anatômica, xylidine Pounceau para a detecção de proteínas totais, ácido periódico-reagente de Schiff para polissacarídeos neutros, sudan black B para detecção de lipídios e reagente de lugol para detecção de amido. Observou-se a indução da embriogênese somática direta e indireta. Os testes histoquímicos revelaram a presença de grande quantidade de corpos proteicos e grãos de amido em embriões zigóticos de *P. edulis*, os quais foram gradualmente metabolizados durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. Já os corpos lipídicos foram identificados somente após 20 dias de cultivo e localizavam-se principalmente na bainha parenquimática. O presente estudo descreve as alterações histoquímicas e o padrão de acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em *P. edulis*.

Palavras-chave: Passifloraceae, compostos de reserva, morfogênese *in vitro*, embriões somáticos.

Histochemical evaluation of somatic embryogenesis induction in *Passiflora edulis* Sims

ABSTRACT

The aim of this work was to describe the reserves accumulation throughout the somatic embryogenesis process in *Passiflora edulis* Sims 'FB-300', obtained from mature zygotic embryos through histochemical methods. Mature zygotic embryos were cultivated on somatic embryogenesis induction medium, composed of basic MS salts and 31.06µM of picloram + 2.22µM of benziladenin(BA) + 2.27µM of tidiazuron (TDZ). Explants of zygotic embryos with 0, 10, 20, 30 and 40 days of somatic embryogenesis induction were collected and fixed in a Karnovsky solution and, subsequently, subjected to dehydration through an etilic series and embedded in an acrylic resin. Transversal and longitudinal sections, 5µm thick, were colored with toluidine blue to anatomical characterization, xylidine Ponceau for detection of total protein, Schiff's periodic-reagent acid for neutral polysaccharides, sudan black B for lipids, and Lugol reagent for starch detection. It was observed the direct and indirect somatic embryogenesis induction. Histochemical tests revealed the presence of large amounts of protein bodies and starch grains in zygotic embryos of *P. edulis*, which were gradually metabolized during somatic embryo development. Lipid bodies were identified only after 20 days of culture and they were located mainly in the parenchymatic sheath. This work describes the histochemical alterations and the reserves accumulation pattern during the somatic embryogenesis induction in *P. edulis*.

Key-words: Passifloraceae, reserve compounding, *in vitro*, somatic embryos.

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é uma importante via de regeneração de plantas e apresenta inúmeras vantagens, tais como: a oferta de linhagens celulares para a engenharia genética, regeneração de uma estrutura bipolar a partir de uma única célula, produção ilimitada de clones com características elite, pesquisa básica funcional e molecular, produção de sementes sintéticas e conservação de recursos genéticos pela criopreservação (Li et al., 2006; Yang e Zhang, 2010; Aslam et al., 2011).

O processo de embriogênese somática inclui uma série de eventos característicos, como a desdiferenciação de células, a ativação da divisão celular e a reprogramação de seus padrões de fisiologia, metabolismo e expressão gênica (Yang e Zhang, 2010). Essas características, aliadas às respostas morfológicas *in vitro* de modo genótipo-específico (Jiménez 2005; d'Onofrio e Morini, 2006), dificultam o estabelecimento de protocolos de embriogênese somática em diversas espécies.

Em *Passiflora*, poucos protocolos de embriogênese somática foram propostos (Otoni et al., 2013). O primeiro relato de obtenção de embriões somáticos no gênero foi para *P. giberti* por Otoni (1995). O autor reportou a regeneração de embriões somáticos a partir de suspensões celulares, derivadas de calos embriogênicos obtidos a partir de explantes foliares, e a partir de calos embriogênicos oriundos do cultivo de protoplastos isolados de suspensão celular. Em 2007, Reis et al. obtiveram a formação de protuberâncias que se assemelhavam à embriogênese somática indireta a partir de raízes transformadas de *P. cincinnata* via *Agrabacterium rhizogenes*. Silva et al. (2009) e Paim Pinto et al. (2011) obtiveram embriões somáticos de *P. cincinnata* e *P. edulis*, respectivamente, utilizando o embrião zigótico como fonte de explante.

