

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

**Sistemas de regeneração *de novo* a partir da organogênese e
embriogênese somática em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi,
Passifloraceae - Uma espécie da Amazônia Meridional**

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO- BRASIL
FEVEREIRO – 2016

RODRIGO BRITO DE FARIA

Sistemas de regeneração *de novo* a partir da organogênese e embriogênese somática em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi, Passifloraceae - Uma espécie da Amazônia Meridional

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 Ana Aparecida Bandini Rossi

TANGARÁ DA SERRA
MATO GROSSO- BRASIL
FEVEREIRO – 2016

Sistemas de regeneração *de novo* a partir da organogênese e embriogênese somática em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi, Passifloraceae - Uma espécie da Amazônia Meridional

RODRIGO BRITO DE FARIA

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.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho (D. Sc. Genética e Melhoramento)
Universidade do estado de Mato Grosso (Orientadora)

Prof^a. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi (D. Sc. Genética e Melhoramento)
Universidade do estado de Mato Grosso (Co-Orientadora)

Prof. PhD. Elyabe Monteiro de Matos (D. Sc. Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa – MG (Membro)

*[...] Deleita-te no Senhor e ELE
concederá o que deseja o teu
coração [...]*

Salmos 37-4

À Deus
Aos meus pais João, Luzia,
Aos irmãos Iago, Igor e
Amigos.
Dedico!

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela incondicional fidelidade, pelo sustento de cada dia, pela provisão do amanhã e pelos livramentos;

À Universidade do Estado de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

À Minha orientadora Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, pela ajuda, companheirismo, por ser uma facilitadora e uma ponte nesta etapa da minha formação acadêmica, por me ensinar a trilhar nos caminhos da cultura de tecidos como uma visão holística, pelos ensinamentos profissionais, pessoais e acadêmicos pela amizade e confiança dedicada a mim;

Aos meus Pais João Batista de Faria e Luzia Alves Brito de Faria que sempre me incentivaram a trilhar o caminho dos estudos;

Ao Professor Dr. Wagner Campos Otoni pelo acolhimento em seu laboratório para realização das análises histoquímicas, citometria de fluxo, pelo grande conhecimento transmitido;

À professora Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi, por aceitar o convite para este trabalho como co-orientadora e pelas sugestões.

Ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos pela amizade, ajuda durante a permanência e adaptação ao LCT II e pelas contribuições para este trabalho.

Ao professor Dr. Ilio Fealho de Carvalho pelos ensinamentos na pesquisa científica e pela amizade;

A equipe do LCTV, Nadia Botini, Paula Pinheiro, Camila Antoniazzi, Camila Filipin, Jéssica Fernandes, Kaliane Zaira, Naiara Silva, Andréia Mikovski, Carla Fernandes pela ajuda nos experimentos e amizade;

Ao Daniel Pereira Miranda pela amizade e hospedagem em sua casa e pelos momentos de alegria na república os Bartira (Nicolas, Leandro, Lucas e Givan) em Viçosa – MG;

Debora e Lucas Gomes e pela amizade e vizinhança.

A Anyela pela amizade e companheirismo durante a minha permanência no LCTII;

A Dra. Andréa Dias Koehler pela amizade e ensinamentos;

Ao Diego Batista pela ajuda na análise estatística e amizade;

Ao Wellington e a Ana Claudia pela ajuda nas análises Anatômicas;

À Luciana, Talita, Hellen, Denise e Daniele pela ajuda nas análises de citometria de fluxo e pela amizade;

Ao Sérgio, Evandro, Kellen, Ludmila e Duanny pela amizade e companheirismo;

A Raquel, Dan, Dona Elcy, Itainá e Lily pela amizade.

A meus amigos do Mestrado em Genética e Melhoramento da UNEMAT;

A meus amigos da Igreja Batista Nacional pela amizade sincera neste pequeno tempo em que convivemos e pelos momentos de alegria;

E a todos que colaboraram diretamente e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Obrigado!

BIOGRAFIA

Rodrigo Brito de Faria nasceu em São Félix do Araguaia no estado de Mato Grosso em vinte sete de junho de mil novecentos e noventa, filho de João Batista de Faria e Luzia Alves Brito de Faria, irmãos: Iago Brito de Faria e Igor Kaway Brito de Faria. No ano de dois mil e oito ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas na Universidade do Estado de Mato Grosso *campus* de Nova Xavantina, finalizando a graduação no ano de dois mil e doze;

Atuou como coordenador da Vigilância em Saúde de subsetores como Vigilância Sanitária, Epidemiológica, Ambiental, Saúde do Trabalhador e em Políticas e Práticas de Educação em Saúde no ano de dois mil e treze em São Félix do Araguaia;

Ingressou no Programa de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade do Estado de Mato Grosso/Universidade Estadual Norte Fluminense *campus* de Tangará da Serra no ano de dois mil e quatorze como orientado da professora Doutora Maurecilne Lemes da Silva Carvalho na linha de pesquisa de Biotecnologia e Recursos genéticos vegetais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Micropropagação por organogênese aplicada a maracujazeiros.....	15
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> a partir de explantes foliares.....	16
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos hipocotiledonares.....	17
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos radiculares.....	18
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de cotilédones.....	19
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de tecidos endospermicos.....	19
2.7 Citometria de fluxo.....	21
2.8 Embriogênese somática.....	21
2.9 Metabolismo e expressão gênica durante a embriogênese.....	23
2.10 Histoquímica e mobilização de reserva.....	24
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
Capítulo I - Organogênese, histoquímica e avaliação da estabilidade genética em regenerantes obtidos a partir de diferentes tecidos em <i>Passiflora cristalina</i> Vanderplank e Zappi.....	40
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Local de realização dos experimentos.....	46
2.2 Obtenção de sementes, assepsia e inoculação de explantes em meio de cultivo.....	46
2.3 Delineamento experimental.....	47
2.4 Caracterização histoquímica.....	48
2.5 Análise da estabilidade genética.....	48
3. RESULTADOS E DICUSSÕES.....	49
3.1 Análise histoquímica.....	66

3.2 Análise da estabilidade genética.....	73
4. CONCLUSÕES.....	78
5. REFERÊNCIAS.....	79
CAPÍTULO II - Embriogênese somática e análises histoquímica em <i>Passiflora cristalina</i> Vanderplank e Zappi.....	91
RESUMO.....	91
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1 Análise citológica.....	96
2.2 Caracterização Anatômica e histoquímica.....	96
3. RESULTADOS E DICUSSÕES.....	97
3.1 Caracterização anatômica e histoquímica.....	105
4. CONCLUSÕES.....	115
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

RESUMO

FARIA, Rodrigo Brito, M. Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, fevereiro de 2016. **Sistemas de regeneração *de novo* a partir da organogênese e embriogênese somática em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi, Passifloraceae - Uma espécie da Amazônia Meridional**

Orientadora: Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Co-orientadora: Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi

O primeiro capítulo objetivou a regeneração *de novo* no estabelecimento de um protocolo responsivo de organogênese utilizando-se de diferentes tipos de explantes, análises histoquímicas na mobilização de substâncias ergásticas e avaliação da estabilidade genética de regenerantes obtidos da espécie *Passiflora cristalina*. Sementes de *P. cristalina* foram obtidas a partir de coletas em populações silvestres no município de Alta Floresta/MT. Primeiramente, com o auxílio de uma mini-morsa retirou-se o tegumento das sementes, e em condições assépticas foram desinfestadas e germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$. Após 30 dias de cultivo foram obtidas plântulas com ± 10 cm de altura que foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos foliares ± 1 cm³, hipocotiledonares e radiculares com ± 1 cm foram inoculados em meio contendo sais básicos e vitaminas de MS, 4,5% (p/v) de mio-inositol, 1% (p/v) 30% (p/v) sacarose, e 8,5% (p/v) de Ágar (p/v), juntamente com diferentes concentrações de reguladores de crescimento: Benzil-adenina (BA), 2.21, 4.43, 6.65 e 8.87 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 0.0 $\mu\text{M L}^{-1}$, Tidiazuron (TDZ), 2.27, 4.54, 6.81, 9.08, $\mu\text{M L}^{-1}$ e Cinetina (CIN) 2.32, 4.64, 6.97, 9.29 $\mu\text{M L}^{-1}$. Os cotilédones do embrião e endosperma das sementes foram desinfestadas e cultivados nas mesmas condições. Os experimentos foram mantidos em sala de cultivo sob irradiância, à temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$. A análise estatística baseou-se em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três repetições a avaliadas pelo teste de médias Scott-Knott ($p \leq 0.05$). Para segmentos foliares a concentração que melhor induziu brotações foi de 8.87 μM de BA correspondendo a 368,22 brotos em 60 dias de cultivo e 299,33 em 90 dias. Para segmentos hipocotiledonares a concentração que melhor correspondeu em brotações foi de 4.43 μM de BA com 744,66 em 40 dias e 1396,66 em 60 dias. Para segmentos radiculares as maiores médias se deram para CIN na concentração de 4.64 μM com 44 brotos em 15 dias e 2.32 μM com 25.33 brotos para 30 dias. Utilizando-se de cotilédones as melhores médias em brotações se deram para a concentração de 4.43 μM de BA em 30 dias de cultivo e 8.87 μM de BA em 50 dias, para TDZ se deu para a concentração de 2.27 μM com 158.66 em 30 dias e 4.54 μM com 368.66 em 50 dias. Para endosperma as médias não diferiram entre si pelo teste de média para os reguladores utilizados BA, TDZ e CIN. Pela histoquímica pode-se observar a produção e metabolização de substâncias ergásticas durante a morfogênese *in vitro*. Durante a citometria de fluxo foi possível identificar alterações no conteúdo de DNA dos regenerantes oriundos de segmentos hipocotiledonares em 3 amostras evidenciando tetraploidia (4n), e em todos os

regenerantes utilizando tecidos endospermicos triploidia (3n), para as amostras dos regenerantes obtidos a partir de folha e raiz e cotilédones o conteúdo de DNA permaneceu diploide (2n). O segundo capítulo objetivou a regeneração *de novo* a partir da embriogênese somática, análises histoquímicas e a produção e a mobilização de metabólitos em *Passiflora cristalina*. Sementes livres de tegumentos foram desinfestadas, e, assepticamente realizou a extração de embriões zigóticos que foram inoculados em meio MS como descrito anteriormente com a adição de 2,4-D nas concentrações de 9.04, 13.57, 18.09, 22.62, 27.14, 31.67, 36.19, 40.72, 45.24 μM combinados a 4.43 μM de BA. A análise estatística foi um (DIC) constituído por três repetições, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0.05$). Explantes que apresentaram pro-embriões em 20 dias de cultivo foram transferidos para o meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento e gelificado com Phytigel®, aos 30 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento foram observados embriões somáticos (cordiformes, torpedos e cotilédones) para concentrações de 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 27.33 embriões, seguido de 18.09 μM + 4.45 μM de BA com 3 embriões de forma indireta. Aos 60 dias de cultivo *in vitro* embriões somáticos cotilédones foram observados nas concentrações 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 51.66 embriões, seguido 21.22 embriões para a concentração de 18.09 μM + 4.43 μM de BA. Pelas análises histoquímicas pode-se observar que após o período de indução entre 20-60 dias de cultivo ocorreu a produção de amido, mobilização de polissacarídeos neutros, proteínas, lipídeos em regiões com intensa atividade metabólica e uma maior evidência de pectinas em regiões em estágio de diferenciação e crescimento celular durante a formação de embriões somáticos.

Palavras chave: Maracujazeiro silvestre, níveis de ploidia, mobilização de reservas.

ABSTRACT

FARIA, Rodrigo Brito, M. Sc, University of state Mato Grosso, February 2016. **New regeneration systems from organogenesis and somatic embryogenesis in *Passiflora cristalina* Vanderplank and Zappi, Passifloraceae. - A species of Meridional Amazon**

Adviser: D.Sc. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho. Counselor: D.Sc. Ana Aparecida Bandini Rossi.

The first chapter of this study aimed to further regeneration in the establishment of a responsive protocol organogenesis using different types of explants as leaves, hypocotyls, roots, embryo cotyledon and endosperm, histochemical analysis in mobilizing ergastic substances and evaluation genetic stability regenerants. Seeds of *P. cristalina* were obtained from collections in wild populations in the municipality of Alta Floresta/MT. First, with the assistance of a mini-vise retired tegument seeds, and in aseptic conditions were sterilized and germinated on medium MS½. After 30 days of culture plantlets were obtained at ± 10 cm which were used as a source of explants. ± 1 cm³ leaf segments, hypocotyls and root con ± 1 cm were inoculated in basic medium containing MS salts and vitamins, 4.5% (w/v) myo-inositol, 1% (w/v) to 30% (w/v) sucrose and 8.5% (w/v) agar (w/v) together with different concentrations of growth regulators: Benzyladenine (BA), 2.21, 4.43, 6.65 and 8.87 μM L⁻¹ and 0.0 μM L⁻¹, Thidiazuron (TDZ), 2.27, 4.54, 6.81, 8.9, μM L⁻¹ and Kinetin (KIN) 2.32, 4.64, 6.97, 9.29 μM L⁻¹. The cotyledons of the embryo and endosperm of the seeds were sterilized and grown under the same conditions. The experiments were kept in culture room under irradiance, temperature 27 ± 2 °C. The statistical analysis is based on a completely randomized design (CRD) consists of three repetitions evaluated by means of test Scott-Knott (p ≤ 0.05). For leaf segments concentration that best induced shoots was 8.87 μM BA corresponding to 368.22 shoots 60 days after culture and 299.33 in 90 days. For segments hypocotyledonary the concentration that best matches in shoots was 4.43 μM BA with 744.66 in 40 days and 1396.66 in 60 days. To root segments the highest average was given to CIN at a concentration of 4.64 μM with 44 shoots in 15 days and 2.32 μM with 25.33 shoots for 30 days. Using cotyledons best averages shoots were observed for the concentration of 4.43 μM BA 30 days of culture and 8.87 μM BA in 50 days for TDZ was observed in the concentration of 2.27 μM to 158.66 on 30 days and 4.54 μM with 368.66 in 50 days. Endosperm to the averages do not differ by average test for regulators used BA, TDZ and KIN. For histochemistry can observe the production and metabolization of ergastic substances during *in vitro* morphogenesis. During flow cytometry, it was possible to identify changes in the DNA content of the regenerating derived from hypocotyl segments 3 samples showing tetraploid (4n), and all regenerants using endospermic tissues triploidy (3n), for samples of regenerants

obtained from leaf and root and the cotyledons remained diploid DNA content (2N). The second chapter aimed to new regeneration from somatic embryogenesis from mature zygotic embryos, as well as histochemical analyzes characterizing the production and mobilization of metabolites during embryogenesis. Seeds free teguments were sterilized and aseptically performed the extraction zygotic embryos were inoculated in MS medium as described above with the addition of 2,4-D at concentrations of 9.04, 13.57, 18.09, 22.62, 27.14, 31.67, 36.19, 40.72, 45.24 μM combined to 4.43 μM of BA. Statistical analysis was a (CRD) consists of three repetitions, and the averages were compared by 5% Tukey test ($p \leq 0.05$). Explants that showed pro-embryos at 20 days of culture were transferred to MS medium, in the absence of growth regulators and gelled with Phytigel®, at 30 days of culture on maturation medium in the absence of growth regulators somatic embryos were observed (heart-shaped, torpedo and cotyledon) at concentrations of 27.14 μM of 2,4-D combined with 4.43 μM BA with an average of 27.33 embryos, followed by 18:09 + 4.45 μM BA to 3 embryos indirectly. After 60 days of cultivation cotyledonary somatic embryos in vitro was observed at concentrations of 27.14 μM of 2,4-D combined 4.43 μM BA to with a mean of 51.66 embryos, followed 21.22 embryos to concentratio18.09 μM + 4:43 μM BA. For histochemical analyzes can be seen that after an induction period between 20-60 days of cultivation occurred starch production, mobilization of neutral polysaccharides, proteins, lipids in regions of intense metabolic activity and greater evidence of pectins in regions stage cell growth and differentiation during the formation of somatic embryos.

KEY-WORDS: Wild Passion fruit, Ploidy levels, Mobilization of reserves.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi foi identificada pela primeira vez no município Novo Mundo - Estado de Mato Grosso, no Parque Estadual Cristalino, limite nordeste do parque no ano de 2008 por (Vanderplank e Zappi, 2011). É uma planta pouquíssima estudada (Gerônimo, 2014; Silveira, 2015), possuem flores vistosas avermelhadas, seus frutos são ovalados (Vanderplank e Zappi, 2011). Suas flores são potencialmente ornamentais, os frutos possuem um sabor levemente adocicado.

As passifloráceas tem importância econômica no setor médico, e, especialmente, como fonte de alimento, além de interesse econômico, a família tem uma grande importância ecológica (Nardin et al., 2015). O cultivo de maracujá tem mostrado forte crescimento e expansão, devido à grande popularidade em diferentes segmentos do mercado consumidor, incluindo tanto como fruta fresca, produção de suco e na indústria de cosméticos (Vieira et al., 2014). Além, de alguns possuírem valores ornamentais por serem exóticos também revelam-se como fontes úteis de moléculas biológicas que podem ser fitofármacos potentes no futuro (Dhawan et al., 2004).

Podem possuir atividade antiinflamatória (Verma et al., 2015), efeitos antioxidativos (Cazarin et al., 2014; Colomeu et al., 2014; Saravanan et al., 2014^a; Saravanan et al., 2014^b), anti-diabéticos (Colomeu et al., 2014; Saravanan e Parimelazhagan, 2014), analgésico, antipirético (Saravanan et al., 2014^{a,b}), anti-diarréico e efeitos citotóxicos (Asadujjaman, 2014). Também é relatado a atividade antimicrobiana (Saravanan et al., 2014), antidepressivo e antiepilético (Singh et al., 2012), além defeitos ansiolíticos e sedativos (Deng et al., 2010). Bem como aplicabilidades biotecnológicas, por exemplo, de acordo com Medley et al., (2013) algumas espécies de maracujazeiros são indicados como biorremediadores e bioacumuladores de metais pesados. Na indústria alimentícia de sua casca extraem polissacarídeos (Liew et al., 2014; Seixas et al., 2014). Os frutos são consumidos e/ou processados *in natura* (Embrapa, 2004; Furlaneto et al., 2011). Também podem ser utilizados na indústria cosmética (Ferrari et al., 2004), pois, as sementes do maracujá são consideradas boas fontes de ácidos graxos essenciais (Zeraik et al., 2010).

As flores são utilizadas na ornamentação, pois são consideradas exóticas e complexas algumas de coloração forte e brilhante, e outras de coloração suave e marcante devido, principalmente, à presença da corona, que caracteriza a família Passifloraceae (Cruz et al., 2008). E a sua folhagem é exótica e variada (Abreu, 2009).

O gênero tem um elevado grau de variabilidade genética, e muitas espécies silvestres possuem características interessantes para programas de melhoramento em termos de rendimento, qualidade dos frutos e resistência a doenças (Silva et al., 2009). O Brasil é um dos principais centros de dispersão da variabilidade genética do gênero *Passiflora*, sua auto-incompatibilidade aliada à incidência de doenças, desmatamentos e monocultivos promovem a erosão genética (Faria et al., 2007).

A regeneração de órgãos em pequenos explantes de tecidos vegetais oferece a possibilidade de estudar a sua diferenciação, e as respostas qualitativas e quantitativas da aplicação de reguladores de crescimento como as auxinas e citocininas envolvidas na regulação de processos de desenvolvimento e na morfogênese *in vitro* (Krieken et al., 1990). Que ocorre mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática (Alves, 2004).

Sistemas de cultura de tecidos dependem do equilíbrio de uma série de fatores como reguladores de crescimento, luz, temperatura, pH e nutrientes, entre outros, os nutrientes minerais são responsáveis por específicas funções no metabolismo da planta, como parte de proteínas, aminoácidos, características estruturais e também participando de reações enzimáticas, potencial osmótico, e a deficiência de minerais em plantas pode causar perturbações do metabolismo que se manifestam como bioquímicas, alterações morfológicas, fisiológicas e de acordo com o nutriente e para o nível de deficiência (Monteiro et al., 2000).

Na organogênese há a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origens em locais diferentes daqueles onde desenvolvem-se no curso normal de desenvolvimento da planta, esta via de regeneração pode ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, entretanto, o sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores das respostas morfogênicas (Moura et al., 2001).

Já a embriogênese somática é uma via através da qual as células somáticas sob condições indutivas desenvolvem células embrionárias, onde as mudanças morfológicas e bioquímicas são fundamentais para a formação de embriões somáticos (Zimmerman, 1993; Komamine et al., 2005; Rose et al., 2010). É um processo peculiar exibindo padrões de desenvolvimento diferentes, tais como a diferenciação celular, ativação e divisões, reprogramação da expressão do gene e fisiologia e metabolismo (Rose et al. 2010). Típico da desdiferenciação que retorna uma célula somática diferenciada reprogramando-a um estado de células totipotentes (Xu e Huang et al., 2014).

Tanto a organogênese e embriogênese são métodos práticos de propagação, a embriogênese oferece um maior potencial em programas de melhoramento, pois permite a junção eficiente da clonagem e modificação genética (Sharp et al., 1980). Já a organogênese é limitada a primórdios de órgãos, enquanto que um embrião é caracterizado por uma estrutura bipolar contendo broto e raiz, após de uma série de sequências de desenvolvimento (Sharp et al., 1980).

Embora estudos recentes sobre a regeneração de plantas tenham aumentado bastante à compreensão da plasticidade celular em plantas, ainda muitas perguntas permanecem sem resposta (Xu e Huang et al., 2014).

A citometria é uma técnica rápida e eficaz para se avaliar o conteúdo de DNA nuclear de células vegetais (Dolezel et al., 1989; Yanpaisan et al., 1999; Dolezel e Bartos, 2005). E tem sido empregada com sucesso em passifloráceas para se avaliar a estabilidade genética de regenerantes obtidos (Pinto et al. 2010, Silva et al., 2011, Silva e Carvalho 2014, Vieira et al., 2014, Ferreira et al., 2015).

Juntamente com estudos histológicos que são de fundamental importância durante a regeneração *in vitro*, pois, revelam processos e mecanismos básicos envolvidos na mobilização, reservas, e, na aquisição de competência embriogênica (Silva et al., 2009; Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2014; Rosa et al., 2015; Rocha et al., 2015, Silva et al., 2015). E também organogênica (Vieira et al., 2014, Silva et al., 2011, Rocha et al., 2012, 2014, 2016).

O primeiro capítulo deste trabalho objetivou a regeneração *de novo* no estabelecimento de um protocolo responsivo de organogênese utilizando-se de

diferentes tipos de explantes, análises histoquímicas na mobilização de substâncias ergásticas e avaliação da estabilidade genética de regenerantes obtidos da espécie *Passiflora cristalina*. O segundo capítulo objetivou o estabelecimento de protocolo de embriogênese somática bem como análises histoquímicas em *Passiflora cristalina*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Micropropagação por organogênese em maracujazeiros

A micropropagação tem sido uma ferramenta importante que melhorou a investigação e o desenvolvimento em muitos campos da ciência vegetal, permitindo a investigação fundamental realizada sobre a fisiologia da morfogênese e diferenciação celular (Pipino et al., 2010).

A organogênese ocorre em algumas culturas de células ou de tecidos, em resposta à manipulação de fitormônios (Christianson et al., 1985). É geralmente composta por três fases distintas: a primeira fase caracteriza-se na qual as células são desdiferenciadas para adquirir competência organogênica; a segunda fase em que as células desdiferenciadas são canalizadas e determinadas para a formação de órgãos específicos em resposta a fitormônios exógenos; e a terceira fase em que morfogênese órgão procede de forma independente de fitormônios exógenos (Sugiyama, 1999).

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

2.2. Cultivo *in vitro* a partir de explantes foliares

O cultivo *in vitro* de folha são bastante empregados para regeneração em diversas espécies vegetais como para: damasqueiros *Prunus* spp. (Escalettes e Dosba, 1993); cerejeiras *Prunus avium* L. cv. Burlat, Hedelfinger, Napoleom, Schneiders e *Prunus cerasus* cv. Beutal Spacher Rexelle e Morellenfeuer (Tang et al., 2002); chicória *Eryngium foetidum* L. (Arockiasamy et al., 2002); framboesa *Rubus* (Fiola et al., 1990); maçã *Malus* (Swartz et al., 1990); uva *vitis* spp. (Stamp et al., 1990); Eucalipto *Eucalyptus gunnii* (Hervé et al., 2001); plantas medicinais *Holostemma ada-kodien* Schult. (Martin, 2002); amora *morus* spp. (Chitra e Padmaja, 2005); plantas ornamentais *Dieffenbachia* cv. Camouflage (Shen et al., 2007); *Valeriana jatamansi* Jones (Chen et al., 2014).

Para passifloráceas a regeneração utilizando explantes foliares foram aplicados na regeneração de várias espécies de maracujazeiros como *Passiflora coccínea* utilizando protoplastos derivados de mesófilo foliar (Otoni et al., 1994) e *Passiflora suberosa* L. (Otoni et al., 1996) utilizadas como segmentos foliares em *Passiflora edulis* (Amugune et al., 1993; Dornelas e Vieira, 1994; Faria e Segura, 1997; Gloria et al., 1999; Monteiro et al., 2000; Becerra et al., 2004; Davey et al., 2005; Trevisan e Mendes, 2005; Fernando et al., 2007); *Passiflora caerulea* L. (Jasrai e Mudgil, 1999), (Ozarowski et al., 2013c), (Busilacchi et al., 2008); *P. amethystina*, *P. giberti* *P. mollissima* *P. maliformis* (Dornelas e Vieira, 1994); *Passiflora suberosa* L. (Garcia et al., 2011) *Passiflora foetida* (Komathi et al., 2011); *Passiflora cincinnata* (Lombardi et al., 2007); *P. giberti* e *P. molíssima* (Davey et al., 2005); *Passiflora setacea* (Vieira et al., 2014); *Passiflora alata* (Pinto et al., 2010).

2.3. Cultivo *in vitro* de segmentos hipocotiledonares

Segmentos hipocotiledonares são comumente utilizados como fonte de explante para a regeneração via cultura de tecidos para diversas espécies como: pimenta,

pinhão manso, goiaba, romã, cenoura, berinjela, melão, eucalipto. *Capsicum annuum* (AGRAWAL et al., 1989; Valera-Montero e Ochoa-Alejo, 1992); *Jatropha curcas* (Sujatha e Mukta, 1996); *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda (Singh et al., 2002); *Prunus domestica* L. (Tian et al., 2007); *Daucus carota* (Grzebelus et al., 2012) *Solanum melongena* L. (Mallaya e Ravishankar, 2013); *Cucumis melo* L. inodorus (Ren et al., 2013); *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli (Parmar et a., 2013); *Eucalyptus dunnii* (Oberschelp et al., 2015).

Para Passifloráceas a utilização de segmentos hipocotiledonares são amplamente empregados como destacado na tabela abaixo:

Tabela 01. Revisão da utilização de segmentos hipocotiledonares como fonte de explante em *Passiflora* sp.

Espécies	Reguladores vegetais concentração (μM)	Autor(res)/Ano
<i>Passiflora edulis</i> <i>Passiflora amethystina</i> <i>Passiflora giberti</i> <i>Passifloramollissima</i>	Combinações de ANA e BA em 0,0, 1,0, e 2,0 mg L^{-1} e 0,0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg L^{-1} , respectivamente.	Dornelas e Vieira, 1994
<i>Passiflora edulis</i>	5 μM de BA e 2 μM AIA.	Faria e segura, 1997
<i>Passiflora edulis</i>	4,44 μM de BA	Fernando et al., 2007
<i>Passiflora edulis</i>	4,4. μM de BA	Reis et al., 2007
<i>Passiflora cincinnata</i> e <i>Passiflora edulis</i> "FB-100"	2,21 μM de BA	Dias et al., 2009
<i>Passiflora edulis</i>	4,43 μM de BA	Alexandre, 2008
<i>Passiflora alata</i>	4,43 μM de BA, 2,27 μM TDZ, e combinados BA (4,43 μM) + TDZ (2,27 μM)	Pinto et al., 2010

<i>Passiflora setacea</i> D.C	4.43 μ M BA, 2.27 μ M thidiazuron μ M de TDZ, e suas combinações (4.43 μ M de BA) + (2.27 μ M de TDZ).	Vieira et al., 2014
<i>Passiflora edulis</i>	4.44 μ M BA	Rocha et al., 2016

2.4. Cultivo *in vitro* de segmentos radiculares

Raízes de modo geral são utilizadas para estudos de indução de brotações adventícias em diversas espécies vegetais, pois demonstram bastante sucesso na regeneração *in vitro* (Gamborg et al., 1976).