Estudos envolvendo métodos histoquímicos permitem analisar a mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico, possibilitando reconhecer regiões e/ou tecidos que requerem alta demanda energética (Branca et al., 1994; Cangahuala-Inocente et al., 2009). Esses estudos podem auxiliar na otimização e aumentar a eficiência do sistema de regeneração (Almeida et al., 2006; Otoni et al., 2013).

No gênero *Passiflora*, estudos envolvendo métodos histoquímicos foram realizados, em sua maioria, durante a organogênese *in vitro* (Appezzato-da-Glória et al. 1999; Fernando et al. 2007; Lombardi et al. 2007). Em se tratando da morfogênese via embriogênese somática, trabalhos com caracterização histoquímica ainda são escassos, sendo relatado recentemente por Rocha et al. (2012), os quais avaliaram o padrão de mobilização de reservas durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*.

O objetivo deste estudo foi descrever o acúmulo de reservas durante o processo de embriogênese somática em *P. edulis* obtido a partir de embriões zigóticos maduros via métodos histoquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Indução da embriogênese somática

Sementes de *Passiflora edulis*, população FB-300 Araguary, foram obtidas dos Viveiros Flora Brasil Ltda, Araguari, MG. A remoção dos tegumentos das sementes, para a retirada dos embriões zigóticos foi realizada com o auxílio de mini-morsa (Reis et al., 2007). A desinfestação das sementes ocorreu em capela de fluxo laminar, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido da imersão por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) acrescido de duas gotas do agente dispersante Tween-20 a 0,1% (v/v) a cada 100 mL de solução. Posteriormente, as sementes foram submetidas a 4 enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada. Após o último enxague, as sementes foram mantidas *overnight* em água destilada estéril para reidratar e facilitar remoção dos embriões zigóticos.

Os embriões zigóticos foram removidos assepticamente do endosperma das sementes e inoculados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitamina de MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, e 0,65% (p/v) de Ágar (Merck®, Alemanha) como agente gelificante, e acrescido de 31,06 µM de Picloram + 2,22 µM de benziladenina (BA) + 2,27 µM de tidiazuron (TDZ).

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e posteriormente o meio foi autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,1 atm de pressão). As culturas foram estabelecidas em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo alíquotas de 15 mL de meio, vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®), e mantidas em sala de cultivo, na ausência de luz, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (Silva et al., 2009) por 40 dias.

2.2. Preparo das amostras e caracterização anatômica e histoquímica

Foram coletados explantes de embriões zigóticos de *P. edulis* com 0, 10, 20, 30 e 40 dias de indução da embriogênese somática. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky [solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão fosfato de potássio monobásico (pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio 5mM], conforme descrito por Karnovsky (1965) e modificado por Rocha et al. (2012).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série de concentração crescente de etanol e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Cortes transversais e longitudinais com 5 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com Xylidine Ponceau (Vidal, 1970) para a detecção de proteínas totais, ácido periódico-reagente de Schiff (O'Brien e McCully, 1981) para polissacarídeos neutros, sudan black B (Pearse, 1972) para detecção de lipídios, vermelho de rutênio para detecção de pectina, reagente de lugol (Johansen, 1940) para detecção de amido e azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) para caracterização anatômica. A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmara digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.3. Análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise ultraestrutural, explantes de embriões zigóticos de *P. edulis* com 20 dias de indução da embriogênese somática e calos embriogênicos foram fixados em Karnovsky, desidratados em concentração crescente de acetona, secos ao ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha) e metalizados com ouro (SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Alemanha). As observações e registros fotográficos foram feitos em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430VP, Zeiss, Heidelberg, Alemanha), no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfogênese via embriogênese somática direta, quanto a embriogênese somática indireta, foram observadas simultaneamente através dos cortes anatômicos nos explantes. Embriões somáticos de origem direta foram observados na região cotiledonar do explante inicial (Fig. 1C-E), originados através de divisões das células da epiderme no sentido anticlinal e divisões das células do mesofilo em orientações diversas (Fig. 1A). Massas pró-embriônicas, originadas de divisões celulares nos planos anticlinais e periclinais nas células do parênquima e do meristema fundamental, foram observadas na região do eixo embrionário (Figs. 1B-D-F). A formação de embriões somáticos a partir de divisões e proliferação de células da epiderme caracterizou o padrão direto de regeneração, o qual teve origem multicelular, visto que os embriões somáticos não conectavam-se com o explante de origem por um suspensor (Figs. 1C-E). Já o padrão de divisão celular desorganizado, com visível desordem dos tecidos, seguida pela formação de uma zona meristemática e posterior diferenciação dos agregados celulares envoltos por uma protoderme, evidenciou a presença de embriogênese somática indireta (Figs. 1D-F).

A presença de embriogênese somática direta e indireta simultaneamente durante o processo de indução da embriogênese somática ainda não foi relatada no gênero *Passiflora*. Esse fenômeno pode ser explicado pelas condições de cultivo e principalmente pelo uso de picloram combinado com BA e TDZ durante o processo de indução da embriogênese somática em *P. edulis*. Observa-se que ocorreu interação sinérgica entre os reguladores de crescimento que possibilitou a reprogramação genética, seguida pela divisão, desdiferenciação, rediferenciação e proliferação celular, a qual culminou no desenvolvimento de embriões somáticos diretamente e indiretamente do explante.

A auxina mais utilizada durante a embriogênese somática em *Passiflora* é o 2,4-D e o padrão de regeneração obtido com o uso desta auxina é diferente do relatado no presente trabalho, como pode ser observado no trabalho de Silva et al. (2009) que obteve embriogênese somática indireta primária e direta secundária, ao cultivar embriões zigóticos de *P. cincinnata* em meio MS na presença de 18,1 μM de 2,4-D + 4,5 μM de BA.

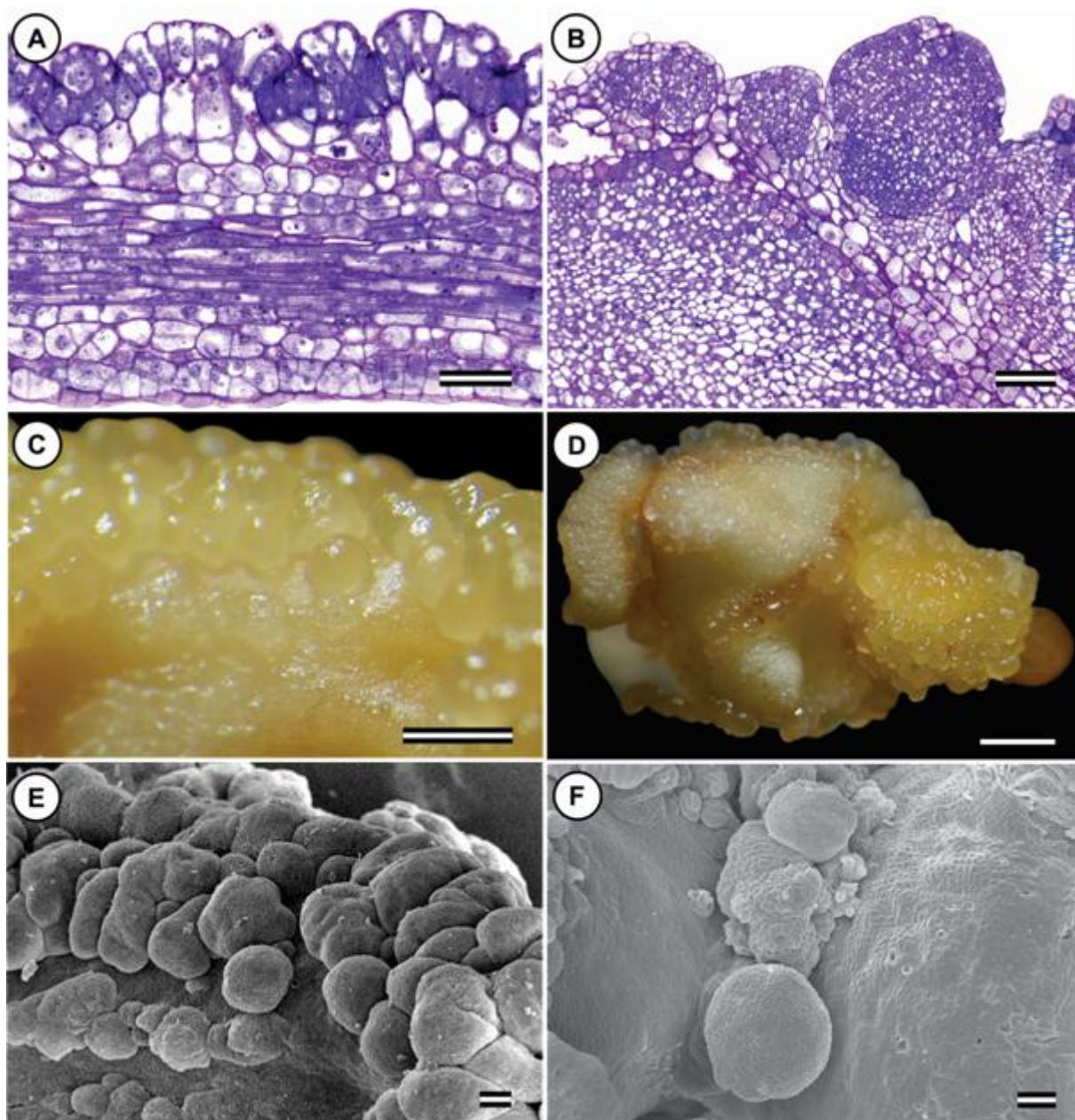


Figura 1. Padrões de regeneração observados durante a embriogênese somática em *Passiflora edulis*. A-B) Cortes anatômicos transversais corados com azul do toluidina. C-D) Microscopia de luz. E-F) Microscopia eletrônica de varredura. A-C-E) Pro-embriões somáticos originados diretamente da região cotiledonar do explante inicial, a partir de divisões das células da epiderme no sentido anticlinal e divisões das células do meristema fundamental em orientações diversas. B-D-F) Formação de protuberâncias e embriões somáticos globulares na região do eixo do embrião zigótico. Barras: A = 50 μm ; B = 250 μm ; C, D, E e F = 100 μm .

Os testes histoquímicos revelaram que os cotilédones do embrião zigótico, utilizados como fonte de explante, apresentaram grande quantidade de corpos proteicos, com formato arredondado e tamanho pouco variado, evidenciados pela reação ao Xylidine Ponceau (XP) (Fig. 2A). A presença de grãos de amido foi