Em Passifloráceas a utilização de raízes para a indução de brotações adventícias reportadas para os trabalhos em *Passiflora cincinnata* (Lombardi et al., 2007), para *P. cincinnata* e *P. edulis* FB 100, 200 e 300 associando técnicas morfoanatômicas e da estabilidade genética dos regenerantes (Silva et al., 2011), Análises anatômicas e ultra estruturais durante a indução de brotações adventícias em *P. edulis* (Rocha et al., 2012^a), avaliando o tipo de explante, regulador e condições *in vitro* durante a organogênese em *P. setacea* e ainda a estabilidade genética (Vieira et al., 2014), expressão do gene peSERK1 durante a organogênese em *P. edulis* (Rocha et al., 2016).

2.5. Cultivo *in vitro* de cotilédones

O cultivo *in vitro* a partir de cotilédones do embrião zigótico tem sido para a regeneração em diversos vegetais como: mostarda, girassol, canola, couve, romã, marmelo, melancia, *Brassica juncea* L. Czern (Sharma et al.,1990); *Helianthus annuus* L. (Chraibi et al., 1992), *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* (Chi e Pua, 1989); *Brassica oleracea* subsp. *Italica* e *Brassica oleracea* Subsp. *Capitata* (Ravanfar et al., 2014);

Aegle marmelos Corr. (Hossaim et al., 1994) *Punica granatum* L. (Naik e chand, 2003)
Citrullus lanatus T. (Comptom e Gray, 1994).

No entanto, os únicos trabalhos reportando a utilização de cotilédones para regeneração em passifloráceas basearam-se na utilização de cotilédones extraídos de plântulas jovens de híbridos de *Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* com 30 dias de cultivo *in vitro* (Hall et al., 2000). Dornelas e Vieira, (1994) utilizando-se de cotilédones de espécies *P. amethystina*, *P. giberti*, *P. mollissima*, *P. maliformis* e *P. edulis* Sims obtidos a partir de germinação em casa de vegetação e também Carvalho et al. (2013) para *P. gibertii* N. E. Brown na indução de calos.

2.6. Cultivo *in vitro* de tecidos endospermicos

Células vegetais diferenciadas têm uma capacidade incomum para rejuvenescimento por desdiferenciação e diferenciação subsequentemente para formar novos órgãos ou plantas completas (Tirichine et al., 2007). Cultura de tecidos vegetais fornece o melhor meio para promover a totipotência celular de células vegetais e, portanto, é à base da abordagem moderna para o melhoramento de culturas, mesmo as células de endosperma triploides são totipotentes e proporcionam uma abordagem direta e fácil de regenerar plantas triploides difíceis de modo *in vivo* (Chaturvedi et al., 2003). Em plantas diplóides, o endosperma é um tecido triplóide, isto é, contém 3 conjuntos cromossômicos, como resultado de fertilização dupla, que é um processo único em plantas superiores. Durante o processo de fertilização um dos gametas masculinos se funde com o óvulo para formar o zigoto, que mais tarde formará o embrião, o outro gameta masculino funde-se com a célula central, que contém 2 núcleos haplóides, esta segunda fusão frequentemente resulta em uma estrutura triploide, o endosperma. Consequentemente, o endosperma é formado como resultado de fertilização dupla e fusão tripla (ou seja, a fusão entre 3 núcleos haploides diferentes, 1 do gameta masculino e 2 do provenientes do gameta feminino) (Góralski et al., 2005; Thomas e Chaturvedi, 2008; Hoshino et al., 2011).

O endosperma desempenha um papel importante no ciclo de vida de plantas,

mantém um ambiente fisiológico ideal e fornece a nutrição para o embrião em desenvolvimento na maioria das plantas angiospermas (Góralski et al., 2005). Os quais podem conter proteínas, amido ou gorduras os quais o embrião pode utilizar-se destas reservas durante o processo de germinação da semente (Thomas e Chaturvedi, 2008).

Plantas triploides apresentam características de suma importância para uso comercial, por exemplo, podem formar frutos sem sementes (Banana, citrinos, melão) ou pode ter um sabor melhor de que os seus ancestrais diploides (batata), devido a isso, o desenvolvimento de processos eficientes para a produção de triploides é importante para comercial, bem como efeitos de estudos do comportamento *in vitro* (Góralski et al., 2005).

A utilização de tecidos endospermicos para regeneração *in vitro* já foi aplicado para a regeneração de plantas como o sândalo *Santalum album* L. (Sita et al., 1980); *Acacia nilótica* (Garg et al., 1996); *Morus alba*, *Azadirachta indica* (Thomas e Chaturvedi, 2008); *Oriza sativa* (Bajaj et al., 1980); *Zea mays* (Quaile et al., 1991); *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* (Miyashita et al., 2009); *Actinidia deliciosa* Cv. Hayward (Popielarska et al., 2006). Para passifloráceas, trabalhos ainda são bastante escassos. Relatos na literatura de regeneração utilizando-se de tecidos espermáticos foi realizado apenas para *Passiflora foetida* por Mohamed et al. (1996).

2.7. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método rápido e preciso de se medir do conteúdo de DNA nuclear em células vegetais (Dolezel et al., 1989). Onde as suspensões dos núcleos e/ou células permeabilizadas são coradas com um fluorocromo específico para o DNA, onde a quantidade de luz emitida por cada núcleo é quantificada e o resultado da análise é geralmente apresentado na forma de um histograma de fluorescência de intensidade, que representa o conteúdo relativo de DNA (Yanpaisan et al., 1999; Dolezel e Bartos, 2005). A citometria de fluxo é uma ferramenta muito poderosa para analisar heterogeneidade em populações de células (Yanpaisan et al., 1999).

Estudos avaliativos sobre o nível de ploidia e estabilidade genética do material regenerado aplicados em passifloráceas foram realizados por Pinto et al. (2010) avaliando os diferentes níveis de ploidia obtidos de regenerantes oriundos durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*, Silva et al. (2011), avaliando a estabilidade genética durante o tempo e cultivo *in vitro* por meio da embriogênese *P. cincinnata* (Silva e Carvalho, 2014), avaliando a estabilidade dos regenerantes obtidos durante a organogênese em *P. setacea* entre regenerantes obtidos por meio de folhas, hipocótilos e raízes (Vieira et al., 2014), avaliando o nível de ploidia e estabilidade genética em regenerantes provenientes de embriogênese somática em *Passiflora miniata* e *Passiflora speciosa* (Ferreira et al., 2015).

2.8. Embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo através do qual uma única célula vegetal ou grupo de células do tecido somático formam embriões, estruturas bipolares que carregam órgãos embrionários típicos, a radícula, hipocótilo e cotilédones, a maior importância dos embriões somáticos é sua aplicação praticidade na propagação vegetativa em grande escala, e ainda transformação genética (Arnold et al., 2002; Otoni et al., 2013; Pilarska et al., 2015).

A embriogênese somática tem sido considerada, como uma ferramenta para a propagação clonal de culturas, e teoricamente como um sistema modelo para identificar os mecanismos que regulam a embriogênese de plantas aos níveis moleculares, celulares e tecidual, devido à acessibilidade de embriões em todas as fases de desenvolvimento, e assim compreender os eventos moleculares fundamentais que desencadeiam a embriogênese somática o que poderia nortear o aperfeiçoamento dos protocolos de propagação *in vitro* (Mahdavi-Darvari et al., 2014).

Embora os mecanismos que induzem a embriogênese são bastante complexos, eles são semelhantes entre diferentes espécies de plantas (Mahdavi-Darvari, et al., 2014). A transição de células somáticas para embriogênicas compreendem três fases:

indução embriogênica, fase embrionária, e expressão do programa embriogênico onde os genes que funcionam em estágios em células diferenciadas são suprimidos e os genes necessários para a embriogênese são ativados (Mahdavi-Darvari, et al., 2014).

Para passifloráceas protocolos regenerativos por embriogênese somática baseiam-se no protocolo estabelecido por Silva et al., (2009) para espécie *Passiflora cincinnata* Masters considerada uma espécie modelo para o gênero, o que possibilitou a aplicação de protocolos regenerativos para espécies como *Passiflora miniata* e *Passiflora speciosa* Ferreira et al., (2015), *P. alata*, *P. crenata*, *P. edulis* e *P. gibertii* (Rosa et al., 2015), *Passiflora cincinnata* Pinto et al., (2010) estudos avaliando o tempo de cultivo durante embriogênese em *P. cincinnata* (Silva e Carvalho, 2014), estudos avaliando técnicas histocitológicas e histoquímicas em *P. edulis* (Rocha et al., 2012), estabilidade genética por citometria de fluxo dos eventos embriogênicos (Pinto et al., 2010^b) Histoquímica verificando a mobilização e metabolização de compostos ergásticos durante a embriogênese somática (Silva et al., 2015).

E ainda como fonte de explante utilizaram embriões zigóticos para a indução da embriogênese em *Passiflora edulis* (Pinto et al., 2011), *P. alata* Curtis, *Passiflora crenata*, *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora gibertii* (Rosa et al., 2015), *Passiflora miniata* e *Passiflora speciosa* (Ferreira et al., 2015) *Passiflora edulis* Sims (Rocha et al., 2014; Silva et al., 2015) assim como estabelecido em *P. cincinnata* por (Silva et al., 2009).

2.9. Metabolismo e expressão gênica durante a embriogênese

A capacidade de uma célula vegetal em adquirir competência e assumir um novo destino de desenvolvimento depois da modulação das condições da cultura, representa a base da cultura de tecidos vegetais, este método tem contribuído para a biotecnologia vegetal contemporânea, permitindo que a sofisticação das práticas de clonagem (Rocha et al., 2015).

O processo de totipotência em células somáticas de plantas ocorre mediante a indução do processo de desdiferenciação e depois rediferenciação celular para gerar

embrióides viáveis é definida como embriogênese somática (ES), e assume duas formas de origem de embriões somáticos diretamente, de células vegetativas (ES direta) ou indiretamente a partir da fase intermediária da formação de calo (ES indireta) (Wu et al., 2015).

Uma vez que as células somáticas expressam a totipotência, muitas cascatas de sinais são ativadas para promover a divisão celular e a mudança de células meristemáticas a partir do qual embriões somáticos se desenvolvem, com base nas suas funções, a regulação dos genes durante o estágio de desenvolvimento pode ser divididos em três categorias principais, o ciclo celular, a formação e regulação do meristema e a transdução de sinais em cascata (Elhiti et al., 2013).

Compreender as interações entre os fatores chaves que iniciam embriogênese somática é um desafio na biologia molecular moderna, existem agora muitas novas técnicas moleculares que permitem a dissecação da rede molecular em diferentes estágios de desenvolvimento (Elhiti et al., 2013).

Na fase de indução da embriogênese somática, alguns genes são ativados por aplicação de hormônios exógenos ou até mesmo, stresses que por sua vez podem induzir a formação de células embriogênicas durante a fase de indução, que é dividida em três fases: desdiferenciação, expressão da totipotência e determinação celular (Elhiti et al., 2013).

Os genes responsáveis pelo controle da embriogênese somática são vários, alguns identificados incluem: ARF19, PRC1, WUS, STM, LEC1, CDKA; 1, SERK1, PRZ1, CLF, GLB1, HSP17, e RGP-1 (Elhiti et al., 2013). BABYBOOM1, LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), e LEC2 (Malik et al., 2007). DC8, DC49, DC59, DC3, DC5, DC13, EMB-1, ECP31, ECP40, EP2, EP3, DC1.2, DC2.26,3.1, DC2.15, DC4.2, DC7.1, DC9.1, DC10.1, EF- α , ATP-D e CEM1 (Zimmerman, 1993).

2.10. Histoquímica e mobilização de reserva

Estudos histológicos podem revelar os acontecimentos da divisão celular que ocorrem durante a regeneração de plantas *in vitro*, contribuindo assim para a compreensão do desenvolvimento da planta (Almeida et al., 2012). E também dos mecanismos básicos envolvidos na aquisição de competência embriogênica (Rocha et al., 2012).

A histoquímica na cultura de tecidos associada a diferentes técnicas tem sido bastante utilizada, pois, revela-se como uma ferramenta bastante útil frente à resposta morfogênica no estágio inicial de indução da organogênese em folhas, hipocótilos e raízes em *P. setacea* (Vieira et al., 2014) ápices caulinares de pupunha *Bactris gasipaes* (Almeida et al., 2012), durante organogênese em raízes em *P. cincinnata* e *P. edulis* para identificação de conexões vasculares (Silva et al., 2011) e também durante a embriogênese somática caracterizando regiões histológicas e também de células embriogênicas em *P. cincinnata* (Silva et al., 2009); análises histocitológicas e histoquímicas durante a embriogênese somática em *P. cincinnata* (Rocha et al., 2012^b), caracterização anatômicas e morfológica durante a embriogênese em *Passiflora edulis* (Rocha et al., 2015^b); e em *Passiflora alata*, *Passiflora crenata*, *Passiflora edulis*, *Passiflora gibertii* (Rosa et al., 2015) análises histoquímicas durante a embriogênese somática em *Passiflora edulis* (Silva et al., 2015).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**. 166: 307-315, 2009.
- ALMEIDA, M. A. C. B.; NAKAZAWA, G. T.; MADALENA, B.; MENDES, J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**. 57: 571-573, 2000.
- ALVES, E. C. S. D. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogenesis of the leaf explant of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39: 421-430. 2004.
- ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M.; BRUCKNER C. H.; LOPES, J. C. In vitro propagation of passionfruit. In: Alexandre RS, Bruckner CH, Lopes JC (eds.). Propagation of Passionfruit: Morphological, Physiological and Genetic Aspects. **EDUFES**, 117-184, 2009.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant cell reports**. 31: 1495-1515, 2012.
- AMUGUNE, N. O.; GOPALAN, H. N. B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**. 1: 99-104, 1993.
- ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 22: 87-91, 2012.
- AROCKIASAMY, S.; PRAKASH, S.; IGNACIMUTHU, S. Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L. **Biologia plantarum**. 45: 129-132, 2002.

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

ASADUJJAMAN, Md et al. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of integrative medicine**. 12: 121-126, 2014.

BAJAJ, Y. P. S.; SAINI, S. S.; BIDANI, M. Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice. **Theoretical and Applied Genetics**. 58: 17-18. 1980.

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.

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

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

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

CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K. D.; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. D. L.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **Antioxidant capacity** and chemical composition of passion fruit peel (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**. 44: 1699-1704, 2014.

COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C. B. B.; SCHUMACHER, N. S. G.; MARÓSTICA, M. R.; MELETTI, L. M. M.; ZOLLNER, R. L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International immunopharmacology**. 18: 106-115, 2014.

- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. **HortScience**. 29: 211-213. 1994.
- CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Plant Physiology**. 160: 557-564. 2003.
- CHEN, R.; ZHANG, M.; LÜ, J.; ZHANG, X.; SILVA, J. A. T.; MA, G. Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf explants of *Valeriana jatamansi* Jones. **Scientia Horticulturae**. 165: 392-397. 2014.
- CHI, G. L.; PUA, E. C. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*. **Plant Science**. 64: 243-250, 1989.
- CHITRA, D. V., & PADMAJA, G. Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. **Scientia horticulturae**. 106: 593-602, 2005.
- CHRAIBI, K. M.; CASTELLE, J. C.; LATCHE, A.; ROUSTAN, J. P.; FALLOT, J. A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) the role of ethylene. **Plant Science**. 86: 215-221, 1992.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**. 112: 494-497, 1985.
- CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30: 875-879, 2008.
- DAVEY M. R.; ANTHONY P.; POWER J. B.; LOWE K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**. 23: 131-171, 2005.

- DENG, J., ZHOU, Y., BAI, M., LI, H., LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of ethnopharmacology**. 128: 148-153, 2010.
- DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LCRETI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**. 31: 113-120, 1989.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. 95: 99-110. (2005).
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.; ANUPAM. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**. 94: 1-23, 2004.
- DREW, R. **A Micropropagation of Passiflora species (Passion fruit)**. In: Bajaj YPS (ed.) *Hightech and Micropropagation*. Springer-Verlag. p. 135-149, 1997.
- DIAS, L. L.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D. M.; BARROS, R. S.; FLOH, E. I.; OTONI, W. C Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 99: 199-208, 2009.
- DORNELAS, M. C.; CARNEIRO VIEIRA, M. L. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 36: 211-217, 1994.
- DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; OLIVIERA, J. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**. 15: 106-110, 1995.
- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 49: 631-642, 2013.
- ESCALETES, V.; DOSBA, F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. **Plant Science**. 90: 201-209, 1993.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. D. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. D. S.; CUNHA, M. A. P. D. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**. 66: 535-543, 2007.

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

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

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

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

FIOLA, J. A.; HASSAN, M. A.; SWARTZ, H. J.; BORS, R. H.; MCNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 20: 223-228, 1990.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I. K. Plant tissue culture media. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 12: 473-478, 1976.

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

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

GERÔNIMO, I. G. C. **Caracterização de espécies silvestres de passiflora via análise meiótica e conteúdo 2c DNA**. Campos dos Goytacazes: UNIVERSIDADE

ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF, 54 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).

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

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

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

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

HENDRIX, R. C.; LITZ, R. E.; KIRCHOFF, B. K. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl, *S. quitoense* Lam. (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 11: 67-73, 1987.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIERES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**. 161: 645-653, 2001.

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

HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; KARIM, M. R.; JOARDER, O. I.; BISWAS, B. K. Regeneration of plantlets from in vitro cultured cotyledons of *Aegle marmelos* Corr.(Rutaceae). **Scientia Horticulturae**. 57: 315-321, 1994.

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

JASRAI, Y. T.; MUDGIL, Y.; REMAKANTHAN, A.; KANNAN, V. R. Direct shoot regeneration from cultured leaves of *Passiflora caerulea* L. and field performance of regenerated plants. **Phytomorphology**. 49: 289-293, 1999.

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

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

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

KRIEKEN V. D, W. M.; CROES, A. F.; SMULDERS, M. J.; WULLEMS, G. J. Cytokinins and Flower Bud Formation *in vitro* in Tobacco Role of the Metabolites. **Plant Physiology**. 92: 565-569, 1990.

LIEW, S. Q.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. 2: 231-236. 2014.

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

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 120: 407-422. 2015.

MALIK, M. R., WANG, F., DIRPAUL, J. M., ZHOU, N., POLOWICK, P. L., FERRIE, A. M., KROCHKO, J. E. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. **Plant Physiology**. 144: 134-154. 2007.

MARTIN, K. Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. **Plant Cell Reports**. 21: 112-117, 2002.

MEDLEY, P., BOLLHÖFER, A., PARRY, D., & MARTIN, P. Radium concentration factors in passionfruit (*Passiflora foetida*) from the Alligator Rivers Region, Northern Territory, Australia. **Journal of Environmental Radioactivity**. 126: 137-146. 2013.

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

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

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

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

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

NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Journal of Plant Physiology**. 160: 423-430, 2003.

NARDIN, C. F.; BERNACCI, L. C.; PLOTZE, R. O.; BRUNO, O. M.; SHEPHERD, G. J. Recognition and differentiation of species in the *Passiflora sidifolia* complex. **Botany**. 93: 809-824, 2015.

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

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, p. 1-17. 2013.

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

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

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

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**, 3rd edn. Churchill-Livingstone, London, 1972.

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

PINTO, D. L. P.; ALMEIDA B. B.; 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.

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.

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

POPIELARSKA, M. A. R. Z. E. N. A.; SLESIAK, H.; GORALSKI, G. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** 48: 97-104. 2006.

QUAYLE, T. J.; HETZ, W.; FEIX, G. Characterization of a maize endosperm culture expressing zein genes and its use in transient transformation assays. **Plant Cell Reports**. 9: 544-548. 1991.

RAVANFAR, S. A.; AZIZ, M. A.; RASHID, A. A.; SALIM, S. In vitro adventitious shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica oleracea* subsp. *italica* and *Brassica oleracea* subsp. *capitata* using TDZ and NAA. **Pakistan Journal of Botany** 46: 329-33, 2014.

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

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio

between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 120: 1087-1098, 2015.

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

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

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

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

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

REIS, L. B.; COSTA, R. R.; OTONI, W. C. INFLUÊNCIA DE AGENTES GELIFICANTES NA ORGANOGÊNESE IN VITRO DE EXPLANTES JUVENIS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEGENER). PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION, **Plant Cell Culture Micropropagation**.1:80-88, 2005.

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

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

SARAVANAN, S.; KARUPPUSAMY, A.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves—A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**. 54: 272-280, 2014.

SHANMUGAM S.; PARIMELAZHAGAN, T. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. **Food Science and Human Wellness**. 3: 56-64, 2014.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R.; GARCIA, P. S.; CARMEN, L. D. O., JAGADEVAN, S.; GIMENES, M. L. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**. 38: 186-192. 2014.

SHARMA, K. K.; BHOJWANI, S. S.; THORPE, T. A. Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. **Plant Science**. 66: 247-253. 1990.

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

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

SHEN, X.; CHEN, J.; KANE, M. E. Indirect shoot organogenesis from leaves of *Dieffenbachia* cv. *Camouflage*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89: 83-90, 2007.

- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 51: 247-258, 2008.
- SILVA, C. V.; DE OLIVEIRA, L. S.; LORIATO, V. A. P.; SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; Oliveira, J. E.; OTONI, W. C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 107: 407-416, 2011.
- SILVA, G. M.; CRUZ, A. C.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 1-7, 2015.
- SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 47-54. 2009.
- SILVA, T. C. R.; CARVALHO, C. R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 50: 158-165, 2014.
- SILVEIRA, G. F. **Diversidade genética e aspectos reprodutivos de *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi, uma espécie nativa da Amazônia Matogrossense**. Alta Floresta: Universidade do Estado De Mato Grosso – UNEMAT, 81 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).
- SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R. K. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. **Journal of Ethnopharmacology**. 139: 273-279, 2012.
- SITA, G. L.; RAM, N. R.; VAIDYANATHAN, C. S. Triploid plants from endosperm cultures of sandalwood by experimental embryogenesis. **Plant Science Letters**. 20: 63-69, 1980.

STAMP, J. A.; COLBY, S. M.; MEREDITH, C. P. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 22: 127-133, 1990.

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

SWARTZ, H. J.; BORS, R.; MOHAMED, F.; NAESS, S. K. The effect of in vitro pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 21: 179-184. 1990.

TANG, H.; REN, Z.; REUSTLE, G.; KRCZAL, G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**. 93: 235-244, 2002.

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

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

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

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

VERMA, S.; KHARE, P.; YADAV, G. Investigation of Anti-inflammatory Activity of *Passiflora nepalensis* Against Carrageenan Induced Inflammation in Rats. **Global Journal of Pharmacology**. 9: 13-16, 2015.

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

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. *Passiflora* spp. Passionfruit. General Editor: Gabrielle J. Persley, **The Doyle Foundation, Glasgow**. 436, 2005.

WU, X. M. ; KOU, S. J. ; LIU, Y. L. ; FANG, Y. N. ; XU, Q. ; GUO, W. W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA-and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Journal**. 13: 383-394, 2015.

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

YANPAISAN, W.; KING, N. J.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**.17: 3-27, 1999.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**. 96: 86-91. 2010.

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

Capítulo I

Organogênese, histoquímica e avaliação da estabilidade genética em regenerantes obtidos a partir de diferentes tecidos em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi

RESUMO

O presente trabalho objetivou a regeneração *de novo* no estabelecimento de um protocolo responsivo de organogênese utilizando-se de diferentes tipos de explantes, análises histoquímicas na mobilização de substâncias ergásticas e avaliação da estabilidade genética de regenerantes obtidos da espécie *Passiflora cristalina*. Sementes de *P. cristalina* foram obtidas a partir de coletas em populações silvestres no município de Alta Floresta/MT. Primeiramente, com o auxílio de uma mini-morsa retirou-se o tegumento das sementes, e em condições assépticas foram desinfestadas e germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$. Após 30 dias de cultivo foram obtidas plântulas com ± 10 cm de altura que foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos foliares ± 1 cm³, hipocotiledonares e radiculares com ± 1 cm foram inoculados em meio contendo sais básicos e vitaminas de MS, 4,5% (p/v) de mio-inositol, 1% (p/v) 30% (p/v) sacarose, e 8,5% (p/v) de Ágar (p/v), juntamente com diferentes concentrações de reguladores de crescimento: Benzil-adenina (BA), 2.21, 4.43, 6.65, 8.87 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 0.0 $\mu\text{M L}^{-1}$, Tidiazuron (TDZ), 2.27, 4.54, 6.81, 9.08, $\mu\text{M L}^{-1}$ e Cinetina (CIN) 2.32, 4.64, 6.97, 9.29 $\mu\text{M L}^{-1}$. Os cotilédones do embrião e endosperma das sementes foram desinfestadas e cultivados nas mesmas condições. Os experimentos foram mantidos em sala de cultivo sob irradiância, à temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$. A análise estatística baseou-se em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três repetições a avaliadas pelo teste de médias Scott-Knott ($p \leq 0.05$). Para segmentos foliares a concentração que melhor induziu brotações foi de 8.87 μM de BA correspondendo a 368,22 brotos em 60 dias de cultivo e 299,33 em 90 dias. Para segmentos hipocotiledonares a concentração que melhor correspondeu em brotações foi de 4.43 μM de BA com 744,66 em 40 dias e 1396,66 em 60 dias. Para segmentos radiculares as maiores médias foram para CIN com 4.64 μM com 44 brotos em 15 dias e 2.32 μM com 25.33 brotos para 30 dias. Utilizando-se de cotilédones as melhores médias em brotações se deram para a concentração de 4.43 μM de BA em 30 dias de cultivo e 8.87 μM de BA em 50

dias, para TDZ se deu para a concentração de 2.27 μM com 158.66 em 30 dias e 4.54 μM com 368.66 em 50 dias. Para endosperma as médias não diferiram entre si pelo teste de média para os reguladores utilizados BA, TDZ e CIN. Os testes histoquímicos evidenciaram o consumo energético pela metabolização celular durante a morfogênese *in vitro*, e, pelas análises de citometria de fluxo foi possível identificar alterações no conteúdo de DNA dos eventos organogênicos em tetraploides (4n) de brotos originados do hipocótilo e triploides (3n) oriundos de tecidos endospermicos, para as amostras dos regenerantes obtidos a partir de folhas e raízes e cotilédones o conteúdo de DNA permaneceu diploide (2n).

Palavras-chave: Regeneração, histoquímica, citometria de fluxo, mobilização de reservas.

Organogenesis, histochemical evaluation and genetic stability of regenerants obtained from different tissues in *Passiflora cristalina* Vanderplank and Zappi

ABSTRACT

This study aimed the regeneration *de novo* in the establishment of a responsive protocol organogenesis using different types of explants, histochemical analysis in mobilizing ergastic substances and evaluation of genetic stability of regenerants obtained of specie *Passiflora cristalina*. Seeds of *P. cristalina* were obtained from collections in wild populations in the municipality of Alta Floresta/MT. Initially, with the assistance of a mini-vise withdrew tegument of seeds, and in aseptic conditions were sterilized and germinated on medium MS½. After 30 days of culture plantlets were obtained at ± 10 cm which were used as a source of explants. Leaf segments ± 1 cm³, hypocotyl and root were inoculated with ± 1 cm in basic medium containing MS salts and vitamins, 4.5% (w/v) myo-inositol, 1% (w/v) to 30% (w/v) sucrose and 8.5% (w/v) agar (w/v) together with different concentrations of growth regulators: Benzyladenine (BA), 2.21, 4.43, 6.65, 8.87 µM L⁻¹ and 0.0 µM L⁻¹, thidiazuron (TDZ), 2.27, 4.54, 6.81, 8.9, µM L⁻¹ and Kinetin (KIN) 2.32, 4.64, 6.97, 9.29 µM L⁻¹. The cotyledons of the embryo and endosperm of the seeds were sterilized and cultivated under the same conditions. The experiments were kept in culture room under irradiance, temperature 27 ± 2 ° C. The statistical analysis is based on a completely randomized design (CRD) consists of three repetitions evaluated by means of test Scott-Knott (p ≤ 0.05). For leaf segments concentration that best induced shoots was 8.87 µM BA corresponding to 368.22 shoots 60 days of culture and 299.33 in 90 days. For segments hypocotyledonary the concentration that best matches in shoots was 4.43 BA µM with 744.66 in 40 days and 1396.66 in 60 days. To root segments the highest averages were for CIN with 4.64 µM with 44 shoots in 15 days and 2.32 µM with 25.33 shoots for 30 days. Using cotyledons the best averages shoots occurred to the concentration of 4:43 mM of BA 30 days of cultivation and 8.87 mM of BA 50 days to TDZ occurred to the concentration of 2.27 uM with 158.66 in 30 days and 4:54 uM with 368.66 in 50 days. Endosperm to the averages do not differ by average test for regulators used BA, TDZ and KIN. The histochemical tests showed the energy consumption by the cellular metabolism during morphogenesis *in vitro*, and, by analysis of flow cytometry it was possible to identify changes in the DNA content of organogenic

events in tetraploid (4n) of shoots originated from hypocotyl and triploid (3n) derived from endosperm tissues, for the samples of regenerants obtained from leaves and roots and cotyledons the DNA content remains diploid (2N).

KEY-WORDS: Regeneration, Histochemical, Flow cytometry, Reserve mobilization.

1. INTRODUÇÃO

A habilidade das plantas em produzir novos órgãos adventícios ao longo de seu ciclo de vida é a base para a aplicação da técnica da cultura de tecidos e para o estabelecimento de um sistema de regeneração (Rocha et al., 2016). Os principais tipos de regeneração das plantas são pelas vias *de novo* organogênese e a embriogênese somática (Xu e Huang, 2014).

A organogênese é uma técnica que se baseia na regeneração *de novo* onde ocorre a formação de gemas e raízes sob condições *in vitro*, que pode ser pela de forma direta ou indireta. O sucesso para esta via de regeneração depende do tipo de explante e dos reguladores de crescimento que se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (Moura et al., 2001; Nick, 2014; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2016). Para a obtenção de brotações pela via *de novo* da organogênese padrões morfogênicos são definidos, primeiramente ocorre a aquisição da competência, que precede a fase da indução e a competência das células ou dos tecidos comprometidos e direcionados ao desenvolvimento dos órgãos (Wareing 1982; Duclercq et al. 2011).

O sistema de regeneração de maracujazeiro é baseado na organogênese (Zerbini et al., 2008; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012; Rocha et al., 2016), e tem sido a principal via de regeneração para o gênero *Passiflora*. Embora recentemente alguns estudos tenham demonstrado a regeneração pela embriogênese somática (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2011; Rosa et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Silva et al., 2015). A via *de novo* a partir da organogênese é a rota preferencial para a aplicação na biotecnologia contemporânea, devido às condições de cultivo ser relativamente simples e os resultados satisfatórios (Duclercq et al. 2011; Rocha et al., 2016).

São reportados estudos sobre regeneração pela via organogênica para diversas Passifloráceas utilizando-se de diferentes tipos de explantes como segmentos nodais, intermodais e foliares (Garcia et al., 2011; Pacheco et al., 2012) em segmentos radiculares de *P. cincinnata* e *P. edulis* (Silva et al., 2011), hipocotiledonares (Vieira et al., 2014, Rocha et al., 2016), segmentos nodais em *P. foetida* (Anand et al., 2012; Shekhawat et al., 2015).

Durante o sistema de regeneração *in vitro* requer a disponibilidade e o acúmulo de substâncias de reservas para o desenvolvimento do novo propágulo. Os métodos histoquímicos possibilitam a análise na mobilização de reservas e a síntese de reserva durante a regeneração *de novo* o que leva a reconhecer regiões que demandam alto gasto energético (Cangahuala-Inocente et al. 2009). Estudos que envolvem a histoquímica na mobilização de reservas no gênero *Passiflora* ainda são pouco relatados na literatura (Fernando et al. 2007; Rocha et al., 2012; Silva et al., 2015).

Em recente revisão realizada por Xu e Huang (2014), sugerem os hormônios utilizados durante o cultivo *in vitro* respondem aos fatores de transcrição para determinar a transição e o destino das células e, que está etapa requer alterações no genoma e na expressão gênica, que são regulados pela rota epigenética.

A instabilidade genética tem sido comumente observada em plantas derivadas desses sistemas de cultivo *in vitro*. Essas alterações no genoma pode limitar o uso de sistemas de regeneração em plantas, particularmente no que se refere a propagação massal e para a transformação genética (Paim-Pinto et al., 2010; Smulders e de Klerk 2011).

A citometria de fluxo é um método rápido e confiável para determinar o conteúdo de DNA nuclear e níveis de ploidia relativas de amostras celulares com resultados reprodutíveis (Ribalta et al., 2012). Plantas obtidas de sistemas de regeneração em *Passiflora* tem sido avaliadas devido a possíveis instabilidades genéticas.

Estudos avaliativos sobre o nível de ploidia e estabilidade genética do material regenerado aplicados em passifloráceas foram realizados por Pinto et al. (2010) avaliando os diferentes níveis de ploidia obtidos de regenerantes oriundos da embriogênese somática em *P. cincinnata*; Silva et al. (2011), avaliando a heterogeneidade vertical do DNA de plantas obtidas por meio da embriogênese também em *P. cincinnata* (Silva e Carvalho, 2014), avaliando a estabilidade dos regenerantes obtidos durante a organogênese, *P. setacea* por meio de folhas, hipocótilos (Vieira et al., 2014), avaliando o nível de ploidia e estabilidade genética em regenerantes provenientes de embriogênese somática em *P. miniata* e *P. speciosa* (Ferreira et al., 2015).

A espécie *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi foi identificada pela primeira vez no município Novo Mundo no estado de Mato Grosso, no parque estadual cristalino, limite nordeste do parque no ano de 2008 por (Vanderplank e Zappi, 2011). É uma planta pouco estudada (Gerônimo, 2014; Silveira, 2015), possuem flores vistosas avermelhadas, seus frutos são ovalados e de sabor levemente adocicado (Vanderplank e Zappi, 2011). A espécie possui potencial para a utilização principalmente na ornamentação, entretanto, não se tem conhecimento sobre a existência de resistência aos fitopatógenos que afetam principalmente a cultura de *Passiflora edulis* e outras espécies comerciais.

O presente trabalho objetivou a regeneração *de novo* no estabelecimento de um protocolo responsivo de organogênese utilizando-se de diferentes tipos de explantes, análises histoquímicas na mobilização de substâncias ergásticas e avaliação da estabilidade genética de regenerantes obtidos da espécie *Passiflora cristalina*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, situado no CEPDA, Universidade do estado de Mato Grosso - MT *campus* Universitário de Tangará da Serra – Mato Grosso, Brasil, e no Laboratório de Cultura de Tecidos situado no Bioagro na Universidade Federal de Viçosa – MG.

2.2. Obtenção de sementes, assepsia e inoculação de explantes em meio de cultivo

Sementes de *Passiflora cristalina* foram obtidas a partir de coletas em populações silvestres localizadas na região de Alta Floresta – MT, Brasil. Posteriormente os tegumentos das sementes foram extraídos, com auxílio de mini-morsa de acordo com (Reis et al., 2007 e Silva et al., 2009). Em câmara de fluxo vertical sementes de *P. cristalina* foram desinfestadas, mediante a imersão em álcool 70% (v/v) por 3 minutos, posteriormente em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v)

por 25 minutos, acrescido de três gotas do agente surfactante Tween-20 a 0,1% (v/v).

Em seguida, as sementes foram submetidas a 4 enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada e após foram mantidas (over night) em água destilada estéril, posteriormente, em condições assépticas ainda em fluxo foram secas em papel germiteste e germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$, para a posterior obtenção e utilização como fonte de explantes: folhas $\pm 1,0$ cm³, hipocótilos e raízes. $\pm 1,0$ cm

Para cotilédones do embrião e endosperma as sementes foram desinfestadas, em seguida mantidas em overnight e, posteriormente secas. Todos os explantes foram cultivados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de MS, 4,5% (p/v) (Laborclin®) de mio-inositol, 1% (p/v) 30% (p/v) sacarose, e 8,5% (p/v) de Ágar, (acumedia®, Michigan) (p/v) como agente gelificante, juntamente com diferentes concentrações de reguladores de crescimento: Benzil-adenina (BA) nas concentrações de 2.21, 4.43, 6.65 e 8.87 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 0.0 $\mu\text{M L}^{-1}$, Tidiazuron (TDZ), 2.27, 4.54, 6.81, 9.08, $\mu\text{M L}^{-1}$ e Cinetina (CIN) 2.32, 4.64, 6.97, 9.29 $\mu\text{M L}^{-1}$ e MSØ como controle. Os experimentos foram mantidos em sala de cultivo sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes, à temperatura 27 ± 2 °C.

Foram realizadas duas avaliações, sendo, para tecidos foliares em 60 e 90 dias de cultivo, hipocotiledonares 40 e 60 dias, radiculares 15 e 30, cotiledonares 30 e 50 e endospermicos 30 e 40.

2.3. Delineamento Experimental

A análise estatística baseou-se em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três repetições entre os três tratamentos (BA, TDZ e CIN) em 13 concentrações diferentes, onde foram avaliados a frequência de brotos, raízes e calos, o teste estatístico utilizado baseou-se no teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0.05$) realizado por meio do software Sisvar (Ferreira, 2011).

2.4. Caracterização Histoquímica

Para caracterização histoquímica explantes foliares, hipocotiledonares, radiculares, cotiledonares e endospermicos de *P. cristalina* foram coletados com 20 dias após a indução da organogênese e cotilédones aos zero dias de cultivo. Os explantes foram fixados em solução (Karnovsky, 1965) constituída por 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato, pH 7,2. As amostras foram desidratadas em série etílicas e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA), foram obtidos cortes seriados transversais e longitudinais das amostras com 5 µm de espessura.

Testes histoquímicos foram realizados com Ácido periódico de Shiff (PAS; O'Brien e McCully 1981) para a detecção de polissacarídeos neutros, Xilidine Ponceau (XP; Vidal, 1970) para a detecção de proteínas totais, Lugol (Johansen, 1940) para a detecção de grânulos de amido, Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940) para detecção de pectinas, Sudan Balck B (Pearse, 1972) para a detecção de lípídeos totais.

As observações e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

2.5. Análise da Estabilidade Genética

Para avaliar o nível de ploidia das plantas regeneradas, fragmentos de aproximadamente 2 cm² de folhas jovens e vigorosas foram seccionadas com uma lâmina afiada de inox 0,5mm, em uma placa de Petri 60x15 mm com 0,5 mL do tampão de extração OTTO-I (Otto, 1990), suplementados com 2,0 mM de DTT (Sigma®), a um pH 2.3. Em seguida 0,5 mL do OTTO-I (Otto, 1990), onde foram adicionados homogeneizados e posteriormente filtrados em filtro de nylon (30 µm, Partec®),

centrifugados a 100 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido e incubado por 10 minutos em tampão de extração OTTO-I (Otto, 1990). A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução OTTO-II (Otto, 1990) acrescida de 75 μ M de iodeto de propídeo (IP, Sigma®), pH 7,5 (Dolezel et al., 1992) durante 20 minutos, e em seguida filtrada em filtros de nylon (20 μ m, Partec®).

A leitura da solução foi realizada com auxílio de um citômetro de fluxo BD FACSVerserTM localizado no centro de microscopia da UFV, Inicialmente foi estabelecido um valor padrão (plantas juvenis de *P. cristalina* obtidas da germinação de sementes *in vitro*), onde as análises foram subdivididas em três períodos (1^o, 2^o e 3^o), sendo dois padrões no primeiro período (1^o) e um padrão para cada período (2^o e 3^o) deste modo, estabeleceu-se o pico obtido a partir da análise do padrão no momento da calibração do citômetro (padrão diploide 2n pico em 10³).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos explantes foliares após 20 dias de cultivo observou-se o intumescimento na região do bordo das folhas em todo o explante e a formação de protuberâncias coloração esverdeada no plano abaxial (Figura 1A) que após os 40 dias de cultivo se diferenciaram em brotações adventícias (Figura 1B).

A citocininas BA foi o regulador que melhor induziu brotações na concentração de 8.87 μ M em 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* correspondendo a 368.33 e 299.33 (Tabela 2) e (Figura 1B) de forma direta e indireta (Figura 1B).

Vieira et al., (2014) obtiveram brotações utilizando BA na concentração de 4.43 μ M, correspondendo a médias de brotações em 50.0% de forma direta e indireta em *Passiflora setacea*. Cultivando tecidos foliares provenientes de espécies de *Passiflora* spp. (Amugune et al., 1993; Becerra et al., 2004; Fernando et al., 2007; Lombardi et al., 2007; Busilacchi et al., 2008; Pinto et al., 2010; Vieira et al., 2014), a utilização de BA para a indução da organogênese está entre concentrações de 4.43 a 6.65 μ M, entretanto, para *P. cristalina* foi necessário uma maior concentração de 8.87 μ M de BA para a obtenção brotações adventícias (Tabela 2) (Figura 1B).

CIN não induziu brotações adventícias entre as diferentes concentrações testadas em *P. cristalina* (Figura 1F).

Também foi observado a redução entre médias observadas durante 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* em explantes foliares o que pode ser explicado pelo fato da senescência (Figuras D e E), sendo observadas nas concentrações de 2.21, 4,43 μM de BA e 2.27, 4.54, 6.81, 9.08 μM de TDZ (Tabela 2). Brotações com características de hiperidricidade foram observadas (Figura 1C). O longo período de exposição dos explantes provavelmente favoreceu a hiperidricidade dos materiais, isso acarretou em redução no número de brotações, alongamento e explantes senescentes como observado na (Figuras 1C e D).

Para os reguladores TDZ e CIN as médias não diferiram entre si, ainda que o TDZ tenha induzido brotações expressivas entre 60 dias de cultivo com 77,33 brotos e 90 dias com 86.33 para a concentração de 9.08 μM (Tabela 2). Entre os tratamentos não houve a produção de raízes (Tabela 2). BA e TDZ A produção de calos durante a organogênese em *P. cristalina*, foram observadas médias maiores para TDZ pela concentração de 2.27 μM com 10 calos, seguido de 6.81 μM com 9 calos e 9.08 μM com 8 calos. Utilizando BA as médias foram em 8.87 μM correspondendo a 8 calos seguido de 6.65 μM com 7.33 e 4.43 e 2.21 μM com 7 (Tabela 2).

Os segmentos foliares cultivados na ausência de regulador de crescimento não induziu brotações, raízes ou calos em explantes foliares de *P. cristalina*. (Tabela 2).

Tabela 2. Médias do número de brotos, raízes e calos obtidos em explante foliares de *P. cristalina*.

		Médias/dias					
		Brotos		Raízes		Calos	
Regulador/crescimento	[μ M]	60	90	60	90	60	90
BA	0.0	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0	0,0 ^b
	2.21	175,66 ^b	97,66 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	7 ^a	6,66 ^a
	4.43	172 ^b	73,66 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	7 ^a	4,66 ^a
	6.65	172,33 ^b	203,66 ^b	0,0 ^a	0,0 ^a	7,33 ^a	7,33 ^a
	8.87	368,33 ^a	299,33 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	8 ^a	8,33 ^a
TDZ	2.27	22,33 ^c	29 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	10 ^a	4 ^a
	4.54	5,66 ^c	0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	4,33 ^a	1,33 ^a
	6.81	27,33 ^c	6,66 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	9 ^a	7 ^a
	9.08	77,33 ^c	86,33 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	8 ^a	6,33 ^a
CIN	2.32	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	4.64	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	6.97	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	9.29	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b

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

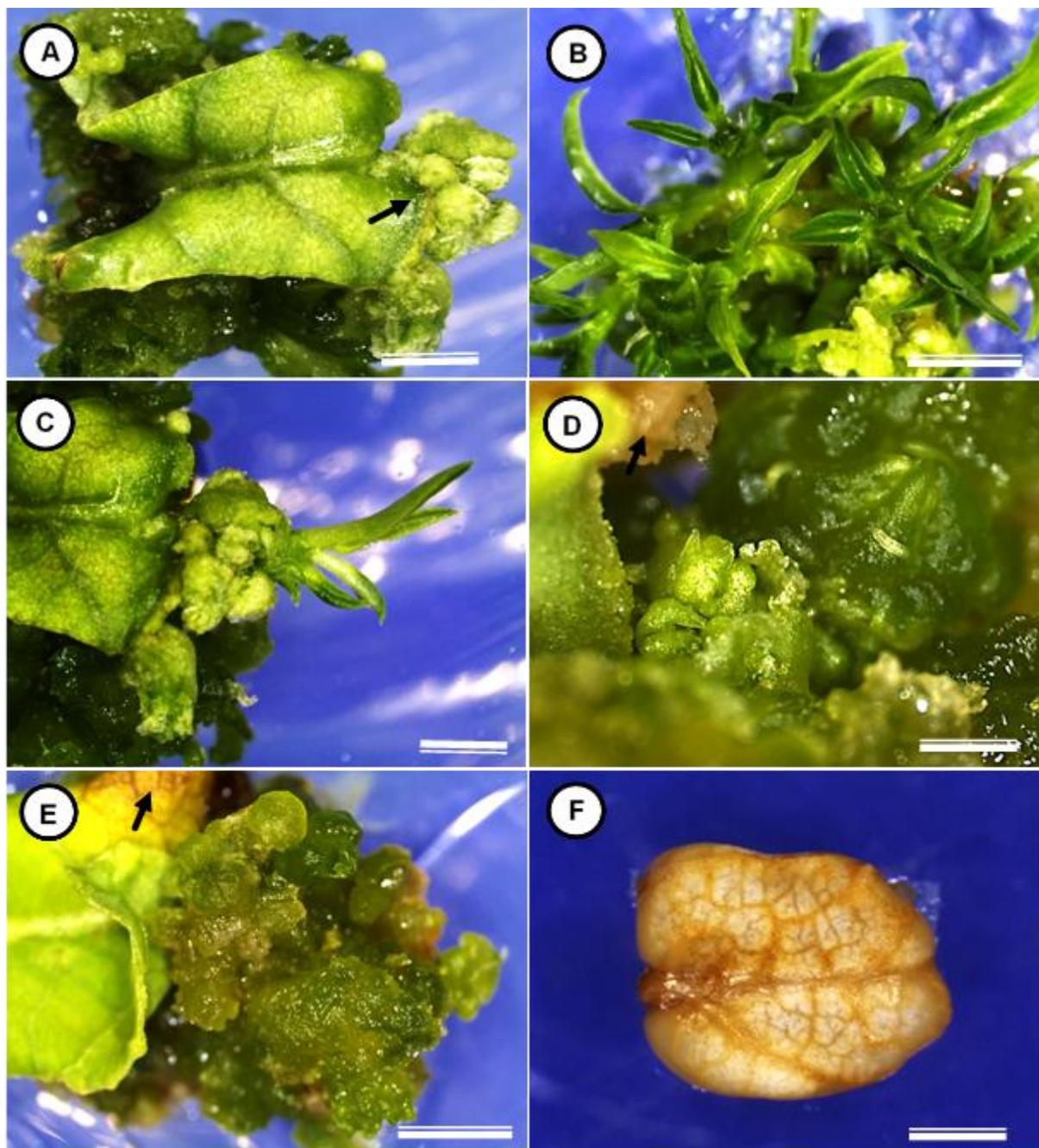


Figura 1: Organogênese em *P. cristalina* utilizando-se de folhas como fonte de explantes, (A) 8.87 μM de BA aos 20 dias de cultivo evidenciado protuberâncias, e, aos 60 dias de cultivo (B) 8.87 μM de BA evidenciando brotações, (C) 2.21 μM de BA brotações e protuberâncias, (D) 9.08 μM de TDZ e (E) 2.27 μM de TDZ brotações e regiões em senescência, (F) 2.32 μM de CIN senescência do explante foliar. Barra (A) 90 μm , (B) 110 μm , (C) 100 μm , (D) 50 μm (E) 100 μm , (F) 50 μm .

Já os explantes hipocotiledonares passaram pelos mesmos estágios de desenvolvimento dos explantes foliares, primeiramente o intumescimento após sete dias de cultivo *in vitro*, e, aos 15 dias houve a formação de protuberâncias (Figura 2A) e brotações na região basal dos hipocótilos (Figuras B, C e D).

O maior número de brotações obtidas foi utilizando a concentração de 4.43 μM de BA entre os 40 e 60 dias de cultivo (Tabela 3) e (Figura 2B). As médias obtidas diferiram-se entre os tratamentos conforme observado na Tabela 3, inclusive observou-se médias de brotações crescentes entre os reguladores testados BA e TDZ para todas as concentrações entre as avaliações.

Vieira et al. (2014) em *Passiflora setacea* obtiveram com sucesso a regeneração de brotações de forma direta em indireta na concentração de 4.43 μM de BA correspondendo a medias entre 98 brotações, e ainda utilizando a combinação entre BA e TDZ obtiveram médias chegando a 85 brotações. Para *P. cristalina* as maiores médias também foram observadas com a mesma concentração testada indicando similaridade entre as concentrações utilizadas e respostas obtidas (Tabela 3).

Silva et al. (2011) relatam que o regulador de crescimento BA é descrito como sendo uma citocinina essencial para a regeneração *in vitro* de maracujazeiros, independentemente do tipo de explante e as respostas variam de acordo com a espécie e o genótipo. O que foi confirmado durante a utilização de explantes hipocotiledonares de *P. cristalina*.

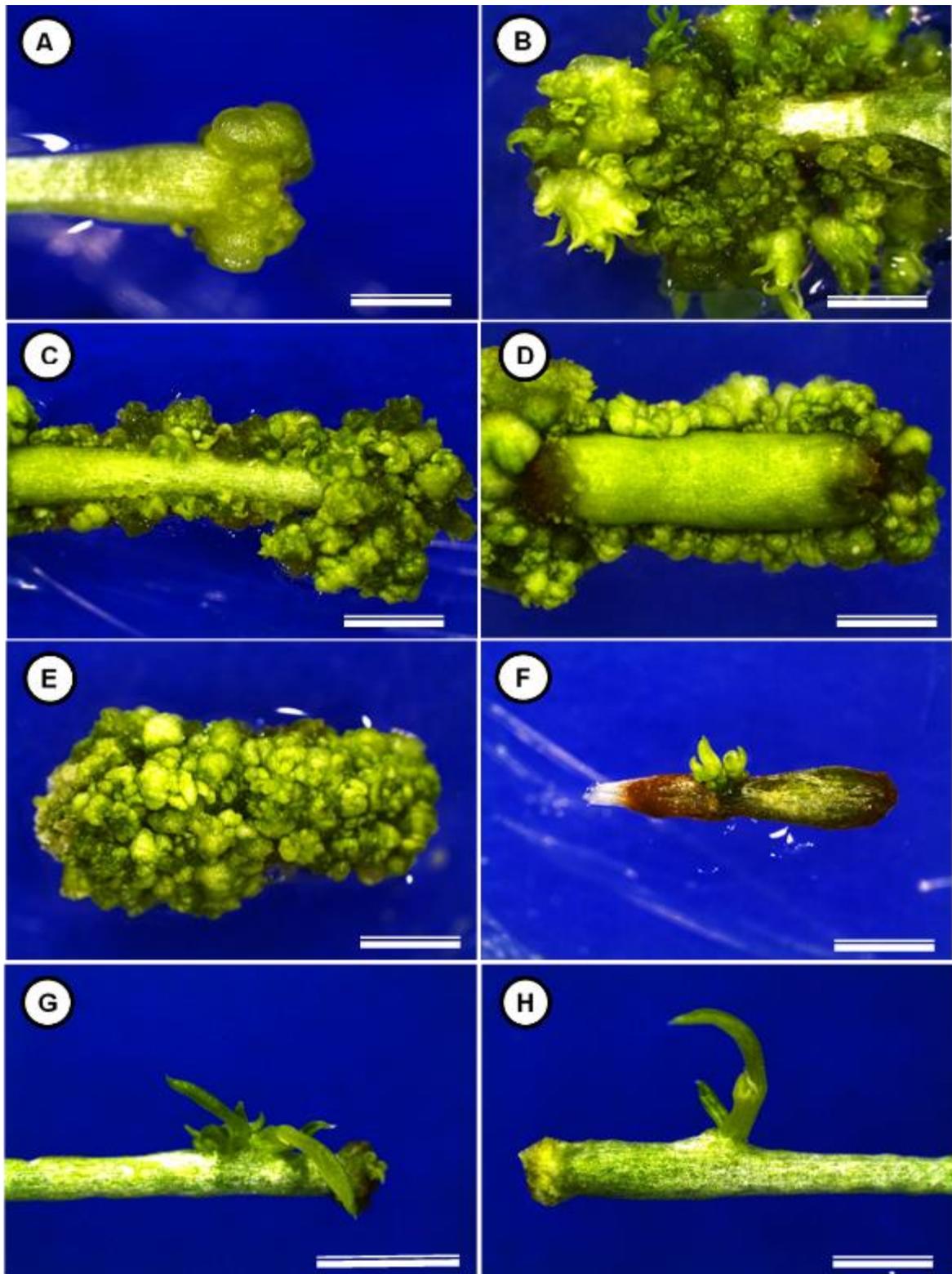


Figura 2: Organogênese em *P. cristalina* utilizando-se de segmentos hipocotiledonares como fonte de explantes, (A) 4.43 μM de BA aos 15 dias de cultivo evidenciando protuberâncias, (B) 4.43 μM de BA e (C) 8.87 μM de BA brotações, (D) 9.08 μM de TDZ, e, (E) 2.27 μM de TDZ protuberâncias e brotos, (F) 4.64 μM de CIN explante em processo de senescência e brotações (G) e (H) brotações em meio MSØ. Barra (A) 50 μm , (B) 100 μm , (C) 110 μm , (D) 60 μm , (E) 100 μm , (F) 60 μm , (G) 90 μm , (H) 100 μm .

TDZ é um composto substituído por fenilureia (Huetteman e Preece, 1993; Lu, 1993) e o seu papel durante a morfogênese está intimamente relacionado com o metabolismo dos reguladores endógenos de crescimento (Murthy et al., 1998), sendo mais biologicamente ativo do que BA, e concentrações mais baixas são necessárias em cultura de tecidos, especialmente durante a micropropagação, e é mais eficaz para a maioria das espécies na qual tem sido testado (Lu, 1993).

Durante a indução da organogênese é possível observar que o regulador TDZ induziu médias entre as concentrações de 2.25 e 6.81 μM com 606.33 brotos e 4.54 e 9.08 μM com 750 e 751 brotos respectivamente (Tabela 3).

Pode-se ressaltar ainda que doses mais elevadas de TDZ influenciam no alongamento das brotações adventícias em todos os explantes utilizados e, ainda, induzem uma maior quantidade de protuberâncias (Figuras 2C e E), e calos em *P. cristalina* quando comparados com BA e CIN.

Durante a indução da organogênese foi observado a produção de raízes apenas para a concentração de 4.43 μM de BA, em 60 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 3). Tanto a indução ou não de brotações, rizogênese e calogênese podem ser explicadas possivelmente pelo fluxo de hormônios endógenos que atuam diretamente na morfogênese *in vitro* (Wang et al., 2015; Hisano et al., 2016).