evidenciada pela reação positiva ao ácido periódico-reagente de Schiff (PAS) (Fig. 2B), enquanto que corpos lipídicos não foram observados (Fig. 2C).

Resultados contrastantes foram obtidos por Rocha et al. (2012), os quais observaram a presença de lipídios e corpos proteicos, e ausência de grãos de amido nos cotilédones do embrião zigótico de *P. cincinnata*. Tozzi e Takaki, (2011) observaram que durante a germinação de sementes de *P. edulis*, a presença de lipídios decresceu significativamente após dez dias de cultivo, enquanto que um aumento de grãos de amido ocorria simultaneamente.

As principais substâncias de reservas das sementes são carboidratos, lipídios e proteínas, as quais variam quanto à quantidade entre as plantas (Tozzi e Takaky, 2011). O acúmulo dessas substâncias é considerado um dos processos chave na embriogênese zigótica e somática, fornecendo energia nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário até a fase autotrófica após a germinação (Merkle et al., 1995; Cangahuala-Inocente et al., 2004; Cangahuala-Inocente et al., 2009).

Uma drástica redução de corpos proteicos e amido foi observada após 10 dias de cultivo dos embriões zigóticos de *P. edulis* em meio de indução da embriogênese somática, demonstrando o consumo desses compostos de reserva durante o processo de proliferação celular. Neste período, embriões somáticos em estágio globular foram observados (Fig. 1B) e possuíam pequenas inclusões de corpos proteicos e grãos de amido na região de formação da protoderme e corpo do embrião somático (Figs. 2D-E). Corpos lipídicos não foram identificados neste estágio (Fig. 2F). Embriões somáticos de *Acca sellowiana* em estágio globular também apresentavam pequenos corpos proteicos e pequenos grãos de amido (Cangahuala-Inocente et al., 2009).

Compostos de reserva exercem um importante papel na morfogênese *in vitro* (Cangahuala-Inocente et al., 2004). As proteínas estão envolvidas na regulação da expansão celular e criação de características biofísicas necessárias para a morfogênese (Jiménez, 2001), e seu consumo é comumente registrado durante a indução e o desenvolvimento embriogênico, servindo como fonte de energia para a rediferenciação das células somáticas (Cangahuala-Inocente et al., 2009). Já o amido é considerado uma fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular, fornecendo energia para o desenvolvimento de embriões somáticos (Stamp, 1987; Martin et al., 2000). Isso explica a redução de corpos

proteicos e grãos de amido durante o início da embriogênese somática em *P. edulis*, o qual é marcado por intensa proliferação celular.

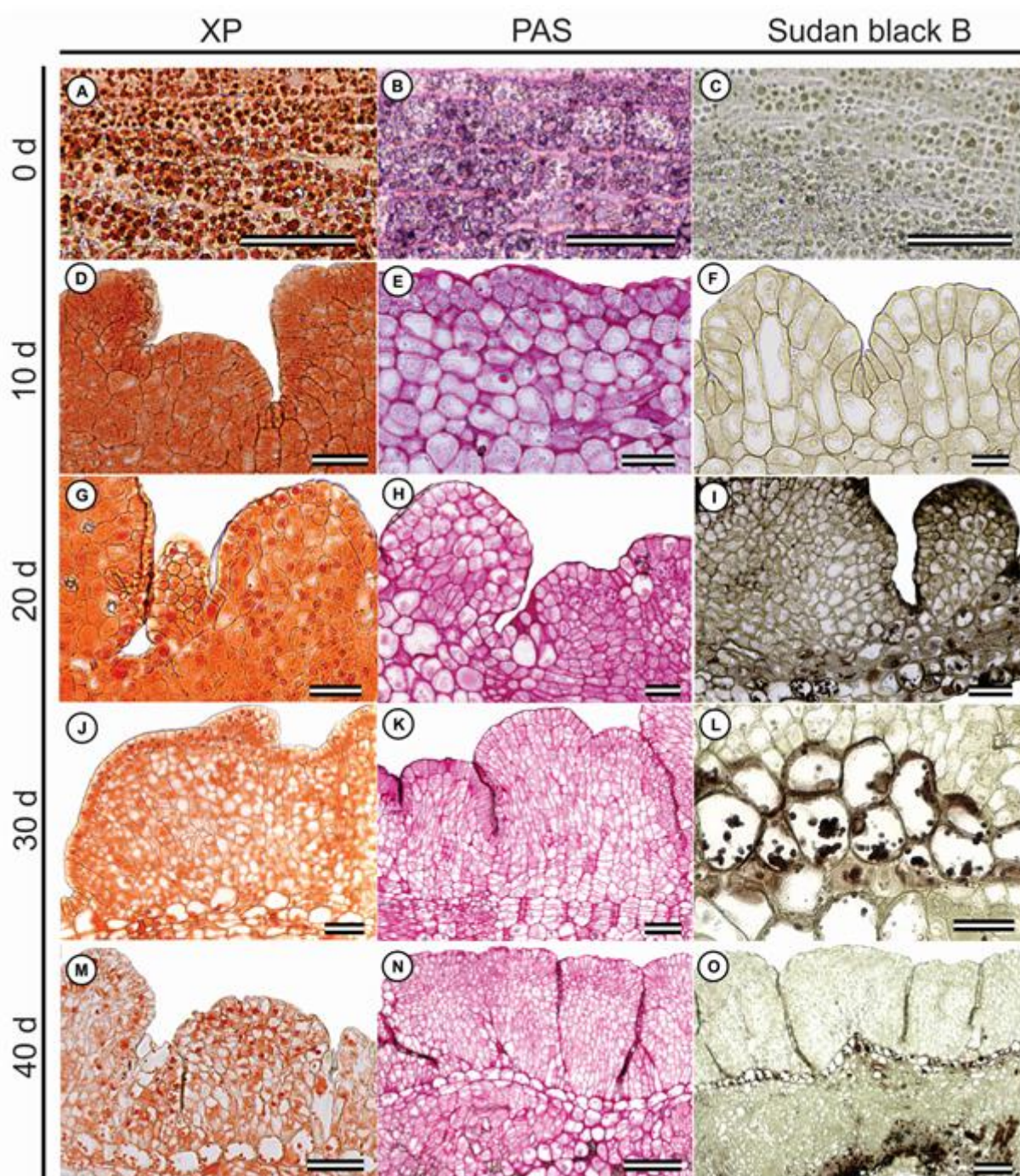


Figura 2. Análise histoquímica do processo de indução da embriogênese somática em *Passiflora edulis* a partir de embriões zigóticos maduros, utilizando meio de MS acrescido de 31,06 μM de Picloram + 2,22 μM de BA + 2,27 μM de TDZ. Cortes histológicos submetidos ao xylidine Ponceau - XP (A, D, G, J, M), PAS (B, E, H, K, N) e ao sudan black B (C, F, I, L, O). A) Corpos proteicos evidenciados pela coloração vermelha. B) Grãos de amido com reação positiva ao PAS. C) Reação negativa de corpos lipídicos ao sudan black B. D) Pró-embriões com pequenas inclusões de corpos proteicos. E) Grãos de amido em células do cotilédone do

embrião zigótico evidenciados pelo PAS. F) Reação negativa para corpos lipídicos. G) Corpos proteicos na região do corpo do pró-embrião somático com 20 dias de cultivo. H) Grãos de amido identificados pela reação positiva ao PAS, distribuídos por toda a extensão do pró-embrião somático e explante inicial. I) Presença de corpos lipídicos, com formato arredondado/ovalado e tamanho variado, na região de formação da protoderme do embrião somático e em células do parênquima do explante inicial. J-K) Pequenas inclusões de corpos proteicos e grãos de amido em pró-embriões somáticos com 30 dias de cultivo. L) Presença de corpos lipídicos em células da bainha parenquimática. M) Corpos proteicos em embriões somáticos globulares com 40 dias de cultivo. N) Grãos de amido em embriões somáticos globulares com 40 dias de cultivo. O) Reação positiva para lipídios. Barras: A à K = 50 μm ; L e M = 30 μm ; N e O = 100 μm .