Para calogênese as maiores médias foram observadas entre os tratamentos de 8.87 μM de BA, 2.27, 4.54, 6.81 e 9.08 μM de TDZ em 60 dias de cultivo, entretanto, observa-se em 40 dias a produção de brotações de forma direta para a concentração de 4,43 μM de BA e 4.64 e 6.97 μM de CIN, mesmo que as médias observadas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

As médias observadas não diferiram utilizando-se do regulador CIN entre as diferentes concentrações testadas para indução de brotações, rizogênese ou calogênese. Para CIN nota-se a redução no número de brotações entre 40 e 60 dias de cultivo.

Para o controle (MSØ), foi observado a indução de brotações adventícias indicando possivelmente níveis elevado de citocininas endógenas em *P. cristalina*, que é comum em algumas Passifloráceas, e que também foi verificado durante a regeneração de cotilédones e folhas de *P. edulis* (Dornelas e Vieira, 1994), Lombardi et

al. (2007) durante a regeneração proveniente de raízes de *P. cincinnata* Vieira et al. (2014) utilizando-se de hipocótilos e raízes de *P. setacea*.

Tabela 3. Médias do número de brotos, raízes e calos obtidos em explantes hipocotiledonares de *P. cristalina*.

Regulador/crescimento	[μ M]	Médias/dias					
		Brotos		Raízes		Calos	
		40	60	40	60	40	60
BA	0.0	40,33 ^d	43,33 ^d	0,0 ^a	0,0 ^b	1,33 ^a	0,0 ^c
	2.21	651,66 ^a	1029,66 ^b	0,0 ^a	0,33 ^b	4 ^a	3,33 ^c
	4.43	744,66 ^a	1396,66 ^a	0,0 ^a	7,0 ^a	0 ^a	2,33 ^c
	6.65	556,66 ^a	1048,33 ^b	0,0 ^a	0,0 ^b	3,33 ^a	5,33 ^c
	8.87	326,33 ^b	1102,33 ^b	0,0 ^a	0,0 ^b	1 ^a	6,33 ^b
TDZ	2.27	97 ^d	606,33 ^c	0,0 ^a	0,0 ^b	2 ^a	9,33 ^a
	4.54	180,66 ^c	750 ^c	0,0 ^a	0,0 ^b	2 ^a	10 ^a
	6.81	169,66 ^c	606,33 ^c	0,0 ^a	0,0 ^b	5 ^a	10 ^a
	9.08	156 ^c	751 ^c	0,0 ^a	0,0 ^b	6 ^a	10 ^a
CIN	2.32	35,66 ^d	18 ^d	0,0 ^a	0,0 ^b	3 ^a	2 ^c
	4.64	44 ^d	17,66 ^d	0,0 ^a	0,0 ^b	0 ^a	3 ^c
	6.97	18,66 ^d	4 ^d	0,0 ^a	0,0 ^b	0 ^a	3,66 ^c
	9.29	15,33 ^d	5,33 ^d	0,0 ^a	0,0 ^b	1,33 ^a	1,33 ^c

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

Após seis dias de estabelecimento de explantes radiculares observou-se intumescimento e, a posterior formação de protuberâncias (Figuras 3 A, B e D). As regiões com as protuberâncias após 15 dias de cultivo já se pode observar a sua diferenciação em brotações (Figura 3C). De acordo com Rocha et al. (2012) as brotações adventícias em raízes de *P. edulis* formam-se mediante a diferenciação de células do periciclo, ou seja, do conjunto de células próximas ao feixe vascular central, determinando a formação regiões meristemóides iniciais para posterior formação do broto propriamente dito.

E ainda foi observado que aos 30 dias de cultivo iniciou-se a senescência entre os explantes observando a redução de médias obtidas tanto para organogênese quanto para calogênese (Tabela 4). Em espécies climatéricas, a expectativa é que a sensibilidade ao etileno é mantida sob sistemas de cultura *in vitro*, portanto, vários protocolos de regeneração tem considerado o uso de inibidores de etileno como um benefício para aumentar as respostas morfogênicas (Dias et al, 2009), sugerindo uma melhoria no número de trocas de gasosas entre a atmosfera interna da frascos de cultura e a atmosfera circundante podem ser favorável para uma melhor manipulação do crescimento e diferenciação de maracujá micropropagadas, bem como diminuir os efeitos negativos do etileno (Dias et al, 2009;. Otoni et al., 2013.). (Figura 3B).

Silva et al. (2011) relatam que o processo de regeneração em raízes de *P. cincinnata* e *P. edulis* 'FB 100', 'FB 200' e 'FB 300' ocorreu em momentos diferentes e era tipicamente assíncrono, e a suplementação com 4.44 µM de BA foi considerado essencial para apoiar resposta organogênica direta em explantes de raízes. Já Vieira et al. (2014) na obtenção de organogênese em *P. setacea* utilizou as concentrações de 4.43 µM de BA combinado a 2.27 µM de TDZ com médias correspondendo a 93.0% em brotações de forma direta e indireta.

BA é o regulador de crescimento comumente utilizado para a regeneração de novo por organogênese em maracujazeiros, entretanto em todas as concentrações utilizadas no cultivo de segmentos radiculares de *P. cristalina*, este regulador não induziu o desenvolvimento de brotações adventícias conforme descrito na Tabela 4.

A melhor concentração de CIN que respondeu em formação de calos foram 4.64,

6.97 e 9.29 μM para 15 dias e 2.32 μM após 30 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 4). Não foi observado a produção de brotações, raízes e calos para o controle (MSØ).

Tabela 4. Médias do número de brotos, raízes e calos obtidos em explantes radiculares de *P. cristalina*.

		Médias/dias					
		Brotos		Raízes		Calos	
Regulador/crescimento	[μM]	15	30	15	30	15	30
BA	0.0	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	2.21	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	4.43	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	6.65	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	8.87	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
TDZ	2.27	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	4.54	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	6.81	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
	9.08	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
CIN	2.32	35,66 ^a	25,33 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b	3 ^a
	4.64	44 ^a	0,33 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	2 ^a	1 ^b
	6.97	18,66 ^b	1 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a	3,33 ^a	0,33 ^b
	9.29	15,33 ^b	8,33 ^b	0,0 ^a	0,0 ^a	3,33 ^a	1 ^b

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



Figura 3: Organogênese em *P. cristalina* utilizando-se de segmentos radiculares como fonte de explante aos 7 dias de cultivo evidenciando para as concentrações (A) 9.29 μM e, (B) 4.64 μM de CIN brotações e protuberâncias, (C) 4.43 μM de CIN broto (D) 9.29 μM de CIN protuberâncias. Barra: (A) 70 μm , (B) 60 μm , (C) 110 μm , (D) 90 μm .

Após a inoculação de explantes cotiledonares, observou-se o intumescimento em 10 dias de cultivo *in vitro*, posteriormente a formação de protuberâncias e conversão em brotações em 15 dias de cultivo. As médias observadas diferiram entre si para o regulador BA nas concentrações de 4.43 μM com 255.33 brotos (Figura 4A), 8.87 μM com 199 brotações, 6.65 μM com 102 e 2.21 μM com 85 brotos para 30 dias de cultivo *in vitro*, já TDZ com as seguintes concentrações 2.27 μM com 158 brotos, 6.81 com 124 brotos e 9.08 com 117.66 brotações também para 30 dias de cultivo (Tabela 5).

Já para 50 dias para o regulador BA 4.43 μM com 442 brotos (Figura 4B), 8.87 μM com 416, 6.65 μM com 233,33 e 2.21 μM com 144,66, para TDZ 4.54 μM com 368 brotos (Figura 4D), 2.27 μM com 266,44 brotos, 6.81 μM com 150,33 brotos e 9.08 μM com 148 brotos (Tabela 5).

Pode-se ressaltar que durante 30 dias do cultivo *in vitro* a concentração de 4.54 μM de TDZ (Tabela 5), (Figura 4C), aos 50 dias foi a concentração que mais se destacou em produtividade chegando a uma média de 368 brotações (Tabela 5), (Figura 4D) e ainda foi evidenciada a baixa produção de calos (Tabela 5).

Rocha et al., 2015 obtiveram organogênese utilizando embriões zigóticos em *P. edulis* Sims com as concentrações de 36.2, 72.4 e 144.8 μM de BA combinado a 4.5 μM de 2,4-D, onde, observou que melhor concentração da citocinina BA para indução de brotações correspondeu a 72.4 μM de combinado a 4.5 μM de 2,4-D.

BA na concentração de 2.21 μM induziu de forma direta brotações entre os dois períodos de avaliação, e ainda foi observado a baixa produção de calos de acordo com a Tabela 5 indicando a regeneração e maior parte de forma direta. Regeneração de brotações adventícias direta é um método essencial para regeneração de plantas *in vitro* evitando variantes (Kumari et al., 2016).

CIN não induziu brotos, raízes ou calos em cotilédones de *P. cristalina* e durante a indução da organogênese não houve a formação de raízes entre as diferentes concentrações e reguladores testados (Tabela 5).

As maiores médias obtidas para a produção de calos foi utilizando-se do regulador BA nas concentrações de 8.87 μM com 01 calo em 30 e 50 dias de cultivo, 4.43 e 6.65 μM para 30 e 50 dias. Já TDZ para as concentrações de 6.81 μM com 02 calos, 2.27 μM com 1.33 calos, 9.08 μM com 1 calo e 4.54 com 0.66 calos entre 30 e 50

dias de cultivo *in vitro* (Tabela 5).

O controle (MSØ) não induziu brotações, raízes ou calos em cotilédones de *P. cristalina* (Tabela 5).

Tabela 5. Médias do número de brotos, raízes e calos obtidos em explantes cotiledonares de *P. cristalina*.

Regulador/crescimento	[µM]	Médias/dias					
		Brotos		Raízes		Calos	
		30	50	30	50	30	50
BA	0.0	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	2.21	85,33 ^a	144,66 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	4.43	205,33 ^a	442 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,66 ^a	0,66 ^a
	6.65	102 ^a	233,33 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,66 ^a	0,66 ^a
	8.87	199 ^a	416 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	1,0 ^a	1,0 ^a
TDZ	2.27	158,66 ^a	266,33 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	1,33 ^a	1,33 ^a
	4.54	71,33 ^b	368,66 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,66 ^a	0,66 ^a
	6.81	124 ^a	150,33 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	2,0 ^a	2,0 ^a
	9.08	117,66 ^a	148 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	1,0 ^a	1,0 ^a
CIN	2.32	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	4.64	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	6.97	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
	9.29	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

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

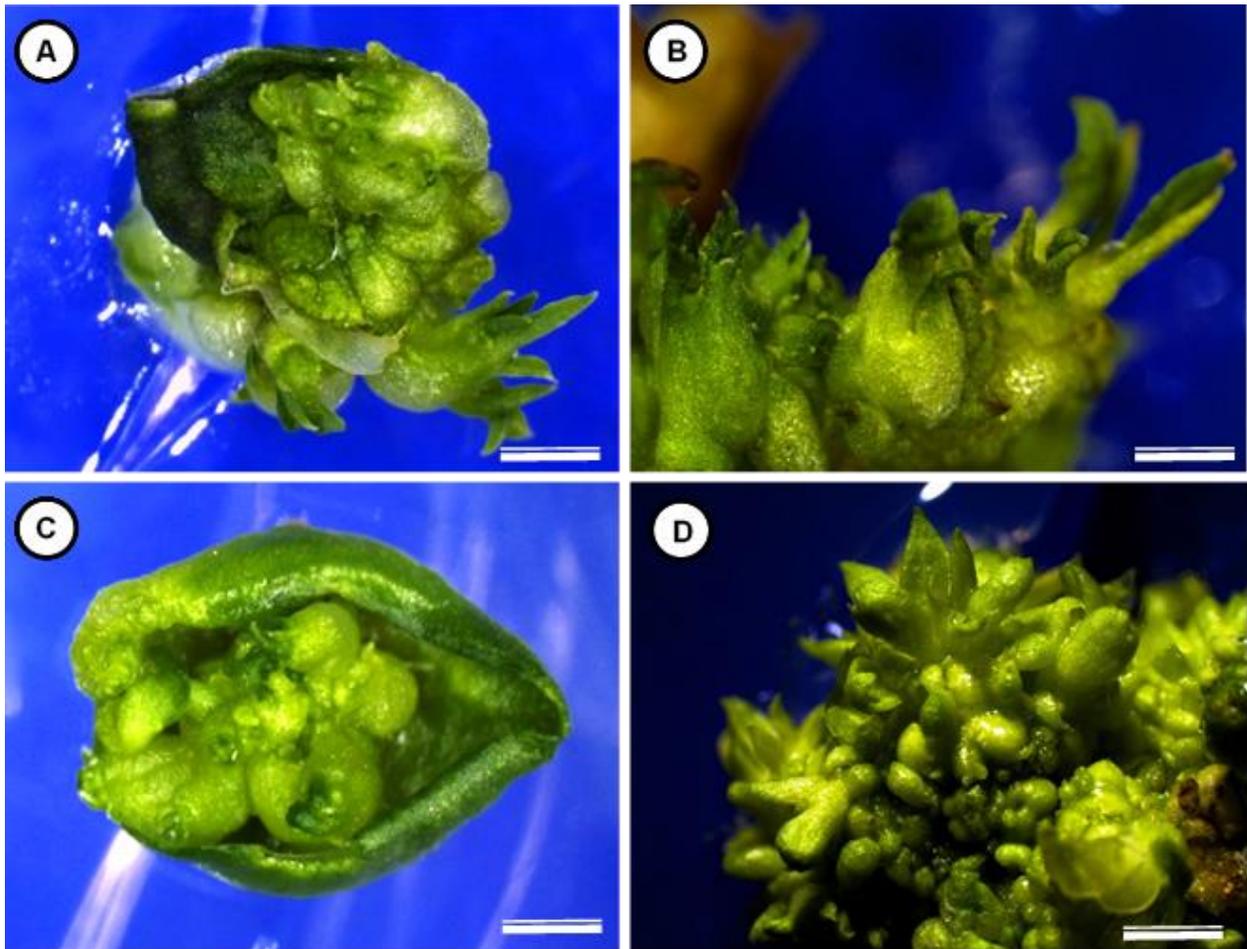


Figura 4: Organogênese em *P. cristalina* utilizando-se de cotilédones como fonte de explante evidenciando para as concentrações (A) 2.21 μM de BA, (B) 4.43 μM de BA e (C) 4.54 μM de TDZ brotações aos 30 dias de cultivo *in vitro*, (D) 2.27 μM de TDZ protuberâncias aos 50 dias de cultivo. Barra (A) 50 μm , (B) 60 μm , (C) 60 μm , (D) 60 μm .

Explantes endospérmicos passaram pelos mesmos estágios de desenvolvimento de tecidos foliares, hipocotiledonares, radiculares e cotiledonares revelando inicialmente o intumescimento em 10 dias de cultivo *in vitro*, posteriormente a formação de protuberâncias e conversão em brotações em 15 dias de cultivo.

As médias obtidas para a variável brotos entre concentrações testadas pelo teste de médias Skott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro ($p \leq 0.05$), não diferiram

entre si, entretanto, as maiores médias obtidas para a regeneração em brotações ocorreu na utilização do regulador BA nas concentrações de 4.43, 6.65, 8.87 μM em 30 e 40 dias de cultivo, observando médias crescentes entre as avaliações (Tabela 6) e (Figura 5A e B).

Mohamed et al., 1996, obtiveram regeneração em *Passiflora foetida* utilizando-se de endosperma com diferentes concentrações de BA (2.0, 5.0 e 10 μM). O regulador BA induziu de forma expressiva brotações adventícias em tecidos endospérmicos de *P. cristalina* (Tabela 6), podendo ser indicado para obtenção de plantas triploides. Chaturvedi et al., 2003 obteve regeneração em calos obtidos de endosperma de *Azadirachta indica* e. Góralski et al., 2005 obteve com sucesso regeneração usando tecidos endospermáticos de *Actinidia deliciosa* CV. *Hayward* destacando a melhor concentração como sendo 2.27 μM de TDZ.

Durante a indução da organogênese pode-se observar que o TDZ durante as avaliações de 30 e 40 dias, pode-se observar que houve uma diminuição no número de brotações perdendo a competência até o total senescência dos explantes (Tabela 6).

Mesmo pela análise estatística não diferir entre os tratamentos nota-se níveis altos de brotações, indicando ainda sim um método eficiente de regeneração a partir tecidos endospermáticos de *P. cristalina*, obtendo um total de 966 brotos com a concentração de 8.87 μM de BA em 30 dias e 886 para 6.65 μM aos 40 dias de cultivo (Tabela 6) e (Figuras 5A e B).

Durante a indução da organogênese houve a formação de calos sendo que as médias observadas para 40 dias de cultivo diferiram para os reguladores BA nas concentrações de 4.43 μM e 6.65 μM com 1,66 calos, e 8.87 μM com 0,66 calos, e TDZ para as concentrações de 9.08 μM com 4.66 calos, 2.27 μM com 3,0 calos e 4.54 μM com 2,33 calos (Tabela 6) e (Figura 5D).

Não ocorreu a produção de raízes entre reguladores e concentrações testadas em tecidos endospérmicos de *P. cristalina* (Tabela 6).

Para o controle MSØ não houve a produção de brotos, raízes ou calos (Tabela 6)

Tabela 6. Médias do número de brotos, raízes e calos obtidos em explantes endospérmicos de *P. cristalina*

Regulador/crescimento [µM]		Médias/dias					
		Brotos		Raízes		Calos	
		30	40	30	40	30	40
BA	0.0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b
	2.21	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,33 ^a	0,0 ^b
	4.43	109,66 ^a	175,66 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	2,0 ^a	1,66 ^a
	6.65	79,66 ^a	295,33 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	3,0 ^a	1,66 ^a
	8.87	192,66 ^a	322 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	3,0 ^a	0,66 ^a
TDZ	2.27	69,66 ^a	65,66 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	4,0 ^a	3,0 ^a
	4.54	16,33 ^a	36,33 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	2,66 ^a	2,33 ^a
	6.81	37,66 ^a	29 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	1,33 ^a	0,0 ^b
	9.08	66 ^a	33,66 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	4,66 ^a	4,66 ^a
CIN	2.32	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b
	4.64	2,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,33 ^a	0,0 ^b
	6.97	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b
	9.29	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^b

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

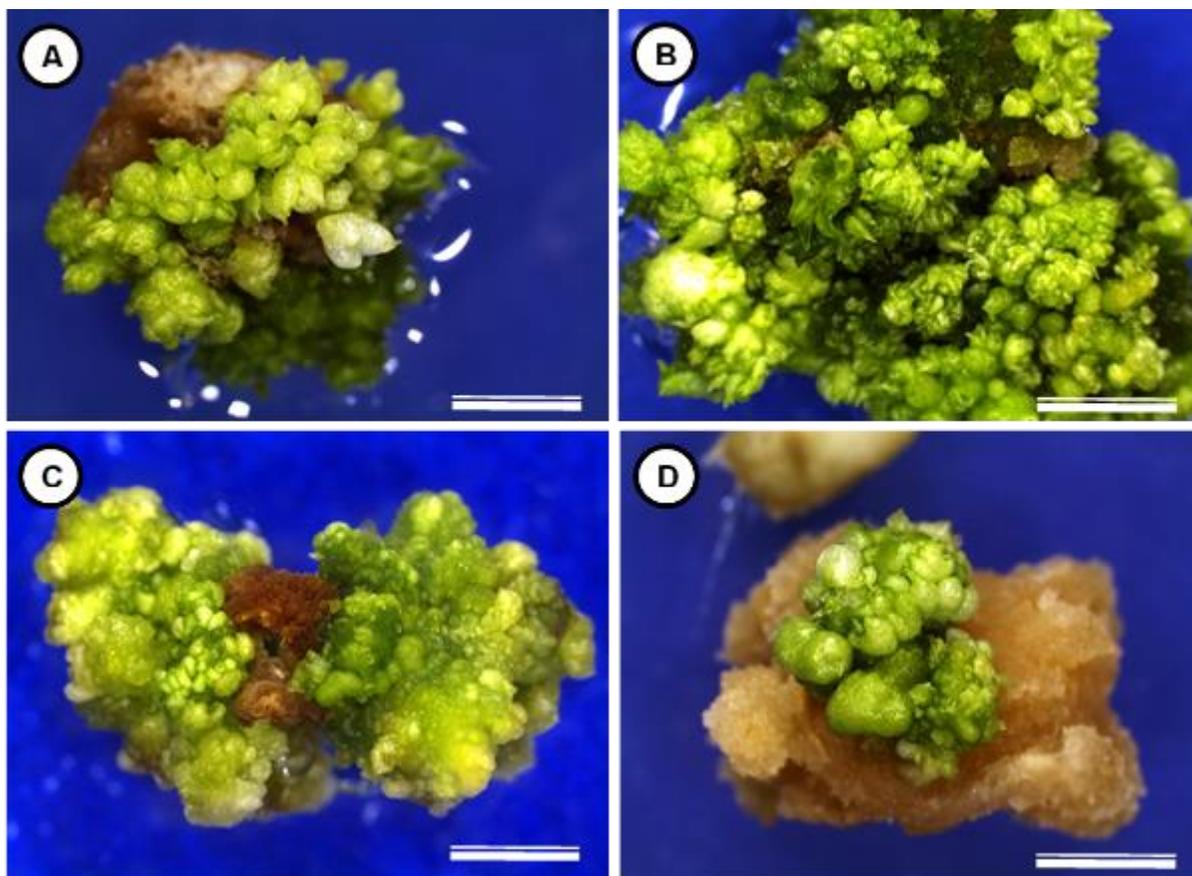


Figura 5: Organogênese em *P. cristalina* utilizando-se de endosperma como fonte de explante aos 30 dias de cultivo nas concentrações (A) 6.65 μM de BA e, (B) 8.87 μM de BA aos 40 dias de cultivo evidenciando brotações, (C) 4.54 μM de TDZ aos 30 dias e (D) 4.54 μM de TDZ aos 40 dias de cultivo *in vitro* protuberâncias e brotações. Barras (A) 80 μm , (B) 110 μm , (C) μm 110, (D) 80 μm .

O tecido espermático em plantas diploides é um tecido triploide, contém 3 conjuntos cromossômicos, como resultado de fertilização dupla, que é um processo único em plantas superiores. Conseqüentemente, o endosperma é formado como resultado de fertilização dupla e fusão tripla (ou seja, a fusão entre 3 núcleos haploides diferentes, 1 do gameta masculino e 2 do provenientes do gameta feminino) (Góralski et al., 2005; Thomas e Chaturvedi, 2008; Hoshino et al., 2011).

Plantas triploides apresentam características de suma importância para uso comercial, por exemplo, podem formar frutos sem sementes (Banana, citrinos, melão)

ou pode ter um sabor melhor de que os seus ancestrais diploides (batata), devido a isso, o desenvolvimento de processos eficientes para a produção de triploides é importante para comercial, bem como efeitos de estudos do comportamento *in vitro* (Góralski et al., 2005). Os resultados utilizando-se de tecidos espermáticos para a regeneração em *Passiflora* abre perspectivas de sua utilização para programas de melhoramento genético do gênero e pode ser estendida para a espécie mais importante comercialmente *P. edulis*.

A organogênese *de novo* em *P. cristalina* pode ser considerado um sistema efetivo e responsivo na produção de grande número de brotações e modelo para o gênero.

3.1. Análise histoquímica

Para tecidos foliares durante análises histoquímicas polissacarídeos neutros foram observados em baixas quantidades sendo concentrados em regiões propensas a formação de brotações indicado pelas setas na (Figura 6A), também observado em tecidos hipocotiledonares (Figura 6B), radiculares (Figura 6C), canalizados para a região apical em brotações propriamente ditas de tecidos cotiledonares (Figura 6D), também encontrados em regiões com alta atividade morfogênica em tecidos endospermicos (Figura 6E), e em grande quantidade em cotilédones aos zero dias de cultivo *in vitro* confirmando a reserva deste componente (Figura 6F).

Proteínas foram observadas também em regiões com intensa divisão celular a em tecidos foliares sendo indicado pelas setas na Figura 7A, também verificadas em tecidos hipocotiledonares (Figura 7B), radiculares (Figura 7C), na região apical de brotações de tecidos cotiledonares (Figura 7D), regiões com alta atividade metabólica em tecidos endospermicos (Figura 7F), e predominantemente em toda a região cotiledonar aos zero dias de cultivo. Pectinas foram verificadas concentradas em regiões de alta divisão celular em tecidos foliares sendo indicado pelas setas na (Figura 7A), hipocotiledonares (Figura 7B), radiculares (Figura 7C), observadas em regiões meristemáticas de brotações provenientes de tecidos cotiledonares (Figura 7D), e

também endospérmicos (Figura 7E), e em alta concentração em feixes vasculares e na epiderme de cotilédones aos zero dias de cultivo (Figura 7F).

A pectina é o componente mais abundante classe de macromolécula no interior da matriz celular, também é abundante na lamela média entre as paredes celulares primárias, atuando na regulação e adesão intercelular, está em grande parte restrita à paredes celulares primárias, fornecendo um ambiente para a deposição, deslizamento e extensão da rede celulose e glicanos, está envolvida no controle da porosidade da parede celular e é o principal material adesivo entre as células. (Willats et al., 2001). Está também responsável pela esterificação, formando géis, atuando durante o processo de crescimento da planta (Knox et al., 1990).

Grãos de amido foram observados durante a indução da organogênese em tecidos foliares sendo canalizados em regiões de brotações indicado pela seta na (Figura 8A), em regiões promissoras a formação de brotos em tecidos hipocotiledonares (Figura 8B), radiculares (Figura 8C), cotiledonares (Figura 9D) e endospérmicos (Figura 9E) e em baixa quantidade em tecidos cotiledonares aos zero dias de cultivo.

De modo geral grãos de amido foram encontrados em baixa quantidade em tecidos foliares, cotiledonares e endospérmicos (Figura 9A, 9D, 9E).

Rocha et al., 2012 não identificaram a presença de corpos de amido no embrião zigótico de *Passiflora cincinnata* indicando que durante o desenvolvimento *in vitro* houve a necessidade da produção *de novo* de amido sendo necessário para os processos morfogênicos.

Lipídeos não foram encontrados em brotações oriundas de tecidos foliares (Figura 10A), sendo encontrados em regiões epidérmicas promissoras a formação de brotações em tecidos hipocotiledonares, localizados em regiões de alta intensidade morfogênica em tecidos radiculares e cotiledonares, já tecidos endospérmicos houve uma diminuição quanto maior o desenvolvimento (Figura 10E), e predominantemente encontrado em toda a região cotiledonar aos zero dia de cultivo, indicando o alto consumo deste componente durante a organogênese em *P. cristalina*.

Na Figura 10F pode-se observar a grande quantidade de corpos lipídicos em cotilédones de *Passiflora cristalina* (Figura 10F) Segundo Tozzi e Takaki (2010), lipídeos desempenham um papel importante na semente, é a principal fonte de energia

para a germinação. Rocha et al.(2012) e Silva et al. (2015) verificaram o consumo de corpos proteicos, lipídicos e carboidratos devido a metabolização por consumo durante a morfogênese *in vitro*, mediante a quebra por enzimas específicas. Resultados similares com o do presente estudo pela análise histoquímica.