Após 20 dias de indução, os embriões somáticos em estágio globular apresentavam corpos proteicos na região do corpo do embrião somático e nas células do parênquima do explante inicial (Fig. 2G). Grãos de amido foram identificados pela reação positiva ao PAS e localizam-se distribuídos por toda a extensão do embrião somático e do explante inicial (Fig. 2H). Corpos lipídicos, com formato arredondado/ovalado e tamanho variado, foram observados na região de formação da protoderme do embrião somático e em células do parênquima do explante inicial (Fig. 2I).

Pequenas inclusões de corpos proteicos e grãos de amido foram observadas aos 30 dias de cultivo em meio de indução da embriogênese somática (Fig. 2J). Os grãos de amido localizavam-se principalmente nas regiões da protoderme e nas células de formação do procâmbio (Fig. 2K). Neste período corpos lipídicos reagiram positivamente ao sudan black B e situavam-se principalmente na bainha parenquimática (Fig. 2L).

Os lipídios, juntamente com proteínas, exercem papel fundamental na composição das membranas celulares. Segundo Buchanan et al. (2000), a biossíntese de lipídios em vegetais superiores envolve o retículo endoplasmático e os plastídios. Os ácidos graxos destinados a membranas celulares são sintetizados via plastídios, enquanto que os ácidos graxos de armazenamento são sintetizados via retículo endoplasmático. Em *P. cincinnata*, os embriões somáticos não apresentaram materiais de reserva como lipídios e proteínas, apenas grãos de amido foram identificados, porém não foram abundantes ou uniformemente distribuídos por todas as células (Rocha et al., 2012).

Após 40 dias de indução da embriogênese somática, corpos proteicos e grãos de amido ainda estavam presentes nas células parenquimáticas dos

cotilédones dos explantes iniciais (Figs. 2M -N). Contudo, pode-se observar uma redução gradual desses compostos durante o processo de embriogênese, confirmando a degradação dos mesmos como fonte de energia para a formação dos embriões somáticos. Resultados semelhantes foram observados durante a embriogênese somática em *Feijoa sellowiana*, com uma drástica redução dos grãos de amido durante o desenvolvimento dos aglomerados de células embriogênicas (Cangahuala-Inocente et al., 2004).