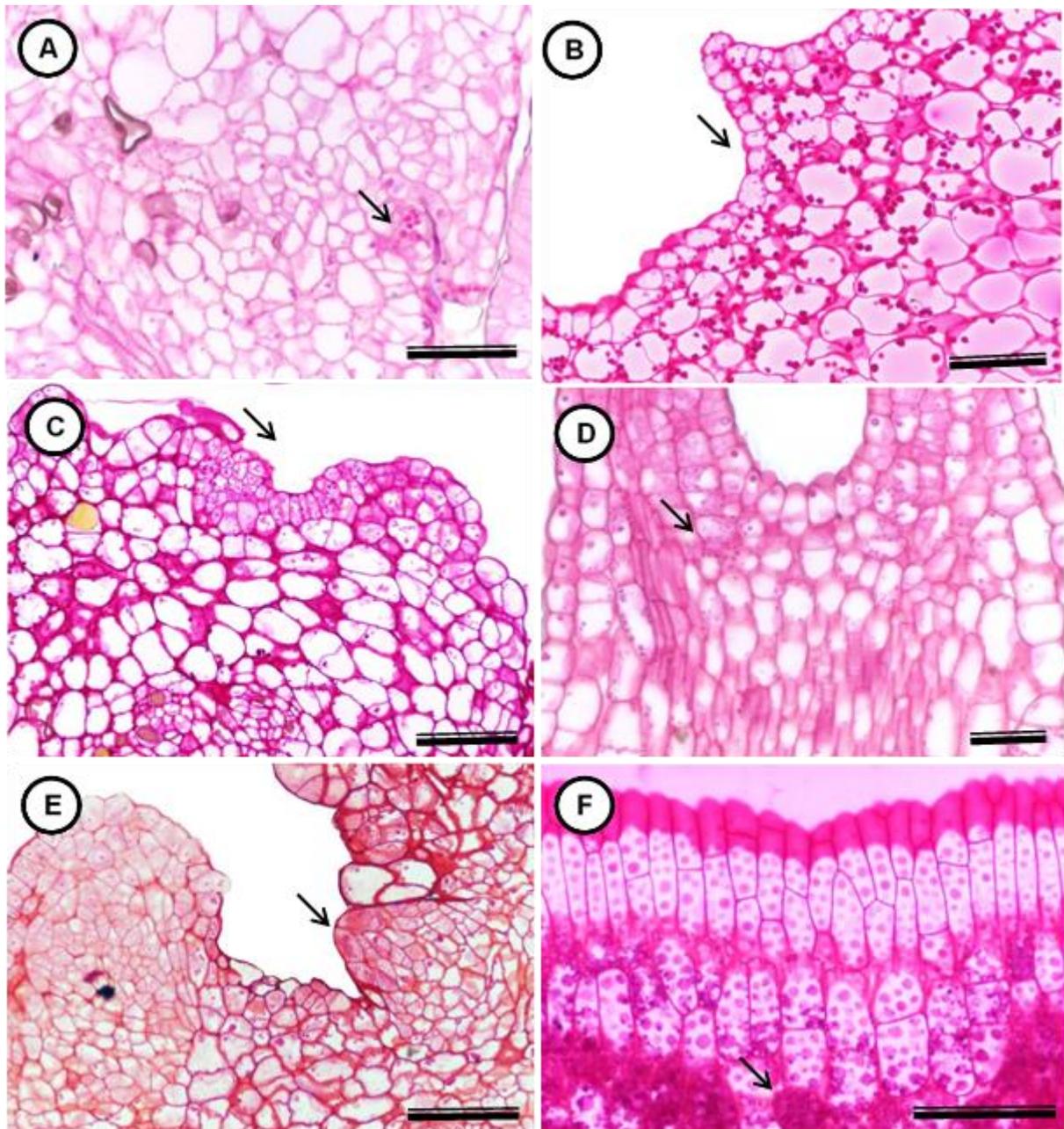


Figura 6: Avaliação histoquímica com o corante Ácido periódico de Schiff (PAS) para a verificação de polissacarídeos neutros, fixados aos 20 dias de cultivo da organogênese evidenciando mobilização e metabolização (seta) em (A), (B), (C), (E), regiões em divisão mitótica para a formação de protuberâncias, (D), broto com menores concentrações de polissacarídeos (F) células com alta concentração de polissacarídeos utilizando (A) folhas cultivadas com a concentração de $8.87 \mu\text{M}$ de BA, (B) hypocótilos com $4.43 \mu\text{M}$ de BA evidenciando , (C) raízes com $4.64 \mu\text{M}$ de BA, (D) cotilédones com $4.42 \mu\text{M}$ de BA, (E) endosperma com $8.87 \mu\text{M}$ de BA, e (F) cotilédone do embrião aos zero dias de cultivo. Barras: (A), (D), (E) $90 \mu\text{m}$ (B), (C) $50 \mu\text{m}$; (F) $250 \mu\text{m}$.

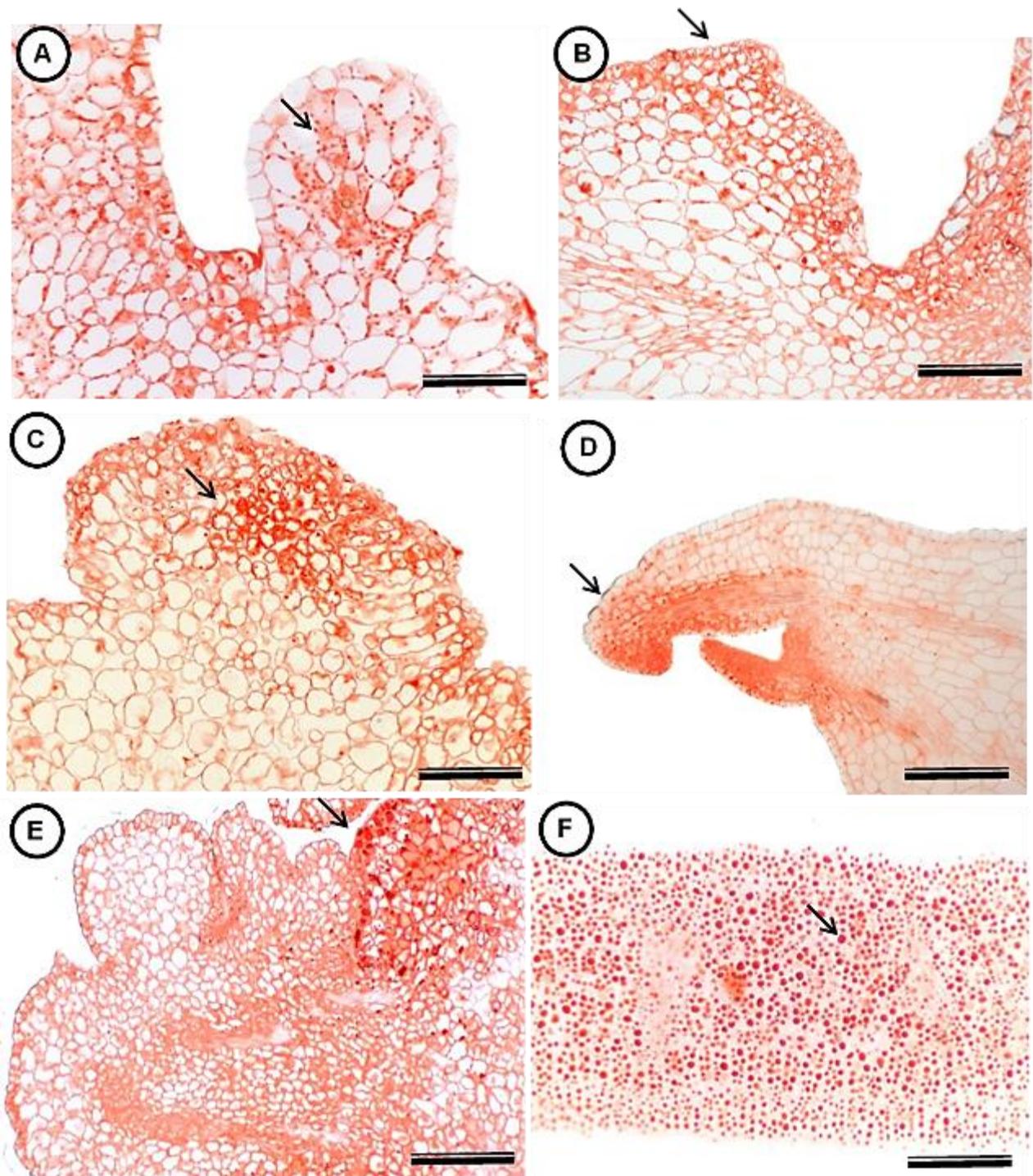


Figura 7: Avaliação histoquímica com o corante Xilidine Ponceau (XP), para a verificação de proteínas fixados aos 20 dias de cultivo da organogênese evidenciando mobilização e metabolização (seta), (A), (B), (C), (E) protuberâncias, (D) broto, (F) células ricas em corpos proteicos utilizando (A) folhas cultivadas com a concentração de 8.87 μM de BA, (B) hipocótilos com 4.43 μM de BA, (C) raízes com 4.64 CIN, (D) cotilédones com 4.42 μM de BA, (E) endosperma com 8.87 μM de BA, e (F) cotilédone do embrião aos zero dias de cultivo. Barras: (A), (B), (C), (D), 100 μm (E), (F) 150 μm .

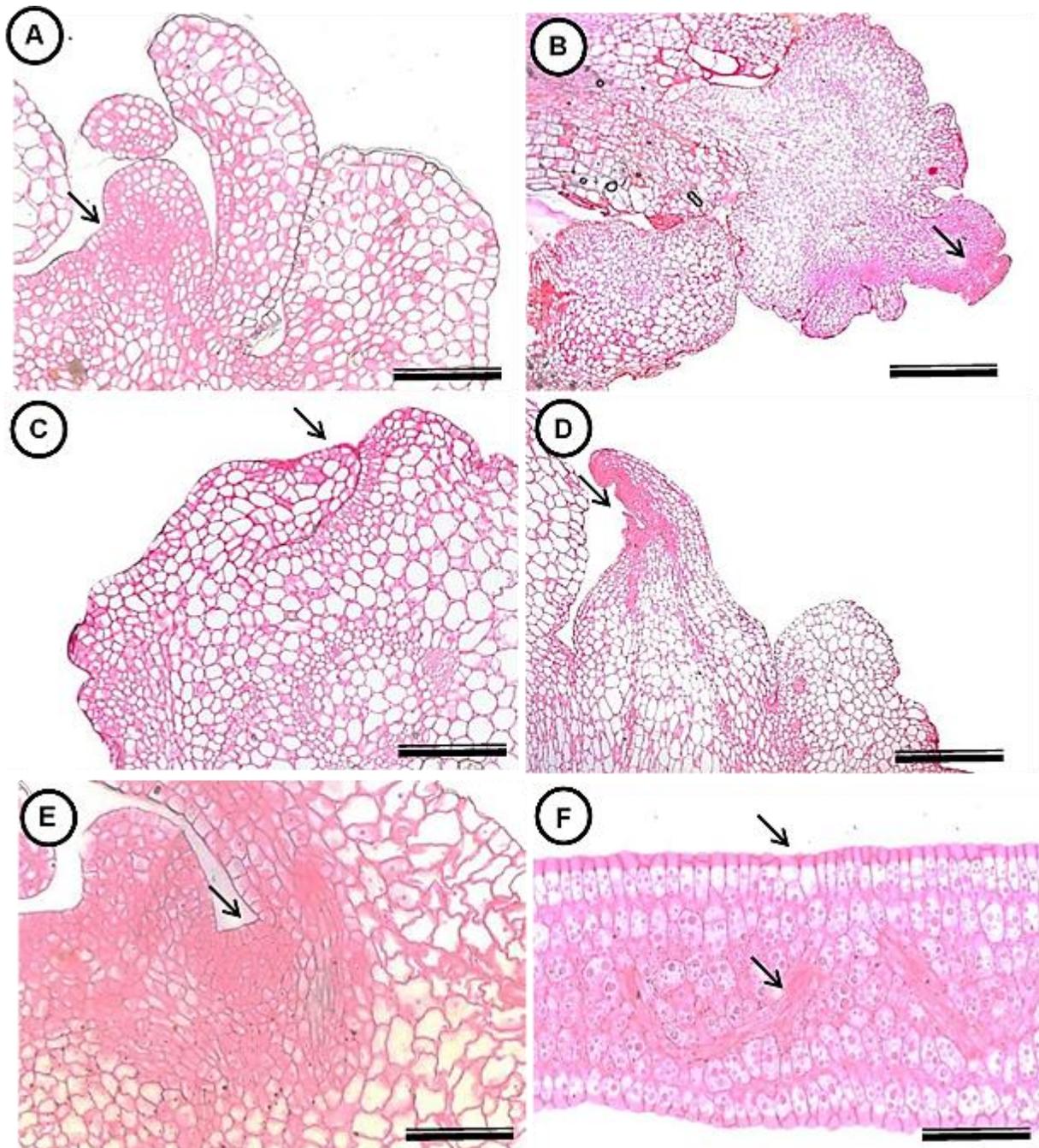


Figura 8: Avaliação histoquímica com o corante Vermelho de Rutênio, para a verificação de pectinas, fixados aos 20 dias de cultivo da organogênese evidenciando mobilização e metabolização (seta) (A), (B), (C), protuberâncias, (D), (E) região de meristema (F) epiderme e feixes vasculares ricos em pectinas, (A) folhas cultivadas com a concentração de $8.87 \mu\text{M}$ de BA, (B) hipocótilos com $4.43 \mu\text{M}$ de BA, (C) raízes com $4.64 \mu\text{M}$ de BA, (D) cotilédones com $4.42 \mu\text{M}$ de BA, (E) endosperma com $8.87 \mu\text{M}$ de BA, e (F) cotilédone do embrião aos zero dias de cultivo. Barras (A), (C), $90 \mu\text{m}$ (B), (D) (F) $100 \mu\text{m}$ (E), $250 \mu\text{m}$.

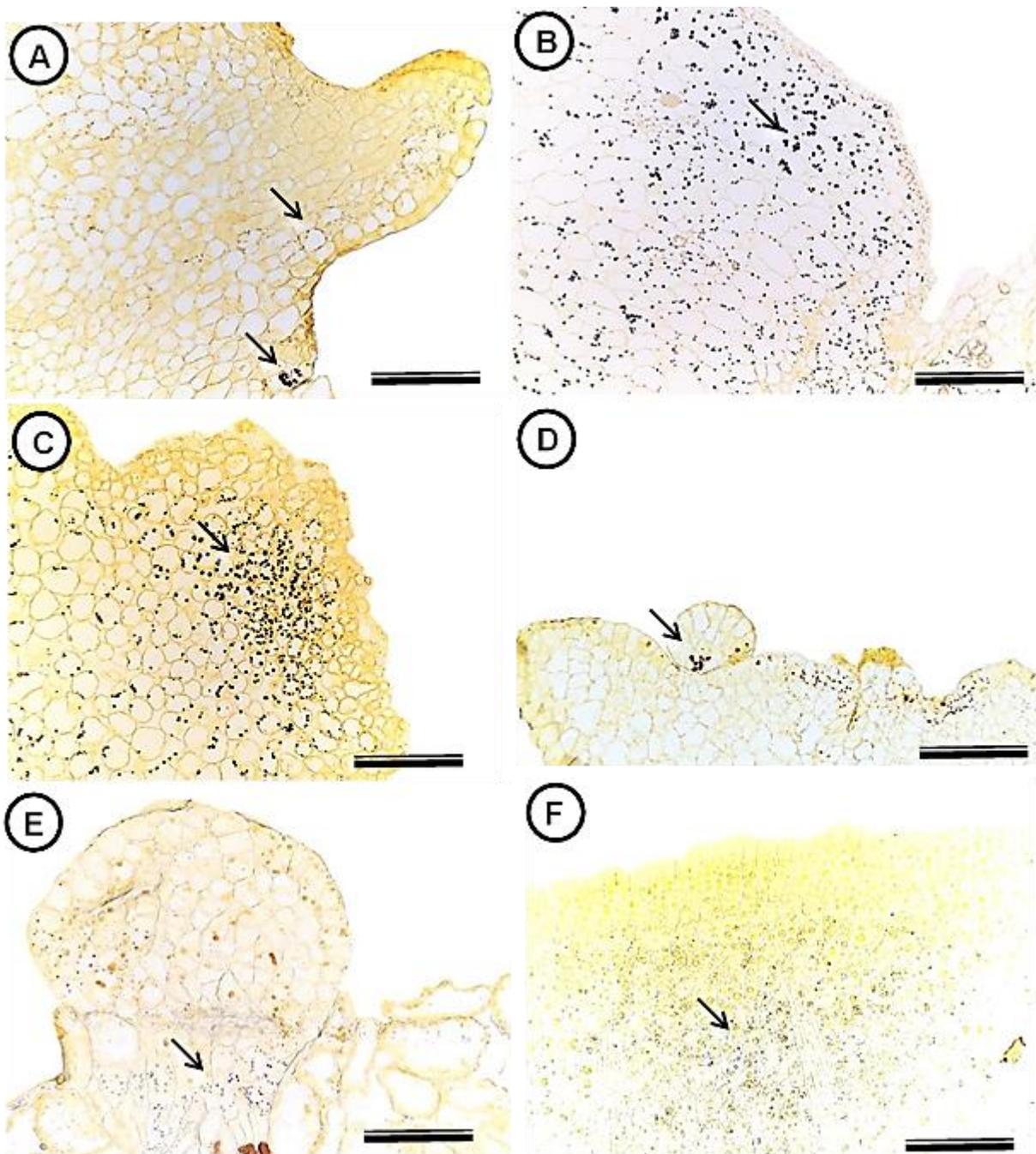


Figura 9: Avaliação histoquímica com o corante lugol para a verificação de amido, fixados aos 20 dias de cultivo da organogênese evidenciando mobilização e metabolização (seta), (A), (B), (C), (D), (E), protuberâncias (F) células com pouca concentração grãos de amido utilizando (A) folhas cultivadas com a concentração de 8.87 μM de BA, (B) hipocótilos com 4.43 μM de BA, (C) raízes com 4.64 CIN, (D) cotilédones com 4.42 μM de BA, (E) endosperma com 8.87 μM de BA, e (F) cotilédone do embrião aos zero dias de cultivo. Barras (A), (B), (C), (D) 100 μm (E) 150 μm (F), 90 μm .

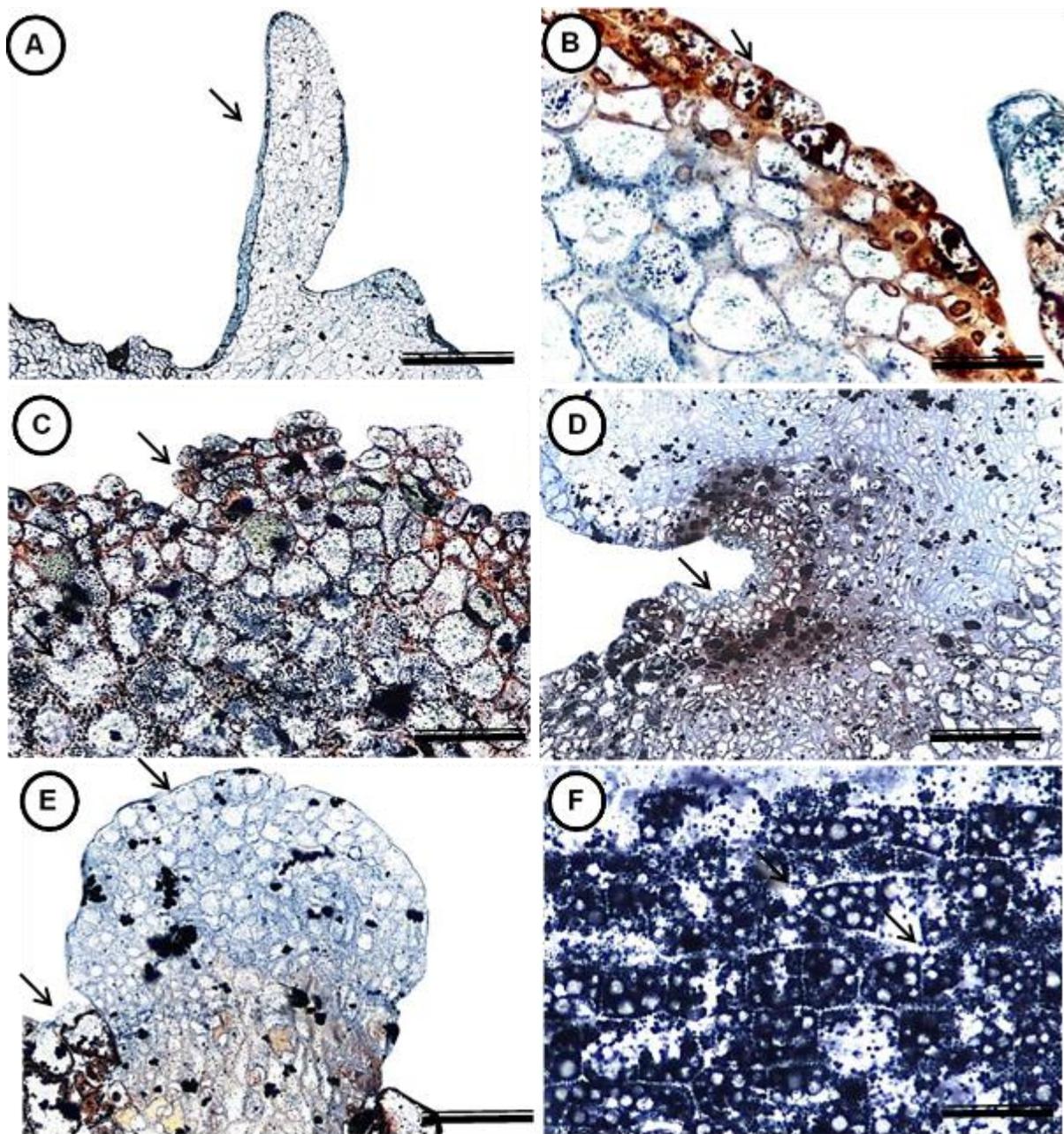


Figura 10: Avaliação histoquímica com o corante Sudan Black B para a observação de lipídios, fixados aos 20 dias de cultivo da organogênese evidenciando mobilização e metabolização (seta), (A) broto, (B) células epidérmicas ricas em corpos lipídicos, (C) agregado celular contendo lipídeos em região de epiderme (D), concentração de corpos lipídicos, (E) canalização e consumo de lipídeos por protuberância, (F) células ricas em líídeos, utilizando (A) folhas cultivadas com a concentração de 8.87 μM de BA, (B) hipocótilos com 4.43 μM de BA, (C) raízes com 4.64 CIN, (D) cotilédones com 4.42 μM de BA, (E) endosperma com 8.87 μM de BA, e (F) cotilédone do embrião aos zero dias de cultivo. Barras (A), (D), (E), 100 μm (B), (F) 200 μm (E), 90 μm .

3.2. Análise da estabilidade genética

Foram avaliados um total de 57 eventos organogênicos para caracterização do conteúdo de DNA nuclear, obtidos de diferentes tipos de regenerações em *P. cristalina*. Variações nos níveis de DNA nuclear entre os explantes avaliados. Os regenerantes 2n foram obtidos provenientes das plantas germinadas a partir de sementes e utilizadas como padrão durante a citometria. As brotações das folhas (Figura 11A), raízes (Figura 11C) e cotilédones (Figura 11D) permaneceram com nível de ploidia 2n, não variou. Já as brotações oriundas dos hipocótilos em 3 eventos apresentaram níveis de ploidia 4n, demonstrando que a utilização deste tipo de explante pode induzir a formação de regenerantes instáveis geneticamente.

Os tecidos espermáticos produziram constantemente brotos triploides (3n) 100% dos regenerantes (Figura 11E) e (Figura 12B).

Plantas triploides apresentam características de suma importância para uso comercial, por exemplo, podem formar frutos sem sementes (Banana, citrinos, melão) ou pode ter um sabor melhor de que os seus ancestrais diploides (batata), devido a isso, o desenvolvimento de processos eficientes para a produção de triploides é importante para comercial, bem como efeitos de estudos do comportamento *in vitro* (Góralski et al., 2005).

Os resultados utilizando-se de tecidos espermáticos para a regeneração em *Passiflora* abre perspectivas de sua utilização para programas de melhoramento genético do gênero e pode ser estendida para a espécie mais importante comercialmente *P. edulis*. A organogênese *de novo* em *P. cristalina* pode ser considerada um sistema efetivo e responsivo na produção de grande número de brotações e modelo para o gênero com nível de ploidia 3n para tecidos endospermáticos.

Os picos dos canais durante as análises variaram entre diploides (1034,175 – 1090,564) incluindo os padrões (Figura 11, A- F), triploides (Figura 11E) e (Figura 12B) (1491,596 – 1655,754) onde aumentou consideravelmente quando comparado com o padrão 2n, e, tetraploides (2148,150 - 2190,200), ou seja, dobrou no momento da

leitura (Figura 12C).

Para as análises o coeficiente de variação (CV) variou entre 1,37% a 3,42%, no pico G₁. Indicando uma alta resolução no momento da leitura de acordo com (Yanpaisan et al., 1999), não sendo necessário a adição de outros componentes para melhor visualização.

Pinto et al., 2011, durante a regeneração em *Passiflora cincinnata* observaram variações no nível de ploidia obtendo regenerantes (4n). Silva e Carvalho (2014) verificaram que a variação no conteúdo de DNA no momento da indução da embriogênese somática está intimamente associada ao período de exposição ao meio de cultivo. Silva et al., 2011, avaliando regenerantes provenientes de raízes não identificou variações com conteúdo de DNA em *P. cincinnata* e populações comerciais de *Passiflora edulis* Sims ('FB 100', 'FB 200', e 'FB 300') indicando estabilidade genética entre os regenerantes obtidos.

No presente estudo a indução de indivíduos tetraploides foram obtidos apenas em regenerantes provenientes de segmentos hipocotiledonares indicando que para este tecido há uma grande possibilidade de obtenção de indivíduos com alteração no conteúdo de DNA. A obtenção de plantas tetraploides em passilforáceas ainda é pouco estudada pela literatura inclusive na obtenção de caracteres desejáveis no melhoramento genético. Particularmente, regenerantes 4n abrem novos caminhos para diferentes estudos avaliando a possível super expressão de caracteres desejáveis inclusive a incorporação em banco de germoplasmas.

Células poliplóides são raramente observadas se dividindo, a ativação do programa de endociclo pode ser um mecanismo para evitar a transmissão de lesões do DNA no pool de células meristemáticas, induzindo a célula danificada num estado não divisional, de tal modo salvaguardar a progênie de Mutações no DNA (Veylder et al., 2011).

Em hipocótilos umas hipóteses para a indução de endoreplicação após danos ao DNA poderiam ocorrer devido ao possível aumento do número de fitas de DNA para reparação de genes danificados durante a organogênese, por recombinação homóloga usando uma cópia intacta como molde (Veylder et al., 2011) originando plantas com

uma deformidade no endociclo ainda ao se alongarem no escuro podem implicar no aumento no nível de ploidia.

Vieira, 2011 observou frequência de indivíduos anormais, ou seja, que variaram o conteúdo de DNA, oriundos de regeneração em raízes para *Passiflora setacea* com a combinação de BA e TDZ, que supostamente podem estar sendo induzidos devido as células do periciclo reterem a expressão de genes do ciclo celular (Martinez et al., 1992; Hermeley et al., 1993 e Burssens et al., 2000), Onde possivelmente estes genes seriam responsáveis em iniciar o processo do ciclo celular sem sofrer desdiferenciação (Atta et al., 2009).

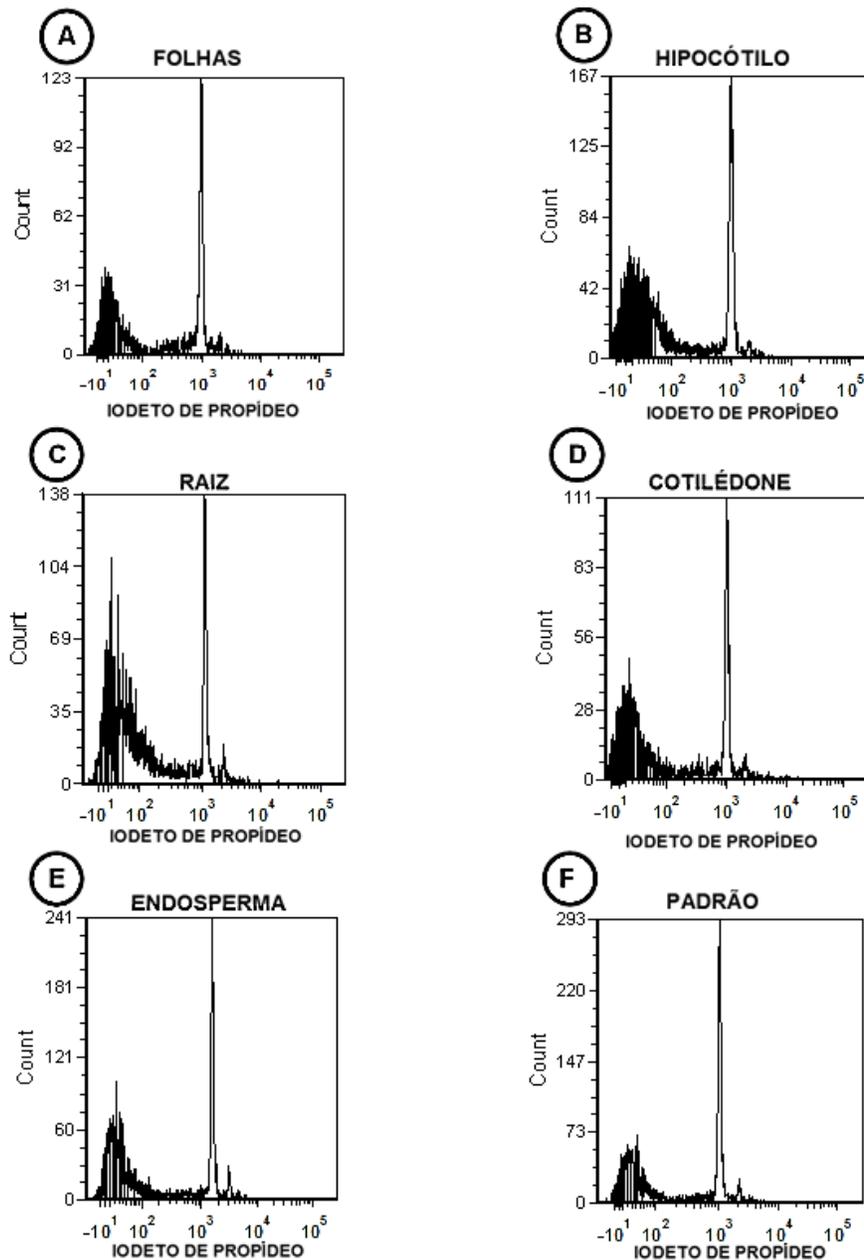


Figura 11: histogramas representando o pico referente a valor do DNA nuclear picos do canal variando entre diploides (1034,175–1090,564), triploides (1491,596–1655,754), obtidos a partir de núcleos de *P. cristalina* corados com iodeto de propídeo regenerantes provenientes de folhas (A), hipocótilos(B), raízes (C), cotilédones (D), endospermas(E), padrão planta de *P. cristalina* germinadas *in vitro* (F).

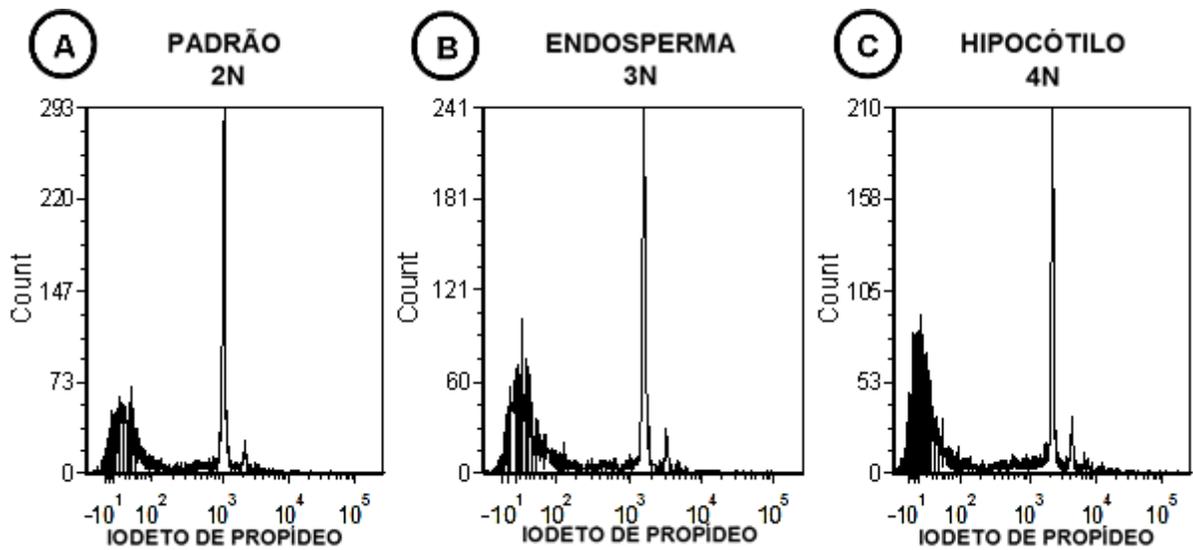


Figura 12: Histogramas comparando os diferentes níveis de ploidia picos do canal variando entre diploides (1034,175–1090,564), triploides (1491,596–1655,754) e tetraploides (2148,150–2190,200) obtidos referente ao DNA nuclear obtido a partir de núcleos corados com iodeo de propídeo em *Passiflora cristalina* por diferentes tipos de regenerações A (padrão 2n), B (endosperma 3n) e C (Hipocótilos 4n).

4. CONCLUSÕES

Obteve-se a regeneração de todos os tipos de explantes de *P. cristalina* empregados.

BA promoveu as melhores médias em brotações em *Passiflora cristalina* entre os explantes folhas, hipocótilos, cotilédones e tecidos endospermicos;

CIN promoveu a regeneração a partir de segmentos radiculares em *P. cristalina*;

O regulador TDZ promoveu as maiores médias para calogênese entre os diversos tipos de explantes combinando a hiperidricidade e a dificuldade na conversão de brotações adventícias;

O endosperma evidenciou ser um tecido que possibilita a regeneração de plantas triploides.

Há a necessidade de melhor verificação da concentração/estabilidade genética, em segmentos hipocotiledonares, uma vez que houve a produção de indivíduos tetraploides provenientes desta via de regeneração.

E ainda de estudos avaliando endoreplicações em diferentes tecidos vegetais associando estudos visando a estabilidade genética dos tecidos regenerados;

Os testes histoquímicos evidenciaram o consumo energético pela metabolização celular durante a morfogênese *in vitro* de compostos ergásticos.

O sistema de regeneração *de novo* por organogênese em *Passiflora cristalina* foi estabelecido com sucesso nos diferentes tipos de explantes cultivados *in vitro* e abre novas perspectivas para a regeneração melhoramento genético, visto o alto potencial regenerativo da espécie inclusive a obtenção de plantas poliploides.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. *In vitro* propagation of passionfruit. Morphological, Physiological and Genetic Aspects. **EDUFES**. 117-184, 2009.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**. 31: 1495-1515, 2012.

AMUGUNE, N. O.; GOPALAN, H. N. B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**. 1: 1993.

ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARC'H, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PAUTOR, V.; RECH, P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyls explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**. 57: 626-644, 2009.

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.

BURSSSENS, S.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; BEECKMAN, T.; RICHARD, C.; SHAUL, O.; FERREIRA, P.; VAN MONTAGU, M.; INZE´, D. Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2 1* gene. **Planta**. 211: 623–631, 2000.

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P. H. J.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Dynamics of biochemical and

morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in *Acca sellowiana* (Berg.) Burr. **Plant Growth Regulation**. 59: 103-115, 2009.

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

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

ĆOSIĆ, T.; MOTYKA, V.; RASPOR, M.; SAVIĆ, J.; CINGEL, A.; VINTERHALTER, B.; NINKOVIĆ, S. In vitro shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*): effects of genotype, explant type and applied cytokinins. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 121: 741-760, 2015.

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

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**. 85: 625-631, 1992.

DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; DE OLIVIERA, J. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**. 15: 106-110, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

GERONIMO, I. G. C. **Caracterização de espécies silvestres de passiflora via análise meiótica e conteúdo 2c DNA**. Campos dos Goytacazes: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF, 54 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).

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

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

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

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

HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; AND INZE', D. Cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. **Plant Cell**. 5: 1711–1723, 1993.

HOU, J.; WU, Y.; SHEN, Y.; MAO, Y.; LIU, W.; ZHAO, W.; WU, L. Plant regeneration through somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature zygotic embryos of *Sapium sebiferum* Roxb. **Scientia Horticulturae**. 197: 218-225, 2015.

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

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

JASRAI, Y. T.; MUDGIL, Y.; REMAKANTHAN, A.; KANNAN, V. R. Direct shoot regeneration from cultured leaves of *Passiflora caerulea* L. and field performance of regenerated plants. **Phytomorphology**. 49: 289-293, 1999.

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

KENGAR, A.; PARATKAR, G. T. Effect of Plant Growth Regulators on Indirect Organogenesis in *Ruta graveolens*. L. **International Journal**. 3: 1113-1119, 2015.

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

KNOX, J. P.; LINSTED, P. J.; KING, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta**. 181: 512-521, 1990.

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

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

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

MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J. M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 19: 1-11, 1989.

MARTINEZ, M. C.; JORGENSEN, J. E.; LAWTON, M. A.; LAMB, C. J.; DOERNER, P. W. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89: 7360–7364, 1992.

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

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

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

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

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

- O'BRIEN TP, MCCULLY ME The study of plant structure principles and selected methods. **Termacarphi Pty Ltd, Melbourne.** 352,1981.
- OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; 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: 1995.
- OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Protoplast isolation from leaf mesophyll of *Passiflora suberosa* L.: influence of age of donor plants. **Revista Ceres.** 1996.
- OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. **Methods in cell biology.** 33: 105-110, 1990.
- OZAROWSKI, M.; THIEM, B. (Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 23: 937-947, 2013.
- PATEL, K. R.; THORPE, T. A. Morphogenesis (cytochemistry). In: **Cell and Tissue Culture in Forestry.** Springer Netherlands, 1987. p. 183-201.
- PINTO, D. L. P.; DE ALMEIDA BARROS, B.; VICCINI, L. F.; DE CAMPOS, J. M. S.; DA 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.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**, 3rd edn. Churchill-Livingstone, London. 1972.
- PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. In vitro organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 46: 28-33. 2010.
- RAJANNA, L.; SHARMA, G. S. In vitro Axillary Bud Proliferation and Direct Organogenesis of *Aristolochia tagala* cham.: A Rare Medicinal Plant. **Research & Reviews: Journal of Botany.** 4: 21-28. 2015.

RATHORE, M. S.; SHEKHAWAT, S.; KAUR, G.; SINGH, R. P.; SHEKHAWAT, N. S. Micropropagation of vegetable rennet (*Withania coagulans* [Stocks] Dunal)—a critically endangered medicinal plant. **Journal of Sustainable Forestry**. 31: 727-746. 2012.

REIS, L. B.; COSTA, R. R.; OTONI, W. C. INFLUÊNCIA DE AGENTES GELIFICANTES NA ORGANOGÊNESE IN VITRO DE EXPLANTES JUVENIS DE MARACUJAZEIRO-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEGENER). **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 1: 88-80, 2005

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

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

RIBALTA, F. M.; CROSER, J. S.; OCHATT, S. J. Flow cytometry enables identification of sporophytic eliciting stress treatments in gametic cells. **Journal of Plant Physiology**. 169: 104-110, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVEIRA, G. F. **Diversidade genética e aspectos reprodutivos de *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi, uma espécie nativa da Amazônia Matogrossense**. Alta

Floresta: Universidade do Estado De Mato Grosso – UNEMAT, 81 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).

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

SMITH, B. G.; HARRIS, P. J. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. **Biochemical Systematics and Ecology**. **27**: 33-53, 1999.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. **51**: 247-258, 2008.

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

THOMAS, T. D.; PHILIP, B. Thidiazuron-induced high-frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of ia medicinal climber, *Tylophora Indica* (Burm. F.) merrill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. **41**:124-128, 2005.

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.

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

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

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

VEYLDER, L.; LARKIN, J. C.; SCHNITTGER, A. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. **Trends in Plant Science**. 16: 624-634, 2011.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. 17.1 **Passiflora spp. Passionfruit**. General Editor: *Gabrielle J. Persley*, The Doyle Foundation, Glasgow, Scotland. 436. 2005.

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

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M. D.; MALDONADO, J. F. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. D. Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 25: 489-493, 2003.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. 17.1 *Passiflora* spp. Passionfruit. General Editor: *Gabrielle J. Persley*, **The Doyle Foundation, Glasgow. Scotland**. 436, 2005.

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

WILLATS, W. G.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. In **Plant Cell Walls Springer Netherlands**. 2001. (pp. 9-27).

XIE, D.; HONG, Y. In vitro regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 66: 167-173, 2001.

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

YANPAISAN, W.; KING, N. J.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology advances**. 17: 3-27, 1999.

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

ZHANG, Z.; FINER, J. J. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) organogenesis from primary leaves of young seedlings preconditioned by cytokinin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 123: 645-655, 2015.

CAPÍTULO II

Embriogênese somática e análises histoquímica em *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi

RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica regenerativa dentro da cultura de tecidos vegetais que fornece subsídios práticos para utilização em programas de melhoramento genético vegetal. O trabalho objetivou a regeneração *de novo* a partir da embriogênese somática, análises histoquímicas e a produção e a mobilização de metabólitos em *Passiflora cristalina*. Sementes livres de tegumentos foram desinfestadas, e, assepticamente realizou a extração de embriões zigóticos que foram inoculados em meio MS com a adição de 2,4-D nas concentrações de 9.04, 13.57, 18.09, 22.62, 27.14, 31.67, 36.19, 40.72, 45.24 μM combinados a 4.43 μM de BA. A análise estatística foi um (DIC) constituído por três repetições, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0.05$). Explantes que apresentaram proembriões em 20 dias de cultivo foram transferidos para o meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento e gelificado com Phytigel®, aos 30 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento foram observados embriões somáticos (cordiformes, torpedos e cotiledonares) para concentrações de 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 27.33 embriões, seguido de 18.09 μM + 4.45 μM de BA com 3 embriões de forma indireta. Aos 60 dias de cultivo *in vitro* embriões somáticos cotilédonares foram observados nas concentrações 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 51.66 embriões, seguido 21.22 embriões para a concentração de 18.09 μM + 4.43 μM de BA. Pelas análises histoquímicas pode-se observar que após o período de indução entre 20-60 dias de cultivo ocorreu a produção de amido, mobilização de polissacarídeos neutros, proteínas, lipídeos em regiões com intensa atividade metabólica e uma maior evidência de pectinas em regiões em estágio de diferenciação e crescimento celular durante a formação de embriões somáticos.

Palavras chave: Cultivo *in vitro*, Regeneração, Embrião somático, Histoquímica.

Somatic embryogenesis and histochemical analyzes in *Passiflora cristalina*
Vanderplank and Zappi

ABSTRACT

The Somatic embryogenesis is a regenerative technique within the plant tissue culture that provides practical information for use in plant breeding programs. The work aimed to the regeneration *de novo* from somatic embryogenesis, histochemical analysis and the production and mobilization of metabolites in *Passiflora cristalina*. Seeds free of teguments were sterilized and aseptically performed the extraction zygotic embryos were inoculated onto MS medium with the addition of 2,4-D at concentrations of 9.04, 13.57, 18.09, 22.62, 27.14, 31.67, 36.19, 40.72, 45.24 μM combined to 4.43 μM of BA. Statistical analysis was a (DIC) consists of three repetitions, and the averages were compared by 5% Tukey test ($p \leq 0.05$). Explants that showed pro-embryos at 20 days of culture were transferred to MS medium, in the absence of growth regulators and gelled with Phytigel®, at 30 days of culture on maturation medium in the absence of growth regulators somatic embryos were observed (heart-shaped, torpedo and cotyledon) at concentrations of 27.14 μM of 2,4-D combined with 4.43 μM BA with an average of 27.33 embryos, followed by 18.09 + 4.45 μM BA to 3 embryos indirectly. After 60 days of cultivation cotyledonary somatic embryos in vitro was observed at concentrations of 27.14 μM of 2,4-D combined 4.43 μM BA to with a mean of 51.66 embryos, followed 21.22 embryos to concentratio18.09 μM + 4.43 μM BA. For histochemical analyzes can be seen that after an induction period between 20-60 days of cultivation occurred starch production, mobilization of neutral polysaccharides, proteins, lipids in regions of intense metabolic activity and greater evidence of pectins in regions stage cell growth and differentiation during the formation of somatic embryos.

KEY-WORDS: In vitro culture, Regeneration, Somatic embryo, Histochemistry.

1.0. INTRODUÇÃO

O Brasil é o centro de diversidade de Passifloráceas, com mais de 150 espécies nativas (Rocha et al., 2012). O gênero tem importância econômica no setor médico, e, especialmente, como fonte de alimento, além de interesse econômico, a família tem uma grande importância ecológica (Nardin et al., 2015). O cultivo de maracujá tem demonstrado forte crescimento e expansão, devido à grande popularidade em diferentes segmentos do mercado consumidor, incluindo tanto como fruta fresca, produção de suco e na indústria de cosméticos (Vieira et al., 2014). Além de alguns possuírem valores ornamentais por serem exóticos, também se revelam como fontes úteis de moléculas biológicas que podem ser fitofármacos potentes no futuro (Dhawan et al., 2004).

A espécie *Passiflora cristalina* Vanderplank e Zappi foi identificada pela primeira vez no município Novo Mundo - Estado de Mato Grosso, no Parque Estadual Cristalino, limite nordeste do parque no ano de 2008 por (Vanderplank e Zappi, 2011). É uma planta pouquíssima estudada (Gerônimo, 2014; Silveira, 2015), possuem flores vistosas avermelhadas, seus frutos são ovalados (Vanderplank e Zappi, 2011). Suas flores são potencialmente ornamentais, os frutos possuem um sabor levemente adocicado.

A micropropagação tem sido uma ferramenta importante que melhorou a investigação e o desenvolvimento em muitos campos da ciência das plantas, permitindo a verificação fundamental a ser realizado sobre a fisiologia da morfogênese e diferenciação (Pipino et al., 2010).

Na regeneração *de novo* a embriogênese somática se destaca como uma importante via para a regeneração de plantas e oferece vantagens sobre o melhoramento convencional. A embriogênese somática pode disponibilizar linhagens de células para a engenharia genética, regeneração de uma estrutura bipolar provenientes de grupos de células, produção em larga escala de plantas geneticamente idênticas, homogeneidade, estudos básicos funcional e molecular, produção de sementes sintéticas e a conservação de recursos genéticos através da criopreservação (Pinto et al. 2010; Yang e Zhang, 2010, Xu e Huang et al., 2014).

A embriogênese somática, cuja formação do embrião é originado de células somáticas, é um mecanismo natural de reprodução assexuada em algumas espécies de plantas que podem ser induzidas *in vitro* (Silva et al., 2014). É um processo típico de desdiferenciação que retorna uma célula somática diferenciada reprogramando-a um estado de células totipotentes (Xu e Huang et al., 2014). Na embriogênese somática uma única célula vegetal ou grupo de células do tecido somático formam embriões, estruturas bipolares que possuem órgãos embrionários típicos, a radícula, hipocótilo e cotilédones (Arnold et al., 2002; Otoni et al., 2013; Pilarska et al., 2015).

O número de protocolos de embriogênese somática para espécies de *Passiflora* spp. ainda é considerado baixo (Otoni et al., 2013). Atualmente os protocolos regenerativos por embriogênese somática baseiam-se no protocolo estabelecido por Silva et al., (2009) para espécie *Passiflora cincinnata* considerada uma espécie modelo para o gênero, o que possibilitou a aplicação de protocolos regenerativos para outras espécies como *Passiflora edulis* (Pinto et al., 2010), *P. miniata* e *P. speciosa* (Ferreira et al., 2015), *P. alata*, *P. crenata*, *P. edulis* e *P. gibertii* (Rosa et al., 2015).

Embora estudos recentes sobre a regeneração de plantas tenham aumentado bastante a compreensão da plasticidade celular em plantas, ainda muitas perguntas permanecem sem resposta (Xu e Huang et al., 2014).

A realização de estudos morfológicos e anatômicos sobre embriogênese somática permitem a identificação de células e/ou tecidos que conferem origem a embriões somáticos, bem como, na elucidação dos processos morfogenéticos (Rocha et al., 2012^b; Silva et al., 2015). Atualmente, em várias espécies de plantas estudos desta natureza tem sido reportados (Cangahuala-Inocente et al., 2004, Almeida et al. 2006; Pinto et al. 2010; Rocha et al. 2012; Otoni et al. 2013, Silva et al., 2015), o que contribui para a otimização de protocolos que envolvem a rota de regeneração *de novo* a partir da embriogênese somática.

O trabalho objetivou-o a regeneração *de novo* a partir da embriogênese somática, análises histoquímicas e a produção e a mobilização de metabólitos em *Passiflora cristalina*.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos vegetais, situado no CEPDA do *campus* universitário de Tangará da Serra – MT e Laboratório de Cultura de Tecidos, situado no BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa - MG. Sementes de *Passiflora cristalina* foram obtidas a partir de coleta em populações silvestres localizadas na região de Alta Floresta – MT.

O tegumento das sementes de *P. cristalina* foram extraídos com auxílio de minimorsa de acordo com (Reis et al., 2007, Silva et al., 2009). Em câmara de fluxo horizontal as sementes foram desinfestadas, por meio de imersão em álcool 70% (v/v) por 3 minutos, posteriormente em hipoclorito de sódio comercial a 2,5% (v/v) por 25 minutos, com a adição de três gotas do agente surfactante Tween-20. Em seguida, as sementes foram submetidas a 4 enxagues consecutivos em água destilada e autoclavada, após foram mantidas reidratando durante a noite (*overnight*) em água destilada estéril.

Embriões zigóticos foram utilizados como fonte de explantes para a indução da embriogênese somática, onde após a desinfestação foram isolados assepticamente e, posteriormente inoculados em meio contendo sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de MS, 4,5% (p/v) (Laborclin) de mio-inositol, 1% (p/v) 30% (p/v) sacarose, e 8,5% (p/v) de Ágar, bacteriological (Acumedia®, Michigan) como agente gelificante adicionado a diferentes concentrações do regulador de crescimento Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 9.04, 13.57, 18.09, 22.62, 27.14, 31. 67, 36.19, 40.72, 45.24 μM e combinado com Benzil-adenina (BA) a 4.43 μM .

Massas pró-embriogênicas com 20 dias de cultivo *in vitro* foram transferidas para meio MSØ na ausência de reguladores gelificado com Phytigel 2,5% (p/v) (Sigma® USA) para maturação de embriões somáticos.

O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e posteriormente foram autoclavados durante 15 minutos (121°C e 1,1 atm de pressão). Os embriões zigóticos foram cultivados em placas de Petri, contendo alíquotas de 45 mL de meio após solidificadas foram vedadas com filme de policloreto de vinila PVC (Rolopac®), e mantidas em sala de cultivo, na ausência de luz, à temperatura de 25 ± 2 °C de acordo com Silva et al.

(2009).

A análise estatística foi realizada em dois períodos por meio de duas avaliações (Maturação em 30 dias de cultivo, e, embriogênese somática aos 60 dias) onde constituíram-se de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três repetições entre os tratamentos onde 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% de probabilidade de erro ($p \leq 0.05$) realizado por meio do software Sisvar (Ferreira, 2011).

2.1. Análise Citológica

Amostradas de calos contendo células pró-embriônicas em diferentes concentrações (Tabela 1), 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 e analisadas. As observações e os registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (Car Zeiss Primo Star 8mp, Alemanha) com câmera digital acoplada (Axiocam 105 cor) Localizado no Laboratório de Microscopia da Universidade do Estado de Mato Grosso.

2.2. Caracterização Anatômica e Histoquímica

Calos contendo embriões somáticos de *P. cristalina* foram coletados com 20 e 60 dias de cultivo para os tratamentos 18.09, 22.62 e 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA. Fixados em solução (Karnovsky, 1965) modificada constituída por: 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato, pH 7,2.

Cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964) e para análise histoquímica foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido periódico de Schiff (PAS; O'Brien e McCully, 1981) para a detecção de polissacarídeos neutros, Xilidine Ponceau XP (Vidal, 1970) proteínas totais, Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940) para pectinas,

Lugol (Johansen, 1940) para grânulos de amido e Sudan Balck b (Pearse, 1972) para lipídios totais.

As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA), foram obtidos cortes seriados transversais e longitudinais das amostras com 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'Brien & McCully, 1981).

As observações e captura das imagens foram realizadas em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após 20 de cultivo células potencialmente embriogênicas foram evidenciadas com a coloração vermelha do reagente carmim acético em todos os tratamentos utilizando-se de 2,4-D + BA. As células apresentam-se com formato arredondado e núcleos proeminentes, pouco vacuolizadas, tipicamente embriogênicas, já as células não embriogênicas apresentam coloração azul e são alongadas, com muitos vacúolos. A coloração citológica demonstrou o alto potencial das células para seguir a rota embriogênica em *P. cristalina*, conforme observado na (Figura 1 A-I).

Massas pró-embriogênicas de aspecto compacto e coloração amarelada (Figs 1A-I) foram observadas em todos os tratamentos após 30 dias de cultivo *in vitro*. Entretanto, nos tratamentos 13.57, 18.09 e 27.14 μM de 2,4-D combinados com 4.43 μM de BA embriões somáticos pré-cotiledonares foram observados (Figuras 2 C-D-E) no meio de indução.

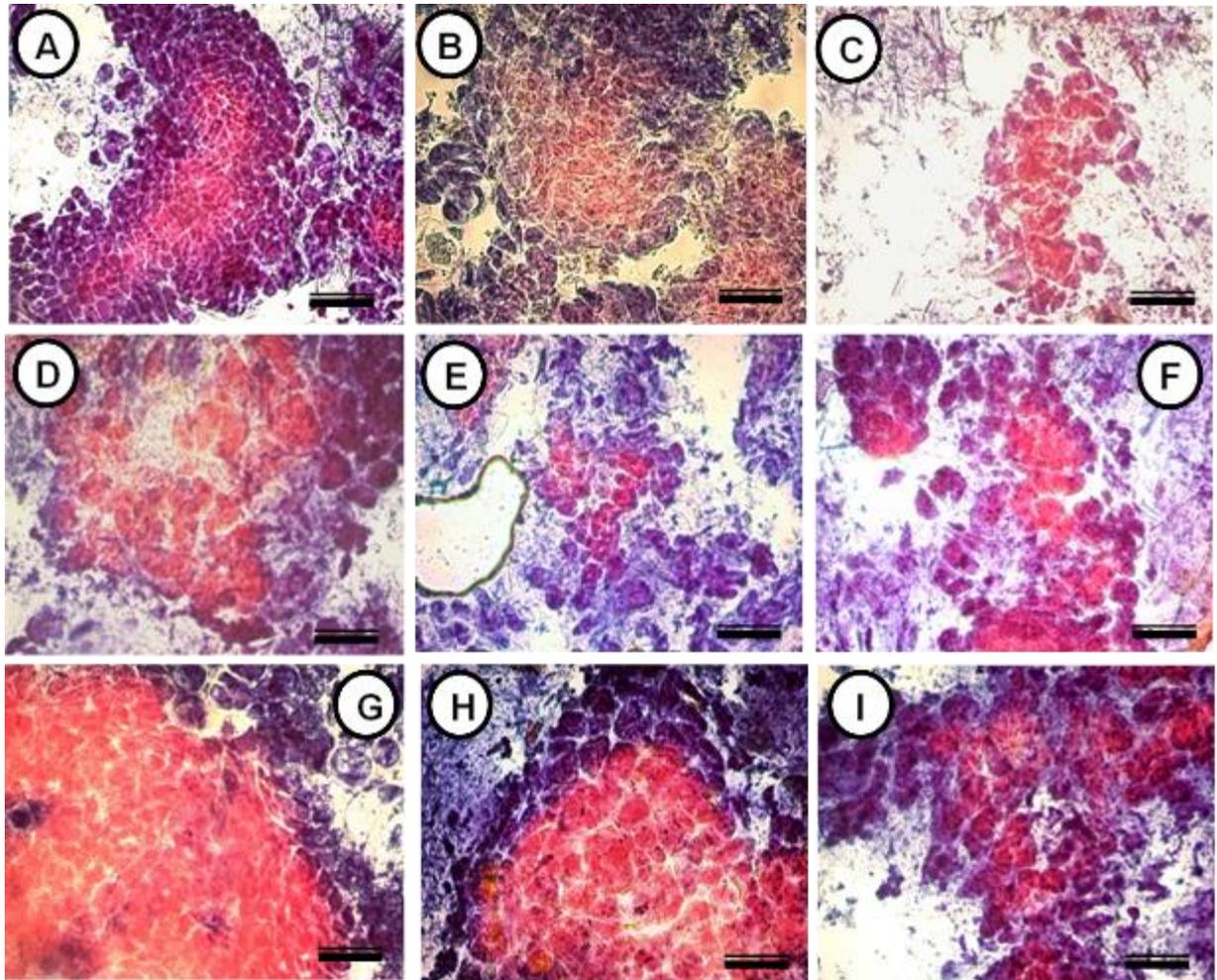


Figura 1: Caracterização citológica das células potencialmente embriogênicas com coloração vermelha (carmim acético) e as com coloração azul (azul de Evans) não embriogênicas em *Passiflora crystalina* em meio de cultivo MS acrescidos com diferentes concentrações de 2,4-D (A) 9.04 μM , (B) 13.57 μM , (C) 18.09 μM , (D) 22.62 μM , (E) 27.14 μM , (F) 31.67 μM , (G) 36.19 μM , (H) 40.72 μM , (I) 45.24 combinados a 4.43 μM de BA. Barras: (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) e (H) 150 μm .