Corpos lipídicos também foram observados neste estágio da morfogênese *in vitro* (Fig. 2O), porém diferentemente dos corpos proteicos e grãos de amido, a quantidade deste composto aumentou conforme o desenvolvimento dos embriões somáticos. Rocha et al. (2012), relatam que durante o processo de embriogênese somática em *P. cincinnata* a quantidade de corpos lipídicos diminuiu gradualmente até o completo esgotamento, que ocorreu aos 18 dias de cultivo.

A pectina é o principal agente cimentante da parede celular, contribuindo para a firmeza, resistência mecânica e coesividade do tecido vegetal. As pectinas são encontradas naturalmente em associação com a celulose e hemicelulose, e compõem mais de 35% da parede celular primária nas dicotiledôneas (Zhongdong et al., 2006; Mohnen, 2008). No presente estudo, os testes com vermelho de rutênio evidenciaram a presença de pectina na parede celular, os quais não apresentaram diferença de coloração entre as células do explante inicial e as células do embrião somático. Resultados contrastantes foram observados durante a embriogênese somática em bananeira, onde a coloração histoquímica com vermelho de rutênio revelou a presença de pectinas principalmente na superfície de embriões somáticos em estágio pré-globular e globular (Xu et al., 2011).

A utilização do reagente de Lugol na histolocalização dos grãos de amido não detectou este composto nos embriões globulares. No entanto, a utilização do reagente PAS evidenciou os grãos de amido nos tecidos do embrião zigótico e no decorrer dos processos de morfogênese via embriogênese somática em *P. edulis*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- O uso do meio MS acrescido de 31,06 μ M de picloram + 2,22 μ M de BA + 2,27 μ M de TDZ induziu tanto à embriogênese somática direta quanto indireta em *P. edulis*.

- Testes histoquímicos revelaram que o embrião zigótico de *P. edulis* possui grande quantidade de corpos proteicos, os quais foram metabolizados durante o desenvolvimento dos embriões somáticos.

- Grãos de amido foram localizados, principalmente, em regiões de proliferação celular e reduziram conforme o desenvolvimento dos embriões somáticos e após 40 dias, apenas pequenas inclusões foram observadas na região de formação do procâmbio dos embriões somáticos.

- Corpos lipídicos reagiram positivamente ao sudan black B somente após 20 dias de cultivo, os mesmos localizavam-se principalmente na bainha parenquimática.

- Não foi observada uma diferença entre células pró-embriogênicas e não embriogênicas quanto à presença de pectinas, demonstrando que esse polissacarídeo não é um marcador de potencial embriogênico em *P. edulis*. A utilização do reagente de Lugol na histolocalização dos grãos de amido não detectou este composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. (2009) Propagação *in vitro* de maracujá. In: ALEXANDRE, R. S.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. (Eds) **Propagação do maracujazeiro: aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos**. Vitória: EDUFES, 2009, p. 117–184.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.W.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, 50: 321–325, 2006.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34: 2007–2013, 1999.
- ASLAM, J.; KHAN, S. A.; CHERUTH, A. J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18: 369–380, 2011.
- BRANCA, C.; TORELLI, A.; FERMI, P.; ALTAMURA, M. M.; BASSI, M. Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma**, 182: 59–64, 1994.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, 224: 33–40, 2004.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M. P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31: 501-514, 2009.
- D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, 107: 194-199, 2006.
- FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L.; MACHADO, S. R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.

New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 91: 37-44, 2007.

FERRAZ, J. V.; LOT, L. **Fruta para consumo *in natura* tem boa perspectiva de renda. Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2007.

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

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

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

KARNOVSKY, M. J. (1965) A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27:127–128, 1965.

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

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.

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

McDANIEL, C. N. Competence, determination and induction in plant development. In: Malacinski, G. M.; Bryant, S. V. (Eds) **Pattern formation**. New York: Macmillan, 1984, p. 393–412.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do Maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial: 83-91, 2011.

MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, 11: 266–277, 2008.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NHUT, D. T.; KHIET, B. L. T.; THI, N. N.; THUY, D. T. T.; DUY, N.; HAI, N. T.; HUYEN, P. X. High frequency shoot formation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via thin cell layer (TCL) technology. In: JAIN, S.M.; HÄGGMAN, H. (eds) **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 17–426.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, 59: 368-373, 1964.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure principles and selected methods. **Termacarphi**, Melbourne, 1981. 345 p.
- OTONI, W. C. **Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 198p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento).
- OTONI, W. C.; PAIM PINTO, D. L.; ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; DIAS, L. L. C.; SILVA, M. L.; SILVA, C. V.; LANI, E. R. G.; SILVA, L. C.; TANAKA, F. A. O. Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 1-17.
- PAIM PINTO, D. L.; ALMEIDA, A. M.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 521-530, 2011.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**, 3rd edition, London: Churchill-Livingstone, 1972. p. 761-1518.
- REIS, L. B.; SILVA, M. L.; LIMA, A. B. P.; OLIVEIRA, M. L. P.; PINTO, D. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulture**, 738: 425–431, 2007.
- ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249: 747-758, 2012.
- SILVA, M. L.; PAIM-PINTO, D. L.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species

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

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.

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany**, 57: 451-459, 1987.

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

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Annales d’Histochimie**, 15: 289-296, 1970.

XU, C.; ZHAO, L.; PAN, X.; ŠAMAJ, J. Developmental Localization and Methylesterification of Pectin Epitopes during Somatic Embryogenesis of Banana (*Musa* spp. AAA). **PLoS ONE**, 6: e22992, 2011.

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

ZHONGDONG, L.; GUOHUA, W.; YUNCHANG, G.; KENNEDY, J.F. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. **Carbohydrate Polymers**, 64: 548–552, 2006.

6. CONCLUSÕES GERAIS

No primeiro capítulo foi proposto um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *P. edulis* utilizando meio MS acrescido de 31,06 μM de picloram + 2,22 μM de BA + 2,27 μM de TDZ. Análises morfo-anatômicas indicaram a presença de embriogênese somática direta e indireta, simultaneamente. A dupla coloração com carmim acético e azul de Evans confirmou a competência embriogênica do material. O gene *SERK* foi expresso em células do embrião zigótico de *P. edulis*, com expressão mais acentuada aos 25 dias de cultivo e redução considerável aos 40 dias de cultivo em meio de indução, e ausência de sinal aos 20 dias em meio de maturação da embriogênese somática. Não foi observada a regeneração de plântulas, permanecendo os embrióides no estágio globular até a completa necrose ou até o surgimento de primórdios foliares.

Com relação aos estudos no segundo capítulo, constatou-se que o embrião zigótico de *P. edulis* possuía grande quantidade de corpos proteicos, os quais foram metabolizados durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. Durante a indução da embriogênese somática, os grãos de amido estavam situados, principalmente, em regiões de proliferação celular e reduziram conforme o desenvolvimento dos embriões somáticos e após 40 dias, apenas pequenas inclusões foram observadas na região de formação do procâmbio dos embriões somáticos. Os corpos lipídicos reagiram positivamente ao sudan black B somente após 20 dias de cultivo e localizavam-se principalmente em células do parênquima localizadas logo abaixo dos embriões somáticos. Não foi observada diferença entre células pró-embriogênicas e não embriogênicas quanto à presença de pectinas, demonstrando que esse polissacarídeo não é um marcador de potencial embriogênico em *P. edulis*. A utilização do reagente de Lugol na histolocalização dos grãos de amido não detectou este composto.

O presente trabalho constitui no primeiro relato de indução de embriogênese somática em *P. edulis* utilizando picloram combinado com BA e TDZ. Os resultados obtidos constituem informações relevantes sobre o padrão de expressão do gene *SERK* e o acúmulo de reservas durante o processo embriogênico em *P. edulis* nas condições propostas. Os resultados demonstram também a dificuldade em se estabelecer as condições adequadas para a maturação dos embriões somáticos e a

necessidade de maiores estudos quanto aos fatores que possam relacionar-se com histodiferenciação e conversão desses embriões em plântulas.