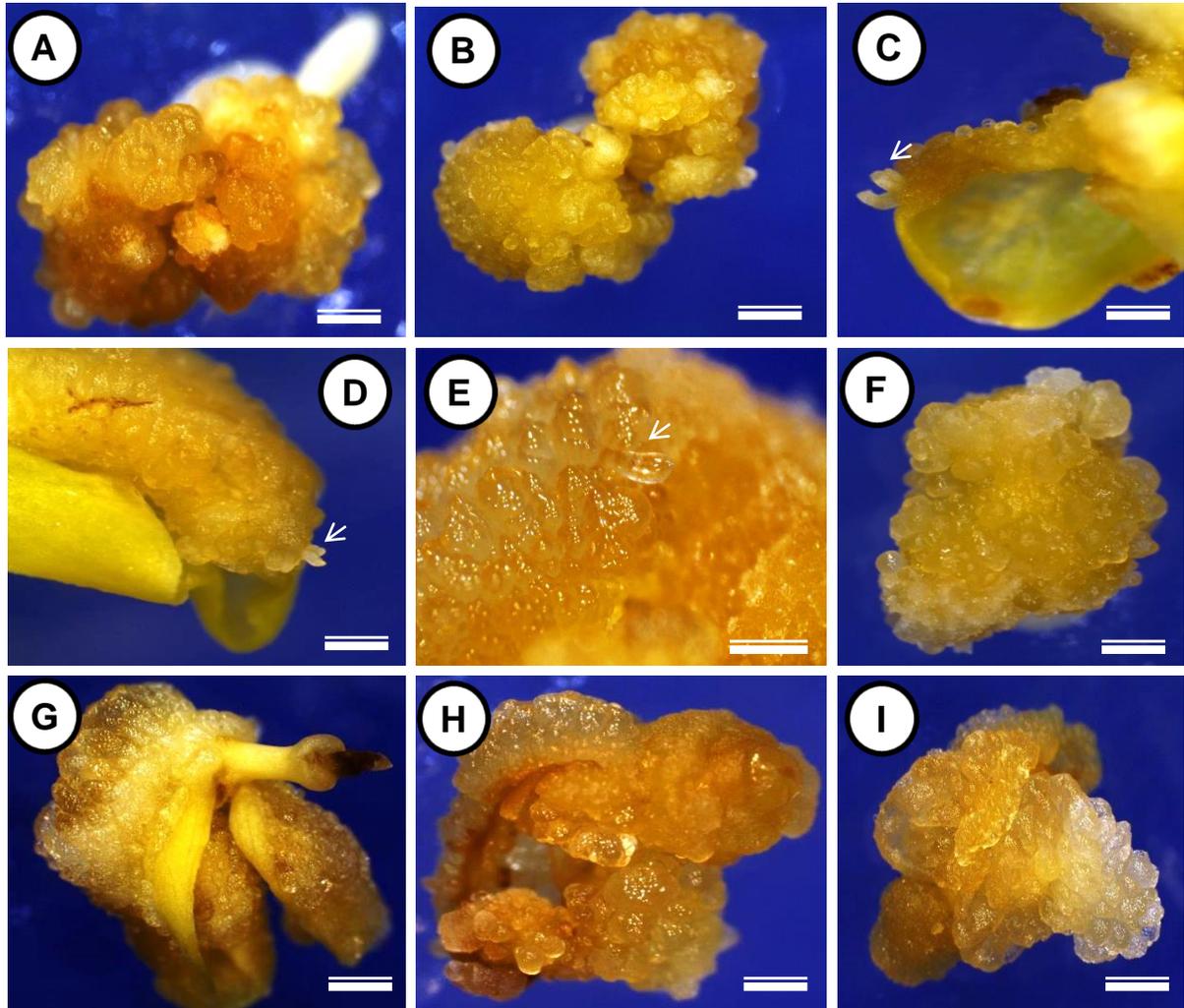


Figura 2: Massas pró-embriogênicas nos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante na indução de embriogênese somática em *P. cristalina* após 20 dias de cultivo. (A) 9.04 μM , (B) 13.57 μM , (C) 18.09 μM , (D) 22.62 μM , (E) 27.14 μM , (F) 31.67 μM , (G) 36.19 μM , (H) 40.72 μM , (I) 45.24 μM de 2,4-D combinados a 4.43 μM de BA. Barras: (A), (B), (C), (D), (F), (G) e (H) 90 μm (E) 110 μm .

Aos 30 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento e gelificado com phytigel embriões somáticos (cordiformes, torpedos e cotiledonares) diferenciaram para concentrações de 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 27.33 embriões, seguido de 18.09 μM + 4.45 μM de BA com 3 embriões (Figura 3).

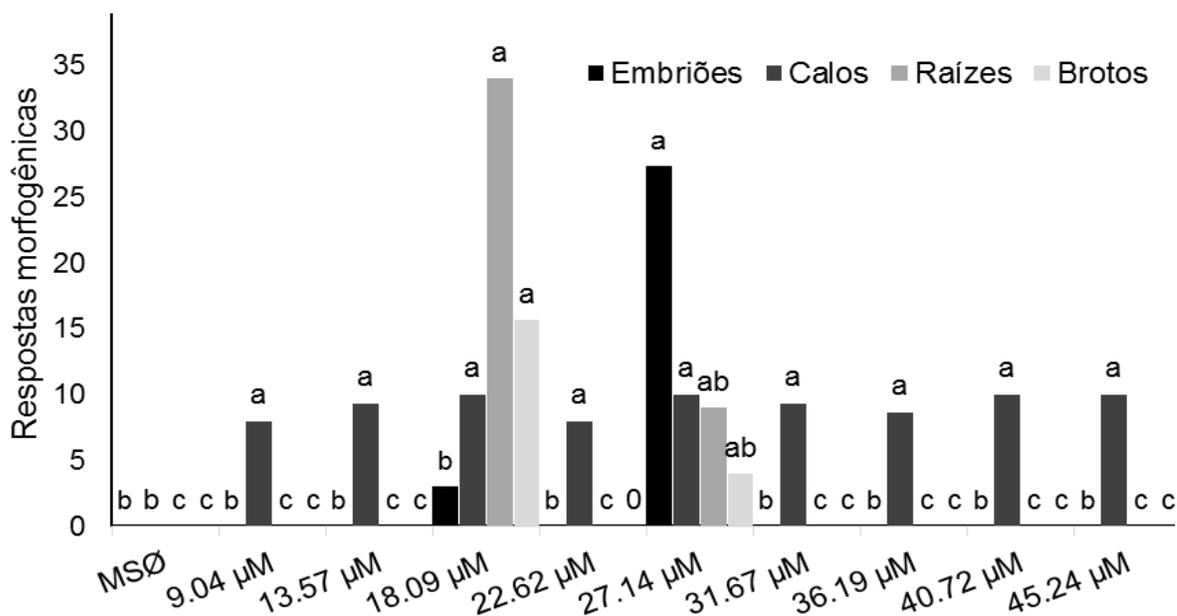


Figura 3: Respostas morfológicas aos 30 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento em *P. cristalina*, anteriormente induzidas por diferentes concentrações de 2,4-D + 4.45 μM de BA.

Durante a fase de maturação de embriões somáticos foi observado formação de raízes correspondendo a médias de 34 raízes para 18.09 μM + 4.45 μM de BA e 9 raízes para 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA também foi observado a produção de brotações adventícias com 15.66 brotações para a concentração de 18.09 μM + 4.45 μM de BA e 4 para a concentração de 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA, tanto a rizogênese quanto a organogênese oriundas de forma indireta (Figura 3).

Aos 60 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento e gelificado com Phytigel embriões somáticos cotiledonares diferenciaram-se nas concentrações de 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com uma média de 51.66 embriões, seguido de 18.09 μM + 4.45 μM de BA com 21.22 embriões (Figura 4) de forma indireta.

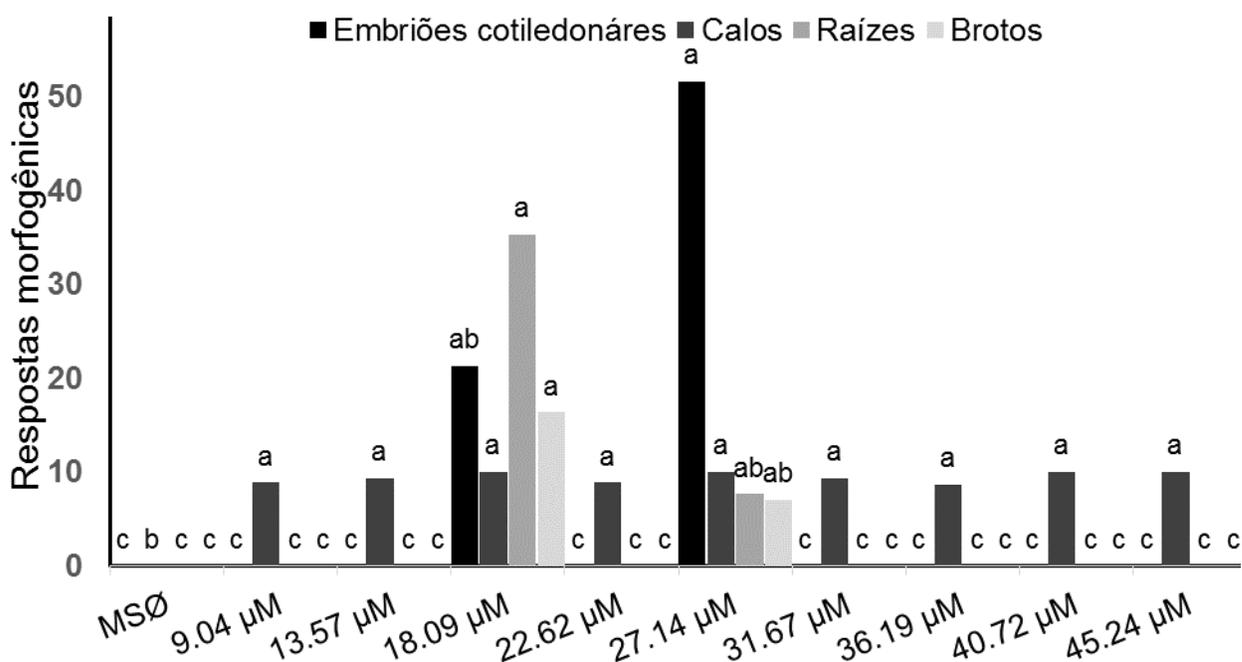


Figura 3: Respostas morfológicas aos 30 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento em *P. cristalina*, anteriormente induzidas por diferentes concentrações de 2,4-D + 4.45 μM de BA.

No trabalho de Silva et al. (2009) foi obtido um maior número de embriões somáticos em *P. cincinnata* utilizando da concentração de 18.1 μM de 2,4-D combinado com 4.5 μM de BA. Já para *P. cristalina* o maior número de embriões cotiledonares foram observados na concentração de 27.14 μM (Figura 1D) (Tabela 2). Entretanto, embriões somáticos em meio de indução na concentração de 18.1 μM de 2,4-D (Figura 2C) (Tabela 2), também produzem embriões aos 20 dias de cultivo *in vitro*, demonstrando que o 2,4-D combinado com o BA ativam genes responsáveis pela

aquisição da competência celular, determinação e diferenciação de células embriogênicas em embriões somáticos em *Passiflora spp.* Para as concentrações de 9.04, 13.57, 22.62, 31.67, 36.19, 40.72 e 45.24 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA não houve a conversão dos embriões globulares obtidos durante o processo de indução (Tabela 2)

Rosa et al. (2015) obtiveram sucesso na regeneração por embriogênese para *P. gibertii* utilizando 13.6 μM 2,4-D combinado a 4.5 μM BA e para *P. alata*, *P. crenata*, *P. edulis* utilizando a concentração de 18.1 μM 2,4-D também combinado a 4.5 μM BA utilizando meio de MS na ausência de reguladores de crescimento e gelificado com phytigel a indução e maturação dos embriões. De acordo com (Yang, 2010) combinação entre auxinas e citocininas para muitas espécies de plantas são necessárias para induzir a embriogênese somática.

Entre os diferentes reguladores auxínicos utilizados para induzir a embriogênese somática, 2,4-D é, de longe, o mais eficiente e portanto, este regulador de crescimento sintético é usado na maioria dos sistemas de cultura de células e tecido embriogênicos (Féher et al., 2003, Yang, 2010). Já entre as citocininas a mais empregada é o BA (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012^b; Rosa et al., 2015).

A combinação desses reguladores em particular para as Passifloráceas atuam de forma sinérgica na indução e na desdiferenciação da embriogênese somática (Silva et al., 2009; Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012^b; Silva e Carvalho, 2014; Rosa et al., 2015). Segundo Scholten e Pierik, (1998) o agente gelificante pode imobilizar componentes adsorvidos a matriz de cultivo, e no momento da inclusão pode adicionar ou não elementos junto ao meio como, por exemplo, (Cu, Mn, Fe, Al, Cr, Cd, Ni, Zn, Sn, Fe, Na e Cl) que podem por sua vez induzir alterações durante a morfogênese *in vitro*.

É possível inferir que durante a indução e de conversão de embriões somáticos utilizando-se dos agentes gelificantes ágar e phytigel respectivamente, podem incorporar ou não elementos que podem induzir efeitos sinérgicos, ou antagônicos junto ao meio de cultivo, atuando diretamente durante a morfogênese *in vitro*, como foi observado neste estudo o comportamento durante conversão de embriões para o agente gelificante phytigel (Tabela 2).

Durante a indução da embriogênese somática em *P. cristalina* foi observado à formação de calos, raízes e brotos. As maiores médias obtidas para a formação de

calos foram evidenciadas para as concentrações de 45.24, 40.72, 27.14, 18.09, μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA com 10 calos nas concentrações de 31.67 e 13.57 μM com 9.33, 22.62 e 9.04 μM com 8,88 e 36.19 μM com 8.66 calos (Tabela 2). Quanto a presença de raiz foram observadas as maiores médias em 35.33 e 7.66 para 18.09 e 27.14 μM de 2,4-D combinado a 4.43 μM de BA (Figura 4). Também ocorreu a formação de brotações adventícias com as seguintes médias de 16.33 e 7 brotos para as concentrações de 18.09 e 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA (Figura 4).

Para o tratamento controle (MSØ) os embriões zigóticos a germinaram. Durante o processo de indução da embriogênese somática foi possível observar embriões anormais, apresentando de 3 a 4 cotilédones (Figura 5 A-C) e, embriões normais com dois cotilédones como observado na (Figura 5B-D). Silva et al. (2009) constataram que durante a embriogênese em *P. cincinnata* também ocorreu a formação de embriões policotiledonares.

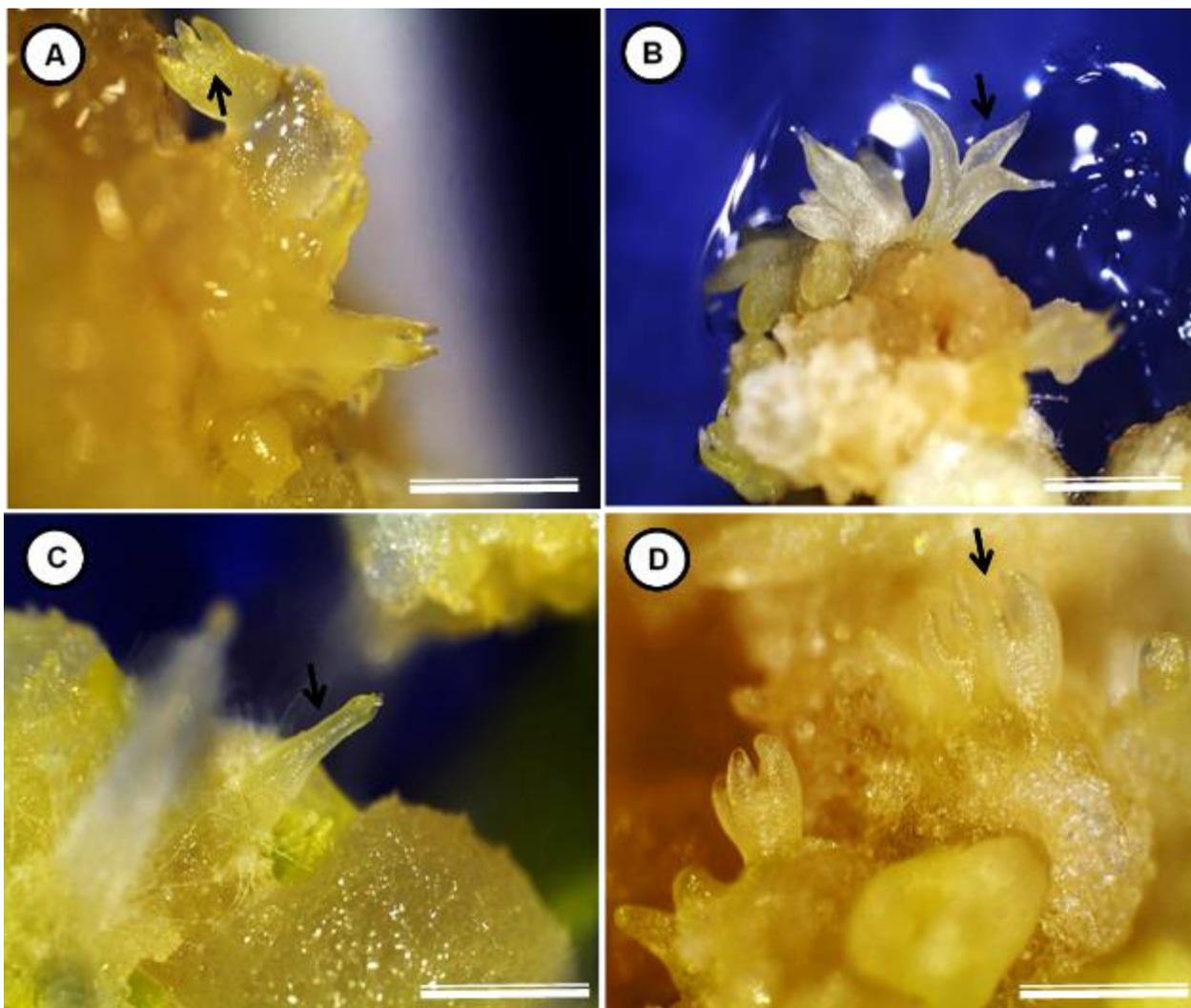


Figura 3. Malformações nos cotilédones dos embriões somáticos em 60 dias de cultivo em meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento induzidos pelas concentrações de. (A) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA, embriões apresentando quatro cotilédones (B) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA embriões com três cotilédones (seta). (C) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA e (D) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA embriões somáticos com desenvolvimento normal apresentando dois cotilédones. Barras: (A) e (B) 90 μm (C) e (D) 50 μm

3.1. Caracterização Anatômica e Histoquímica

Células pró-embriogênicas foram originadas de divisões celulares nos planos periclinal e anticlinal nas células do parênquima de embriões zigóticos de *P. cristalina* (Figura 4 A), apresentando intensa atividade mitótica.

Na Figura 4B protuberâncias são evidenciadas e posteriormente estas estruturas diferenciam em embriões somáticos em estágio globular (Figura C) e em estágio cordiforme onde ocorre sutil invaginação na região apical do embrião globular (Figura 4D) para o desenvolvimento dos cotilédones pró-embriões são observados nas faces adaxial e abaxial principalmente na região dos cotilédones do embrião zigótico (Fig.E).

Essas protuberâncias, são consideradas um estágio intermediário entre embriogênese somática direta e indireta, desde a sua formação de embriões somáticos precede desenvolvimento, no entanto, o padrão de multiplicação observado durante a sua formação e a incapacidade das células para proliferar indefinidamente sugerem que eles não são evidenciados como calos (Rocha et al., 2012) o que também foi observado durante a embriogênese somática em *P. edulis* por (Silva et al., 2015).

De acordo com Rocha et al., 2012 estruturas globulares, semelhantes a embriões somáticos foram formadas na superfície de embriões zigóticos maduros em *P. cincinnata* e acordo com a sua localização, as estruturas globulares são resultados do crescimento do pro-embrião, e tem origem multicelular.

Na Figura 4F pode se observar embrião somático pró-cotiledonar não apresentando conexão com o tecido de origem o que confirma a embriogênese somática em *P. cristalina*.

Embriões somáticos são estruturas bipolares que carregam órgãos embrionários típicos, a radícula, hipocótilo e cotilédones, a maior importância dos embriões somáticos é sua aplicação praticidade na propagação vegetativa em grande escala, e ainda transformação genética (Arnold et al., 2002; Otoni et al., 2013; Pilarska et al., 2015).

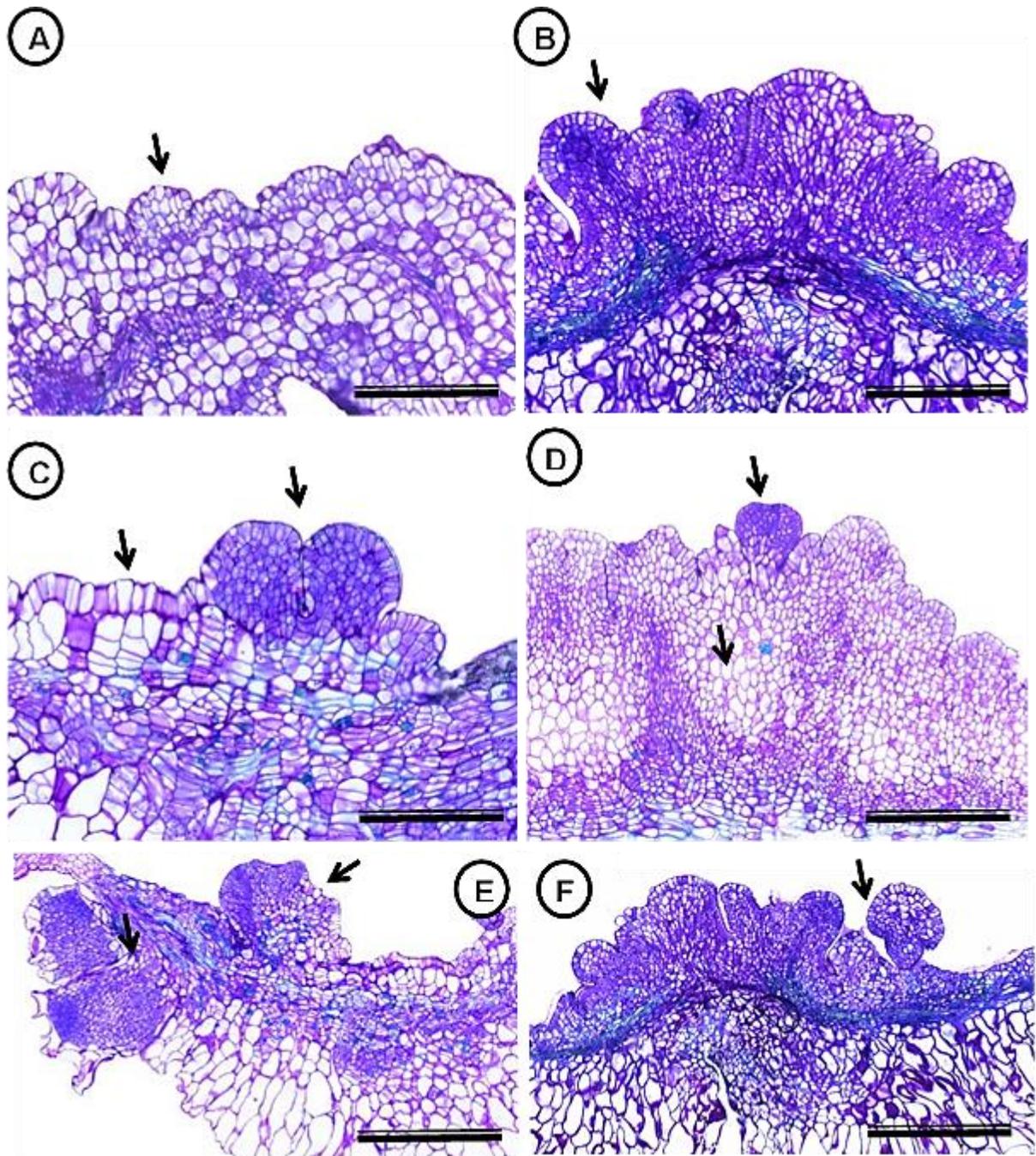


Figura 4: Cortes anômicos evidenciando o processo de desenvolvimento dos embriões somáticos em *P. cristalina* em meio de indução aos 20 dias de cultivo e de maturação aos 60 dias. (A) Divisões celulares periclinal e anticlinal, (B) Protuberâncias, (C) embrião globular, (D) embrião globular em estágio de transição inicial para cordiforme (E) pró-embriões desenvolvendo-se na face adaxial e abaxial em embrião zigótico (F) embrião pró-cotiledonar não apresentando conexão com o tecido de origem. Barras: (A), (B), (C) 90 μm (D) e (E) 50 μm (F) 80 μm .

Polissacarídeos neutros foram observados durante a embriogênese somática em *P. cristalina*, em menor quantidade aos 20 dias de cultivo (Figura 5A, C, D, E) quando comparado com os 60 dias sendo observados de forma evidente (Figura 5B, F),

De acordo com (Cangahuala-Inocente et al. 2009) Os polissacarídeos neutros são de fundamental importância durante a indução da embriogênese zigótica e somática, pois tem a capacidade de fornecer energia durante as primeiras fases de desenvolvimento até a fase autotrófica. Portanto pode-se afirmar que polissacarídeos neutros foram essenciais durante a maturação e conversão de embriões somáticos de *P. cristalina*.

O teste histoquímico evidenciados pela reação ao Xylidine Ponceau (XP), revelou uma grande quantidade de corpos proteicos, sendo mobilizados e metabolizados para regiões de intensa atividade metabólica por divisões celulares em regiões epidérmicas, em maior quantidade em 20 dias de cultivo *in vitro* (Figura 6A, C, D, E), e menor aos 60 dias onde apresentaram embriões em diversos estágios de desenvolvimento possivelmente pela alta necessidade de metabolização durante a formação dos embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 6B, F). Segundo Rocha et al., 2012b; Silva et al., 2015 corpos proteicos durante a morfogênese *in vitro* são utilizados como fonte de energia. Silva et al., (2015) observou maiores concentrações na fase inicial quando comparados com a fase da embriogênese somática em *P. edulis*. Foi observado concentrações elevadas de proteínas totais principalmente durante a fase de indução da embriogênese em 20 dias de cultivo em regiões da epiderme que apresentavam-se em sucessivas mitoses e já aos 60 dias as concentrações foram se esgotando mediante ao estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 6 B e F).

É evidente a consumo de corpos proteicos durante a embriogênese somática em *P. cristalina*, indicando a necessidade deste componente no momento da indução e conversão dos embriões somáticos (Figura 6 B, F). Durante a embriogênese em *P. cincinnata* Rocha et al. (2012) e *P. edulis* Silva et al. (2015) observaram a diminuição deste composto durante o estágio final da embriogênese somática. Corroborando assim dados com o presente estudo.

Pectinas foram observadas em todas as fases avaliadas durante a embriogênese somática (20-60) dias de cultivo *in vitro*, sendo evidenciadas em regiões em constante divisão celular, principalmente durante a transição dos estágios de desenvolvimento de embriões somáticos.

As pectinas compreendem polissacárideos acídicos incluindo homogalaturonano e o ramnogalacturonano e cadeias de polissacáridos neutros ou polissacárido tal como arabinanos, galactanos e arabinogalactanos e o seu papel e a esterificação a capacidade de formar géis atuando durante o processo de crescimento da planta (Knox et al., 1990). Durante a embriogênese somática em *P. cristalina* pectinas foram evidenciadas em menor quantidade em células indiferenciadas com a presença de grandes espaços intracelulares (Figura 7A, C e E). E já em maior quantidade quando se apresentavam mais compactas e diferenciadas a formação de embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 7B, D e F).

Grãos de amidos foram observados em escassa quantidade durante a fase inicial da embriogênese somática (20 dias) (Figura 8 A, E), quando localizados estavam presentes na região cortical dos embriões zigóticos (Figura 8 C-D), entretanto foram localizados em grande quantidade em embriões somáticos quanto apresentavam uma maior estágio de desenvolvimento aos 60 dias de cultivo *in vitro*, (Figura 8 B e E) indicando a produção *de novo* para este componente, e que por sua vez é possível inferir que foi altamente necessário durante a embriogênese somática em *Passiflora cristalina* (Figura 8 B, F). O que também foi verificado por Rocha et al., 2012 indicando a produção *de novo* para grânulos de amidos. Silva et al., (2015) observaram uma drástica redução em grânulos de amido durante a embriogênese somática em *P. edulis*. Indicando a necessidade de consumo deste componente durante a embriogênese somática.

Lipídeos foram encontrados em maior quantidade em fase inicial e durante a diferenciação de embriões somáticos, e, foram esgotando-se até desaparecerem totalmente evidenciando o alto consumo deste componente durante o desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos (Figura 9 A, B, D, E). Também foi observado a mobilização de corpos lipídicos durante a fase de indução da embriogênese aos 20 dias de cultivo (Figura 9 C, D). Rocha et al. (2012) durante a embriogênese somática em *P.*

cincinnata observou o esgotamento total de corpos lipídicos aos 18 dias de cultivo. Já Silva et al. (2015) constatou observaram a permanência destes compostos aos 40 dias de cultivo *P. edulis* na embriogênese somática).

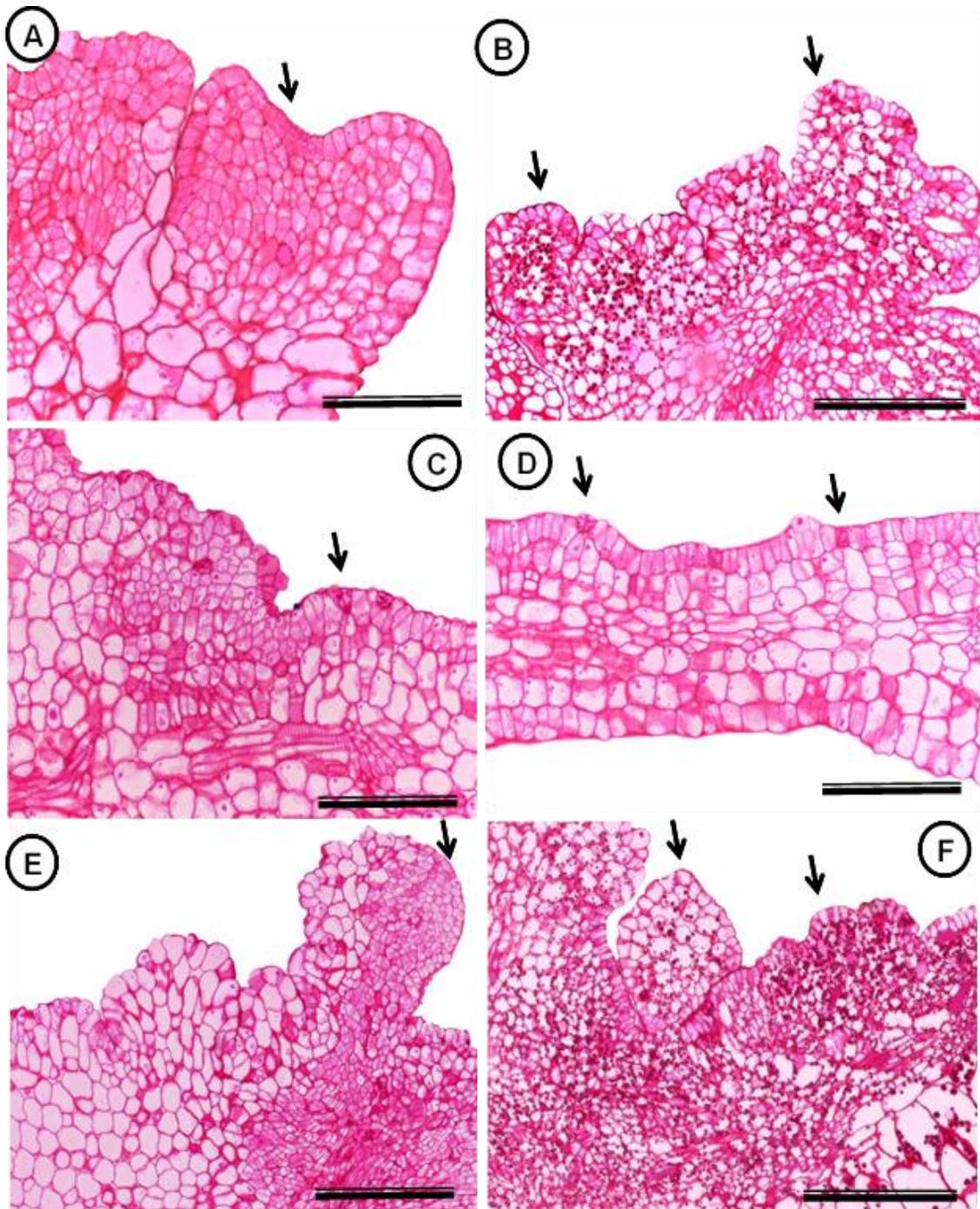


Figura 5: Análise histoquímica utilizando o corante Ácido periódico de Schiff (PAS) para observação de polissacarídeos neutros durante o processo de indução da embriogênese somática em *P. cristalina* a partir de embriões zigóticos maduros (A), embrião cordiforme, (B) embriões globulares e protuberâncias, (C) divisão periclinal, (D) evidenciando baixa concentração de polissacarídeos (E) embrião torpedo, (F) embrião globular e protuberâncias, cultivados em meio MS acrescido de: (A) e (B) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias e 60 dias de cultivo respectivamente, (C) e (D) com 22.62 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias de cultivo, (D) e (E) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Barras: (A), (C), (D), (F)

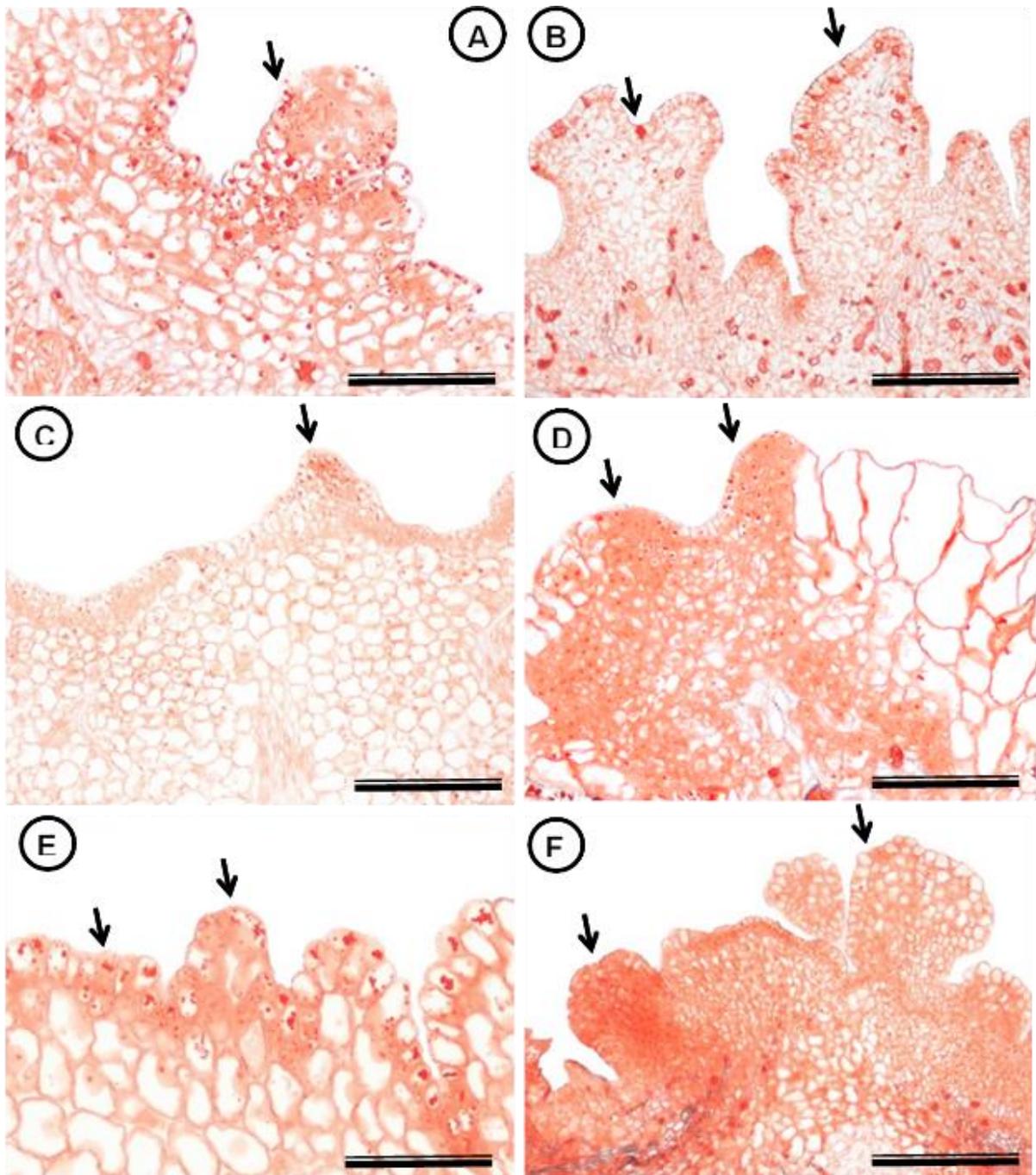


Figura 6: Análise histoquímica utilizando o corante Xilidine Ponceau (XP) para observação de proteínas totais durante indução e meio de maturação da embriogênese somática em *P. cristalina* a partir de embriões zigóticos maduros (A), (C), (D), (E), (F) protuberâncias, (B) embriões somáticos em estágio cotiledonar e torpedo, cultivados em meio MS acrescido de: (A) e (B) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias e 60 dias de cultivo respectivamente, (C) e (D) com 22.62 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias de cultivo, (D) e (E) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Barras: Barras: (A), (E), 100 μm (B), (C) (D) e (F) 90 μm .

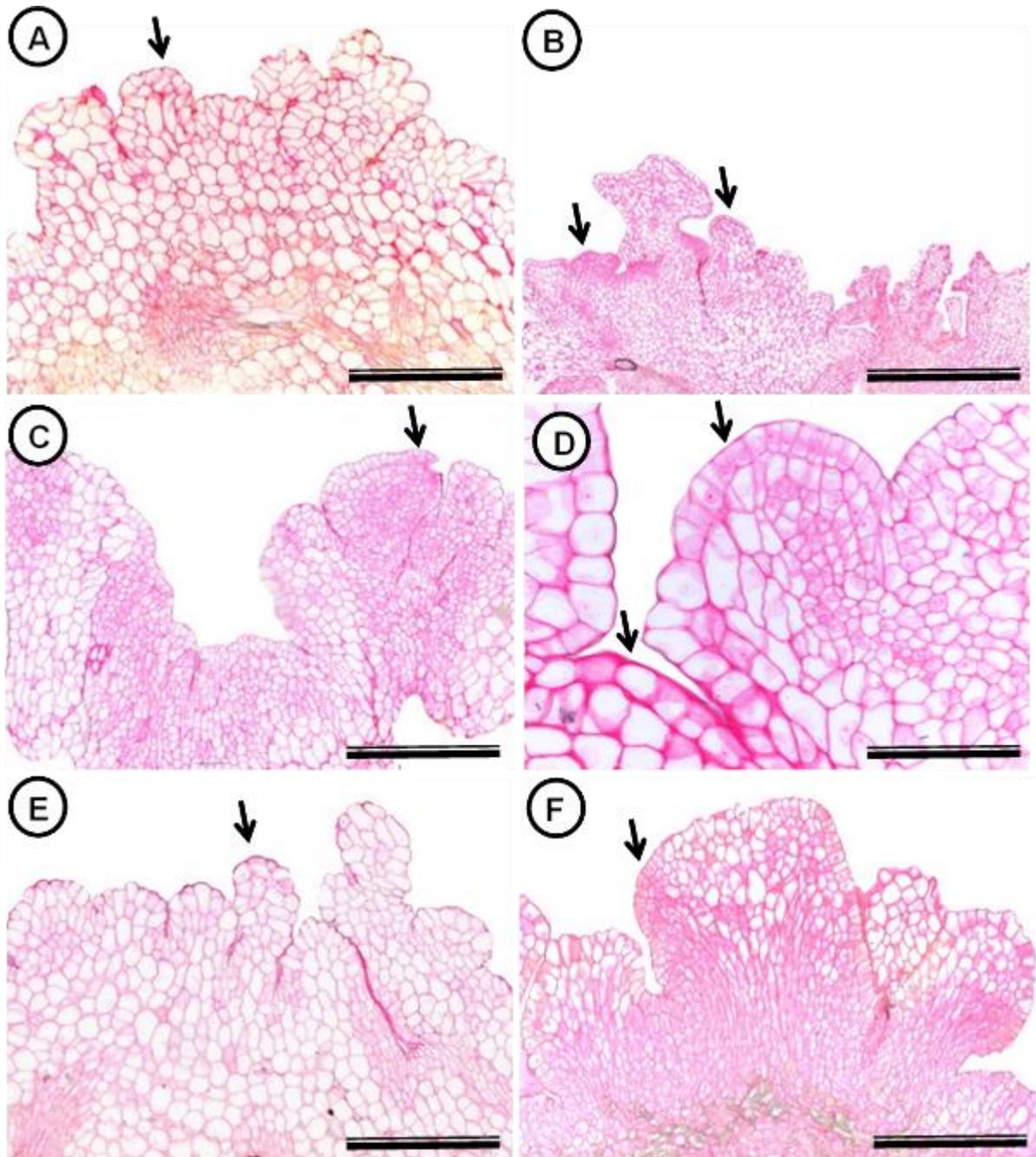


Figura 7: Análise histoquímica utilizando o corante Vermelho de Rutênio para observação de pectinas durante o processo de indução da embriogênese somática em *Passiflora cristalina* a partir de embriões zigóticos maduros (A), (C), (D), (E), (F) evidenciando protuberâncias, (B) embriões somático torpedo e protuberâncias cultivados em meio MS acrescido de: (A) e (B) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias e 60 dias de cultivo respectivamente, (C) e (D) com 22.62 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias de cultivo, (D) e (E) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 e 60 dias de cultivo *in vitro*. (A) e (E) 100 μm (B) e (C) 50 μm (F) e (D) 150 μm .

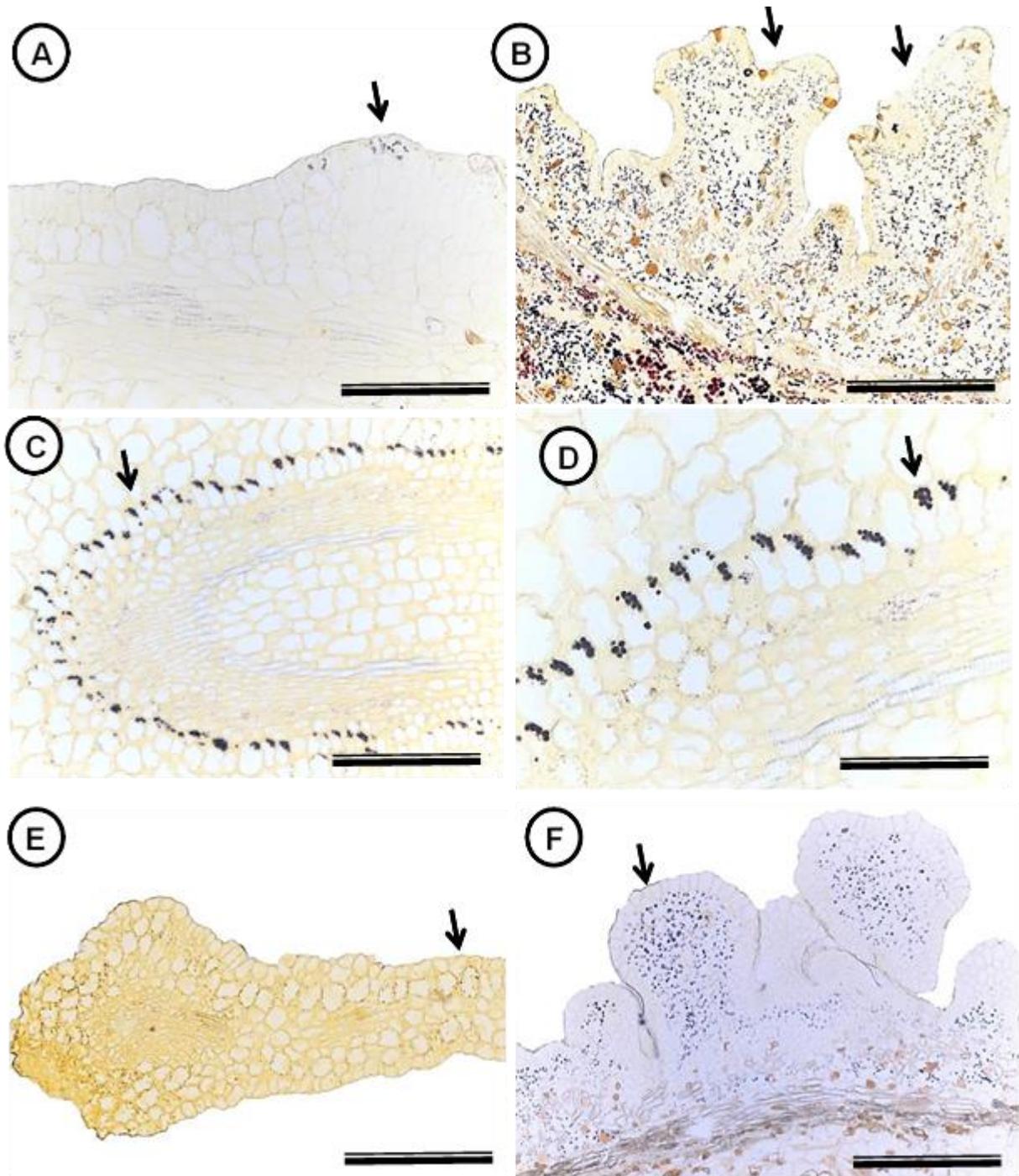


Figura 8: Análise histoquímica utilizando o corante Lugol para observação de grãos de amido durante o processo de indução da embriogênese somática em *Passiflora cristalina* a partir de embriões zigóticos maduros (A) e (D) evidenciando poucos grânulos de amido (B) embriões somáticos torpeda e cotiledonares (C) e (D) grânulos de amido próximo a região cortical do embrião zigótico (F) protuberâncias e embrião globular cultivados em meio MS acrescido de: (A) e (B) 18.09 μ M 2,4-D + 4.43 μ M de BA em 20 dias e 60 dias de cultivo respectivamente,

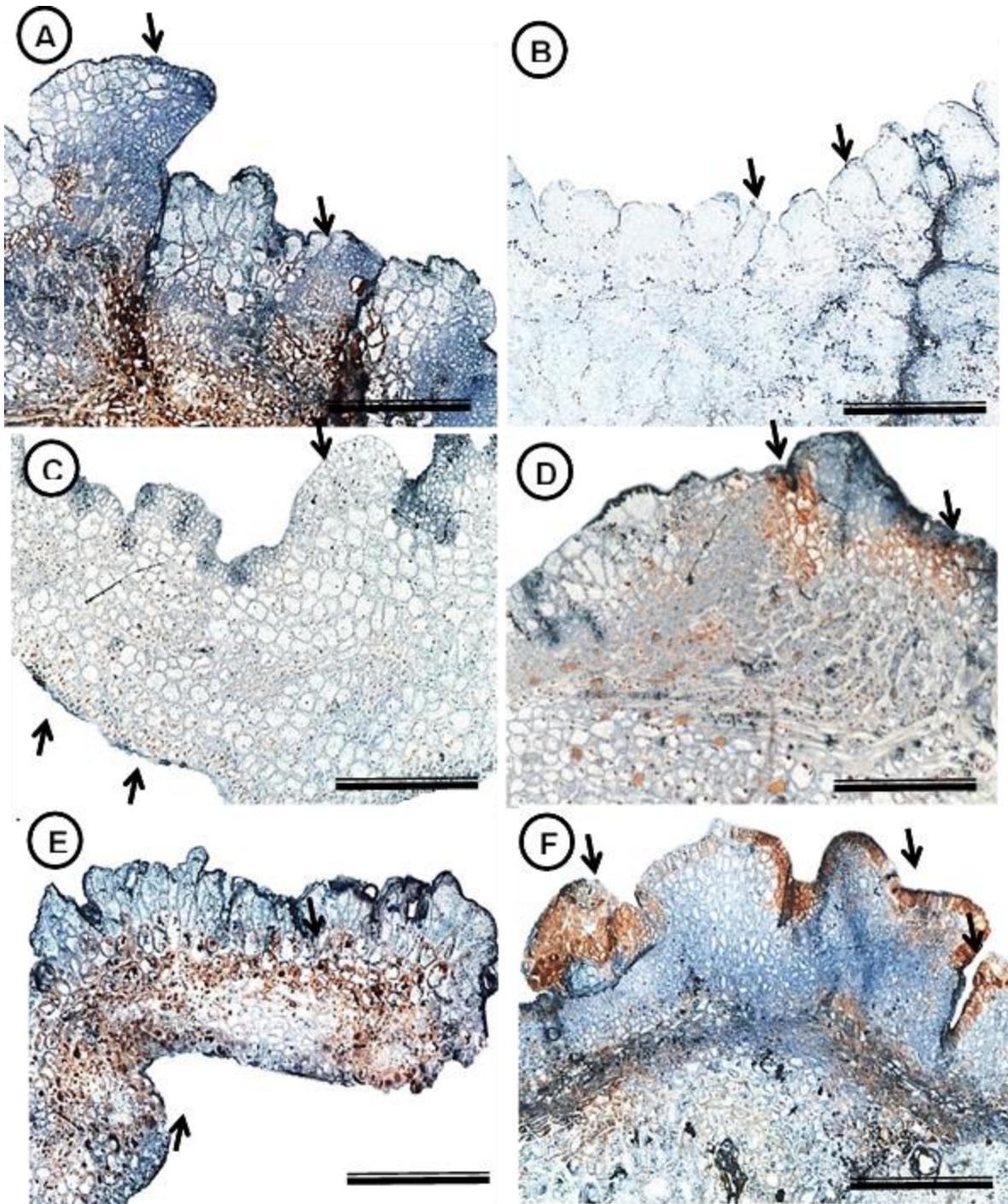


Figura 9: Análise histoquímica utilizando o corante Sudan Black B para observação de lipídeos totais durante o processo de indução da embriogênese somática em *Passiflora cristalina* a partir de embriões zigóticos maduros (A), (B) e (F) embriões somáticos (C), (E) e (D) mobilização de lipídeos para protuberâncias cultivados em meio MS acrescido de: (A) e (B) 18.09 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias e 60 dias de cultivo respectivamente, (C) e (D) com 22.62 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 dias de cultivo, (D) e (E) 27.14 μM 2,4-D + 4.43 μM de BA em 20 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Barras(A), (D), (F) 150 μm (B), (C), (E) 50 μm .

4. CONCLUSÕES

O protocolo de embriogênese somática foi estabelecido com sucesso utilizando-se embriões zigóticos de *P. cristalina*.

O 2,4-D nas diferentes concentrações testadas combinado com BA induz a proliferação de células potencialmente embriogênicas.

A embriogênese somática em *P. cristalina* ocorre de forma indireta.

Respostas organogênicas na regeneração *de novo* com a produção de brotos e raízes foram observadas durante a fase indução e a transferência para meio de maturação na ausência de reguladores de crescimento durante o cultivo dos embriões zigóticos.

Sugere-se estudos avaliativos em embriões somáticos apresentando anormalidades inclusive caracterização quanto ao nível de ploidia.

Pela caracterização anatômica e histoquímica foi possível identificar a produção de grânulos de amido bem como a mobilização de polissacarídeos neutros, proteínas totais, pectinas, amidos, e lipídeos que foram fundamentais durante a indução e conversão de embriões somáticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**. 94: 1-23. 2004.
- 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.
- FERREIRA, D. A. T.; SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Embryogenic potential of immature zygotic embryos of Passiflora: a new advance for in vitro propagation without plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 122: 629-638, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35: 1039-1042, 2011.
- GERÔNIMO, I. G. C. **Caracterização de espécies silvestres de passiflora via análise meiótica e conteúdo 2c DNA**. Campos dos Goytacazes: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF, 54 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.
- KOZAI, T., OKI, H., & FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of Cymbidium plantlet in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22: 205-211. 1990.
- KNOX, J. P.; LINSTED, P. J.; KING, J.; COOPER, C.; ROBERTS, K. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. **Planta**. 181: 512-521, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**. 15: 473–497, 1962.
- NARDIN, C. F.; BERNACCI, L. C.; PLOTZE, R. O.; BRUNO, O. M.; SHEPHERD, G. J. Recognition and differentiation of species in the *Passiflora sidifolia* complex. **Botany**. 93: 809-824, 2015.

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 Pty Ltd, Melbourne, 1981. 352 pp

PINTO, D. L. P.; ALMEIDA B. B.; 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.

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.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**, 3rd edn. Churchill-Livingstone, London, 1972.

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

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

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

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

- SHARP, W. R.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**. 2: 268-310, 1980.
- SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, R. L. M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Reports**. 17: 230-235. 1998.
- SILVA, G. M.; CRUZ, A. C.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 1-7, 2015.
- SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99: 47-54. 2009.
- SILVEIRA, G. F. **Diversidade genética e aspectos reprodutivos de Passiflora cristalina Vanderp. & Zappi, uma espécie nativa da Amazônia Matogrossense**. Alta Floresta: Universidade do Estado De Mato Grosso – UNEMAT, 81 p. (Dissertação de mestrado – Genética e melhoramento).
- SILVA, T. C. R.; CARVALHO, C. R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 50: 158-165, 2014.
- VANDERPLANK, J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**. 66: 149-153, 2011.
- VIDAL, B. C. **Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R**. *Ann Histochem*. 15: 289–296, 1970.
- XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**. 108: 1-33, 2014.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, 5: 1411, 1993.